

**SILVANA RUELLA DE OLIVEIRA**

**Avaliação da espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e de alta resolução no desenvolvimento de métodos analíticos para diagnóstico foliar de cana-de-açúcar e laranjeira**

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química

**Orientador: Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto**

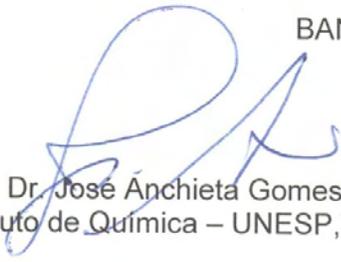
**Araraquara  
2010**

SILVANA RUELLA DE OLIVEIRA

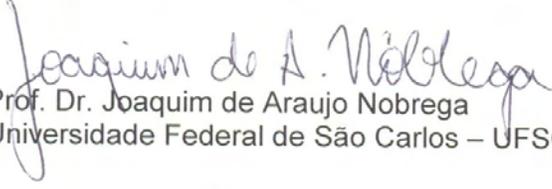
Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Araraquara, 23 de setembro de 2010.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto (Orientador)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Joaquim de Araujo Nobrega  
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos



Drª Ana Rita de Araujo Nogueira  
Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste – EMBRAPA, São Carlos



Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda  
Instituto de Química – UNICAMP, Campinas



Profª Drª Cassiana Seimi Nomura  
Instituto de Química - USP, São Paulo

## **DADOS CURRICULARES**

### **1 Dados pessoais**

1.1 Nascimento: 17 de novembro de 1983

1.2 Nacionalidade: Brasileira

1.3 Naturalidade: Assis Chateaubriand - PR

1.4 Filiação: Ledugero Ruella de Oliveira

Maria Aparecida de Oliveira

1.6 Profissão: Químico

### **2 Formação Acadêmica**

2.1 Graduação em Química - Licenciatura

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE – Toledo, PR

Período: 02/2001 – 12/2004

2.2 Mestrado em Química

Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista – UNESP– Araraquara, SP

Período: 03/2005 – 01/2007

Título: Avaliação da padronização interna na determinação de chumbo em vinagre por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite

Orientador: Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto

2.3 Doutorado em Química

Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista – UNESP– Araraquara, SP

Período: 03/2007 – em andamento

Orientador: Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto

2.4 Estágio Sanduíche de doutorado

Department of Chemistry – Wake Forest University – Winston Salem, NC, USA

Período: 10/2009 – 03/2010 (6 meses).

Título: Avaliação da espectrometria de absorção/emissão/fluorescência atômica em filamento de tungstênio no desenvolvimento de métodos analíticos para diagnóstico foliar

Orientador: Dr. Bradley Todd Jones

### 3 Produção Científica

#### 3.1 Artigos Científicos submetidos, aceitos e publicados

1. FERREIRA, R.B.; **OLIVEIRA, S. R.**; FRANZINI, V. P.; Virgilio, A.; Gomes Neto, J. A. Evaluation of Alternate Lines of Phosphorus and Potassium for Fertilizer Analysis by High-Resolution Continuum Source Flame Atomic Absorption Spectrometry. **Atomic Spectroscopy** (submetido).
2. RAPOSO Jr., J. L.; **OLIVEIRA, S. R.**; NÓBREGA, J. A.; JONES, B. T.; GOMES NETO, J. A. Determination of Silicon in Lubricant Oil by High-Resolution Continuum Source Flame Atomic Absorption Spectrometry Using Least-Square Background Correction and Internal Standardization. **Analytical Letters** (aceito).
3. NEVES, D. R.; **OLIVEIRA, S. R.**; do Rêgo, J. F.; FLUMIGNAN, D. L.; OLIVEIRA, J. E.; GOMES NETO, J. A. Evaluation of Ir and Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>/Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> as Modifiers for the Simultaneous Determination of Mn, Ni, Pb, and Sb in Fuel Ethanol by Graphite Furnace AAS. **Atomic Spectroscopy**, v. 31, n. 4, p. 141-145, 2010.
4. RAPOSO Jr, J. L.; **OLIVEIRA, S. R.**; NOBREGA, J. A.; GOMES NETO, J. A. Mathematical Equation Correction to Spectral and transport Interferences in High-Resolution Continuum Source Flame Atomic Absorption Spectrometry: determination of lead in Phosphoric Acid. **Eclética Química**, v. 35, n. 1, p. 19-24, 2010.
5. **OLIVEIRA, S. R.**; GOMES NETO, J. A.; NÓBREGA, J. A.; JONES, B. T. Determination of macro- and micronutrients in plant leaves by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry combining instrumental and sample preparation strategies. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 65, p. 316-320, 2010.
6. CALDAS, N. M.; **OLIVEIRA, S. R.**; GOMES NETO, J. A. Feasibility of internal standardization in the direct and simultaneous determination of As, Cu and Pb in sugar-cane spirits by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 636, p. 1-5, 2009.
7. AMBROZINI, B.; AMORIM FILHO, V. R.; **OLIVEIRA, S. R.**; SACRAMENTO, L. V. S.; GOMES NETO, J. A. Evaluation of modifiers for determination of V in parsley by GF AAS. **Food Chemistry**, v.116, p. 1024-1028, 2009.
8. CALDAS, N. M.; RAPOSO Jr, J. L.; **OLIVEIRA, S. R.**; GOMES NETO, J. A.; BARBOSA Jr., F. Direct and Simultaneous Determination of Cd, Cu, and Se in Blood Samples by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. **Atomic Spectroscopy**, v. 30, p. 115-119, 2009.
9. **OLIVEIRA, S. R.**; RAPOSO Jr, J. L.; GOMES NETO, J. A. Fast sequential multi-element determination of Ca, Mg, K, Cu, Fe, Mn and Zn for foliar diagnosis using high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry: Feasibility of secondary lines, side pixel registration and least-squares background correction. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 64, p. 593-596, 2009.

10. RAPOSO Jr, J. L.; **OLIVEIRA, S. R.**; CALDAS, N. M.; GOMES NETO, J. A. Evaluation of alternate lines of Fe for sequential multi-element determination of Cu, Fe, Mn and Zn in soil extracts by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 627, p. 198-202, 2008.
11. RAPOSO Jr, J. L.; **OLIVEIRA, S. R.**; NÓBREGA, J. A.; GOMESS NETO, J. A. Internal standardization and least-squares background correction in high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry to eliminate interferences on determination of Pb in phosphoric acid. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 63, p. 992-995, 2008.
12. SOUZA, J. L.; MARTIN, N.; **OLIVEIRA, S. R.**; LINDINO, C. A. Preparação de eletrodos de hidroxiapatita por diferentes metodologias de síntese e sua aplicação na determinação de fosfito em fertilizantes líquidos. **Acta Scientiarum Technology (Online)**, v. 30, p. 231-236, 2008.
13. **OLIVEIRA, S. R.**; OLIVEIRA, A. P.; GOMES NETO, J. A. Tungsten permanent chemical modifier with co-injection of Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>+Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> for direct determination of Pb in vinegar by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 105, p. 236-241, 2007.
14. **OLIVEIRA, S. R.**; GOMES NETO, J. A. Evaluation of Bi as internal standard to minimize matrix effects on the direct determination of Pb in vinegar by graphite furnace atomic absorption spectrometry using Ru permanent modifier with co-injection of Pd/Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 62, p. 1046-1050, 2007.
15. FRESCHI, G. P. G.; FRESCHI, C. D.; **OLIVEIRA, S. R.**; GOMES NETO, J. A. Evaluation of Ir-based Modifiers in the Simultaneous determination of As, Bi, Pb, Sb, and Se in Milk by GF AAS. **Atomic Spectroscopy**, v. 27, p. 179-185, 2006.
16. AMORIM FILHO, V. R.; POLITO, W. L.; **OLIVEIRA, S. R.**; FRESCHI, G. P. G.; GOMES NETO, J. A. Simultaneous determination of Cd and Pb in antibiotics used in sugarcane fermentation process by GFAAS. **Eclética Química**, v. 31, p. 7-12, 2006.

### 3.2 Resumos em eventos científicos

3.2.1 Congresso Nacional – 15 trabalhos

3.2.2 Congresso Internacional – 7 trabalhos

### 3.3 Participações em eventos científicos - 23

*À Deus, pela vida e por tudo que ele me deu!!*

*Aos meus pais Ledugero e Maria, meus exemplos de caráter, amor e felicidade...*

*Ao meu noivo Maurício, pelo amor, carinho, companheirismo, paciência, ajuda e amizade...*

*Aos meus irmãos Ailton e Edilson, por todo amor, carinho e contínuo incentivo...*

*Ao meu sobrinho Raphael, por todo amor e carinho...*

*Às minhas cunhadas Elaine e Lais pela amizade, carinho e apoio...*

*Aos meus amigos, família que Deus me deixou escolher...*

*Vocês são meu porto seguro...minha vida!!*

## AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma me ajudaram a conquistar esta vitória, em especial:

Ao professor Dr. José Anchieta Gomes Neto por sempre acreditar na minha capacidade, mesmo quando eu mesma duvidei. Obrigada por ser um orientador amigo, sempre presente, que compartilha seus conhecimentos e idéias e que sempre me impulsionou a evoluir e a crescer, seja com as conquistas ou com as dificuldades. Muito obrigada!!

À professora Dra. Mercedes de Moraes, pela amizade e preciosos ensinamentos.

Ao professor Dr. Joaquim A. Nóbrega, pela ajuda com o trabalho, companheirismo e ensinamentos.

Ao professor Dr. Bradley T. Jones, por confiar no meu trabalho, por todo apoio, por compartilhar seus conhecimentos e possibilitar minha experiência em seu laboratório nos Estados Unidos. Thank you Brad!!

Aos meus amigos do grupo de Espectroanalítica e Automação (GEA): Denise, Jorge, Alex, Jardes e Camila pela amizade, auxílio e discussões sobre o trabalho.

Aos meus amigos que passaram pelo GEA: Drika, Marielsa, Patrícia, Beatriz, Carol, Gian, Vanessa, Volnei, Naíse, Fabiana, Simone, Rafael, Renata e Roberta pela amizade, conselhos, auxílio e incentivo. Obrigada!!

Aos meus amigos da Wake Forest University: Bruna, George, Carl, Summer, Robbie e Jiyan, pela amizade, conversas e apoio.

Aos professores do Departamento de Química Analítica, pelos ensinamentos e amizade. Aos funcionários do IQ pelo atendimento sempre atencioso e amigo.

Aos meus pais Ledugero e Maria, pelo dom da vida, pelo imenso amor e carinho e por serem meus maiores exemplos de caráter, humildade, respeito, força e alegria!! Obrigada por sempre acreditarem em mim, por respeitarem minhas escolhas e por estarem ao meu lado em todos os momentos: amo vocês!!

Ao meu noivo Maurício, meu melhor amigo e confidente, por ser tão especial na minha vida e por cada momento juntos!! Obrigada pelo amor, respeito, carinho, companheirismo, ajuda, incentivo, pelos "mimos", por sempre acreditar no meu potencial e vibrar com minhas conquistas: você é o amor da minha vida!!

Aos meus irmãos Edilson e Ailton, minhas cunhadas Elaine e Lais, e ao meu sobrinho Raphael, pela imensa felicidade de ter uma família tão linda, unida e especial. Obrigada por todo amor, carinho, apoio e amizade!!

Aos meus sogrinhos queridos, José e Lucila Caiut, por me amarem como sua "filhotinha" e por me darem tanto carinho: à vocês todo o meu amor e admiração!!

Aos meus amigos de Winston Salem-NC, pela amizade e por me acolherem como uma família, foi maravilhoso conhecer e conviver com vocês!! À vocês meu eterno carinho!!

Aos meus padrinhos Luiz e Vera, por todo apoio, amizade e carinho!!

As minhas eternas amigas, Jô, Néia e Dri, pela amizade, carinho, confiança, incentivo, risadas, momentos de conversa, descontração e por serem tão especiais. Vocês são minhas irmãs: amo vocês!!

Aos meus queridos amigos, Paty Dametto, Rafa (Piá), Jú Tomé, Michele, Jú Gubiani, Vanessa Pezza, Ivonete, Ademir, Dani e Márcio Belvedere (desculpa se me esqueço de alguém) pela amizade, carinho e incentivo. Com certeza, sem vocês tudo seria muito mais difícil e triste: Adoro vocês!!

Ao Instituto de Química - UNESP por todo suporte.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela bolsa durante todo o doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela bolsa de estágio de doutorado no exterior.

*Viva!*

*“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar*

*a vida com paixão, perder*

*com classe e vencer com ousadia,*

*pois o triunfo pertence a quem se atreve...*

*A vida é muito para ser*

*insignificante”*

*Charles Chaplin*

## RESUMO

A diagnose foliar é uma ferramenta para avaliar o estado nutricional das plantas, corrigir deficiências ou excessos de nutrientes, otimizar a produção e avaliar os requerimentos de fertilizantes. Desenvolver novas metodologias analíticas para determinações multielementares de macro (Ca, K, Mg, P e S) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn) em folhas de cana-de-açúcar e de laranjeira por espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e de alta resolução (HR-CS FAAS) foi o objetivo deste trabalho. A determinação multielementar de Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K em folhas de cana-de-açúcar por HR-CS FAAS foi feita após digestão das folhas em forno de micro-ondas. Usando linhas atômicas principais para Cu (324,754 nm), Fe (248,327 nm), Mn (279,482 nm) e Zn (213,857 nm), linhas secundárias para Ca (239,856 nm) e K (404,414 nm) e linha adjacente (202,588 nm) a linha secundária (202,582 nm) para Mg, curvas analíticas nos intervalos 0,1–0,5 mg L<sup>-1</sup> Cu, 0,5–4,0 mg L<sup>-1</sup> Fe, 0,5–4,0 mg L<sup>-1</sup> Mn, 0,2–1,0 mg L<sup>-1</sup> Zn, 10,0–100,0 mg L<sup>-1</sup> Ca, 5,0–40,0 mg L<sup>-1</sup> Mg e 50,0–250,0 mg L<sup>-1</sup> K foram obtidas. A interferência espectral causada pela molécula de NO na linha principal do Zn (213,857 nm) foi removida com correção pelo algoritmo dos mínimos quadrados (LSBC). Exatidão e precisão foram avaliadas pela análise de 5 materiais de referência certificados e os resultados foram concordantes ao nível de 95% de confiança. Folhas de cana-de-açúcar foram analisadas e os resultados foram próximos dos obtidos por LS FAAS. As recuperações variaram de 84-114% para todos os analitos. Os limites de detecção foram 0,6 mg L<sup>-1</sup> Ca, 0,4 mg L<sup>-1</sup> Mg, 0,4 mg L<sup>-1</sup> K, 7,7 µg L<sup>-1</sup> Cu, 7,7 µg L<sup>-1</sup> Fe, 1,5 µg L<sup>-1</sup> Mn e 5,9 µg L<sup>-1</sup> Zn. Um preparo de amostras alternativo foi proposto para determinar B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, P, S e Zn por HR-CS FAAS. As folhas de cana-de-açúcar e de laranjeira foram incineradas e solubilizadas em ácido clorídrico. Este solubilizado foi dividido em três: um para determinar B, P e S; outro para determinar Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K (após diluição) e o outro para determinar Mo (após pré-concentração e extração com MIBK). As ferramentas da HR-CS FAAS utilizadas foram: linhas secundárias e adjacentes, absorbância integrada sobre o comprimento de onda e bandas de absorção molecular. A exatidão e precisão foram avaliadas pela análise de 3 materiais de referência certificados e os resultados foram concordantes ao nível de 95% de confiança. Os limites de detecção foram 1,9 mg L<sup>-1</sup> Ca, 0,6 mg L<sup>-1</sup> Mg, 1,5 mg L<sup>-1</sup> K, 7,3 µg L<sup>-1</sup> Cu, 20,4 µg L<sup>-1</sup> Fe, 4,2 µg L<sup>-1</sup> Mn, 8,2 µg L<sup>-1</sup> Zn, 0,2 mg L<sup>-1</sup> B, 15,7 µg L<sup>-1</sup> Mo, 29,2 mg L<sup>-1</sup> P e 22,4 mg L<sup>-1</sup> S. As recuperações variaram de 82-112% e os desvios padrão relativos ( $n=12$ ) foram menores ou iguais a 5,7% para todos os analitos. O estado nutricional das culturas de cana-de-açúcar e de laranja foi avaliado pelo Sistema Integrado de Diagnose e Recomendação (DRIS).

Palavras-chave: diagnose foliar, macronutrientes, micronutrientes, HR-CS FAAS

## ABSTRACT

Foliar diagnosis is a tool for evaluating nutritional state of plants, correcting nutrient deficiencies or excesses, optimizing crop production and evaluating fertilizer requirements. The goal of this work was to develop new methodologies for multielement determination of macro (Ca, K, Mg, P and S) and micronutrients (B, Cu, Fe, Mn, Mo, and Zn) in sugarcane and orange leaves by high resolution continuum source atomic absorption spectrometry (HR-CS FAAS). The multielement determination of Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg and K in sugarcane leaves by HR-CS FAAS was carried out after microwave-assisted sample digestion. Using main lines for Cu (324.754 nm), Fe (248.327 nm), Mn (279.482 nm) and Zn (213.857 nm), secondary lines for Ca (239.856 nm) and K (404.414 nm), and side line (202.588 nm) at wing of secondary line (202.582 nm) for Mg, analytical curves in the 0.1–0.5 mg L<sup>-1</sup> Cu, 0.5–4.0 mg L<sup>-1</sup> Fe, 0.5–4.0 mg L<sup>-1</sup> Mn, 0.2–1.0 mg L<sup>-1</sup> Zn, 10.0–100.0 mg L<sup>-1</sup> Ca, 5.0–40.0 mg L<sup>-1</sup> Mg e 50.0–250.0 mg L<sup>-1</sup> K intervals were obtained. Spectral interference caused by NO molecule on the main line for Zn (213.857 nm) was removed with least squares background correction (LSBC). Accuracy and precision were evaluated by analysis of 5 certified reference materials and the results were in agreement at 95% confidence level. Sugarcane leaves were analyzed and the results were close to those obtained by LS FAAS. Recoveries varied from 84 to 114% for all analytes. The limits of detection were 0.6 mg L<sup>-1</sup> Ca, 0.4 mg L<sup>-1</sup> Mg, 0.4 mg L<sup>-1</sup> K, 7.7 µg L<sup>-1</sup> Cu, 7.7 µg L<sup>-1</sup> Fe, 1.5 µg L<sup>-1</sup> Mn and 5.9 µg L<sup>-1</sup> Zn. An alternative sample preparation was proposed for determining B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, P, S and Zn by HR-CS FAAS. Sugarcane and orange leaves were submitted to dry ashing and solubilized in hydrochloric acid. This digest was divided in 3: one for B, P and S determination; other for Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg and K (after dilution) and another one for Mo determination (after pre-concentration and extraction with MIBK). The tools of HR-CS FAAS used were: secondary and alternative side lines, integrated wavelength absorbance and molecular absorption bands. Accuracy and precision were evaluated by analyzing 3 certified reference materials and the results were in agreement at 95% confidence level. The limits of detection were 1.9 mg L<sup>-1</sup> Ca, 0.6 mg L<sup>-1</sup> Mg, 1.5 mg L<sup>-1</sup> K, 7.3 µg L<sup>-1</sup> Cu, 20.4 µg L<sup>-1</sup> Fe, 4.2 µg L<sup>-1</sup> Mn, 8.2 µg L<sup>-1</sup> Zn, 0.2 mg L<sup>-1</sup> B, 15.7 µg L<sup>-1</sup> Mo, 29.2 mg L<sup>-1</sup> P and 22.4 mg L<sup>-1</sup> S. Recoveries varied from 82 to 112% and the relative standard deviations ( $n=12$ ) were lower or equal to 5.7% for all analytes. The nutritional state of sugarcane and orange cultures was evaluated by diagnosis recommendation integrated system (DRIS).

Keywords: foliar diagnosis, macronutrients, micronutrients, HR-CS FAAS.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Instrumento utilizado por Lockyer para medidas de absorção atômica: (A) atomizador, (B) tubo de ferro, dentro de um forno alimentado por carvão, (C) um dispositivo Kipp utilizado para gerar hidrogênio, (D) lâmpada elétrica de fonte contínua e (E) espectroscópio com prisma ou um espectrógrafo com um dispositivo fotográfico 27
- Figura 2** - Representação esquemática do espectrômetro desenvolvido por Harnly 31
- Figura 3** - Número de publicações por ano em absorção atômica com fonte contínua a partir de 1907 33
- Figura 4** - Configuração de um espectrômetro de absorção com fonte contínua e de alta resolução (HR-CS AAS): (1) lâmpada de arco curto de Xe; (2) espelhos elipsoidais focalizadores; (3) atomizador (chama ou forno de grafite); (4) fenda de entrada; (5) espelhos parabolóides; (6) prisma; (7) fenda intermediária ajustável; (8) rede echelle e (9) detector CCD 34
- Figura 5** - Comparação entre os perfis de emissão de uma lâmpada de fonte contínua e uma lâmpada de cátodo oco. (A) Absorção com uma lâmpada de cátodo oco. (B) Absorção com uma fonte contínua e um monocromador de média resolução. (C) Absorção com uma lâmpada de fonte contínua e um monocromador de alta resolução. (D) Absorção com uma fonte contínua, um monocromador de alta resolução e com modulação do comprimento de onda emitido pela fonte 37
- Figura 6** - Lâmpada de arco curto de Xenônio operando no modo “hot spot” (esquerda) e no modo difuso (direita) 39
- Figura 7** - Lâmpada de arco curto de xenônio utilizada em HR-CS AAS. (A) Invólucro de vidro; (B) eletrodos; (C) contatos elétricos metálicos 40
- Figura 8** - Registro do sinal analítico com o pixel central (M), com a área de pico ( $M_x$ ) e com pixels adjacentes ( $N_x$ ) 43
- Figura 9** - Perfil atômico típico para (a) prata em 328,068 nm e para o (b) índio em 303,936 nm. Solução contendo 1 mg L<sup>-1</sup> Ag e In 44
- Figura 10** - Espectro tridimensional (absorbância em função de tempo e comprimento de onda) para amostra de urina na vizinhança da linha analítica do Cd em 228,802 nm (a) sem correção; e (b) após correção usando LSBC 48
- Figura 11** - Foto da coleta de folhas de laranjeira: 3<sup>a</sup> ou 4<sup>a</sup> do ramo com fruto 66

<b>Figura 12</b> - Estratégia de preparo de amostra de folhas de cana-de-açúcar e de laranja para a determinação dos macro e micronutrientes	77
<b>Figura 13</b> - Curvas analíticas para Cu em 1% (v/v) HNO <sub>3</sub> , nos comprimentos de onda 324,754 nm (P) e 327,396 nm (S) e $\Sigma$ linhas (P + S) com absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 1 até 9 pixels	83
<b>Figura 14</b> - Curvas analíticas para Fe em 1% (v/v) HNO <sub>3</sub> , nos comprimentos de onda 248,327 nm (P) e 248,814 nm (S) e $\Sigma$ linhas (P + S) com absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 1 até 9 pixels	85
<b>Figura 15</b> - Curvas analíticas para Mn em 1% (v/v) HNO <sub>3</sub> , nos comprimentos de onda 279,482 nm (P) e 279,827 nm (S) e $\Sigma$ linhas (P + S) com absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 1 até 9 pixels	87
<b>Figura 16</b> - Curvas analíticas para Zn em 1% (v/v) HNO <sub>3</sub> , no comprimento de onda 213,857 nm (P) com absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 1 até 9 pixels	89
<b>Figura 17</b> - Correção de fundo com mínimos quadrados para Zn em 213,857 nm: <b>(a)</b> branco do digerido da amostra usado como referência, <b>(b)</b> digerido da amostra – interferência da banda molecular do NO e <b>(c)</b> espectro do Zn após correção pelos mínimos quadrados	96
<b>Figura 18</b> - Influência da concentração de La na absorvância de <b>(a)</b> Ca e <b>(b)</b> Mg em uma amostra de folhas de cana-de-açúcar digerida pelo procedimento 2	97
<b>Figura 19</b> - Curvas analíticas para <b>(a)</b> Ca 422,673 nm; <b>(b)</b> Mg 285,213 nm e <b>(c)</b> K 766,491 nm em 1% (v/v) HNO <sub>3</sub> e 1% (m/v) La com absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 1 e 3 pixels	99
<b>Figura 20</b> - Curva de calibração nas linhas secundárias para <b>(a)</b> Ca em 239,856 nm e para <b>(b)</b> K em 404,414 nm com absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 3 pixels	104
<b>Figura 21</b> - Curva de calibração para Mg na linha secundária 202,582 nm: <b>(a)</b> 3 pixels e <b>(b)</b> 1 pixel	105
<b>Figura 22</b> - Espectro de absorvância <i>versus</i> comprimento de onda para Mg na linha secundária 202,582 nm	106
<b>Figura 23</b> - Espectro de absorvância <i>versus</i> comprimento de onda para Mg nos comprimentos de onda alternativos: <b>(a)</b> 202,576 nm; <b>(b)</b> 202,577 nm; <b>(c)</b> 202,578 nm; <b>(d)</b> 202,580 nm; <b>(e)</b> 202,585 nm; <b>(f)</b> 202,586 nm; <b>(g)</b> 202,587 nm; <b>(h)</b> 202,588 nm	107
<b>Figura 24</b> - Curva de calibração para Mg em 202,576 nm	109
<b>Figura 25</b> - Curva de calibração para Mg em 202,577 nm	109
<b>Figura 26</b> - Curva de calibração para Mg em 202,588 nm	110

<b>Figura 27</b> - Espectro de absorvância <i>versus</i> comprimento de onda <b>(a)</b> e espectro tridimensional <b>(b)</b> para Ca na linha secundária 239,856 nm em amostra de folhas de cana-de-açúcar	117
<b>Figura 28</b> - Espectro de absorvância <i>versus</i> comprimento de onda <b>(a)</b> e espectro tridimensional <b>(b)</b> para K na linha secundária 404,414 nm em amostra de folhas de cana-de-açúcar	118
<b>Figura 29</b> - Espectro de absorvância <i>versus</i> comprimento de onda <b>(a)</b> e espectro tridimensional <b>(b)</b> para Mg na linha alternativa (“asa”) 202,588 nm em amostra de folhas de cana-de-açúcar	118
<b>Figura 30</b> - Espectro de absorvância <i>versus</i> comprimento de onda <b>(a)</b> e espectro tridimensional <b>(b)</b> para Cu na linha principal 324,750 nm em amostra de folhas de cana-de-açúcar	119
<b>Figura 31</b> - Espectro de absorvância <i>versus</i> comprimento de onda <b>(a)</b> e espectro tridimensional <b>(b)</b> para Fe na linha principal 248,327 nm em amostra de folhas de cana-de-açúcar	119
<b>Figura 32</b> - Espectro de absorvância <i>versus</i> comprimento de onda <b>(a)</b> e espectro tridimensional <b>(b)</b> para Mn na linha principal 279,482 nm em amostra de folhas de cana-de-açúcar	120
<b>Figura 33</b> - Espectro de absorvância <i>versus</i> comprimento de onda <b>(a)</b> e espectro tridimensional <b>(b)</b> para Zn na linha principal 213,857 nm em amostra de folhas de cana-de-açúcar (após aplicar LSBC)	120
<b>Figura 34</b> - Curvas de calibração para S nos comprimentos de onda <b>(a)</b> 257,958 nm e <b>(b)</b> 258,055 nm correspondentes a molécula diatômica CS com absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 1 até 9 pixels	123
<b>Figura 35</b> - Curva de calibração para o P na linha atômica 213,618 nm com absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 1 até 9 pixels	124
<b>Figura 36</b> - Curva de calibração para o B na linha atômica 249,773 nm	126
<b>Figura 37</b> - Curva de calibração para o Mo na linha atômica 313,249 nm	127
<b>Figura 38</b> - Curva de calibração para o P na linha atômica 213,618 nm	127
<b>Figura 39</b> - Curva de calibração para o S (via CS) em 258,055 nm	128
<b>Figura 40</b> - Curva de calibração para Mo em MIBK na linha atômica principal 313,249 nm	132
<b>Figura 41</b> - Espectro de absorvância <i>versus</i> comprimento de onda <b>(a)</b> e espectro tridimensional <b>(b)</b> para Cu na linha principal 324,754 nm em amostra de folhas de laranja	135
<b>Figura 42</b> - Espectro de absorvância <i>versus</i> comprimento de onda <b>(a)</b> e espectro tridimensional <b>(b)</b> para Fe na linha principal 248,327 nm em amostra de folhas de laranja	135

- Figura 43** - Espectro de absorvância *versus* comprimento de onda **(a)** e espectro tridimensional **(b)** para Mn na linha principal 279,482 nm em amostra de folhas de laranjeira 136
- Figura 44** - Espectro de absorvância *versus* comprimento de onda **(a)** e espectro tridimensional **(b)** para Zn na linha principal 213,857 nm em amostra de folhas de laranjeira 136
- Figura 45** - Espectro de absorvância *versus* comprimento de onda **(a)** e espectro tridimensional **(b)** para B na linha principal 249,773 nm em amostra de folhas de laranjeira 137
- Figura 46** - Espectro de absorvância *versus* comprimento de onda **(a)** e espectro tridimensional **(b)** para Mo na linha principal 313,259 nm em amostra de folhas de laranjeira 137
- Figura 47** - Espectro de absorvância *versus* comprimento de onda **(a)** e espectro tridimensional **(b)** para Ca na linha secundária 239,856 nm em amostra de folhas de laranjeira 138
- Figura 48** - Espectro de absorvância *versus* comprimento de onda **(a)** e espectro tridimensional **(b)** para K na linha secundária 404,414 nm em amostra de folhas de laranjeira 138
- Figura 49** - Espectro de absorvância *versus* comprimento de onda **(a)** e espectro tridimensional **(b)** para Mg na linha alternativa 202,588 nm em amostra de folhas de laranjeira 139
- Figura 50** - Espectro de absorvância *versus* comprimento de onda **(a)** e espectro tridimensional **(b)** para P na linha principal 213,618 nm em amostra de folhas de laranjeira 139
- Figura 51** - Espectro de absorvância *versus* comprimento de onda **(a)** e espectro tridimensional **(b)** para S na linha de absorção da molécula diatômica CS em 258,055 nm em 140
- Figura 52** - Diagnóstico Nutricional da cultura de laranja, variedade Valência (talhão 2) obtido pelo sistema DRIS 148
- Figura 53** - Diagnóstico Nutricional da cultura de cana-de-açúcar (cana soca), variedade SP 81-3250 (talhão 4) obtido pelo sistema DRIS 149

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Razão $N^*/N_0$ e a dependência com a temperatura e comprimento de onda	35
<b>Tabela 2</b> - Programa de moagem das amostras de cana-de-açúcar em moinho criogênico	65
<b>Tabela 3</b> - Teores adequados de nutrientes em folhas de cana-de-açúcar e de laranja	67
<b>Tabela 4</b> - Programa otimizado do forno de micro-ondas para a digestão das amostras de folhas de cana-de-açúcar	68
<b>Tabela 5</b> - Programa otimizado do forno de micro-ondas para a complexação de íons fluoreto em digeridos de folhas de cana-de-açúcar	68
<b>Tabela 6</b> - Programa otimizado do forno de micro-ondas para a digestão das amostras de folhas de cana-de-açúcar	69
<b>Tabela 7</b> - Condições otimizadas para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por HR-CS FAAS em folhas de cana-de-açúcar	71
<b>Tabela 8</b> - Condições otimizadas para a determinação de Ca, Mg e K por HR-CS FAAS em folhas de cana-de-açúcar	73
<b>Tabela 9</b> - Condições otimizadas para a determinação de Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K por HR-CS FAAS em folhas de cana-de-açúcar	74
<b>Tabela 10</b> - Condições otimizadas para a determinação de P, S, B e Mo por HR-CS FAAS em folhas de cana-de-açúcar	75
<b>Tabela 11</b> - Inclinação da curva analítica (b), coeficiente de correlação linear (R), concentração característica ( $C_0$ ), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e desvio padrão relativo (RSD) para Cu em 324,754 nm (P) e em 327,396 nm (S) com absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 1 até 9 pixels. $\Sigma$ linhas significa soma das absorvâncias das duas linhas de Cu	84
<b>Tabela 12</b> - Inclinação da curva analítica (b), coeficiente de correlação linear (R), concentração característica $C_0$ , limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e desvio padrão relativo (RSD) para Fe em 248,327 nm (P) e em 248,814 nm (S) com absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 1 até 9 pixels. $\Sigma$ linhas significa soma das absorvâncias das duas linhas de Fe	86
<b>Tabela 13</b> - Inclinação da curva analítica (b), coeficiente de correlação linear (R), concentração característica ( $C_0$ ), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e desvio padrão relativo (RSD) para Mn em 279,482 nm (P) e em 279,827 nm (S) com absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 1 até 9 pixels. $\Sigma$ linhas significa soma das absorvâncias das duas linhas de Mn	88

<b>Tabela 14</b> - Inclinação da curva analítica (b), coeficiente de correlação linear (R), concentração característica ( $C_0$ ), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e desvio padrão relativo (RSD) para Zn em 213,857 nm (P) com absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 1 até 9 pixels	89
<b>Tabela 15</b> - Resultados (em $\text{mg kg}^{-1}$ ) para a determinação ( $n=4$ ) de Cu, Fe, Mn e Zn em amostra de folhas de cana-de-açúcar do talhão n° 4 moídas em moinho criogênico e moinho de facas por HR-CS FAAS empregando os procedimentos n° 1, 2, 4 e 5	91
<b>Tabela 16</b> - Resultados (em $\text{mg kg}^{-1}$ ) para a determinação ( $n=4$ ) de Cu, Fe, Mn e Zn nos materiais certificados Tomato Leaves, Apple Leaves, Spinach Leaves, Peach Leaves e Citrus Leaves por HR-CS FAAS empregando o procedimento n° 2	93
<b>Tabela 17</b> - Inclinação da curva analítica (b), coeficiente de correlação linear (R), concentração característica ( $C_0$ ), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e precisão (RSD) para Cu, Fe, Mn e Zn com absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 3 pixels ( $CP \pm 1$ ) obtidos por HR-CS FAAS	94
<b>Tabela 18</b> - Inclinação da curva analítica (b), coeficiente de correlação linear (R), concentração característica ( $C_0$ ), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e desvio padrão relativo (RSD) para Ca 422,673 nm; (b) Mg 285,213 nm e (c) K 766,491 nm em 1% (v/v) $\text{HNO}_3$ e 1% (v/v) La e absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 1 e 3 pixels	98
<b>Tabela 19</b> - Resultados (em $\text{mg kg}^{-1}$ ) para a determinação ( $n=4$ ) de Ca, Mg e K em amostra de folhas de cana-de-açúcar do talhão n° 4 moídas em moinho criogênico e moinho de facas por HR-CS FAAS empregando os procedimentos n° 1, 2, 4 e 5	100
<b>Tabela 20</b> - Resultados (em $\text{g } 100\text{g}^{-1}$ ) para a determinação ( $n=4$ ) de Ca, Mg e K nos materiais certificados Tomato Leaves, Apple Leaves, Spinach Leaves, Peach Leaves e Citrus Leaves por HR-CS FAAS empregando o procedimento n° 2	101
<b>Tabela 21</b> - Inclinação da curva analítica (b), coeficiente de correlação linear (R), concentração característica ( $C_0$ ), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e precisão (RSD) para Ca, Mg e K com absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 3 pixels ( $CP \pm 1$ ) obtidos por HR-CS FAAS	102
<b>Tabela 22</b> - Características analíticas das linhas secundárias (Ca, Mg, K) e alternativa (Mg) obtidas por HR-CS FAAS com absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 3 pixels ( $CP \pm 1$ )	103
<b>Tabela 23</b> - Características analíticas das linhas principais (Cu, Fe, Mn e Zn), linhas secundárias (Ca e K) e alternativa (Mg) obtidas por HR-CS FAAS com absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 3 pixels ( $CP \pm 1$ )	111

<b>Tabela 24</b> - Resultados (média $\pm$ desvio padrão) para Ca, Mg e K ( $\text{g kg}^{-1}$ ) e para Cu, Fe, Mn e Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) determinados ( $n=4$ ) em amostra de folhas de cana-de-açúcar (talhão n° 2) e recuperação (em %) pelo método multielementar proposto (HR-CS FAAS)	112
<b>Tabela 25</b> - Resultados (média $\pm$ desvio padrão) para Ca, Mg e K ( $\text{g kg}^{-1}$ ) e para Cu, Fe, Mn e Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) determinados ( $n=4$ ) em amostra de folhas de cana-de-açúcar (talhão n° 3) e recuperação (em %) pelo método multielementar proposto (HR-CS FAAS)	112
<b>Tabela 26</b> - Resultados (média $\pm$ desvio padrão) para Ca, Mg e K ( $\text{g kg}^{-1}$ ) e para Cu, Fe, Mn e Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) determinados ( $n=4$ ) em amostra de folhas de cana-de-açúcar (talhão n° 4) e recuperação (em %) pelo método multielementar proposto (HR-CS FAAS)	113
<b>Tabela 27</b> - Resultados (média $\pm$ desvio padrão) para Ca, Mg e K ( $\text{g kg}^{-1}$ ) e para Cu, Fe, Mn e Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) determinados ( $n=4$ ) em amostra de folhas de cana-de-açúcar (talhão n° 2) e recuperação (em %) pelo método monoelementar (LS FAAS)	113
<b>Tabela 28</b> - Resultados (média $\pm$ desvio padrão) para Ca, Mg e K ( $\text{g kg}^{-1}$ ) e para Cu, Fe, Mn e Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) determinados ( $n=4$ ) em amostra de folhas de cana-de-açúcar (talhão n° 3) e recuperação (em %) pelo método monoelementar (LS FAAS)	114
<b>Tabela 29</b> - Resultados (média $\pm$ desvio padrão) para Ca, Mg e K ( $\text{g kg}^{-1}$ ) e para Cu, Fe, Mn e Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) determinados ( $n=4$ ) em amostra de folhas de cana-de-açúcar (talhão n° 4) e recuperação (em %) pelo método monoelementar (LS FAAS)	114
<b>Tabela 30</b> - Características analíticas das linhas principais para Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K obtidas por LS FAAS no modo monoelementar	115
<b>Tabela 31</b> - Resultados (média $\pm$ desvio padrão) para Ca, Mg e K (% m/m) e para Cu, Fe, Mn e Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) determinados ( $n=4$ ) nos materiais certificados Tomato Leaves, Apple Leaves, Spinach Leaves, Peach Leaves e Citrus Leaves pelo método multielementar proposto (HR-CS FAAS)	116
<b>Tabela 32</b> - Influência da área de integração na inclinação (b) e no coeficiente de correlação linear (R) das curvas analíticas, concentração característica ( $C_o$ ), limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ), e desvios padrão relativo (RSD) para B, Mo, P, and S ( $n=4$ )	125
<b>Tabela 33</b> - Resultados (média $\pm$ desvio padrão) para P e S ( $\text{g kg}^{-1}$ ) e para B e Mo ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) determinados ( $n=4$ ) em amostra de folhas de cana-de-açúcar (talhão n° 2) e recuperação (em %) pelo método multielementar (HR-CS FAAS)	128
<b>Tabela 34</b> - Resultados (média $\pm$ desvio padrão) para P e S ( $\text{g kg}^{-1}$ ) e para B e Mo ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) determinados ( $n=4$ ) em amostra de folhas de cana-de-açúcar (talhão n° 3) e recuperação (em %) pelo método multielementar (HR-CS FAAS)	129

<b>Tabela 35</b> - Resultados (média $\pm$ desvio padrão) para P e S ( $\text{g kg}^{-1}$ ) e para B e Mo ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) determinados ( $n=4$ ) em amostra de folhas de cana-de-açúcar (talhão n° 4) e recuperação (em %) pelo método multielementar (HR-CS FAAS)	129
<b>Tabela 36</b> - Resultados (média $\pm$ desvio padrão) para P (% m/m) e B ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) determinados ( $n=4$ ) no material certificado Spinach Leaves pelo método multielementar proposto (HR-CS FAAS)	130
<b>Tabela 37</b> - Influência da área de integração na inclinação (b) e no coeficiente de correlação linear (R) das curvas analíticas, concentração característica ( $C_0$ ), limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ), e desvios padrão relativo (RSD) para Mo em 313,259 nm extraído com solvente orgânico MIBK ( $n=4$ )	131
<b>Tabela 38</b> - Resultados (em $\text{g kg}^{-1}$ ) para a determinação de Ca, Mg, K, P e S e (em $\text{mg kg}^{-1}$ ) para Cu, Fe, Mn, Zn, B e Mo ( $n=4$ ) e recuperação (em %) em amostra de folhas de cana-de-açúcar dos talhões n° 2, 3 e 4 por HR-CS FAAS (procedimento 7)	133
<b>Tabela 39</b> - Resultados (em $\text{g kg}^{-1}$ ) para a determinação de Ca, Mg, K, P e S e (em $\text{mg kg}^{-1}$ ) para Cu, Fe, Mn, Zn, B e Mo ( $n=4$ ) e recuperação (em %) em amostras de folhas de laranja dos talhões n° 1 (Pêra Rio) e n° 2 (Valência) por HR-CS FAAS (procedimento 7)	134
<b>Tabela 40</b> - Resultados (média $\pm$ desvio padrão) para Ca, Mg, K, P e S (% m/m) e para Cu, Fe, Mn, Zn, B e Mo ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) determinados ( $n=4$ ) nos materiais certificados Tomato Leaves, Peach Leaves e Spinach Leaves	141
<b>Tabela 41</b> - Características analíticas para Cu, Fe, Mn, Zn, B, Mo, Ca, Mg, K, P e S obtidas por HR-CS FAAS com área de integração no comprimento de onda equivalente a 5 pixels ( $CP \pm 2$ )	142
<b>Tabela 42</b> - Resultados ( $n=4$ ) de determinação (em $\text{g kg}^{-1}$ ) e de recuperação (em %) de P em amostras de folhas de cana-de-açúcar e laranja por espectrofotometria e por HR-CS FAAS	143
<b>Tabela 43</b> - Resultados (em $\text{g kg}^{-1}$ ) da determinação ( $n=4$ ) e da recuperação (em %) de S em amostras de folhas de cana-de-açúcar e laranja por turbidimetria e por HR-CS FAAS	144

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

DRIS	Diagnosis and Recommendation Integrated System
AAS	Atomic Absorption Spectrometry
LS FAAS	Line Source Flame Atomic Absorption Spectrometry
HR-CS AAS	High-Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry
HR-CS FAAS	High-Resolution Continuum Source Flame Atomic Absorption Spectrometry
CS AAS	Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry
HCL	Hollow Cathode Lamp
LS AAS	Line Source Atomic Absorption Spectrometry
SIMAAC	Simultaneous Multielement Atomic Absorption Continuum Source
SNR	Signal to Noise Ratio
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
DEM	Double Echelle Monochromator
WSA	Wavelength-Selected Absorbance
SPR	Side Pixel Registration
CP	Center Pixel
MAS	Molecular Absorption Spectrometry
ETV	Eletrothermal Vaporization
HR-CS MAS	High-Resolution Continuum Source Molecular Absorption Spectrometry
LSBC	Least Squares Background Correction
AOAC	Association of Official Analytical Chemists

FIA	Flow Injection Analysis
AES	Atomic Emission Spectrometry
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Optic Emission Spectrometry
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
LA-ICP-MS	Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
LIBS	Laser Induced Breakdown Spectrometry
VIS-NIR	Visible-Near Infrared
MIBK	Methyl Isobutyl Ketone

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	24
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	26
2.1 Evolução da espectrometria de absorção atômica	26
2.2 Conceitos e dispositivos envolvidos na espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e de alta resolução	34
2.3 Métodos Analíticos para a determinação de macro e micronutrientes em folhas	52
<b>3. PROPOSTA DE TRABALHO</b>	61
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	62
<b>4.1 Materiais</b>	62
4.1.1 Instrumentos e Acessórios	62
4.1.2 Reagentes, soluções, amostras e materiais de referência certificados	63
4.1.3 Coleta e preparo das amostras	65
4.1.4 Descontaminação e Armazenamento	70
<b>4.2 Métodos</b>	70
4.2.1 Determinação de Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K em folhas cana-de-açúcar por HR-CS FAAS	70
4.2.2 Determinação de B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, P, S e Zn em folhas de cana-de-açúcar e de laranja por HR-CS FAAS	75
4.2.3 Análise dos resultados	78

<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	80
<b>5.1 Determinação de Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K em folhas cana-de-açúcar por HR-CS FAAS</b>	80
<b>5.2 Determinação de B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, P, S e Zn por HR-CS FAAS em folhas de cana-de-açúcar e de laranja</b>	121
<b>6. CONCLUSÕES</b>	150
<b>REFERÊNCIAS</b>	151

## 1. INTRODUÇÃO

Os setores sucroalcooleiro e citrícola são dois segmentos importantes da economia brasileira que buscam altas produtividades empregando novas tecnologias sem perder o foco no manejo ambientalmente sustentável, que é um dos principais conceitos do agronegócio moderno. A produção agrícola é determinada por muitos fatores, sendo o estado nutricional das plantas um dos mais importantes destes fatores. A diagnose foliar assume um papel importante na nutrição de plantas porque permite identificar fatores limitantes de produção<sup>1</sup>. Nesse contexto, a química analítica, fornecendo informações qualitativas ou quantitativas confiáveis e rápidas acerca da composição química de folhas e solos, responde às necessidades ligadas a esses setores agroindustriais.

A diagnose foliar pode ser visual ou química. A primeira é baseada na premissa de que a falta ou o excesso de um determinado elemento será traduzido em anormalidades típicas e visíveis na planta<sup>1</sup>. É limitada porque antes mesmo que um sintoma apareça, a produção pode estar comprometida. Ainda, pragas e doenças podem induzir sintomas foliares parecidos, dificultando a identificação do problema. Já a diagnose foliar química é mais eficiente na avaliação do estado nutricional das plantas, visto que as folhas são consideradas o foco das atividades fisiológicas<sup>2</sup>. Os teores de nutrientes são determinados por diversos métodos analíticos e interpretados posteriormente. Atualmente, o sistema integrado de diagnose e recomendação – DRIS, proposto por Beaufils em 1973 (apud REIS JUNIOR; MONERRAT, 2002)<sup>3</sup> é considerado um dos sistemas mais adequados para interpretar e avaliar o estado nutricional das plantas, por considerar o equilíbrio entre os nutrientes e não apenas os teores individuais independentemente.

Os nutrientes essenciais mais frequentemente monitorados em diagnósticos nutricionais são os macronutrientes N, P, K, Ca, Mg, S, e os micronutrientes B, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn<sup>2</sup>. A análise química desses elementos está bem estabelecida na literatura. O N é determinado comumente pelo método Kjeldahl<sup>4</sup> ou Nessler<sup>3</sup>, o P pelos métodos do azul ou amarelo de molibdênio<sup>3</sup> ou por espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma indutivamente acoplado<sup>5</sup> (que também determina Ca, Mg, Mn, Mo, Zn<sup>6-7</sup>), o K por espectrometria de emissão atômica em chama<sup>3</sup>, o Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, e Zn por espectrometria de absorção atômica<sup>3,8</sup>, o B geralmente é determinado

pelos métodos da azometina H, da curcumina ou do Azul de Metileno<sup>9</sup>, o Mo pelo método do tiocianato ou ditioi<sup>1,10</sup> e o S por turbidimetria<sup>4</sup>. Essas análises estão bem estabelecidas e frequentemente presentes na maioria dos laboratórios de rotina, mas sofrem a desvantagem de requererem várias técnicas e métodos analíticos diferentes. Como consequência, o tempo e os custos analíticos aumentam. O desenvolvimento de métodos que determinem o maior número possível desses nutrientes conjuntamente, empregando um preparo mínimo da amostra é bem promissor. E a espectrometria de absorção atômica (AAS) pode atender a esta demanda.

A espectrometria de absorção atômica em chama com fonte de linhas (LS FAAS) se destaca entre as técnicas espectrométricas na determinação de vários nutrientes em folhas<sup>1,11</sup>. No entanto, a determinação multielementar, sequencial ou simultânea, de B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, N, P, S e Zn por LS FAAS é inviável porque: 1) não há fontes de radiação para N e S; 2) os limites de detecção para B, Mo e P são insatisfatórios; 3) as medidas de absorção atômica são monoelementares, o que exige otimização das condições operacionais (curvas de calibração específicas, com consequente substituição e condicionamento de fontes de radiação).

A espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e de alta resolução (HR-CS AAS) trouxe novas perspectivas para a análise foliar porque possui um conjunto de características bem interessantes e intrínsecas à técnica, tais como: 1) uso de uma fonte contínua de radiação que emite ampla faixa de comprimentos de onda (190 - 900 nm), permitindo determinação multielementar sequencial rápida; 2) possibilidade de determinar elementos não metálicos, como P e S, por meio da absorção molecular; 3) comprimentos de onda alternativos podem ser monitorados com o objetivo de aumentar ou diminuir a sensibilidade; 4) há uma eficiente correção de fundo, entre outras<sup>12</sup>.

Desta forma, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar e utilizar esta nova tecnologia analítica baseada na HR-CS AAS para diagnose foliar, por meio de desenvolvimento de métodos analíticos de determinação de macro e micronutrientes em folhas de cana-de-açúcar e de laranja.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

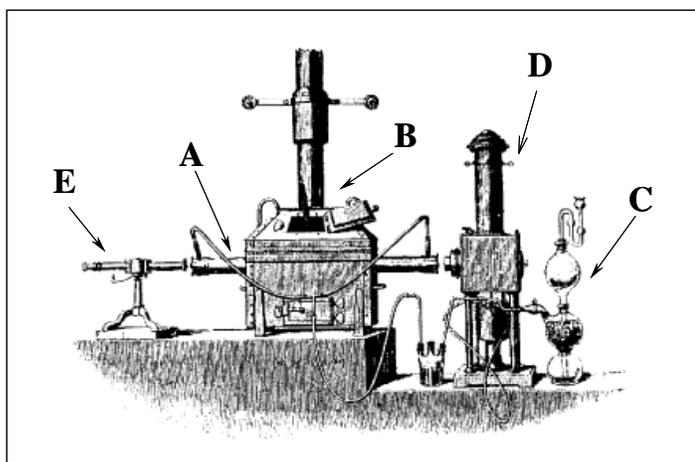
Esta revisão aborda a evolução da espectrometria de absorção atômica até o surgimento da espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e de alta resolução, bem como abrange os principais conceitos envolvidos nesta nova técnica e algumas aplicações. Uma revisão detalhada dos métodos de análise dos macro e micronutrientes em folhas discutindo os principais aspectos envolvidos também será apresentada.

### 2.1 Evolução da espectrometria de absorção atômica

A espectrometria de absorção atômica com fonte contínua (CS AAS) é a mais antiga das técnicas espectroscópicas e provavelmente também a mais nova membra do rol de técnicas espectroquímicas usadas rotineiramente.

O início da espectroscopia aconteceu em 1672 quando o espectro solar foi observado pela primeira vez por Isaac Newton, após a luz solar atravessar um prisma. Mais tarde em 1802 Wollaston descobriu que o espectro solar possuía linhas negras o qual foi estudado mais profundamente por Fraunhöffer em 1814, atribuindo às mais intensas letras de A a G, no intervalo do vermelho ao violeta. Brewster, em 1820, considerou que as linhas de Fraunhöffer eram causadas por processos de absorção na atmosfera solar<sup>13</sup>. Kirchhoff e Bunsen (1860) estabeleceram os princípios básicos desta absorção durante experiências sistemáticas das linhas reversas, nas quais identificaram espectros de emissão de metais alcalinos e alcalino terrosos e os compararam sistematicamente com as linhas negras no espectro solar, identificando elementos que absorviam no espectro solar<sup>12-15</sup>. Eles demonstraram que as linhas amarelas típicas emitidas pelos sais de sódio na chama eram idênticas as linhas negras D do espectro solar. Tais experimentos estabeleceram as relações básicas dos fenômenos de absorção e emissão da radiação e marcaram o início da análise espectroscópica. Para a realização destes experimentos foi utilizada uma fonte de luz que emitia um espectro contínuo na região do visível, a qual era a única fonte de radiação disponível na época. Os primeiros espectroscopistas eram principalmente astrônomos buscando entender os espectros do sol e das estrelas, os quais reconheceram a utilidade do espectro de absorção para análise química<sup>13</sup>.

Os poucos pesquisadores que usaram absorção atômica para suas investigações na segunda metade do século XIX, como Lockyer em 1878<sup>12</sup>, por exemplo, usaram instrumentos similares ao usado por Kirchoff e Bunsen (Figura 1). Lockyer desenvolveu o instrumento completo para CS AAS com o qual ambos espectros de absorção e emissão de metais foram estudados. Estes instrumentos consistiam em: um atomizador (A), um tubo de ferro, dentro de um forno (B) alimentado por carvão; um dispositivo Kipp (C) utilizado para gerar hidrogênio, obtendo-se, assim, uma atmosfera redutora no atomizador; uma fonte de luz (D) que consistia de uma lâmpada elétrica de fonte contínua; e um espectroscópio com prisma (E) ou alternativamente, um espectrógrafo com um dispositivo fotográfico para permitir a obtenção dos espectros dos metais estudados<sup>12,16</sup>.



**Figura 1** - Instrumento utilizado por Lockyer para medidas de absorção atômica: (A) atomizador, (B) tubo de ferro, dentro de um forno alimentado por carvão, (C) um dispositivo Kipp utilizado para gerar hidrogênio, (D) lâmpada elétrica de fonte contínua e (E) espectroscópio com prisma ou um espectrógrafo com um dispositivo fotográfico  
Fonte: WELZ et al., 2005.

As primeiras fontes de radiação utilizadas foram as contínuas devido a sua disponibilidade e também porque atendiam a necessidade de identificar as interrupções no espectro contínuo causadas por absorção atômica, as “linhas negras”. Devido ao uso exclusivo de fontes contínuas naquela época, a absorção atômica foi pouco utilizada na primeira metade do século XX, na qual a emissão

atômica tornou-se a técnica preferida para análise espectroscópica<sup>14</sup>, uma vez que era muito mais fácil detectar um sinal luminoso em um anteparo escuro do que uma redução do sinal emitido pelas fontes contínuas, principalmente considerando os detectores fotográficos disponíveis na época<sup>15</sup>.

Entre os poucos trabalhos, destaca-se o realizado por Paul entre 1935 e 1937, que descreveu os espectros de absorção da Ag, Ce, Mn, Nd e Sm (apud BECKER-ROSS et al., 2006)<sup>16</sup>. Neste trabalho, várias fontes contínuas foram testadas para diferentes intervalos de comprimento de onda: uma lâmpada de filamento de tungstênio de alta potência para a região visível e uma lâmpada de hidrogênio e outra de anodo de arco de carbono para a região ultravioleta. Usando técnicas similares, Garton em 1952 e Bovey e Garton em 1954 investigaram os espectros de absorção do Cu e Ga e também de Lu e Tm, com várias fontes de radiação, inclusive uma lâmpada de arco de xenônio de alta pressão para gerar a radiação contínua (apud BECKER-ROSS et al., 2006)<sup>16</sup>.

Em 1952, Alan Walsh, que havia trabalhado anos com análise espectroquímica de metais e espectroscopia molecular, começou a refletir porque o espectro molecular era obtido em absorção e o atômico em emissão. Na busca por uma resposta, ele utilizou a AAS pela primeira vez para fins analíticos usando um arranjo instrumental de fonte contínua na determinação de Cu. Os resultados mostraram-se bastante insatisfatórios pela baixa sensibilidade, e assim ele concluiu que uma resolução de aproximadamente 2 pm era necessária aos monocromadores e detectores, algo muito além do disponível naquela época<sup>13,17</sup>.

As dificuldades encontradas na aplicação analítica da AAS levaram Alan Walsh a concluir que a medida de absorção atômica requeria fontes de radiação que emitissem linhas de emissão as mais estreitas possíveis. Assim, a função do monocromador era separar a linha analítica das demais emitidas pela fonte de radiação, sendo a alta resolução necessária para as medidas de absorção atômica proveniente da fonte de radiação<sup>12</sup>. A introdução das lâmpadas de cátodo oco (HCL) como fontes de radiação em 1955 aliada a significativa pesquisa de Walsh e colaboradores na melhoria destas fontes de radiação, permitiram que a AAS fosse aceita como técnica de rotina<sup>13</sup>.

A lâmpada de cátodo oco, sendo uma fonte discreta, emite radiações monocromatizadas do espectro luminoso específicas para cada elemento. Como a

linha emitida é mais estreita (alguns picômetros) do que o perfil de absorção da espécie analisada e do que o passo óptico do monocromador, as lâmpadas de cátodo oco se caracterizam por possibilitarem alta sensibilidade e seletividade, baixos limites de detecção e baixos níveis de ruído. Assim, a baixa resolução dos monocromadores existentes na época era compatível com a radiação das fontes discretas.

Os instrumentos de absorção atômica com fonte de linha passaram a ser amplamente utilizados como técnica reconhecida e conceituada na análise elementar. Como vantagens desses instrumentos podemos citar: i) uso de monocromadores de baixa resolução, o que torna o desenho destes instrumentos relativamente simples e baratos; ii) a alta sensibilidade, seletividade e especificidade proporcionadas pela fonte de linha específica para determinado elemento e pelo princípio da modulação; iii) redução das interferências espectrais causadas pela sobreposição de linhas de outros elementos; e iv) alta tolerância relativa da chama e de atomizadores eletrotérmicos como o forno de grafite com os constituintes da matriz. Entre as limitações mencionam-se i) a determinação monoelementar (talvez a maior limitação da LS AAS); ii) a necessidade de lâmpadas específicas para cada analito, ressaltando que as suas vidas úteis são limitadas; iii) a absorção é medida somente sobre intervalos espectrais estreitos, correspondentes à resolução espectral dada pela fonte de radiação, resultando em pouca informação disponível sobre o ambiente espectral<sup>12</sup>.

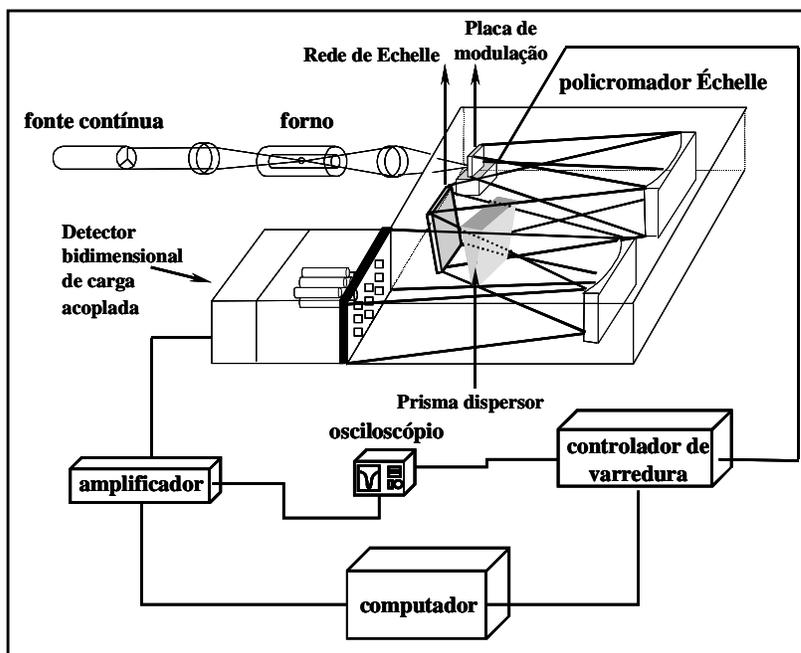
Apesar do bom desempenho analítico da AAS com fonte discreta, a utilização da fonte contínua como fonte de radiação nunca foi esquecida. Desde 1950 até os dias atuais inúmeros pesquisadores têm se esforçado na busca por equipamentos com fonte contínua<sup>12,18-26</sup>. Os três principais desafios enfrentados eram obter sensibilidades, limites de detecção e intervalos de calibração comparáveis a LS AAS. No entanto, substituir uma lâmpada de cátodo oco por uma lâmpada de fonte contínua sem mudar profundamente o arranjo instrumental é algo inviável. A instabilidade das fontes contínuas, como é o caso da lâmpada de arco de xenônio geram linhas de base ruidosas e limites de detecção ruins. Além disso, a média resolução dos monocromadores utilizados em AAS (ideal para isolar linhas de emissão de lâmpadas de cátodo oco) fornece uma resolução espectral grande para usar uma fonte contínua. Assim, isto resulta em piores sensibilidade e

especificidade, curvas de calibração não lineares e maior susceptibilidade a interferências de fundo de banda larga. Outro problema inerente das fontes contínuas é a baixa intensidade das mesmas em comprimentos de onda abaixo de 280 nm. Desta forma, uma redefinição completa da instrumentação é necessária para utilizar a CS AAS<sup>25</sup>.

As primeiras publicações nesta área ocorreram na década de 1960 e enfocaram as limitações do arranjo instrumental proposto por Walsh, tais como, a instabilidade e/ou baixa energia das lâmpadas de cátodo oco para alguns elementos e a indisponibilidade destas lâmpadas para outros elementos, principalmente para os elementos terras raras, demonstrando desta maneira a potencialidade do arranjo instrumental com fonte contínua. Nos anos seguintes, vários trabalhos estudaram a modulação do comprimento de onda com o intuito de melhorar a razão sinal/ruído (SNR) e a sensibilidade em CS AAS<sup>12,15</sup>.

Na primeira fase de estudos envolvendo CS AAS, Keliher e Wohlers empregaram em 1974 pela primeira vez um espectrômetro de fonte contínua com grade Echelle de alta resolução<sup>27</sup>. A maior limitação naquela época era a lâmpada de xenônio de 150 W usada como fonte de radiação contínua que apresentava baixa energia para comprimentos de onda menores que 320 nm, região espectral onde a maioria dos elementos apresenta suas linhas mais sensíveis.

Durante os 25 anos seguintes O'Haver, Harnly e colaboradores<sup>28-36</sup> continuaram a pesquisa e melhoraram consideravelmente o arranjo instrumental, introduzindo a modulação de comprimento de onda, a fonte contínua pulsada e o detector com malha linear de fotodiodos. Eles também inventaram o primeiro espectrômetro de absorção atômica multielementar e simultâneo com fonte contínua (SIMAAC) em 1979 (Figura 2), e demonstraram a aplicabilidade deste sistema para uma variedade de problemas analíticos usando chama e tubo de grafite como atomizadores<sup>19,22,37</sup>.



**Figura 2** - Representação esquemática do espectrômetro desenvolvido por Harnly  
 Fonte: Adaptado de HARNLY, 1986.

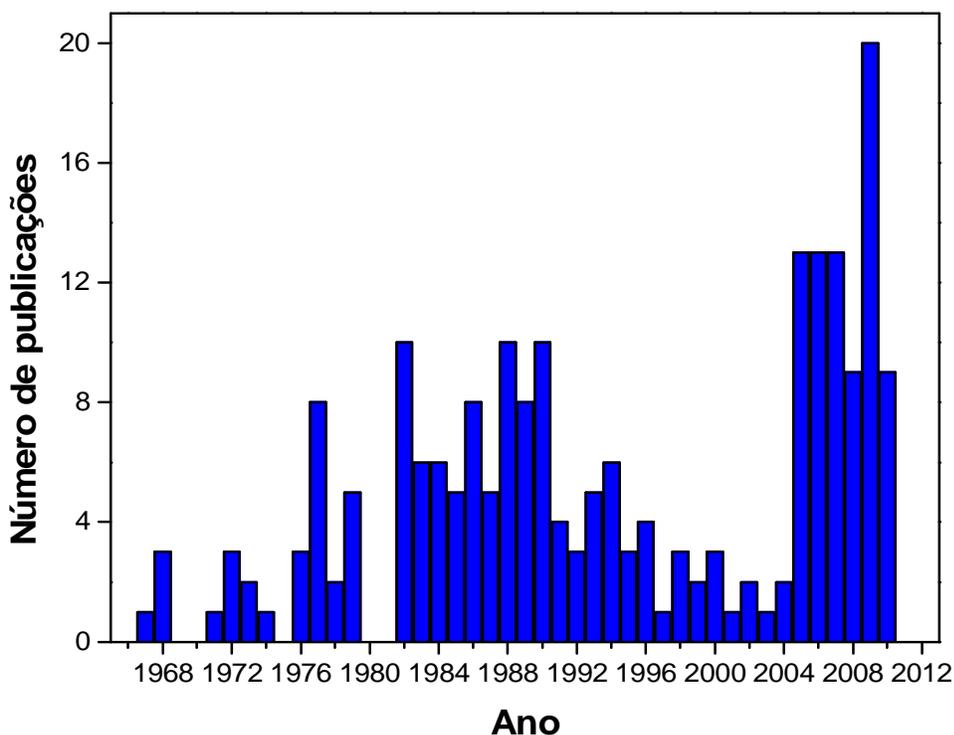
A fonte contínua empregada no SIMAAC era uma lâmpada de arco de xenônio com potência nominal de 300 W e o instrumento era compatível com atomização por chama ou forno de grafite. O policromador possuía um prisma seguido por uma rede de Echelle com 20 fendas de saída tornando, a princípio, possível a determinação de 16 elementos simultaneamente. O detector utilizado consistia de um arranjo bidimensional de detectores com carga acoplada. Além disso, havia uma placa de modulação, que era uma placa refratora de quartzo, que era rotacionada primeiramente em uma direção e subsequentemente na direção oposta ( $\pm 12,5^\circ$ ), fazendo assim a radiação ser refletida alternadamente para fora do policromador e para a fenda de saída. Outro efeito da modulação da fonte contínua pela placa refratora é a geração de linhas adjacentes à linha analítica. Com a modulação da fonte contínua, a intensidade de luz incidente ( $I_0$ ) é definida como a média das intensidades medidas nas linhas anterior e posterior à linha analítica. A luz transmitida ( $I$ ) é definida convencionalmente como a intensidade junto ao centro do perfil. Conforme se observa pela Figura 2, a modulação da fonte contínua torna o espectrômetro um instrumento de duplo feixe. A absorvância é um processo proporcional à absorvância e à concentração do analito e é independente da

intensidade da fonte. Assim, um decréscimo na intensidade da fonte produz decréscimo similar em ambos: no feixe da amostra e no feixe de referência. Como a absorção é proporcional a intensidade da fonte, a relação  $I_0/I$  permanece constante, assim como a absorbância ( $\log I_0/I$ ). Portanto, o fato da absorbância ser independente da intensidade da fonte fornece uma inerente correção para a instabilidade do arco de xenônio e para a absorção de fundo. Desta maneira, o instrumento desenvolvido por Harnly possuía uma correção automática para instabilidade da lâmpada e para a absorção de fundo, a qual é conseguida simplesmente pela modulação da fonte após o atomizador (Figura 2). Entretanto, como a correção é feita em uma linha adjacente à linha analítica, fundos estruturados não eram eficientemente corrigidos. Além disso, apesar de apresentar um bom desempenho, este espectrômetro apresentava algumas desvantagens, como a baixa intensidade da lâmpada na região UV e a modulação de comprimento de onda (feita com uma placa refratora de quartzo), o que resultava em limites de detecção piores do que os obtidos em AAS.

Em um artigo de revisão publicado em 1989<sup>38</sup>, o pesquisador Hieftje afirmou: “Para que a AAS permaneça viável face à forte competição de técnicas alternativas, claramente torna-se necessário uma renovação na instrumentação ou nos conceitos”. Esta afirmação visionária foi seguida de um forte avanço tecnológico ocorrido no final do século XX, o qual permitiu o desenvolvimento de monocromadores e detectores de alta resolução, os quais superaram algumas das dificuldades encontradas na utilização de uma fonte contínua, gerando novo impulso para as pesquisas nesta área.

Becker-Ross começou a estudar o desenvolvimento de espectrômetros de fonte contínua em 1980. Juntamente com o seu grupo de pesquisa, elencou os principais pontos fracos dos instrumentos de fonte contínua usados anteriormente, como a baixa intensidade das lâmpadas convencionais de xenônio na região UV e as desvantagens da modulação de comprimentos de onda com uma placa refratora, definindo quais seriam as necessidades para um arranjo de fonte contínua funcionar adequadamente. Após quase duas décadas de pesquisas, Becker Ross e colaboradores construíram em 1996<sup>24</sup> um espectrômetro protótipo operante com fonte contínua que atendeu a estas necessidades, começando com a fonte de radiação contínua<sup>39-40</sup>, seguido pelo espectrômetro<sup>41-44</sup> e detector<sup>42-44</sup>. Este

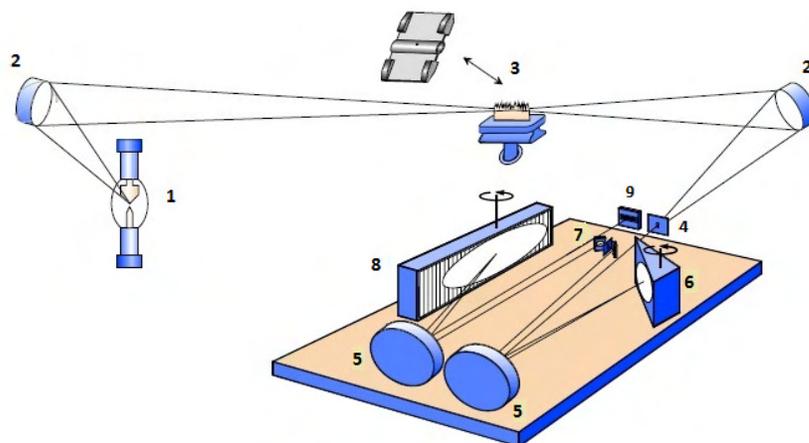
espectrômetro consistia em um espectrômetro Perkin-Elmer modelo 4100 ZL, cujo compartimento ótico foi totalmente substituído por um monocromador duplo Echelle, com resolução  $\Delta\lambda = 110.000$ . Uma lâmpada de arco de xenônio, com potência nominal de 300 W, foi empregada como fonte contínua e o espectrômetro era compatível com atomização por chama ou por forno de grafite, sendo possível, ainda, o acoplamento de geradores de campo ao forno de grafite, caso fosse desejada a correção do fundo por efeito Zeeman. Este protótipo foi a base para o primeiro equipamento comercial HR-CS AAS lançado em 2005, o qual vem sendo comercializado atualmente. Este arranjo instrumental vem impulsionando as publicações na área de absorção atômica, como pode ser observado na Figura 3. Os conceitos envolvidos neste novo arranjo instrumental serão discutidos no próximo tópico.



**Figura 3** - Número de publicações por ano em absorção atômica com fonte contínua a partir de 1907. Fonte: Base de busca Scifinder Scholar, uma divisão da American Chemical Society (Data da pesquisa: 04/05/2010)

## 2.2 Conceitos e dispositivos envolvidos na espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e de alta resolução

A configuração atual de um espectrômetro de absorção atômica com fonte contínua e de alta resolução está esquematicamente ilustrada na Figura 4. Este conceito instrumental é baseado na medida da absorção da radiação eletromagnética proveniente de uma fonte contínua (arco curto de xenônio) por átomos no estado gasoso fundamental atomizados em chamas ou em fornos de grafite. Após passar pelo volume absorvedor a radiação transmitida segue para um monocromador de alta resolução composto por um prisma e uma rede de difração Echelle, e em seguida chega ao detector de carga acoplada (Figura 4). A grandeza física de medida é a absorbância e a relação matemática entre absorbância e concentração é dada pela Lei de Lambert-Beer<sup>13</sup>.



**Figura 4** - Configuração de um espectrômetro de absorção com fonte contínua e de alta resolução (HR-CS AAS): (1) lâmpada de arco curto de Xe; (2) espelhos elipsoidais focalizadores; (3) atomizador (chama ou forno de grafite); (4) fenda de entrada; (5) espelhos parabolóides; (6) prisma; (7) fenda intermediária ajustável; (8) rede echelle e (9) detector CCD  
Fonte: Adaptado de WELZ et al., 2005.

Átomos no estado gasoso fundamental podem absorver energia e passar para um estado excitado. Um determinado átomo absorve linhas ou raias de radiação somente em comprimentos de ondas específicos, correspondentes às

energias necessárias para que as transições eletrônicas do estado fundamental para o estado excitado ocorram, características de cada elemento, segundo equação de Planck:

$$= hc / \lambda \quad (1)$$

Sendo  $\epsilon$  a energia responsável pela transição eletrônica do átomo do estado fundamental para o estado excitado;  $h$  a constante de Planck ( $h = 6,62608 \times 10^{-34}$  Js);  $c$  a velocidade da luz ( $c = 2,99792 \times 10^8$  ms<sup>-1</sup>) e  $\lambda$  é o comprimento de onda.

Somente algumas transições eletrônicas são possíveis e estas definem o espectro de linhas de emissão / absorção de cada elemento. Entretanto, a fração de átomos excitados em um determinado nível de energia é uma função da temperatura e do comprimento de onda (como pode ser observado em alguns exemplos na Tabela 1) e é dado pela distribuição de Boltzmann:

$$\frac{N^*}{N_0} = \frac{g^* e^{-\Delta E / KT}}{g_0} \quad (2)$$

Sendo  $N^*$  o número de átomos no estado excitado e  $N_0$  o número de átomos no estado fundamental;  $E$  é a energia específica da excitação;  $k$  é a constante de Boltzmann ( $k = 1,38066 \times 10^{-23}$  JK<sup>-1</sup>) e  $T$  é a temperatura absoluta<sup>13</sup>.

**Tabela 1** - Razão  $N^*/N_0$  e a dependência com a temperatura e comprimento de onda

Elemento	Energia de Excitação (eV)	(nm)	$g^*/g_0$	$N^*/N_0$		
				2000 K	3000 K	4000 K
Zn	5,80	213,9	3	$7,29 \times 10^{-15}$	$5,58 \times 10^{-10}$	$1,48 \times 10^{-7}$
Cu	2,93	422,7	3	$1,21 \times 10^{-7}$	$3,69 \times 10^{-5}$	$6,03 \times 10^{-4}$
Na	2,11	589,0	2	$0,86 \times 10^{-4}$	$5,88 \times 10^{-4}$	$4,44 \times 10^{-3}$
Cs	1,46	852,1	2	$4,44 \times 10^{-4}$	$7,24 \times 10^{-3}$	$2,98 \times 10^{-2}$

Considerando os princípios citados acima, chega-se à lei de Lambert-Beer<sup>13</sup>, na qual a absorvância,  $A$ , ou densidade óptica é proporcional a concentração  $N$  de átomos no estado fundamental em um volume de observação de comprimento  $l$ .

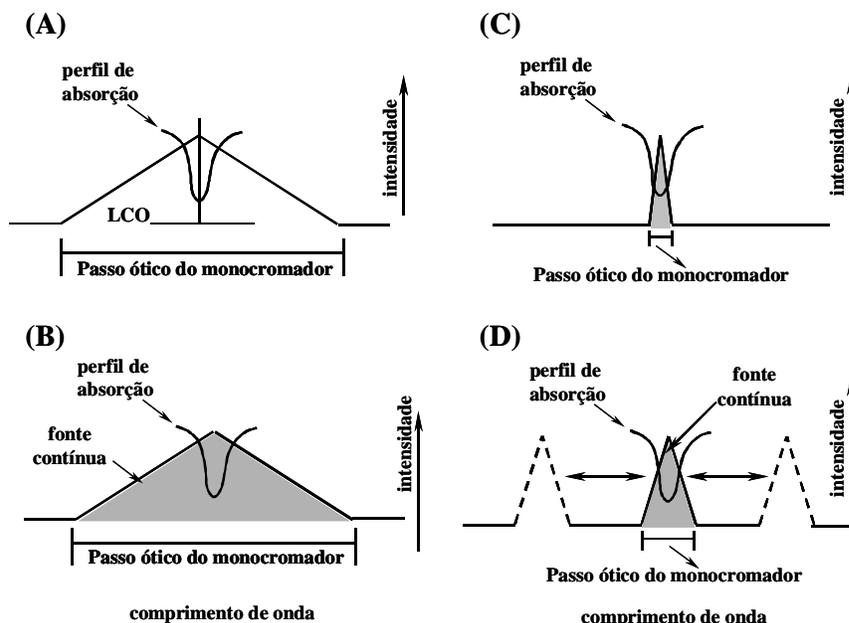
$$A = \log \frac{\Phi_0(\lambda)}{\Phi_{tr}(\lambda)} = 0,43Nlk(\lambda) \quad (3)$$

Sendo  $\Phi_0(\lambda)$  a potência radiante emitida em  $\lambda$ ;  $\Phi_{tr}(\lambda)$  a potência radiante transmitida em  $\lambda$ ; N o número de átomos livres na camada absorvedora; l o comprimento da camada absorvedora e  $k(\lambda)$  o coeficiente de absorção atômica espectral.

Em CS AAS apenas uma lâmpada é utilizada para todos os elementos. Isso diminui os custos analíticos, pois a LS AAS requer, de um modo geral, uma lâmpada para cada elemento. Ainda, com CS AAS a técnica torna-se “quase-simultânea” e multielementar, porque várias linhas analíticas para muitos elementos estão disponíveis nessa fonte de radiação contínua.

As fontes de radiação contínua mais difundidas em AAS são as lâmpadas de deutério, cuja principal aplicação tem sido como uma fonte secundária para a correção da absorção de fundo, e as lâmpadas de arco de xenônio. Esta última tem sido a mais utilizada em CS AAS por emitir mais intensamente do que a lâmpada de deutério, apesar de apresentar um decréscimo acentuado da radiação emitida em  $< 280$  nm.

Devido a larga banda de emissão da fonte contínua, os monocromadores e sistemas de detecção devem possuir alta resolução, de modo que seja selecionada uma faixa bastante estreita da banda emitida pela lâmpada. Verifica-se então que é impossível substituir uma fonte discreta por uma contínua sem que o espectrômetro como um todo seja alterado. A Figura 5 apresenta esquematicamente os perfis de absorção atômica utilizando diferentes configurações de espectrômetros.



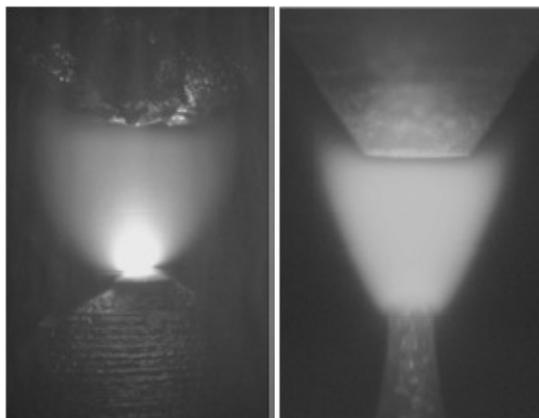
**Figura 5** - Comparação entre os perfis de emissão de uma lâmpada de fonte contínua e uma lâmpada de cátodo oco. (A) Absorção com uma lâmpada de cátodo oco. (B) Absorção com uma fonte contínua e um monocromador de média resolução. (C) Absorção com uma lâmpada de fonte contínua e um monocromador de alta resolução. (D) Absorção com uma fonte contínua, um monocromador de alta resolução e com modulação do comprimento de onda emitido pela fonte  
 Fonte: HARNLY, 1986

A lâmpada de cátodo oco, sendo uma fonte discreta emite linhas extremamente finas do espectro luminoso. Como a linha emitida é mais fina do que o perfil de absorção da espécie analisada e do que o passo óptico do monocromador [Figura 5(A)] as lâmpadas de cátodo oco fornecem alta sensibilidade e seletividade, baixos limites de detecção e baixos níveis de ruído. Assim, um monocromador é necessário somente para isolar a região espectral de interesse, não influenciando, portanto, na natureza monocromática da radiação emitida pela lâmpada. Portanto, um monocromador de resolução média já é suficiente para um instrumento contendo uma lâmpada de cátodo oco e não influencia na sensibilidade e seletividade deste tipo de instrumento. Entretanto, quando uma fonte contínua é utilizada, toda a região do passo óptico do monocromador será irradiada [Figura 5(B)]. Assim, com uma fonte contínua e um monocromador de média resolução, a medida de absorção irá ocorrer em uma região muito larga de comprimento de onda. Nestas condições, a lei de Beer não será obedecida. Conseqüentemente, não serão obtidas relações lineares entre concentração e absorção e as medidas serão susceptíveis a interferências

espectrais, resultando em baixa sensibilidade, seletividade e limites de detecção várias ordens de grandeza superiores aos obtidos com a AAS com fonte discreta. Portanto, quando se utiliza uma fonte contínua o monocromador exerce forte influência sobre o desempenho analítico do instrumento.

A radiação luminosa emitida pela fonte contínua pode se tornar praticamente monocromática se um monocromador de alta resolução é utilizado no espectrômetro de fonte contínua [Figura 5(C)]. Assim, a linha emitida por uma lâmpada de cátodo oco em um espectrômetro convencional é substituída pelo estreito passo ótico do monocromador de alta resolução em um espectrômetro de fonte contínua. Portanto, um espectrômetro de fonte contínua necessita de um monocromador de alta resolução que possua um passo ótico da mesma ordem de grandeza que o perfil de absorção do elemento analisado [Figura 5(C)]. O desenvolvimento de monocromadores de alta resolução, tal como o monocromador Echelle, trouxe novo ânimo para as pesquisas em AAS com fonte contínua e possibilitou o desenvolvimento de espectrômetros com seletividade comparável à obtida com a AAS com fonte discreta. Entretanto, a lâmpada de arco de xenônio convencional é significativamente menos estável do que uma lâmpada de cátodo oco e a utilização de um monocromador de alta resolução reduz a intensidade transmitida, e então para se obter limites de detecção comparáveis aos da AAS com fonte discreta, é necessária à utilização de detectores de alta resolução e alta sensibilidade. Na Figura 5D é apresentado o perfil de absorção quando se utiliza a modulação da fonte contínua. A modulação da fonte contínua é importante, pois automaticamente corrige a absorção e emissão de fundo, além de minimizar problemas relacionados à instabilidade do arco de xenônio.

Para solucionar o problema da menor intensidade da lâmpada de arco de xenônio convencional (radiação difusa) em comparação as lâmpadas de catodo oco, a mesma foi melhorada. Esta nova lâmpada de arco curto de xenônio opera em um modo “*hot-spot*”, ou seja, um plasma pontual extremamente pequeno é gerado na superfície do cátodo, em contraste com a forma difusa das lâmpadas de xenônio comuns<sup>12</sup> (Figura 6).

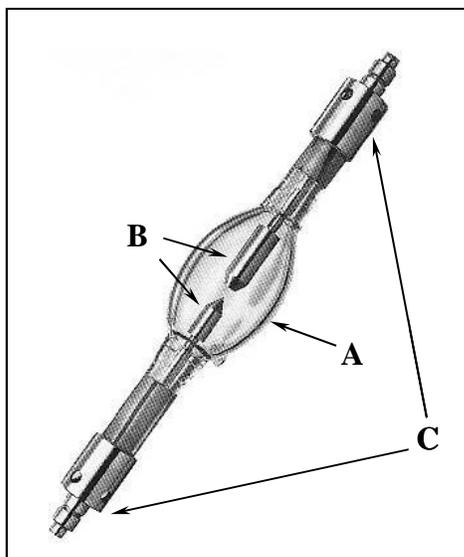


**Figura 6** - Lâmpada de arco curto de xenônio operando no modo “hot spot” (esquerda) e no modo difuso (direita)

Fonte: WELZ et al., 2005.

Nesta lâmpada a contração do plasma é produzida devido a um aumento da pressão de xenônio (em torno de 17 bar com a lâmpada fria) dentro do invólucro (Figura 7A), aos materiais sofisticados que compõem os eletrodos (Figura 7B), geralmente de tungstênio, a curta distância em que os eletrodos estão dispostos (< 1 nm) e a uma específica condição de temperatura induzida pela geometria dos eletrodos. A lâmpada é ligada através de contatos elétricos metálicos (Figura 7C) localizados nas extremidades da lâmpada e assim um plasma pontual de xenônio é gerado com menos de 0,2 nm de diâmetro e temperatura superior a 10000 K, que passa então a emitir radiação contínua entre 190 e 900 nm<sup>12,45</sup>. Assim, há um aumento significativo da intensidade da radiação, particularmente nas proximidades da região UV. Para muitos elementos o aumento da intensidade pode variar de uma até duas ordens de grandeza.

Os arcos de xenônio são considerados instáveis e seu posicionamento é corrigido automaticamente pelo movimento de um espelho que garante que a radiação esteja sempre incidindo no centro do atomizador e portanto, na fenda de entrada do monocromador. A calibração dos comprimentos de onda é feita com uma lâmpada de neônio. Esta lâmpada é posicionada em frente à fenda intermediária, emitindo várias linhas relativamente estreitas que são usadas como referência na calibração. Assim, no começo de cada ciclo analítico, a verdadeira posição do comprimento de onda é verificada e se necessário ajustada, para garantir uma relação exata entre pixel e comprimento de onda.



**Figura 7** - Lâmpada de arco curto de xenônio utilizada em HR-CS AAS. (A) Invólucro de vidro; (B) eletrodos; (C) contatos elétricos metálicos

O espectrômetro com fonte contínua e de alta resolução, ao contrário do espectrômetro com fonte de linhas apresenta requerimentos extremamente sofisticados. O conjunto monocromador-detector deve ter o poder de resolução cerca de duas ordens de grandeza maior do que em LS AAS para garantir sensibilidade comparável e menor risco de interferência espectral. Além disso, condutância geométrica adequada e eficiência de difração garantem a alta razão sinal/ruído (SNR) e, conseqüentemente, os baixos limites de detecção (LOD), inclusive na região UV. A medida simultânea de uma linha analítica e de sua vizinhança espectral também é necessária para garantir uma eficiente correção de fundo, e por fim, mas não menos importante, comprimento de onda preciso e controle de dispersão são indispensáveis para garantir a confiabilidade analítica<sup>12</sup>.

Os monocromadores Echelle duplos (DEM) foram pela primeira vez apresentados em 1993<sup>41</sup> e tem se mostrado os mais apropriados por possuírem dois elementos dispersores em série, um prisma e uma grade Echelle. O prisma é responsável pela pré-dispersão espectral da radiação contínua, selecionando a parte do espectro de interesse. A fenda intermediária seleciona uma parte de ~ 0,3 – 3 nm deste espectro que segue para a grade echelle, na qual esta seção pré-selecionada é altamente resolvida. Como o monocromador não possui uma fenda de saída toda a parte do espectro que atingiu a grade Echelle chega ao detector de alta resolução.

Estes monocromadores dispersam a radiação luminosa de maneira altamente linear (Figura 4).

Os dispositivos de carga acoplada (CCD) têm sido os mais amplamente empregados como detectores em HR-CS AAS. Um dispositivo de carga acoplada possui várias áreas fotossensíveis (pixels), similares aos dispositivos utilizados em câmeras fotográficas digitais, distribuídas linearmente ou bidimensionalmente. Cada pixel contém um amplificador individual e isto faz com que o instrumento opere com 512 detectores completamente independentes, sendo 200 destes utilizados para propósitos analíticos, que são iluminados e avaliados simultaneamente<sup>45</sup>. Isto significa que todo o ambiente espectral ao redor da linha analítica pode ser visualizado, o que possibilita a obtenção de uma série de informações indisponíveis em instrumentos convencionais.

Apesar desta configuração não permitir a determinação multielementar simultânea, a menos que mais de uma linha analítica atravesse a fenda intermediária, ela pode oferecer um espectro tridimensional absorvância em função do tempo e do comprimento de onda. Isto obviamente ajuda a reconhecer e evitar interferências espectrais, colabora para a correção da absorção de fundo e para a otimização de programas de aquecimento no caso de forno de grafite. Assim, em HR-CS AAS existem três maneiras diferentes de visualizar os dados: i) o tradicional sinal transiente, onde se tem absorvância *versus* tempo; ii) o sinal de absorvância integrada *versus* comprimento de onda, onde é possível visualizar qualquer absorção de radiação na região espectral em análise; e iii) o espectro tridimensional, que apresenta a absorvância em função do tempo e do comprimento de onda.

Em HR-CS AAS o uso de uma fonte contínua de radiação com alta intensidade e de um monocromador de alta resolução permite a mudança de comprimento de onda em um curto período de tempo (~ 1 s). Esta característica é responsável pela determinação multielementar sequencial rápida, vantajosa principalmente para espectrômetros com chama, nos quais condições de chama e altura do queimador podem ser controladas automaticamente para cada elemento. Assim, cada elemento pode ser determinado sob condições ótimas e não em condições de compromisso, como acontece em medidas simultâneas<sup>12</sup>. A HR-CS AAS apresenta muitas vantagens quando comparada a LS AAS, pois apresenta um conjunto de características especiais que a LS AAS não possui, tais como, a

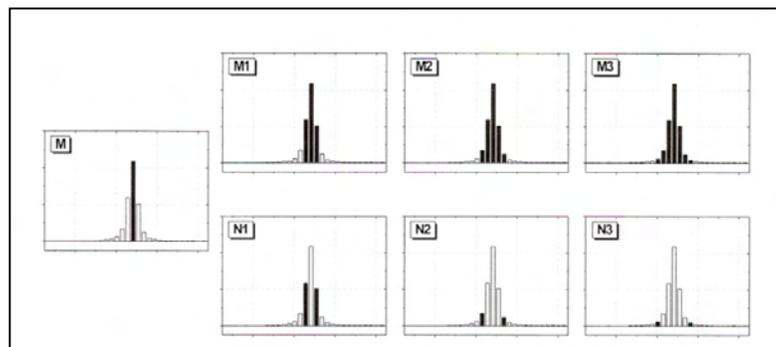
possibilidade de usar linhas principais ou secundárias para aumentar ou diminuir a sensibilidade, a possibilidade de usar diferentes áreas de integração sob a linha analítica (WSA), a possibilidade de usar pixels adjacentes (side pixel registration), para diminuir a sensibilidade e estender o intervalo linear, a determinação de moléculas diatômicas com estrutura rotacional fina e também as novas formas de correção de fundo (background). Cada uma destas características será discutida a seguir.

Existem duas razões para o uso preferencial da linha analítica principal ou mais sensível em LS AAS: i) AAS é principalmente usada na determinação de elementos traço ou ultra-traços, o que obviamente requer alta sensibilidade e ii) usar esta linha possibilita uma diluição maior, o que evita muitas potenciais interferências no caso de matrizes complexas. Em algumas situações, no entanto, a linha analítica mais sensível não é recomendada em LS AAS, por não fornecer a melhor relação sinal/ruído, como acontece com o Pb em 217,001 nm. Além disso, as linhas mais sensíveis podem não ser recomendadas devido à não linearidade da curva analítica, ocasionada pela presença de outras linhas no espectro da lâmpada que não podem ser excluídas mesmo com 0,2 nm de janela espectral, como com o Co em 340,725 nm, o Ni em 244,791 nm e o Pd em 244,791 nm<sup>13</sup>. Em HR-CS AAS estas limitações não ocorrem devido a forte intensidade da fonte contínua mesmo na região UV, o que garante uma razão sinal/ruído da mesma magnitude ao longo de todo o intervalo espectral e também a resolução do monocromador que permite uma ótima separação da linha de interesse e evita interferências. Assim, o uso de linhas principais e secundárias é promissor em HR-CS AAS.

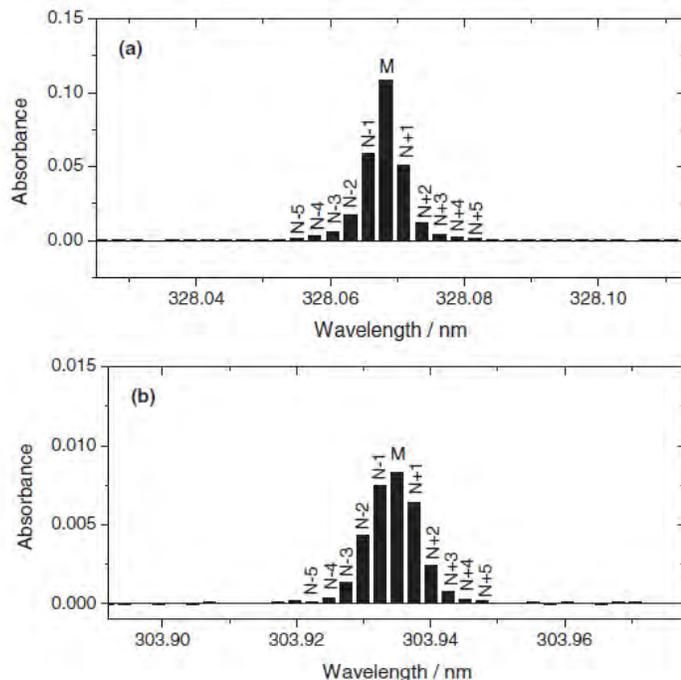
Em HR-CS AAS, é possível registrar o sinal analítico de várias formas: i) no centro da linha analítica CP M (pixel central), como é o caso em LS AAS; ii) usando uma área  $M_x$  do pico de absorção com um aumento do número de pixels selecionados; ii) ou ainda selecionando somente pixels adjacentes  $N_x$ , como pode ser visualizado na Figura 8. Quando aumenta-se a área de pico na detecção, ou seja, quando o número de pixels selecionados é aumentado, a sensibilidade pode ser melhorada, dependendo do perfil do pico<sup>12</sup>. No caso de picos de absorção atômica estreitos, como por exemplo o da prata em 328,068 nm (Figura 9), a sensibilidade obtida no pixel central (CP) é comparável com a obtida com uma lâmpada de cátodo oco. Aumentando o número de pixels para 3, isto é pixel central

$\pm 1$ , a sensibilidade e o intervalo linear aumentam significativamente, porém, uma extensão da área de integração para além de 3 pixels não faz sentido, pois somente ruído passa a ser integrado. Quando o pico é largo, como o que ocorre para o índio (Figura 9), a medida em CP é um pouco menos sensível do que com lâmpada de cátodo oco e a medida que aumenta-se o número de pixels, há uma melhora significativa na sensibilidade até  $CP \pm 3$ .

Usar pixels adjacentes para reduzir a sensibilidade e estender o intervalo linear de calibração é útil na determinação de altas concentrações. A medida que aumenta-se a distância do centro da linha analítica, diminui-se a sensibilidade e aumenta-se o intervalo linear de calibração, sendo que a extensão deste intervalo pode chegar a até 5 ordens de grandeza em concentração.



**Figura 8** - Registro do sinal analítico com o pixel central (M), com a área de pico ( $M_x$ ) e com pixels adjacentes ( $N_x$ )  
Fonte: WELZ et al., 2005.



**Figura 9** - Perfil atômico típico para (a) prata em 328,068 nm e para o (b) índio em 303,936 nm. Solução contendo  $1 \text{ mg L}^{-1}$  Ag e In  
Fonte: WELZ et al., 2005.

Os primeiros estudos sobre absorção molecular em chamas e fornos de grafite foram feitos para investigar a fonte de interferências espectrais em AAS quando a absorção molecular sobrepuja a linha analítica, ou para investigar as reações e mecanismos de atomização<sup>46</sup>.

As primeiras determinações quantitativas de não-metals usando a espectrometria de absorção molecular (MAS) foram feitas com espectrômetros de absorção atômica convencionais (média resolução) e fontes de radiação disponíveis nestes instrumentos. Os pioneiros em determinações quantitativas em MAS com atomização em chama foram Haraguchi e Fuwa em 1976 que determinaram fósforo usando uma lâmpada de deutério e absorção molecular de PO em 246 nm com chama de óxido nitroso-acetileno<sup>47</sup>. Em forno de grafite, o primeiro trabalho foi publicado por Dittrich em 1978, no qual ele investigou a absorção molecular de haletos de gálio e índio usando vaporização eletrotérmica (ETV) e uma lâmpada de cátodo oco de  $\text{H}_2$ <sup>48</sup>.

O surgimento da HR-CS AAS trouxe novo ânimo as pesquisas em absorção molecular, principalmente na determinação de não-metals, devido a alta resolução

espectral e superior capacidade de correção de fundo. Moléculas apresentam espectro complexo devido as numerosas transições rotacionais, vibracionais e eletrônicas possíveis entre os diferentes níveis de energia. As transições rotacionais e vibracionais estão presentes nas regiões de micro-ondas e infravermelho, enquanto que as eletrônicas estão na região UV-Vis. Transições eletrônicas têm sobrepostas em suas bandas componentes vibracionais e rotacionais. Assim, em moléculas poliatômicas as bandas são largas devido a alta densidade de linhas rotacionais que não podem ser resolvidas, e, portanto, não são visualizadas pelo espectrômetro de fonte contínua e de alta resolução. Já as moléculas diatômicas apresentam estruturas rotacionais finas, com larguras comparáveis as de linhas atômicas<sup>12</sup>. Entretanto, somente poucas moléculas com alta energia de dissociação podem “sobreviver” nas temperaturas de uma chama ou de fornos de grafite, ou seja, em temperaturas entre 2000-3000 °C<sup>46</sup>.

Huang e colaboradores publicaram uma série de trabalhos sobre a determinação de Br<sup>49</sup>, Cl<sup>50-51</sup>, F<sup>50,52</sup>, I<sup>53</sup>, N<sup>54</sup>, P<sup>50,55-56</sup> e S<sup>50,57-58</sup> por espectrometria de absorção molecular com fonte contínua e de alta resolução (HR-CS MAS). O flúor, por exemplo, é frequentemente determinado por métodos não espectroscópicos, pois suas linhas de ressonância estão na região UV (abaixo de 100 nm), e, então, nem mesmo um plasma indutivamente acoplado é capaz de gerar uma população significativa de átomos excitados. Por razões similares, em espectrometria de absorção atômica convencional, a determinação de F é impossível, ao menos que métodos indiretos sejam usados. Algumas tentativas de determinação usando espectros de absorção molecular de monofluoretos, principalmente monofluoretos de alumínio, foram feitas em AAS convencional. No entanto, devido a moderada resolução instrumental, estes métodos eram susceptíveis a interferências espectrais levando a errôneas correções de absorção de fundo, o que inviabiliza o uso destes métodos em análise de rotina. Em HR-CS MAS, a determinação de flúor foi feita via absorção molecular de GaF em chama de ar-acetileno<sup>52</sup>. Com um excesso de Ga na chama, todo o fluoreto foi convertido em GaF gerando um sinal para a determinação de fluoreto. As bandas de GaF estão na região entre 211 e 214 nm, sendo o máximo da banda em 211,248 nm usada para a determinação. A influência de vários ácidos concentrados e soluções de sais metálicos foi testada e nenhuma interferência espectral ou não-espectral foi observada. O método foi aplicado na determinação de

flúor em um material de referência certificado e, segundo os autores, os resultados foram confiáveis.

Um outro exemplo da utilização da espectrometria de absorção molecular com fonte contínua e de alta resolução (HR-CS MAS) é a determinação de Br em forno de grafite via AlBr em 278,914 nm e de CaBr em 625,315 nm<sup>49</sup>. Para gerar as moléculas AlBr e CaBr em forno de grafite, as soluções de alumínio (1% m/v) e de cálcio (2% m/v), respectivamente, foram adicionadas a uma solução padrão de brometo diretamente no forno de grafite e então um programa de aquecimento otimizado foi utilizado. Nenhuma interferência espectral, exceto as bandas de CaF em 625,3 nm, que interferem na absorção de CaBr, foi encontrada. No entanto, interferências não-espectrais foram encontradas para CaBr na presença de cloreto, alumínio, potássio e sódio e para AlBr na presença dos ácidos nítrico, fosfórico e sulfúrico. Portanto, estes métodos se complementam e podem ser usados de acordo com a aplicação. O método foi aplicado na determinação de bromo em uma amostra de sal e numa amostra farmacêutica, e os resultados foram concordantes com os valores de referência.

A absorção de fundo pode ser dividida em contínua e descontínua. O programa utilizado em HR-CS AAS pode corrigir automaticamente eventos contínuos, ou seja, eventos que afetam de maneira similar todos os pixels do detector e esta correção aliada à alta intensidade de emissão da fonte contínua dispensa a modulação de radiação, visto que a radiação de corpo negro emitida pelo atomizador, por exemplo, é corrigida por ser um evento contínuo. O conceito de feixe duplo simultâneo é utilizado em HR-CS AAS considerando-se em conta o caráter do detector CCD do instrumento. Embora todos os pixels sejam iluminados pela fonte de radiação e lidos simultaneamente (ao contrário do que acontece em LS AAS, onde são medidos sequencialmente), somente alguns deles são utilizados na leitura da absorção atômica, geralmente de 1 a 5 pixels, enquanto os demais podem ser selecionados automaticamente ou manualmente para corrigir flutuações que afetam da mesma maneira todos os pixels, como por exemplo, flutuações de intensidade da lâmpada. Além disso, o sistema de feixe duplo simultâneo pode corrigir qualquer mudança temporal na transmissão da radiação (como por exemplo, nos gases da chama), e também dispensa o uso de sistemas ópticos adicionais, tornando a

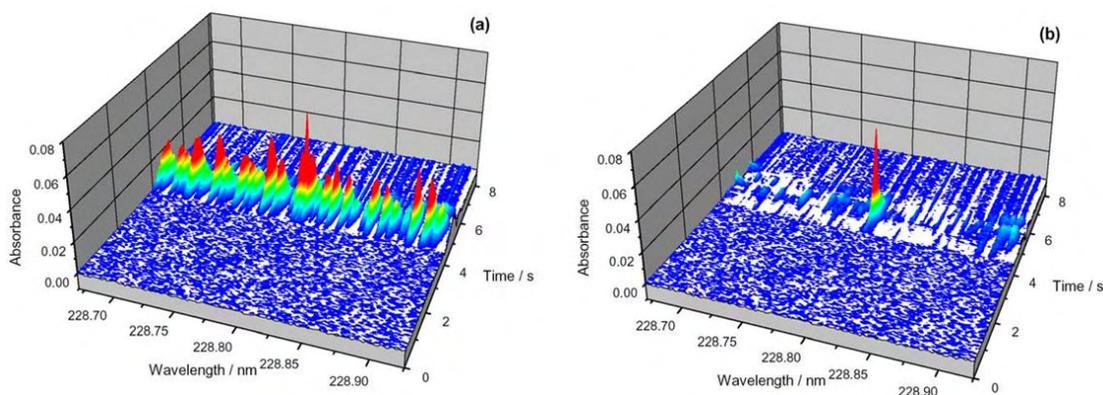
condutância óptica superior a obtida em LS AAS, resultando em uma excelente razão sinal/ruído<sup>12</sup>.

Eventos descontínuos não podem ser corrigidos pelo sistema de feixe duplo e assim, qualquer absorção atômica proveniente de outros átomos além do analito, ou moléculas diatômicas com estrutura rotacional fina permanecem visíveis, pois esta absorção muda sistematicamente com o intervalo espectral observado. As medidas de absorção de fundo por HR-CS AAS são diferentes das medidas por LS AAS em dois pontos: a) a alta resolução espectral e o detector CCD conferem ao instrumento capacidade de tornar visível a natureza e a distribuição do fundo, facilitando a sua correção; b) as medidas de absorção atômica e de fundo são simultâneas, permitindo a visualização dos sinais de fundo que aparecem mais rápido. Na maioria dos casos, não é necessário corrigir os eventos descontínuos, contanto que estes eventos não sobreponham a absorção do analito em comprimento de onda e tempo. O primeiro caso ocorre raramente devido a alta resolução do espectrômetro e o segundo caso é influenciado pela otimização do programa de aquecimento do forno de grafite.

A correção de absorção de fundo em HR-CS AAS pode ser feita de quatro maneiras: i) automaticamente quando os eventos são contínuos; ii) pela separação temporal dos sinais de absorção atômica do analito do sinal de fundo (possível somente se estes sinais surgem em períodos diferentes durante a atomização) ajustando o intervalo de integração do sinal; iii) pela separação espectral do sinal de absorção do analito do sinal de fundo (possível somente se o fundo absorver radiação em comprimento de onda diferente do analito); iv) pela subtração do espectro de absorção de fundo do espectro da amostra, utilizando um algoritmo de mínimos quadrados (LSBC), no caso de haver sobreposição temporal e espectral entre os sinais do analito e do fundo<sup>45</sup>.

Nesta correção, um espectro de referência é gerado, no qual um fundo estruturado é produzido, normalmente utilizando-se um sal. Este espectro é então subtraído utilizando o algoritmo dos mínimos quadrados. O procedimento matemático envolve um ajuste linear do espectro de referência para cada espectro da amostra. O espectro de referência é então aumentado ou diminuído pela multiplicação por um fator de magnificação. As diferenças entre o espectro de referência e o espectro da amostra, assim como seus quadrados são calculados

pixel a pixel e a soma dos valores quadrados sobre todos os pixel é obtida. O fator de magnificação é variado para minimizar a soma dos quadrados, ou seja, encontrar os mínimos quadrados<sup>14</sup>. Um exemplo da correção de fundo utilizando os mínimos quadrados ocorre na determinação de Cd em urina empregando o forno de grafite<sup>12</sup>. Bandas moleculares de PO com estrutura rotacional fina formadas no forno de grafite, provenientes da urina, sobrepuseram temporal e espectralmente o sinal atômico do Cd em 228,802 nm, como pode ser observado na Figura 10a. A interferência foi removida subtraíndo-se o espectro de referência de PO dos espectros das amostras, utilizando os mínimos quadrados, e desta forma obteve-se o sinal atômico do Cd livre de interferência (Figura 10b).



**Figura 10** - Espectro tridimensional (absorbância em função de tempo e comprimento de onda) para amostra de urina na vizinhança da linha analítica do Cd em 228,802 nm (a) sem correção; e (b) após correção usando LSBC  
Fonte: WELZ et al., 2005.

Um outro exemplo de correção de fundo, acontece na determinação de bismuto no dublete 306,745/306,772 nm em chama ar/acetileno, onde o sinal do dublete é sobreposto pela banda de absorção molecular do radical OH. Neste caso, a própria chama produz as bandas de OH. A absorção molecular do OH, está sujeita a flutuações e isso contribui para o nível de ruído da medida. Porém, um espectro de referência do radical OH pode ser detectado sobre o intervalo espectral de interesse, medindo a absorção da chama sem analito. Este espectro é então subtraído de cada

espectro individual medido para a amostra, utilizando o algoritmo de mínimos quadrados, resultando no sinal atômico de interesse<sup>12</sup>.

A presença de elementos concomitantes nas amostras podem levar ao aparecimento de linhas de absorção adicionais ao espectro do analito. Quando estas linhas sobrepõem a linha atômica e não podem ser separadas temporalmente, é possível realizar a correção usando linhas adjacentes e/ou secundárias, isto se o elemento interferente possuir uma outra linha dentro do intervalo espectral visualizado. Na determinação de Zn em ferro e em aço inoxidável usando absorção atômica em chama, a linha do Fe em 213,859 nm não pode ser completamente resolvida da linha do Zn em 213,856 nm, resultando em uma interferência espectral em AAS convencional com ou sem correção de fundo. Mesmo em HR-CS AAS estas linhas não podem ser resolvidas. No entanto, uma segunda linha de Fe em 213,970 nm está presente na mesma janela espectral e assim, como a razão das absorbâncias entre as duas linhas de ferro permanece constante, desde que ambas estejam dentro do intervalo linear de calibração, é possível medir a absorbância de Fe em 213,970 nm, calcular a correspondente absorbância na linha interferente do Fe e então subtrair este valor da absorbância do Zn em 213,856 nm.

Como detalhado, a HR-CS AAS apresenta vantagens: i) melhora na razão sinal/ruído devido à elevada intensidade da fonte de radiação, resultando em melhor precisão e limites de detecção; ii) diminuição dos custos analíticos, uma vez que essa fonte de radiação emite linhas analíticas em uma ampla faixa linear; iii) tanto as linhas de absorção principais como as secundárias são úteis e podem ser utilizadas, até concomitantemente; a medida em vários comprimentos de onda para um mesmo elemento pode levar a excelentes limites de detecção se as respectivas absorbâncias forem somadas; ainda, a utilização das linhas principais e secundárias (mais fracas) poderá estender a faixa linear de trabalho em relação aos equipamentos de fonte discreta; iv) novos elementos poderão ser determinados, para os quais fontes discretas de radiação ainda não são disponíveis, como por exemplo, a determinação de não-metais, como P e S que poderá ser feita via bandas de absorção molecular em chama, em decorrência de estruturas rotacionais finas de moléculas diatômicas como PO e CS; v) toda a região espectral nas vizinhanças da raia analítica torna-se "visível", possibilitando mais informações do que as obtidas por instrumentos convencionais de absorção atômica; vi) a detecção

com arranjo de carga acoplada possibilita uma correção simultânea real da radiação de fundo nas proximidades da raia analítica; vii) o programa de controle do instrumento possibilita a armazenagem de espectros de referência, por exemplo, o espectro de absorção molecular com estruturas rotacionais finas e a subsequente subtração desse do espectro de uma amostra, usando-se o algoritmo dos mínimos quadrados, viabilizando dessa forma a correção de fundo estruturado mesmo sob a raia analítica; viii) embora ainda não disponível, se um detector bidimensional apropriado for usado o sistema permitirá em AAS medidas simultâneas multielementares, prática comum em espectrometria de emissão óptica, mas sem os riscos de sobreposição de linhas desta última técnica; ix) o programa do espectrômetro permite o processamento pós-leitura dos sinais, permitindo selecionar pixels de referência adequados e definir limites de integração; x) a mudança rápida da composição da chama para os diferentes elementos pode não ser adequadamente efetuada, e neste caso a padronização interna poderá aperfeiçoar esse processo; xi) correção automática para eventos contínuos, tais como, absorção molecular e outros fenômenos em banda larga como emissão do atomizador; xii) melhor desempenho analítico na determinação de elementos-traço em matrizes complexas<sup>14</sup>. A potencialidade desta técnica vem sendo empregada em alguns trabalhos recentemente publicados, sendo que algumas das recentes aplicações (a partir de 2000) com o uso da espectrometria de absorção atômica em chama com fonte contínua e de alta resolução estão apresentadas no quadro 1.

**Quadro 1** - Algumas aplicações da HR-CS AAS com atomização em chama

<b>Analito</b>	<b>Amostra</b>
Zn, Cd, Bi, Ni, Pb e Sb	Cobre de alta pureza (materiais elétricos) <sup>13 *</sup>
Cd, Cr, Pb e Zn	Água mineral <sup>13 **</sup>
Na e K	Ração animal e produtos farmacêuticos <sup>13 **</sup>
Zn	Ferro e aço <sup>13 **</sup>
P (PO)	Materiais de referência: escória de Fe <sup>55</sup>
P (PO)	Materiais de referência: fertilizantes e material vegetal <sup>56</sup>
S (CS)	Vinhos <sup>57</sup>
S (CS)	Materiais de referência: Moldes de Fe <sup>58</sup>
F	Material de referência: fertilizante <sup>52</sup>
Cl	Materiais de referência: leite em pó; sedimentos marinhos <sup>51</sup>
Ni e Pb	Água mineral <sup>59</sup>
Cu, Cr, Fe, Ni, Sb, Pb, Zn	Óleos lubrificantes <sup>60</sup>
Pb	Ácido Fosfórico <sup>61</sup>
Cu, Fe, Mn, Zn	Solos <sup>62</sup>
Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn e Zn	Folhas <sup>63</sup>
Al, Ba, Mo, Si e V	Óleos lubrificantes <sup>64</sup>
B (isótopos)	Aço <sup>65</sup>
As, Bi, Cd, In, Pb, Se, Te, Tl (hidretos)	Vários materiais certificados <sup>66</sup>
B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, P, S e Zn	Folhas <sup>67</sup>
Zn	logurte <sup>68</sup>
Pb	Ácido fosfórico <sup>69</sup>

\* HUANG et al., 2001 apud WELZ, 2005, p. 216.

\*\* SCHLEMMER et al., 2004 apud WELZ, 2005, p. 213-215.

### 2.3 Métodos Analíticos para a determinação de macro e micronutrientes em folhas

Os nutrientes essenciais mais frequentemente monitorados em diagnósticos nutricionais<sup>2</sup> são os macronutrientes N, P, K, Ca, Mg, S, e os micronutrientes B, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn. De modo geral, os métodos de determinação desses elementos estão bem estabelecidos na literatura, e a sua maioria requer dissolução da amostra via seca por incineração ou via úmida em sistemas abertos ou fechados.

As técnicas empregadas na determinação destes elementos são bem variadas, desde a gravimetria, espectrofotometria e titrimetria, até as instrumentais mais complexas como espectrometria de absorção atômica (AAS), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

Nitrogênio é comumente determinado em plantas pelo método Kjeldahl<sup>1,4,9-10,70</sup> ou Nessler<sup>3,9</sup>, sendo o primeiro considerado oficial pela AOAC. O método de Kjeldahl foi desenvolvido em 1883 e continua sendo um dos métodos mais usados para a determinação de nitrogênio em diversas amostras. Outro método empregado na determinação de nitrogênio em plantas é o método do Indofenol<sup>9,71</sup>. Neste método a amônia reage com hipoclorito e fenol em meio alcalino (reação de Berthelot) produzindo o azul de indofenol, o qual é a base de um método espectrofotométrico sensível e específico para a determinação de nitrogênio na forma de amônia.

Os métodos oficiais da AOAC para a determinação de fósforo em plantas são a gravimetria e os espectrofotométricos do azul de molibdênio e amarelo de molibdênio<sup>1,3,9-10,70,72-74</sup>. Estes métodos também são os mais comumente empregados. As plantas geralmente analisadas por estes métodos são digeridas em meio nítrico-perclórico ou incineradas em mufla seguida da dissolução das cinzas em ácido clorídrico. O método do azul de molibdênio é baseado na complexação do íon ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3+}$ ), em presença de ácido molíbdico ( $\text{H}_2\text{MoO}_4$ ), que em meio fortemente ácido e com um agente redutor apropriado (ex: ácido ascórbico), converte o  $\text{Mo}^{6+}$  em  $\text{Mo}^{3+}$ , produzindo o ácido fosfomolíbdico [ $\text{H}_3\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})\cdot\text{H}_2\text{O}$ ], de coloração azul, cuja intensidade da cor é proporcional concentração de fósforo na amostra. No método do amarelo de molibdênio, a adição de molibdato para um meio ácido contendo ortofosfato e vanadato resulta na formação do ácido

molibdovanadofosfórico, que possui coloração amarela e absorve em 315 nm. Também existem propostas de utilização destes métodos de maneira automatizada, principalmente empregando análise por injeção em fluxo<sup>72,75-76</sup>.

Os métodos oficiais para a determinação de potássio em plantas são a gravimetria e espectrometria de emissão atômica (AES)<sup>70</sup>, sendo esta última a mais comumente empregada<sup>1,3,10</sup>. A digestão das amostras é geralmente feita em meio nítrico-perclórico com bloco digestor. Devido aos teores normalmente altos deste macronutriente em plantas, as amostras são diluídas antes da determinação. A determinação de potássio em plantas por AES por análise por injeção em fluxo<sup>77</sup> é também encontrada. Outras técnicas para potássio em plantas são encontradas na literatura, sendo as mais empregadas a ICP-OES, a fluorescência de raio-x<sup>78</sup> e a cromatografia iônica<sup>79-80</sup>.

Cálcio e Mg são normalmente determinados em plantas por LS FAAS que é o método oficial de análise destes elementos<sup>70</sup>. Assim como acontece com o K, a digestão das amostras para determinar Ca e Mg é geralmente feita em meio nítrico-perclórico. A incineração em mufla com posterior dissolução das cinzas em ácido clorídrico também é muito usada. Devido aos altos teores normalmente encontrados destes macronutrientes em plantas, as amostras são diluídas antes das determinações. A adição de lantânio é requerida na determinação de Ca e Mg por AAS visando minimizar interferências provocadas por fosfatos e silicatos que formam compostos mais estáveis com os analitos dificultando a atomização dos mesmos. A titrimetria pode também ser utilizada para determinar Ca e Mg em plantas<sup>1,81-82</sup>. Neste caso, os íons interferentes são eliminados inicialmente por troca iônica, precipitação ou extração com solvente para posterior quantificação de Ca e Mg por complexação com EDTA utilizando os indicadores negro de eriocromo T (em pH 10) para a quantificação de Ca e Mg e o azul de eriocromo R (em pH 12) para a quantificação de Ca. A maior limitação deste método é a presença de ferro, manganês, cobre, alumínio e fosfato, que em plantas estão presentes em concentrações suficientes para interferir em ambas as titulações. Além da LS FAAS e da titrimetria, outras técnicas para a determinação de Ca e Mg em plantas são encontrados na literatura, como a ICP-OES<sup>83</sup>, a fluorescência de raio-x<sup>78</sup> para o Ca e a cromatografia iônica para Ca e Mg<sup>79-80</sup>.

A gravimetria é a técnica analítica da AOAC para determinar enxofre em plantas<sup>70</sup>. A determinação gravimétrica baseia-se na precipitação do enxofre pelo cloreto de bário ( $\text{BaCl}_2$ ) na forma de sulfato de bário ( $\text{BaSO}_4$ ). Apesar de ser a técnica oficial, a gravimetria não é muito indicada para análise de rotina, pois as etapas e procedimentos envolvidos são bem trabalhosos e/ou demorados. A turbidimetria é a técnica mais usada para enxofre em plantas<sup>1,9-10</sup> por ser mais rápida, sensível e compatível para análises de rotina<sup>84</sup>. Outro método encontrado para determinar enxofre é o espectrométrico do azul de metileno<sup>9</sup>. Neste método, o enxofre na forma de sulfato é reduzido por HI e hipofosfito, gerando  $\text{H}_2\text{S}$ , que é arrastado por um fluxo de nitrogênio e coletado em solução de acetato de zinco, formando  $\text{ZnS}$ . Em meio ácido o sulfeto de zinco reage com *p*-aminodimetilanilina e Fe (III) para gerar o azul de metileno.

O micronutriente B é geralmente determinado em plantas usando métodos espectrofotométricos, tais como, o da curcumina, carmina, azul de metileno, azometina H e quinalizarina, sendo este último o oficial pela AOAC. Os métodos mais empregados são o da azometina H e da curcumina<sup>1,9-10</sup>. O método da Azometina H é baseado na formação de um complexo de coloração amarela resultante da reação do ácido bórico com o reagente azometina H. Este método é considerado sensível e preciso, porém possui um alto custo operacional e usa reagente tóxico. O método da curcumina fundamenta-se na reação entre o ânion borato e a curcumina em presença de ácido oxálico, havendo a formação de um complexo, predominantemente constituído de rubrocurcumina, solúvel em álcool etílico. Estes métodos espectrofotométricos são bastante susceptíveis a interferências por outros metais, tais como o Al, Cu, Fe, Zn e Mo<sup>85</sup>. Estas possíveis interferências e a baixa sensibilidade algumas vezes limita a aplicação destes métodos para análise de plantas.

O preparo de amostra mais usado para determinação de B é a incineração, uma vez que a digestão via úmida pode provocar perdas de ácido bórico por volatilização<sup>1</sup>. O B também pode ser determinado por AES ou AAS utilizando chama ou forno de grafite. Em chama, devido a sensibilidade limitada desta técnica, a determinação de B em plantas requer separação e pre-concentração para obtenção de resultados confiáveis. Em forno de grafite, resultados aceitáveis só são obtidos com o uso de modificadores químicos, devido a problemas como limites de detecção

ruins e baixa sensibilidade, causados por dissociação ineficiente de espécies contendo B e também por efeitos de memória. A ICP-OES e a ICP-MS são técnicas bastante promissoras para a determinação de B em plantas, pois oferecem maior rapidez, melhor sensibilidade e ótimos limites de detecção<sup>85</sup>.

Os métodos oficiais de determinação de Cu em plantas são baseados em LS FAAS e espectrofotometria (método do ditiocarbamato)<sup>70</sup>, que são as mais usadas rotineiramente na análise de plantas<sup>1,9</sup>. O método do ditiocarbamato fundamenta-se na reação entre o dietilditiocarbamato de sódio e o cobre, formando um complexo amarelo escuro, o dietilditiocarbamato de Cu. Interferências provenientes de outros metais, que também formam compostos coloridos, podem ser eliminadas pela adição do agente mascarante EDTA, que complexa os demais elementos.

Os métodos oficiais de determinação de Fe em plantas são baseados em LS FAAS, espectrofotometria (método da orto-fenantrolina) e titrimetria<sup>70</sup>. Atualmente, a LS AAS é a mais usada destas técnicas para determinar Fe em plantas por ser a mais rápida e adequada para análise de rotina. Entre os procedimentos de preparo de amostras mais empregados estão a incineração e os métodos de digestão via úmida, nos quais várias misturas de ácidos são empregadas. O método espectrofotométrico da orto-fenantrolina<sup>9</sup> é baseado na reação da orto-fenantrolina com os íons  $\text{Fe}^{2+}$  em meio fracamente ácido. O Zn, outro micronutriente presente nas amostras de folhas pode interferir na determinação de Fe(II), pois este pode reagir com a orto-fenantrolina formando um complexo incolor que é mais estável do que o complexo com Fe. A adição de EDTA como agente mascarante elimina essa interferência.

Segundo a AOAC os dois métodos oficiais de determinação de Mn em plantas são os que empregam as técnicas LS FAAS e a espectrofotometria (método do permanganato)<sup>70</sup>. O método espectrofotométrico do permanganato é baseado na oxidação dos íons  $\text{Mn}^{2+}$  por fortes agentes oxidantes em meio ácido gerando os íons  $\text{MnO}_4^-$ . O periodato de potássio e o persulfato de amônio são os dois reagentes mais comuns na oxidação de  $\text{Mn}^{2+}$ . Este método é bem seletivo, mas é um dos menos sensíveis dos métodos espectrofotométricos. Quando maior sensibilidade é requerida, o método espectrofotométrico da formaldoxima pode ser usado.

Segundo a AOAC, Mo pode ser determinado em plantas pelo método espectrofotométrico do tiocianato<sup>70,86-87</sup>. Mo(VI) reage em meio ácido com íons

tiocianato, na presença de agentes redutores, formando vários complexos de Mo(V), que são a base da determinação de Mo. O mecanismo de reação é complexo e por isso é essencial manter as condições de reação constantes para que boa reprodutibilidade seja obtida. A absorbância pode ser medida em soluções aquosas ou então em solventes orgânicos que podem ser usados para extrair este complexo da fase aquosa. Outro método espectrofotométrico usado para determinar Mo em plantas é o método do ditiol<sup>9-10,88</sup>. Neste método, o ditiol (tolueno-3,4-ditiol) reage com o Mo(VI) em meio fortemente ácido para formar um complexo verde que é extraído com solventes orgânicos. A fase orgânica contendo o complexo de Mo é usada para determinar Mo. O Mo também pode ser determinado por AAS em chama ou em forno de grafite. Os limites de detecção geralmente encontrados para Mo usando LS FAAS não são baixos suficientemente para determinar Mo em plantas. Além disso, vários elementos podem interferir. Desta forma, utiliza-se a extração líquido-líquido para concentrar e separar o Mo da maioria dos interferentes. Em forno de grafite, a determinação de Mo em plantas geralmente é feita acompanhada de uma separação<sup>89</sup>.

A ICP-OES e a espectrofotometria (método do iodeto de potássio – peróxido de hidrogênio) são também promissoras na determinação de Mo em plantas. Ambas as técnicas são adequadas<sup>7</sup>, mas a escolha por uma delas depende da sensibilidade requerida para a determinação.

De acordo com a AOAC, Zn pode ser determinado em plantas por LS FAAS e espectrofotometria (método da ditizona)<sup>70</sup>. Apesar desta última ser oficial, ela não é muito aplicada para amostras de plantas. O método espectrofotométrico do zincon é mais frequentemente utilizado para determinar Zn em plantas<sup>1,90</sup>. Neste método, o zincon (2-carbóxi-2'-hidróxi-5'-sulfoformazilbenzeno) reage com o  $Zn^{2+}$  em meio levemente alcalino para formar um complexo azul. Este método sofre interferências de outros metais, e por isto o Zn é separado antes da análise.

O maior desafio enfrentado no campo das análises químicas foliares é adequar o preparo de amostra com a capacidade de detecção das técnicas disponíveis, de forma que as concentrações dos elementos sejam determinadas com confiança. Geralmente, são necessários vários procedimentos de preparo de amostra e vários métodos ou técnicas para determinar os nutrientes mais importantes. Desta forma, a busca por métodos analíticos multielementares que

utilizem o mínimo preparo da amostra, no qual apenas uma porção da amostra é suficiente para a determinação conjunta de vários elementos é cada vez maior. Métodos multielementares de determinação de macro e micronutrientes apresentam como vantagens em análise de rotina em larga escala, redução do tempo de análise e dos custos analíticos, baixo risco de contaminação ou perda da amostra.

A ICP-OES e a ICP-MS destacam-se entre as técnicas multielementares. Os baixos limites de detecção destas técnicas tornaram-as adequadas para determinação de baixas concentrações, principalmente a ICP-MS. Elas são rápidas e possuem amplo intervalo linear. As interferências espectrais (ICP-OES) e isobáricas (ICP-MS) frequentemente enfrentadas podem ser facilmente resolvidas com o uso de linhas alternativas em ICP-OES, interfaces de reação e colisão, equações matemáticas e/ou utilização de um isótopo alternativo do analito em ICP-MS. Devido a alta sensibilidade de ambas, principalmente da ICP-MS, muitas vezes as amostras devem ser bastante diluídas, o que pode acarretar erros às medidas. O custo associado com o emprego destas técnicas, principalmente em ICP-MS é o que ainda limita a aplicação das mesmas em rotina.

O único método oficial da AOAC para determinação multielementar emprega ICP-OES<sup>70</sup>. As amostras de plantas devem ser preparadas via seca por incineração com posterior dissolução das cinzas em ácidos nítrico e clorídrico. Este método contempla os nutrientes B, Ca, Cu, K, Mg, Mn, P e Zn. Além deste método, outros trabalhos publicados contemplam alguns dos principais macro e micronutrientes determinados em plantas<sup>5,74,91-94</sup>. Anderson<sup>5</sup> desenvolveu um método para determinação multielementar de Na, K, Mg, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Cd, Pb, P e S em plantas por ICP-OES. Além de alguns dos principais nutrientes, outros metais muitas vezes tóxicos às plantas também foram determinados. Isso foi possível porque os autores propuseram uma micro-digestão da amostra, utilizando uma pequena massa de amostra, pequenos volumes de reagentes e um volume final reduzido, o que possibilitou a determinação dos elementos mais e menos concentrados por ICP-OES. O método foi eficiente, preciso e destacou-se pela alta frequência e velocidade analíticas e pelo baixo consumo de reagentes e geração de resíduos.

Masson e colaboradores<sup>91</sup> propuseram a determinação simultânea de N, P, K, Ca, Cu, Mg, Fe, Mn and Zn em plantas por ICP-OES após digestão das amostras

por um procedimento Kjeldahl modificado (ácido sulfúrico e água oxigenada). Seis materiais de referência certificados foram avaliados e boa exatidão e reprodutibilidade foram encontradas para P, K, Ca, Mg, Mn and Zn. No entanto, para Cu e N a sensibilidade da técnica foi insuficiente para obter bons resultados e para o Fe os resultados foram insatisfatórios, possivelmente por interferências de matriz.

Um procedimento de digestão foi desenvolvido para amostras de plantas para a determinação multielementar e sequencial de Al, B, Ba, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S, Sr e Zn por ICP-OES<sup>92</sup>. Após digestão das amostras assistida por radiação micro-ondas, o volume final do digerido foi de 100 mL, no qual foram determinados Al, B, Ba, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, P, S, Sr e Zn após otimização das condições do espectrômetro. Para Ca e K os digeridos foram diluídas 10 vezes antes da determinação. Quatro materiais de referência de folhas foram analisados e bons resultados foram obtidos. Boas recuperações também foram encontradas demonstrando que o método é simples e efetivo para estes elementos. Os autores também testaram este método para outros nutrientes como Mo, mas a sensibilidade da técnica não foi suficiente mesmo com nebulizador ultrassônico.

A determinação multielementar de 30 elementos (Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Sb, Se, Si, Sr, Th, Ti, Tl, U, V e Zn) em plantas e grãos por ICP-MS foi proposta por Feng e colaboradores<sup>93</sup>. A digestão das amostras foi feita em forno de micro-ondas com os ácidos nítrico e fluorídrico para total dissolução das mesmas. A quantidade de HF usada foi baixa, porém suficiente para a digestão, e assim a possível precipitação de fluoretos no digerido (sem a etapa com ácido bórico) não foi significativa. Uma vez que o uso do ácido bórico não foi necessário, a determinação de B foi possível neste mesmo digerido. Alguns problemas de interferências isobáricas provenientes da amostras foram observados para  $^{51}\text{V}^+$ ,  $^{53}\text{Cr}^+$ ,  $^{57}\text{Fe}^+$ ,  $^{59}\text{Co}^+$ ,  $^{60}\text{Ni}^+$ ,  $^{75}\text{As}^+$  e  $^{77}\text{Se}^+$  e corrigidos por seleção de isótopos alternativos ou equações matemáticas. Alguns materiais de referência foram analisados e os resultados foram concordantes com os valores certificados para todos os elementos. Como pode ser observado este método permite a determinação dos principais nutrientes para diagnóstico nutricional de plantas.

Masson e colaboradores<sup>94</sup> propuseram a determinação de alguns elementos-traço, As, Cd, Co, Cr, Cu, Mo, Ni e Pb em amostras de plantas usando ICP-MS. A

padronização interna com Rh foi eficientemente usada para compensar efeitos de matriz. A exatidão do método foi verificada usando materiais de referências certificados de plantas digeridos de acordo com dois procedimentos: incineração e digestão em micro-ondas. Não foram encontradas diferenças significativas entre os valores encontrados e os certificados. Os macroelementos Al, B, Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn também foram determinados e os valores concordaram com os certificados. No entanto, o Sc foi usado como padrão interno neste caso, pois seu desempenho foi mais efetivo.

Recentemente, a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado e ablação a laser (LA-ICP-MS) também vem se destacando na análise de nutrientes em plantas. Suas principais vantagens são: análise direta de sólidos para metais e não metais em concentrações traço sem preparo de amostra, fornecimento de informação sobre a distribuição elementar, baixo risco de contaminação e análise em grande escala. Esta técnica foi empregada para o mapeamento quantitativo dos nutrientes K, Mg, Mn, Cu, P, S e B em folhas por Wu e colaboradores<sup>95</sup>. As folhas foram escaneadas diretamente com um laser focalizado e o material que sofreu ablação foi transportado com argônio até o quadrupolo do ICP-MS, no qual as intensidades dos íons  $^{39}\text{K}^+$ ,  $^{24}\text{Mg}^+$ ,  $^{55}\text{Mn}^+$ ,  $^{63}\text{Cu}^+$ ,  $^{31}\text{P}^+$ ,  $^{34}\text{S}^+$  e  $^{11}\text{B}^+$  foram medidas para estudar a distribuição dos elementos de interesse. Os resultados demonstraram que a técnica tem grande potencial para o mapeamento direto de nutrientes em folhas.

Alguns trabalhos empregando a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) na determinação de nutrientes em plantas também podem ser encontrados na literatura<sup>96-98</sup>. Esta técnica é semelhante a LA-ICP-MS, mas o laser faz a ablação e cria o plasma simultaneamente. Em LIBS a emissão espectral, o qual ocorre como um resultado da subsequente relaxação das espécies constituíntes excitadas, é medida por um espectrômetro apropriado.

Outro trabalho recente e interessante sobre determinação de nutrientes em plantas é o proposto por Menesatti e colaboradores<sup>99</sup>. Neste trabalho, os autores propõem o uso de um espectrofotômetro portátil (VIS-NIR) para avaliar o estado nutricional de folhas de laranjeira. Este método é não-destrutivo e de custo razoavelmente baixo e foi usado para determinar N, P, K, Ca, Mg, Fe, Zn e Mn. Este espectrofotômetro portátil emprega um leitor (similar a uma caneta) que mede a reflectância espectral em cada folha seguida de uma calibração “branca” (medida de

pequenas variações no nível da luz externa). Os resultados para N, P, K, Ca, Mg, Fe, Zn e Mn foram comparados com os obtidos por Kjeldahl para N e por ICP-OES para os demais e apresentaram boa concordância.

O surgimento da HR-CS AAS também tem grande potencial para diagnose foliar. A evolução da LS AAS para a HR-CS AAS possibilitou que a AAS até então utilizada como técnica monoelementar passasse a ser empregada em determinações multielementares. Isso foi possível, pois em HR-CS AAS apenas uma lâmpada emite uma ampla faixa de comprimentos de onda, sendo possível determinar vários elementos sequencialmente. Além disso, a intensidade desta lâmpada melhorou consideravelmente os limites de detecção, o que é importante na determinação de micronutrientes presentes em menores concentrações. Recentemente, esta técnica foi utilizada na determinação multielementar de Ca, Mg, K, Cu, Fe, Mn e Zn em folhas de cana-de-açúcar<sup>63</sup>. Várias ferramentas interessantes desta técnica foram utilizadas, como a correção de fundo com os mínimos quadrados para corrigir interferência espectral da molécula de NO sobre a linha principal do Zn, a avaliação de comprimentos de onda alternativos nas adjacências da linha atômica secundária do Mg e o uso de linhas secundárias para Ca e K para reduzir sensibilidade e estender os intervalos lineares destes elementos, evitando assim diluições e possíveis erros as medidas.

Esta técnica também foi empregada na determinação de 11 nutrientes (B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, P, S e Zn) em folhas de cana-de-açúcar e de laranja<sup>67</sup>. Algumas estratégias no preparo da amostra e instrumentais foram utilizadas para possibilitar a determinação destes elementos em apenas uma porção da amostra, tais como, a incineração, que possibilitou o emprego de uma maior massa da amostra, a extração do Mo com MIBK que possibilitou a pré-concentração e separação deste elemento, a utilização da absorção molecular para determinar S e a integração de uma área maior para B, Mo, P e S, que contribuiu para aumentar a sensibilidade. Estes dois trabalhos fazem parte desta tese, na qual serão apresentadas e discutidas as potencialidades e limitações desta técnica no campo de análises foliares.

### 3. PROPOSTA DE TRABALHO

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar as potencialidades da espectrometria de absorção atômica em chama com fonte contínua e de alta resolução (HR-CS FAAS) visando à determinação de macro e micronutrientes. Os principais pontos que foram alvo de estudo neste trabalho são os seguintes:

- a) avaliar procedimentos de preparo de amostras de folhas de cana-de-açúcar e de laranja visando à determinação de macro e micronutrientes por HR-CS FAAS;
- b) desenvolver métodos analíticos para determinar B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, P, S e Zn em folhas de cana-de-açúcar e de laranja, estabelecendo as principais figuras de mérito;
- c) estudar o potencial de uso de linhas adjacentes e secundárias na correção de interferências espectrais e melhoria em sensibilidade, respectivamente;
- d) utilizar os resultados da análise química em diagnóstico nutricional (DRIS) das culturas de cana-de-açúcar e laranja.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Instrumentos e Acessórios

O espectrômetro de absorção atômica em chama com fonte contínua e de alta resolução utilizado foi o ContrAA 300 (AnalytikJena<sup>®</sup>, Alemanha) equipado com uma lâmpada de arco curto de xenônio de 300 W (XBO 301, GLE<sup>®</sup>, Alemanha) operando em modo “hot spot” com emissão de radiação de 190 a 900 nm. O controle dos gases e o ajuste da altura do queimador foram feitos automaticamente.

O espectrômetro de absorção atômica em chama com fonte de linhas AAnalyst 100 (Perkin Elmer<sup>®</sup>, Alemanha) foi utilizado como técnica comparativa. Como fontes de radiação foram utilizadas lâmpadas de catodo oco para Cu (324,8 nm), Fe (248,3 nm), Mn (279,5 nm), Zn (213,9 nm), Ca ( 422,7 nm) e Mg (285,2 nm). O modo de emissão foi usado para o K (766,5 nm). Lâmpada de deutério foi utilizada para correção de fundo.

As amostras foram secas em estufa com circulação forçada de ar TE-394/2 (Tecnal<sup>®</sup>) e moídas em moinho criogênico (Freezer/Mill 6850<sup>®</sup>) e em moinho de facas (Willey Tecnal<sup>®</sup> 648 com peneira de 20 mesh). A decomposição das amostras por via úmida foi feita em bloco digestor (TE - 040/25 Tecnal<sup>®</sup>), em forno de micro-ondas (Perkin Elmer - Anton Paar Multiwave<sup>®</sup>, Áustria) equipado com frascos de quartzo e de polietileno com capacidade de 50 mL e em forno de micro-ondas Multiwave 3000 (Anton Paar<sup>®</sup>) com 48 posições e equipado com frascos de 25 mL de PFA. A decomposição por via seca foi feita em mufla (EDG 7000<sup>®</sup>).

Para a determinação de fósforo pelo método do amarelo de molibdênio foi usada uma bomba peristáltica modelo ISM 761 (Ismatec<sup>®</sup>), um injetor-comutador e um espectrofotômetro modelo 432 (Femto<sup>®</sup>). Para a determinação de enxofre por turbidimetria foi usado um agitador magnético modelo PC 320 (Corning<sup>®</sup>) e um espectrofotômetro modelo B542 (Micronal<sup>®</sup>) operante a 410 nm. Entre outros equipamentos e materiais volumétricos utilizados destacam-se a balança analítica (Bel Engineering<sup>®</sup>) e as micropipetas Eppendorf<sup>®</sup> (100 – 1000 L), Eppendorf<sup>®</sup> (1000 – 5000 L) e Boeco (5 - 100 L).

#### 4.1.2 Reagentes, soluções, amostras e materiais de referência certificados

Todas as soluções foram preparadas com água desionizada de alta pureza (resistividade 18,2 M $\Omega$  cm) obtida a partir de um sistema de osmose reversa Millipore Rios 5<sup>®</sup> combinado com desionizador Millipore Milli-Q academic<sup>®</sup>. Ácidos nítrico 16 mol L<sup>-1</sup> e 70% (m/m) (Spectrum Chemical<sup>®</sup>) e clorídrico 12 mol L<sup>-1</sup> e 37% (m/m) (Merck<sup>®</sup>) foram utilizados para a decomposição das amostras e também no preparo das curvas analíticas. Ácido perclórico 12 mol L<sup>-1</sup> e 71% (m/m) (Merck<sup>®</sup>), peróxido de hidrogênio 30% (m/m) (Merck<sup>®</sup>), ácido fluorídrico 28 mol L<sup>-1</sup> e 48% (m/m) (Merck<sup>®</sup>) e ácido bórico (P.M. 61,83 g mol<sup>-1</sup>) 99,5% (Synth<sup>®</sup>) também foram utilizados na decomposição das amostras. Na determinação de Mo utilizou-se metil isobutil cetona (Tedia<sup>®</sup>).

Soluções estoque monoelementares 1000 mg L<sup>-1</sup> de Mo, Mg, Cu, Fe, K, Mn Zn, B e Ca foram preparadas a partir dos respectivos padrões espectroscópicos (Normex<sup>®</sup>, Carlo Erba) por diluição do conteúdo das ampolas em balões de 1000 mL com água.

Soluções estoque 5000 mg L<sup>-1</sup> P e S foram preparadas dissolvendo-se 8,88 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) e 9,60 g de MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O (Spectrum<sup>®</sup>) em 250 mL de água desionizada.

Para a determinação espectrofotométrica de P, solução estoque 1000 mg L<sup>-1</sup> P foi preparada pela dissolução de 0,9286 g de NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Mallinckrodt Baker<sup>®</sup>) em 250 mL de água desionizada.

Para a determinação turbidimétrica de S, empregou-se solução estoque 50,4 mg L<sup>-1</sup> sulfato que foi preparada dissolvendo-se 0,09225 g de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Spectrum<sup>®</sup>) em 1000 mL de água deionizada.

As soluções estoque foram armazenadas em frascos de polipropileno de alta densidade e sob refrigeração. As soluções analíticas multielementares foram preparadas diariamente pela diluição apropriada das soluções estoque monoelementares. As soluções analíticas contendo Ca e Mg foram preparadas em meio 1% (m/v) La.

Solução estoque 5% (m/v) La foi preparada dissolvendo-se 58,6 g La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (J. T. Baker<sup>®</sup>) em cerca de 250 mL de ácido clorídrico concentrado e diluindo-se a 1000 mL com água.

Solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH foi preparada pela dissolução de 2 g de NaOH (J. T. Baker<sup>®</sup>) em 500 mL de água desionizada. Esta solução foi padronizada por titulação com hidrogenofteralato de potássio e indicador fenolftaleína. A concentração encontrada foi  $0,10644 \text{ mol L}^{-1}$ .

Solução 10% (m/v)  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  foi preparada pela dissolução de 10 g do sal (Merck<sup>®</sup>) em 20 mL de HCl  $6 \text{ mol L}^{-1}$  sob aquecimento e em seguida, diluindo-se a 100 mL com água.

Solução 5% (m/v)  $\text{NH}_4\text{SCN}$  foi preparada dissolvendo-se 5 g do sal (Chemis<sup>®</sup>, Hexas) em 500 mL de água deionizada.

Solução 1,6 % (m/v) de molibdato de amônio foi preparada pela dissolução de 16 g de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Merck<sup>®</sup>) em aproximadamente 800 mL de água quente, completando-se o volume para 1000 mL com água.

Solução 0,08% (m/v) de metavanadato de amônio foi preparada pela dissolução de 0,80 g de  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  em água quente, adicionando-se 112,0 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado e completando-se o volume para 1000 mL com água desionizada.

Na análise turbidimétrica, foi preparada uma solução protetora pela dissolução de 12,0 g de NaCl (Mallinckrodt<sup>®</sup>) em aproximadamente 40 mL de água, adicionando-se 1,0 mL de HCl concentrado e 5,0 mL de glicerol, completando-se o volume para 100 mL com água.

As amostras de folhas de cana-de-açúcar foram coletadas na fazenda Bela Aliança localizada no município de Pirassununga – SP. As amostras de folhas de laranjeira foram coletadas na fazenda Águas Claras localizada no município de Araraquara - SP.

Os materiais de referência de folhas de vegetais SRM 1573a Tomato Leaves, SRM 1572 Citrus Leaves, SRM 1515 Apple Leaves, SRM 1547 Peach Leaves, SRM 1570 Spinach leaves do National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, MD, EUA) foram utilizados para avaliar a exatidão dos métodos propostos.

#### 4.1.3 Coleta e preparo das amostras

A coleta das amostras de folhas de cana-de-açúcar foi feita em três talhões de aproximadamente 12 hectares demarcados na fazenda Bela Aliança, localizada em Pirassununga – SP, onde se encontra plantada a variedade SP 81-3250 com uniformidade em idade (cana soca - 4 meses após corte), espaçamento, solo e manejo de lavoura.

As amostras de folhas de cana-de-açúcar foram coletadas segundo procedimento recomendado para diagnose foliar de cana-de-açúcar<sup>1</sup>. A folha amostrada é a da posição +3, ou seja, a primeira folha com colarinho visível (lígula totalmente aberta). A coleta foi feita aleatoriamente (em “zigzag”), retirando-se de 20 a 30 folhas por hectare, totalizando aproximadamente 250 folhas amostradas por talhão. Após a remoção das folhas no campo, as mesmas foram lavadas abundantemente com água corrente, e em seguida com água desionizada. A parte central (cerca de 20 cm) das folhas foi cortada, descartando-se as nervuras centrais. Após secagem ao ar, as amostras foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 70°C por 72 h.

As folhas secas foram cortadas em pedaços de aproximadamente 5 cm e, para cada talhão, a massa total de vegetal foi dividida em duas partes, uma para a moagem criogênica e a outra para moagem em moinho de facas. O programa otimizado na moagem criogênica das folhas de cana-de-açúcar está apresentado na Tabela 2. As folhas de cana-de-açúcar contêm alto teor de fibras e por isto somente uma pequena quantidade da amostra (aproximadamente 2,5 g) deve ser moída de cada vez. A moagem no moinho de facas deve ser interrompida a cada 20 min devido ao aquecimento do moinho e possível contaminação das amostras.

**Tabela 2** - Programa de moagem das amostras de cana-de-açúcar em moinho criogênico

<b>Etapa</b>	<b>Tempo, min</b>
Pré-congelamento	2
Moagem	3
Congelamento	2

Nº de ciclos: 2; Nº de batidas por segundo: 10

Dois talhões de aproximadamente 5 hectares foram demarcados na fazenda Águas Claras, localizada em Araraquara – SP, onde se encontram plantadas as variedades de laranja Pêra Rio e Valência (porta-enxerto limão cravo) com 17 e 7 anos, respectivamente. Os talhões apresentam uniformidade de espaçamento, solo e manejo. As amostras foram coletadas segundo procedimento recomendado para diagnose foliar de laranja<sup>100</sup>. Trata-se, de modo geral, da 3ª ou 4ª folha a partir do fruto, gerada na primavera, com cerca de 6 meses de idade, quando o fruto tem 2-4 cm de diâmetro, o que, nas condições do Estado de São Paulo, ocorre entre fevereiro e abril (Figura 11). As folhas devem ser colhidas na altura média da planta, em 25 plantas de cada gleba homogênea (solo, planta), sendo uma folha de cada quadrante da planta (N, S, L, O), dando um total de 100. Após a remoção das folhas do campo, as mesmas foram lavadas abundantemente com água corrente, e em seguida com água desionizada. As nervuras centrais das folhas foram retiradas e descartadas. As amostras foram secas ao ar, e em seguida secas em estufa com circulação forçada de ar a 70°C por 72 h. As folhas secas foram submetidas à moagem em moinho de facas.



**Figura 11** - Foto da coleta de folhas de laranjeira: 3ª ou 4ª do ramo com fruto

Procedimentos de digestão por via úmida e via seca foram avaliados com a finalidade de selecionar o mais eficiente e simples, considerando os parâmetros

tempo, custo e quantidade de reagentes e/ou resíduos gerados. A massa e a diluição das amostras foram previamente estimadas utilizando os teores médios dos nutrientes geralmente encontrados em folhas (Tabela 3). Assim, foi possível estabelecer quais os intervalos de concentração que deveriam ser avaliados no espectrômetro para cada elemento, bem como quais as linhas analíticas seriam as mais adequadas. Os procedimentos 1 a 8 a seguir foram feitos em triplicata.

**Tabela 3** - Teores adequados de nutrientes em folhas de cana-de-açúcar e de laranja

Elemento	Teores adequados*,**	
	Cana-de-açúcar	Citrus (laranja)
<b>N</b>	18-25	24-26
<b>P</b>	1,5-3,0	1,2-1,7
<b>K</b>	10-16	10-14
<b>Ca</b>	2,0-8,0	35-40
<b>Mg</b>	1,0-3,0	2,5-3,0
<b>S</b>	1,5-3,0	2,0-2,5
<b>B</b>	10-30	60-140
<b>Cu</b>	6-15	10-30
<b>Fe</b>	40-250	130-300
<b>Mn</b>	25-250	25-49
<b>Mo</b>	0,05-0,2	0,10-1,00
<b>Zn</b>	10-50	25-49

\* teores de macronutrientes em g/kg de matéria seca; \*\* teores de micronutrientes em mg/kg de matéria seca.

Fonte: RAIJ, et al., 1996; MALAVOLTA et al., 1994.

**Procedimento 1:** digestão em bloco digestor pela adição de 0,5 g de amostra + 1 mL de solução 30% (m/m) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e após repouso de cerca de 60 min, adição de 3,5 mL de HNO<sub>3</sub> + 1,0 mL de HCl a tubos de digestão de 100 mL. Os tubos foram colocados no bloco e a temperatura do mesmo foi ajustada para 120°C, permanecendo nesta temperatura por 120 min. Depois da eliminação de grande parte dos vapores de NO<sub>2</sub>, adicionou-se mais 1 mL de solução 30% (m/m) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, vagarosamente e continuou-se o aquecimento até obtenção de solução transparente. Os digeridos foram então filtrados à vácuo e transferidos para balões volumétricos de 50 mL, completando-se o volume com água desionizada. Funis de vidro foram acondicionados na extremidade superior dos tubos de digestão, visando favorecer a condensação e o refluxo de gases e vapores gerados na digestão.

**Procedimento 2:** digestão em forno de micro-ondas pela adição de 0,25 g de amostra + 2 mL de solução 30% (m/m)  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 3,5 mL de  $\text{HNO}_3$  + 0,5 mL de HCl a frascos de quartzo submetidos ao programa da Tabela 4. Em seguida, os digeridos foram transferidos para balões volumétricos de 25 mL e os volumes finais foram completados com água.

**Tabela 4** - Programa otimizado do forno de micro-ondas para a digestão das amostras de folhas de cana-de-açúcar

Etapa	Potência inicial, W	Potência final, W	Tempo, min
1	100	500	5
2	800	800	15
3	0	0	15

\* tempo total do programa de aquecimento: 35 min.

**Procedimento 3:** digestão em forno de micro-ondas pela adição de 0,25 g de amostra + 2 mL de solução 30% (m/m)  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 4,0 mL de  $\text{HNO}_3$  50% (v/v) + 0,5 mL de HCl a frascos de quartzo que também foram submetidos ao programa da Tabela 4. Em seguida, os digeridos foram transferidos para balões volumétricos de 25 mL, e o volume completado com água.

**Procedimento 4:** digestão em forno de micro-ondas pela adição de 0,25 g de amostra + 1 mL de solução 30% (m/m)  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 3,0 mL de  $\text{HNO}_3$  + 0,5 mL de HF a frascos de polietileno submetidos ao programa da Tabela 4. Em seguida, adicionou-se 3,0 mL de ácido bórico a cada frasco e os mesmos foram submetidos ao programa de aquecimento da Tabela 5. Os digeridos foram transferidos para balões volumétricos de 25 mL e os volumes completados com água.

**Tabela 5** - Programa otimizado do forno de micro-ondas para a complexação de íons fluoreto em digeridos de folhas de cana-de-açúcar

Etapa	Potência inicial, W	Potência final, W	Tempo, min
1	1000	1000	10
2	0	0	15

\* tempo total do programa de aquecimento: 25 min.

**Procedimento 5:** digestão em bloco digestor pela adição de 0,5 g de amostra + 6 mL da solução combinada de  $\text{HNO}_3$  +  $\text{HClO}_4$  (2:1 v/v) a tubos de digestão de 100

mL. Aqueceu-se gradativamente até 120°C, mantendo-se essa temperatura até cessar totalmente o desprendimento de NO<sub>2</sub>. Aumentou-se a temperatura para 210°C e manteve-se esta por aproximadamente 20 min até a eliminação completa de fumos brancos de HClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O e obtenção de solução transparente. Esfriou-se, completou-se o volume para 50 mL com água desionizada. Funis de vidro foram acondicionados na extremidade superior dos tubos de digestão, visando favorecer a condensação e o refluxo de gases e vapores gerados na digestão.

**Procedimento 6:** digestão em forno de micro-ondas pela adição de 0,25 g de amostra + 2 mL de solução 30% (m/m) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 3,5 mL de HNO<sub>3</sub> + 0,5 mL de HCl a frascos de PFA submetidos ao programa da Tabela 6 (Multiwave 3000). Os digeridos foram transferidos para balões volumétricos de 25 mL, onde um volume de 5 mL de 5% (m/v) La foi adicionado e o volume completado com água desionizada. É importante ressaltar que a ordem de adição dos reagentes descrita acima é importante, caso contrário pode haver perda da amostra principalmente se o HNO<sub>3</sub> for adicionado primeiro, devido as reações da amostra com o ácido.

**Tabela 6** - Programa otimizado do forno de micro-ondas para a digestão das amostras de folhas de cana-de-açúcar

Etapa	Potência, W	Rampa, min	Permanência, min
1	600	10	5
2	1400	15	5
3	0	0	15

\* tempo total do programa de aquecimento: 50 min

**Procedimento 7:** digestão em bloco digestor pela adição de 2,0 g de amostra + 20 mL de HNO<sub>3</sub> a tubos de digestão de 500 mL, deixando-se em repouso por 12 h. Colocaram-se os tubos no bloco digestor e aqueceu-se gradativamente até a temperatura de 160 °C. Quando a maior parte dos vapores de NO<sub>2</sub> foi eliminada e a solução clareou (~ 20 min a 160 °C), retiraram-se os tubos do bloco digestor e acrescentou-se 5,4 mL de HClO<sub>4</sub> concentrado. Recolocaram-se os tubos no bloco e aumentou-se a temperatura para 210 °C. A digestão completa-se quando uma solução incolor e uma fumaça branca e densa de HClO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O aparecer (~ 20 min a 210 °C). Transferiu-se os digeridos para balões volumétricos de 25 mL,

completando-se o volume com água desionizada. Funis de vidro foram acondicionados na extremidade superior dos tubos de digestão, visando favorecer a condensação e o refluxo de gases e vapores gerados na digestão.

**Procedimento 8:** incineração em mufla durante 2 h a 500 °C de 5 g de amostra adicionada em cápsula de porcelana. Rampa utilizada para a temperatura atingir 500 °C foi 5 °C/min. Após a incineração, esfriou-se e umedeceu-se o resíduo. Adicionou-se 5 mL de solução 6 mol L<sup>-1</sup> HCl e evaporou-se em banho-maria. Dissolveu-se o resíduo com 10 mL de solução 2 mol L<sup>-1</sup> HCl, aqueceu-se, filtrou-se e transferiu-se o solubilizado para balões volumétricos de 25 mL, completando os mesmos com água desionizada.

Os materiais de referência certificados (SRM 1573a Tomato Leaves, SRM 1572 Citrus Leaves, SRM 1515 Apple Leaves, SRM 1547 Peach Leaves, SRM 1570 Spinach leaves) foram digeridos pelos procedimentos 2, 6-8.

#### 4.1.4 Descontaminação e Armazenamento

Os balões volumétricos, frascos para armazenamento de soluções, entre outros utilizados no preparo de soluções foram deixados imersos em solução 10% (v/v) HNO<sub>3</sub> e enxaguados abundantemente com água desionizada e secos antes do uso. Todas as soluções e amostras foram armazenadas em frascos de polipropileno de alta densidade (Nalgene, Rochester, EUA) descontaminados e sob refrigeração.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Determinação de Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K em folhas cana-de-açúcar por HR-CS FAAS

Inicialmente foi otimizado um método para determinar os micronutrientes Cu, Fe, Mn e Zn em folhas de cana-de-açúcar. A acidez nos digeridos das amostras submetidas aos procedimentos 1 e 2 foi determinada por titulação ácido-base.

Com o objetivo de definir os intervalos lineares de concentração de Cu, Fe, Mn e Zn e verificar a influência da acidez na sensibilidade das curvas analíticas destes analitos, as mesmas foram construídas em 1 e 7,5% (v/v) de HNO<sub>3</sub>. Diferentes áreas de integração foram avaliadas, 1 pixel (CP), 3 pixels (CP ± 1), 5

pixels ( $CP \pm 2$ ), 7 pixels ( $CP \pm 3$ ) e 9 pixels ( $CP \pm 4$ ). Os intervalos de concentração e os comprimentos de onda principais (P) e secundários (S) avaliados foram:

Cu - 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg L<sup>-1</sup>;  $\lambda_1 = 324,754$  nm (P) e  $\lambda_2 = 327,396$  nm (S);

Fe - 0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup>;  $\lambda_1 = 248,327$  nm (P) e  $\lambda_2 = 248,814$  nm (S);

Mn - 0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup>;  $\lambda_1 = 279,482$  nm (P) e  $\lambda_2 = 279,827$  nm (S);

Zn - 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>;  $\lambda_1 = 213,857$  nm (P) e  $\lambda_2 = 307,590$  nm (S);

Com taxa de aspiração de 5 mL min<sup>-1</sup> algumas condições operacionais (altura do queimador e os fluxos do combustível e do gás oxidante) foram otimizadas automaticamente buscando-se maior sensibilidade nos comprimentos de onda escolhidos para cada elemento (Tabela 7). Nesta otimização automática estes parâmetros são variados simultaneamente.

**Tabela 7** - Condições otimizadas para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por HR-CS FAAS em folhas de cana-de-açúcar

Elemento e linha atômica (nm)	Altura Queimador (mm)	Acetileno (L/h)	Ar (L/h)	Combustível/Oxidante
Cu 324,754	6	40	503	0,080
Cu 327,396	5	50	503	0,099
Fe 248,327	7	65	503	0,129
Fe 248,814	6	65	503	0,129
Mn 279,482	6	80	503	0,159
Mn 279,827	6	70	503	0,139
Zn 213,857	6	60	503	0,119
Zn 307,590	5	115	503	0,229

Após a construção das curvas analíticas para Cu, Fe, Mn e Zn em meio 1% e 7,5% (v/v) de HNO<sub>3</sub>, em diferentes áreas de integração (1 a 9 pixels) novos intervalos de concentração foram estabelecidos para Fe e Mn, devido a desvios da Lei de Beer. Os novos intervalos foram:

Fe - 0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>;  $\lambda_1 = 248,327$  nm (P) e  $\lambda_2 = 248,814$  nm (S);

Mn - 0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>;  $\lambda_1 = 279,482$  nm (P) e  $\lambda_2 = 279,827$  nm (S);

Para a determinação desses micronutrientes em folhas de cana-de-açúcar digeridas com os procedimentos 1, 2, 4 e 5, as condições otimizadas para cada elemento foram mantidas, porém a calibração foi feita em 1% (v/v) HNO<sub>3</sub>, com área integrada de CP ± 1 (3 pixels) e medidas em quatro replicatas ( $n=4$ ). A interferência espectral na linha atômica principal do Zn, causada pela molécula de NO, foi corrigida pelo método dos mínimos quadrados, no qual um espectro com o interferente foi gerado e usado como referência na correção de fundo. Utilizou-se o branco da curva analítica - 1% (v/v) HNO<sub>3</sub>, como referência na correção do fundo durante a construção da curva analítica e no caso das amostras, empregaram-se os respectivos brancos para corrigir a absorção de fundo.

A eficiência dos procedimentos de preparo foi avaliada comparando-se os teores obtidos de cada micronutriente (Cu, Fe, Mn e Zn). Testes de adição e recuperação foram feitos com o procedimento 2 de preparo de amostras em dois níveis de adição de analito (0,10 e 0,25 mg L<sup>-1</sup> Cu; 0,50 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> Fe, Mn; 0,20 e 0,50 mg L<sup>-1</sup> Zn). Os materiais de referência certificados digeridos pelo procedimento 2 também foram analisados com o objetivo de avaliar a exatidão deste procedimento de digestão.

As determinações de Ca, Mg e K foram feitas separadamente das determinações dos micronutrientes. Para obter a concentração ótima de La, avaliou-se a influência da variação da concentração de La de 0 a 2,5% (m/v) La nas absorvâncias de Ca e Mg em uma amostra de folhas de cana-de-açúcar digerida com o procedimento 2 após diluição de 125 vezes.

Com o objetivo de definir os intervalos de concentração linear dos analitos, curvas analíticas para Ca, Mg e K foram construídas em 1% (m/v) La e 1% (v/v) HNO<sub>3</sub> nas linhas principais destes elementos com áreas de integração de 1 pixel (CP) e 3 pixels (CP ± 1), com taxa de aspiração de 5 mL min<sup>-1</sup> e parâmetros operacionais da Tabela 8. Os intervalos avaliados foram:

Ca – 0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>;  $\lambda_1 = 422,673$  nm (P);

Mg – 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg L<sup>-1</sup>;  $\lambda_1 = 285,213$  nm (P);

K – 0; 0,25; 0,50; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>;  $\lambda_1 = 766,491$  nm (P);

**Tabela 8** - Condições otimizadas para a determinação de Ca, Mg e K por HR-CS FAAS em folhas de cana-de-açúcar

Elemento e linha atômica (nm)	Altura Queimador (mm)	Acetileno (L/h)	Ar (L/h)	Combustível/Oxidante
Ca 422,673	5	60	501	0,120
Mg 285,213	6	80	501	0,160
K 766,491	7	65	501	0,130

Para determinar Ca, Mg e K, digeridos das plantas obtidos pelos procedimentos de 1, 2, 4 e 5 foram diluídos 125 vezes em 1% (m/v) La, respectivamente. Testes de adição e recuperação de padrão também foram feitos com o procedimento 2 de preparo de amostras para avaliar a exatidão do método, em dois níveis de adição de padrão (0,50 e 2,50 mg L<sup>-1</sup> Ca; 0,15 e 0,30 mg L<sup>-1</sup> Mg; 0,25 mg L<sup>-1</sup> e 1,50 mg L<sup>-1</sup> K). Os materiais de referência certificados digeridos pelo procedimento 2 e diluídos 200 vezes também foram analisados com o objetivo de avaliar a exatidão deste procedimento de digestão.

Devido aos teores de Ca, Mg, K em folhas serem tipicamente 1000 vezes maiores do que aqueles encontrados para Cu, Fe, Mn e Zn<sup>101</sup>, a determinação multielementar de Ca, Mg, K, Cu, Fe, Mn e Zn requer a utilização de linhas analíticas com diferentes sensibilidades, as quais estão disponíveis em HR-CS FAAS. Neste contexto, as medidas em HR-CS FAAS foram feitas nas linhas analíticas principais para Cu (324,754 nm), Fe (248,327 nm), Mn (279,482 nm) e Zn (213,857 nm), e nas linhas secundárias para Ca (239,856 nm) e K (404,414 nm) e em linhas alternativas ("asas" da linha secundária) para Mg (202,588 nm). A possibilidade de selecionar linhas alternativas adjacentes a linha analítica de interesse foi investigada para estender o intervalo linear de trabalho para Mg. Esta possibilidade foi avaliada pela medida nas linhas 202,576 nm; 202,577 nm; 202,578 nm; 202,580 nm; 202,585 nm; 202,586 nm; 202,587 nm; 202,588 nm, adjacentes a linha secundária do Mg em 202,582 nm.

A determinação multielementar de Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K em folhas de cana-de-açúcar digeridas pelo procedimento 6 foi feita em quatro replicatas sob as condições operacionais otimizadas e descritas na Tabela 9.

**Tabela 9** - Condições otimizadas para a determinação de Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K por HR-CS FAAS em folhas de cana-de-açúcar

Elemento e linha atômica (nm)	Altura Queimador (mm)	Acetileno (L/h)	Ar (L/h)	Combustível/Oxidante
Cu 324,754	6	40	508	0,079
Fe 248,327	7	65	508	0,128
Mn 279,482	6	80	508	0,157
Zn 213,857	6	60	508	0,118
Ca 239,856	7	70	508	0,138
Mg 202,588	6	60	508	0,118
K 404,414	7	70	508	0,138

Para taxa de aspiração de 5 mL min<sup>-1</sup> e área de integração equivalente a 3 pixels (CP ± 1), curvas analíticas foram construídas em 1% (m/v) La e 1% (v/v) HNO<sub>3</sub> nos seguintes intervalos:

Cu – 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg L<sup>-1</sup> em = 324,754 nm (P);

Fe – 0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg L<sup>-1</sup> em = 248,327 nm (P);

Mn – 0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg L<sup>-1</sup> em = 279,482 nm (P);

Zn – 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg L<sup>-1</sup> em = 213,857 nm (P);

Ca – 0; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0; 100,0 mg L<sup>-1</sup> em = 239,856 nm (S);

Mg – 0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 mg L<sup>-1</sup> em = 202,588 nm (asa);

K – 0; 50,0; 100,0; 150,0; 200,0 e 250,0 mg L<sup>-1</sup> em = 404,414 nm (S);

A LS FAAS foi utilizada como técnica comparativa. Testes de adição e recuperação de padrão foram feitos em dois níveis de adição: 0,1 e 0,25 mg L<sup>-1</sup> Cu, 0,5 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> Fe, Mn, 0,2 e 0,5 mg L<sup>-1</sup> Zn, 10 e 40 mg L<sup>-1</sup> Ca, 5 e 20 mg L<sup>-1</sup> Mg e 50 e 150 mg L<sup>-1</sup> K. Cinco materiais de referência (SRM 1573a Tomato Leaves, SRM 1572 Citrus Leaves, SRM 1515 Apple Leaves, SRM 1547 Peach Leaves, SRM 1570 Trace Elements in Spinach leaves) também foram analisados para avaliar tanto a exatidão do método proposto como a possibilidade de estender sua aplicação para outros tipos de folhas.

#### 4.2.2 Determinação de B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, P, S e Zn em folhas de cana-de-açúcar e de laranjeira por HR-CS FAAS

Um estudo preliminar foi feito para avaliar os comprimentos de onda correspondentes à molécula diatômica CS para determinar S. O intervalo avaliado foi de 20 a 250 mg L<sup>-1</sup> nas áreas de integração de 1 a 9 pixels. Os comprimentos de onda avaliados foram: 257,594; 257,958 e 258,055 nm. O mesmo estudo foi feito para os comprimentos de onda atômicos do P no intervalo de 20 a 250 mg L<sup>-1</sup> para os comprimentos de onda 213,547, 213,618 e 214,911 nm.

As otimizações da composição da chama (óxido nitroso/acetileno) e da altura de observação foram feitas automaticamente (Tabela 10) a uma taxa de aspiração de 5 mL min<sup>-1</sup>. A influência da área de integração na sensibilidade de B, Mo, P e S foi avaliada com curvas analíticas multielementares nos seguintes intervalos e comprimentos de onda:

P - 0; 50; 100; 150; 200; 250; 300; 400; 500; 1000; 2000 mg L<sup>-1</sup>, = 213,618 nm;

S - 0; 50; 100; 150; 200; 250; 300; 400; 500; 1000; 2000 mg L<sup>-1</sup>, = 258,055 nm;

B - 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; mg L<sup>-1</sup>, = 249,773 nm;

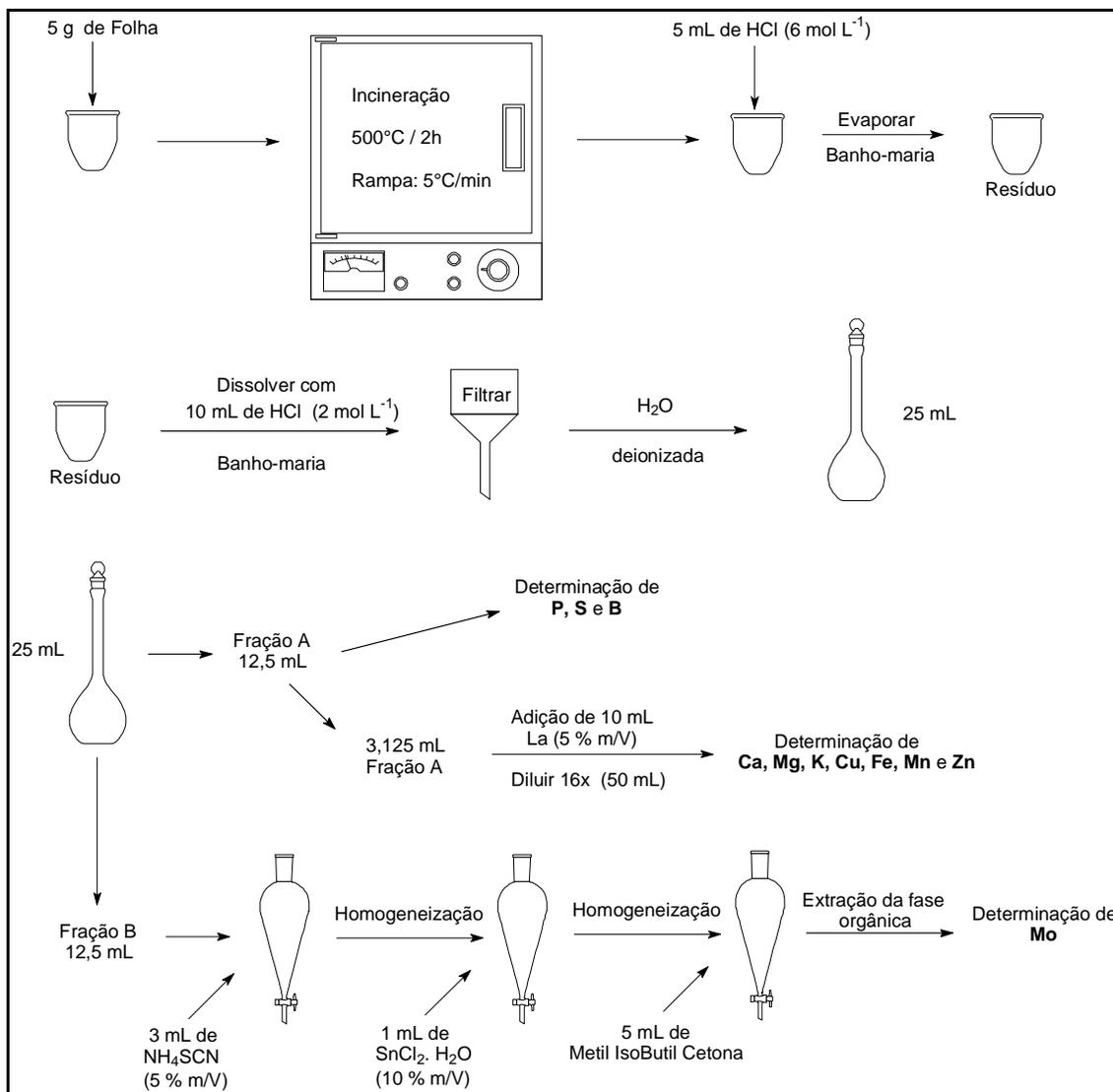
Mo - 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0 mg L<sup>-1</sup>, = 313,259 nm;

**Tabela 10** - Condições otimizadas para a determinação de P, S, B e Mo por HR-CS FAAS em folhas de cana-de-açúcar

Elemento e linha atômica (nm)	Altura Queimador (mm)	Acetileno (L/h)	Óxido Nitroso (L/h)	Combustível/Oxidante
P 213,618	4	225	396	0,568
S 258,055	6	245	396	0,619
B 249,773	6	225	396	0,568
Mo 313,259	8	225	396	0,568

A determinação multielementar de P, S, B e Mo foi realizada após digestão das folhas de cana-de-açúcar pelo procedimento 7, no qual uma massa maior de amostra foi necessária. Testes de adição e recuperação de padrão foram realizados em dois níveis de adição, 100 e 200 mg L<sup>-1</sup> P e S, 0,50 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> B e 0,2 e 0,5 mg L<sup>-1</sup> Mo. Somente o material de referência Spinach leaves foi analisado neste caso.

A determinação dos 11 analitos foi feita utilizando a estratégia analítica ilustrada na Figura 12. O solubilizado da amostra obtido pelo procedimento 8 (via seca) foi dividido em duas frações iguais (A e B). A determinação de B, P e S foi feita diretamente no solubilizado da amostra (fração A) nas condições descritas na Tabela 10, utilizando chama óxido nitroso/acetileno, taxa de aspiração de  $5 \text{ mL min}^{-1}$  e área de integração de 5 pixels ( $CP \pm 2$ ). As curvas analíticas foram construídas em meio de  $0,8 \text{ mol L}^{-1}$  HCl, que era a concentração de HCl presente no digerido. Testes de adição e recuperação foram feitos em um nível de adição:  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  B,  $200 \text{ mg L}^{-1}$  P e  $250 \text{ mg L}^{-1}$  S. A determinação de P, S e B nos materiais de referência certificados (SRM 1573a Tomato Leaves, SRM 1547 Peach Leaves, SRM 1570 Trace Elements in Spinach leaves) também foi feita. O material de referência Peach Leaves não apresenta teor certificado para S e assim, utilizou-se o valor de referência.



**Figura 12** - Estratégia de preparo de amostra de folhas de cana-de-açúcar e de laranja para a determinação dos macro e micronutrientes

A determinação de Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K nas folhas de cana-de-açúcar e laranja foi feita após diluição de 16 vezes da fração A. Um volume de 3,125 mL do extrato foi adicionado a um balão volumétrico de 50 mL, ao qual adicionou-se 10 mL de La 5% (m/v) e completou-se o volume com água desionizada. A determinação foi feita sob as mesmas condições operacionais, mesmos comprimentos de onda e intervalos de concentração das curvas analíticas utilizados no método otimizado no item 4.2.1. No entanto, as curvas analíticas foram construídas em 0,5% (v/v) HCl e 1% (m/v) La, pois, após diluição a concentração de HCl nos digeridos era de

aproximadamente 0,5% (v/v) HCl. Para as folhas de laranjeira os intervalos de concentração para Ca foram expandidos (Ca: 0; 40; 80; 100; 200; 400 mg L<sup>-1</sup>). Testes de adição e recuperação de padrão foram feitos em um nível de adição: 0,10 mg L<sup>-1</sup> Cu, 0,5 mg L<sup>-1</sup> Fe e Mn, 0,20 mg L<sup>-1</sup> Zn, 10 mg L<sup>-1</sup> Ca, 5 mg L<sup>-1</sup> Mg e 50 mg L<sup>-1</sup> K. As determinações de Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K nos materiais de referência certificados (SRM 1573a Tomato Leaves, SRM 1547 Peach Leaves, SRM 1570 Spinach leaves) também foram feitas para verificar a exatidão do método proposto.

A determinação de Mo foi feita na fração B após extração com metil isobutil cetona (MIBK)<sup>11</sup>. O Mo foi complexado com tiocianato de amônio em meio ácido e este complexo foi extraído na fase orgânica (Figura 12). As soluções analíticas foram preparadas da seguinte forma: adicionou-se 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 mL de solução contendo 0,5 mg L<sup>-1</sup> Mo em cada balão, em seguida 10 mL de HCl 6 mol L<sup>-1</sup> e água desionizada até aproximadamente 45 mL. Adicionou-se 3 mL de tiocianato de amônio e prosseguiu-se conforme a determinação nas amostras (Figura 12). As concentrações da curva analítica foram: 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg L<sup>-1</sup> na linha principal do Mo (313,259 nm).

A determinação de Mo na fração orgânica foi realizada sob as mesmas condições operacionais otimizadas para obter maior sensibilidade no comprimento de onda principal (Tabela 10). O teste de adição e recuperação foi feito em um nível de adição: 0,25 mg L<sup>-1</sup> Mo. O Mo está presente somente no material de referência Peach Leaves e assim, nos demais materiais (Spinach leaves e Tomato leaves) comparou-se com os valores de referência.

Os métodos do amarelo de molibdênio para a determinação de fósforo e o turbidimétrico do sulfato de bário para a determinação de enxofre foram usados como métodos comparativos.

#### 4.2.3 Análise dos resultados

A exatidão dos métodos propostos foi feita por meio do emprego de materiais de referência certificados, testes de adição e recuperação de padrão e empregando outra técnica analítica (LS FAAS). A validação foi feita por testes estatísticos bem estabelecidos, como os testes *t de student* e o teste F. As principais figuras de mérito para cada método de determinação foram estabelecidas, tais como, intervalo de

trabalho, precisão, exatidão, concentração característica e limites de detecção e de quantificação.

Os teores obtidos para os macros e micronutrientes em folhas de cana-de-açúcar e de laranjeira foram aplicados ao Sistema Integrado de Diagnose e Recomendação (DRIS) com o objetivo de demonstrar como este sistema funciona e pode ser útil na avaliação do estado nutricional destas culturas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Depois da amostragem, a primeira etapa de uma análise química consiste em submeter uma alíquota representativa da amostra a um tratamento adequado visando sua preparação para os passos subsequentes. Em HR-CS FAAS, assim como na maioria das técnicas analíticas utilizadas na determinação de elementos em baixas concentrações, a amostra deve estar na forma de uma solução para que possa ser aspirada pelo sistema de nebulização. Para solubilizar as amostras, alguns procedimentos via úmida e via seca foram propostos com o objetivo de otimizar a melhor condição de determinação.

A determinação dos 11 elementos propostos neste trabalho envolveu um grande desafio, pois as concentrações dos macronutrientes nas amostras de folhas estão na ordem de  $\text{g kg}^{-1}$ , enquanto que os micronutrientes estão presentes em concentrações da ordem de  $\text{mg kg}^{-1}$ . Assim, a maior dificuldade encontrada neste trabalho foi otimizar um procedimento de preparo de amostra compatível com a sensibilidade da técnica HR-CS FAAS e que possibilitasse a determinação de macro e micronutrientes.

### 5.1 Determinação de Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K em folhas cana-de-açúcar por HR-CS FAAS

A determinação dos micronutrientes Cu, Fe, Mn e Zn e dos macronutrientes Ca, Mg e K foi inicialmente proposta separadamente, sendo Ca, Mg e K determinados após diluição dos digeridos, pois a diferença de concentração entre macro e micronutrientes nas folhas dificultava o agrupamento destes 7 elementos. Enquanto os micronutrientes requeriam máxima sensibilidade, os macronutrientes requeriam a mínima possível.

Alguns procedimentos de digestão por via úmida foram avaliados com a finalidade de selecionar o mais eficiente e o mais simples possível. A acidez das amostras digeridas em bloco digestor (procedimento 1) e micro-ondas (procedimento 2) foi determinada pela titulação com  $\text{NaOH } 0,10644 \text{ mol L}^{-1}$ , utilizando fenolfetaleína como indicador, sendo a acidez média encontrada de 7,5% (v/v). Para estabelecer os intervalos de concentração linear dos analitos e também verificar a influência da

acidez dos digeridos na sensibilidade das curvas analíticas para Cu, Fe, Mn e Zn, as mesmas foram construídas em 1 e 7,5% (v/v) de HNO<sub>3</sub> sob as condições citadas no item 4.2.1. Comparando-se as inclinações das curvas analíticas observou-se que não houve diferença significativa nas sensibilidades entre 1 e 7,5% (v/v) HNO<sub>3</sub>. Este comportamento também foi observado para as áreas de integração de 1 pixel até 9 pixels. Para os elementos Fe e Mn os intervalos de calibração foram redefinidos, pois o último padrão das curvas analíticas (5,0 mg L<sup>-1</sup>) era muito concentrado para as linhas atômicas principais utilizadas, levando ao desvio da Lei de Beer.

Os resultados obtidos em 1% (v/v) HNO<sub>3</sub> para os elementos estudados (Cu, Fe, Mn e Zn) estão apresentados nas Figuras 13-16 e nas Tabelas 11-14. Para Zn, foram construídas somente curvas analíticas para o comprimento de onda principal (213,857 nm), pois no secundário não houve linearidade no intervalo de concentração avaliado, devido a este comprimento de onda ser bem menos sensível.

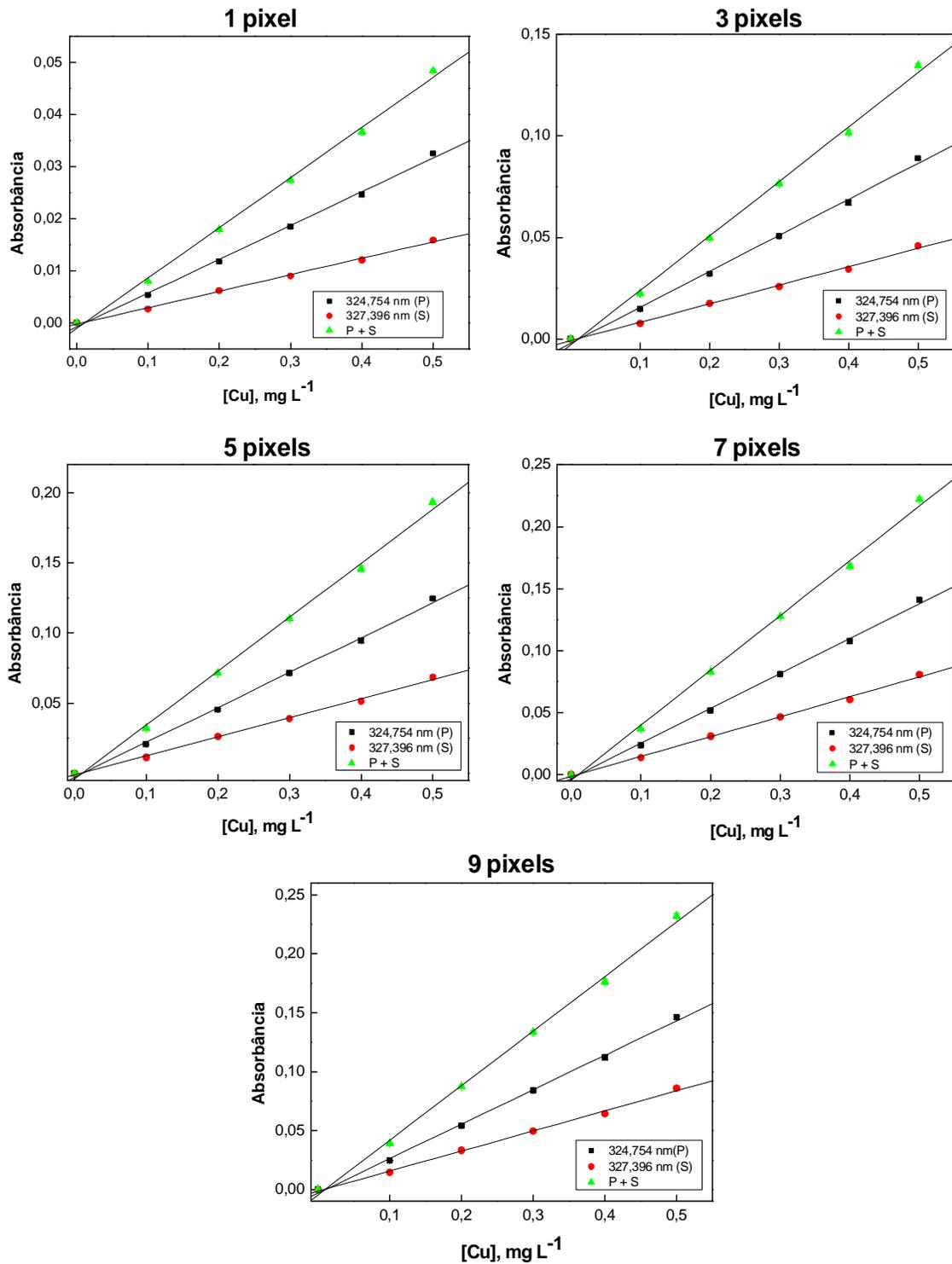
As Figuras 13-16 ilustram o aumento de sensibilidade com as seguintes variações: a) seleção dos comprimentos de onda para uma dada área de integração; sendo que a ordem crescente de sensibilidade é Secundária < Principal; b) variação das áreas integradas; sendo que a ordem crescente de sensibilidade é CP < CP ± 1 < CP ± 2 < CP ± 3 < CP ± 4; e c) somatória das linhas atômicas em uma dada área integrada, sendo que a curva  $\sum$  linhas é mais sensível que qualquer outra curva construída em um comprimento de onda individual. A precisão não variou significativamente entre as linhas principais, secundárias e a soma das linhas, nem com o aumento da área integrada, com exceção do Zn, no qual a precisão diminuiu com áreas de integração maiores que 5 pixels (CP ± 2).

As Tabelas 11-14 ilustram um aumento na sensibilidade variando-se as linhas atômicas e efetuando-se a soma delas. O desvio padrão (SD) para a curva  $\sum$  linhas foi calculado pela equação  $SD = (SD_1^2 + SD_2^2 + \dots + SD_n^2)^{1/2}$ , onde 1, 2, ... n são os comprimentos de onda estudados<sup>4</sup>. Com esses valores de desvio padrão foi possível calcular os limites de detecção e quantificação para todos os elementos. Para todos os elementos avaliados, uma diminuição dos limites de detecção e quantificação foi observada para a curva  $\sum$  linhas, mesmo havendo o aumento dos valores de desvio padrão derivados da equação, pois quando as linhas atômicas

foram somadas as inclinações das curvas analíticas aumentaram consideravelmente.

Para todos os elementos avaliados, os limites de detecção foram piores com área integrada de 1 pixel (Tabelas 11-14). Isso provavelmente ocorreu devido a baixa sensibilidade obtida nesta situação, como pode ser observado pelos baixos valores de inclinação da curva e também pelos altos valores de concentração característica. Para Fe e Mn o aumento na área integrada de 7 para 9 pixels e de 3 para 5 ou mais pixels, respectivamente, prejudicou os limites de detecção. O mesmo pode ser observado para o Zn, em que o limite de detecção foi prejudicado com o aumento da área integrada de 3 para 5 ou mais pixels. Quando o número de pixels aumenta, ou seja, quando a área integrada do pico aumenta, a sensibilidade pode ser melhorada, dependendo da largura do pico<sup>12</sup>. Quando o pico é estreito a sensibilidade aumenta até certa área integrada, geralmente 3 pixels, porém se uma área maior for usada, somente um mínimo aumento da absorbância integrada é observado enquanto que ruído passa a ser integrado, aumentando o desvio padrão e assim piorando o limite de detecção.

A área de integração de 3 pixels ( $CP \pm 1$ ) foi escolhida para a determinação multielementar de Cu, Fe, Mn e Zn nas amostras de folhas considerando a melhor condição de compromisso entre sensibilidade, linearidade, precisão e também limite de detecção.



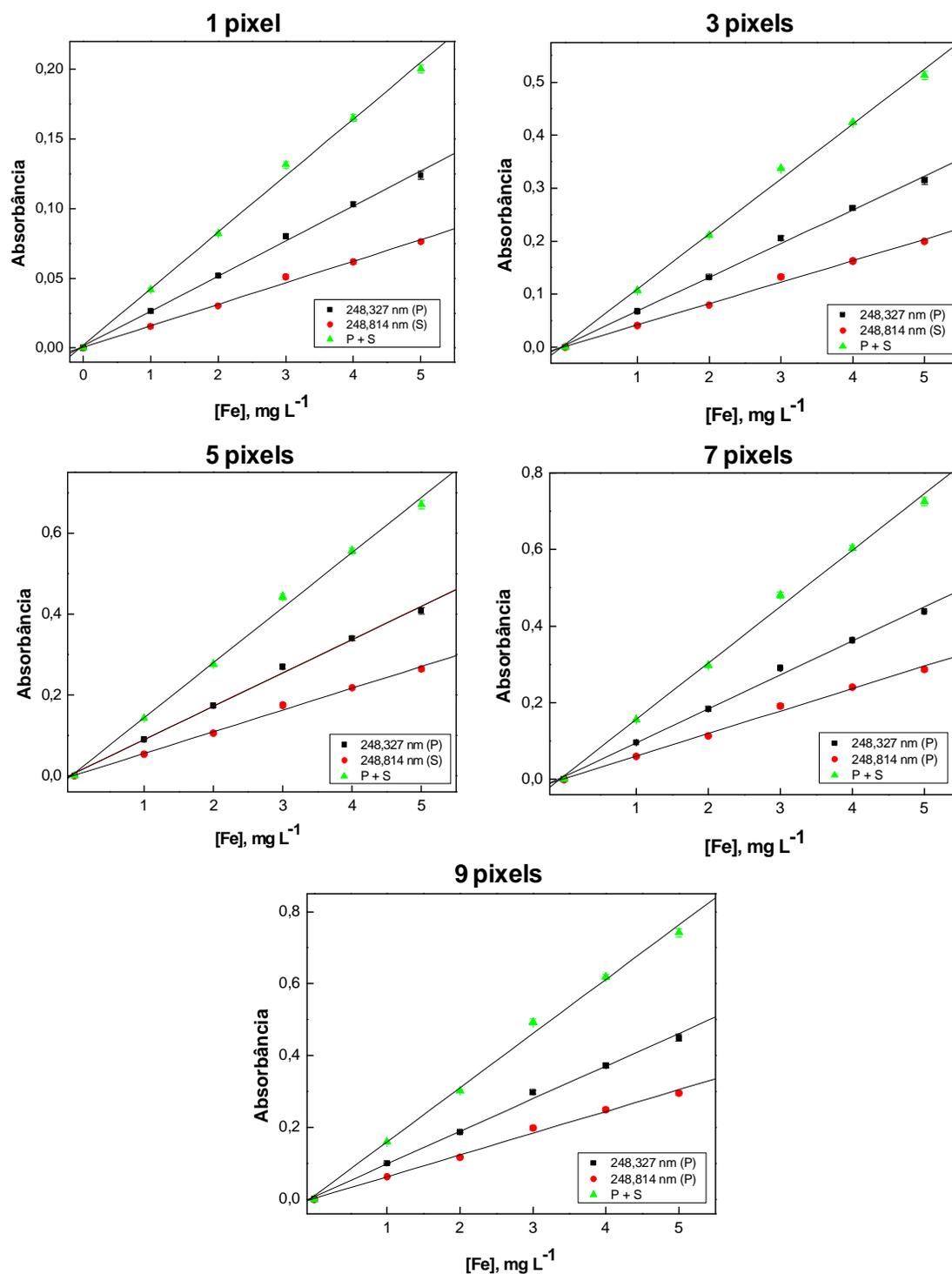
**Figura 13** - Curvas analíticas para Cu em 1% (v/v) HNO<sub>3</sub>, nos comprimentos de onda 324,754 nm (P) e 327,396 nm (S) e  $\Sigma$  linhas (P + S) com absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 1 até 9 pixels

**Tabela 11** - Inclinação da curva analítica (b), coeficiente de correlação linear (R), concentração característica ( $C_0$ ), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e desvio padrão relativo (RSD) para Cu em 324,754 nm (P) e em 327,396 nm (S) com absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 1 até 9 pixels.  $\Sigma$  linhas significa soma das absorvâncias das duas linhas de Cu

1 pixel (CP)						
Linha Atômica, (nm)	b	R	$C_0$ , $\mu\text{g L}^{-1}$	LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQ, $\mu\text{g L}^{-1}$	RSD %
324,754	0,06489	0,99856	67,8	23,1	77,1	2,0
327,396	0,03159	0,99867	139,3	15,2	50,6	2,1
$\Sigma$ linhas	0,09647	0,99871	45,6	9,3	31,1	1,3
3 pixels (CP $\pm$ 1)						
Linha Atômica, (nm)	b	R	$C_0$ , $\mu\text{g L}^{-1}$	LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQ, $\mu\text{g L}^{-1}$	RSD %
324,754	0,17706	0,99858	24,9	8,5	28,2	2,0
327,396	0,09075	0,99868	48,5	6,6	22,0	2,9
$\Sigma$ linhas	0,2678	0,99870	16,4	3,4	11,2	1,3
5 pixels (CP $\pm$ 2)						
Linha Atômica, (nm)	b	R	$C_0$ , $\mu\text{g L}^{-1}$	LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQ, $\mu\text{g L}^{-1}$	RSD, %
324,754	0,24866	0,99876	17,7	4,8	16,1	1,9
327,396	0,13571	0,99864	32,4	4,4	14,7	3,0
$\Sigma$ linhas	0,38429	0,99877	11,4	3,1	10,4	1,3
7 pixels (CP $\pm$ 3)						
Linha Atômica, (nm)	b	R	$C_0$ , $\mu\text{g L}^{-1}$	LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQ, $\mu\text{g L}^{-1}$	RSD, %
324,754	0,28197	0,99899	15,6	4,3	14,2	1,9
327,396	0,16026	0,99863	27,4	3,7	12,5	3,3
$\Sigma$ linhas	0,44223	0,99893	10,0	2,7	9,0	1,3
9 pixels (CP $\pm$ 4)						
Linha Atômica, (nm)	b	R	$C_0$ , $\mu\text{g L}^{-1}$	LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQ, $\mu\text{g L}^{-1}$	RSD, %
324,754	0,28197	0,9991	15,0	4,1	13,7	1,9
327,396	0,16026	0,99862	25,9	5,3	17,6	3,7
$\Sigma$ linhas	0,44223	0,99902	9,5	3,2	10,8	1,4

$C_0$  = concentração característica (0,0044 / inclinação da curva analítica);

LOD = limite de detecção ( $3 \times \text{SD}_{\text{branco}} / b$ ); LOQ = limite de quantificação ( $10 \times \text{SD}_{\text{branco}} / b$ )



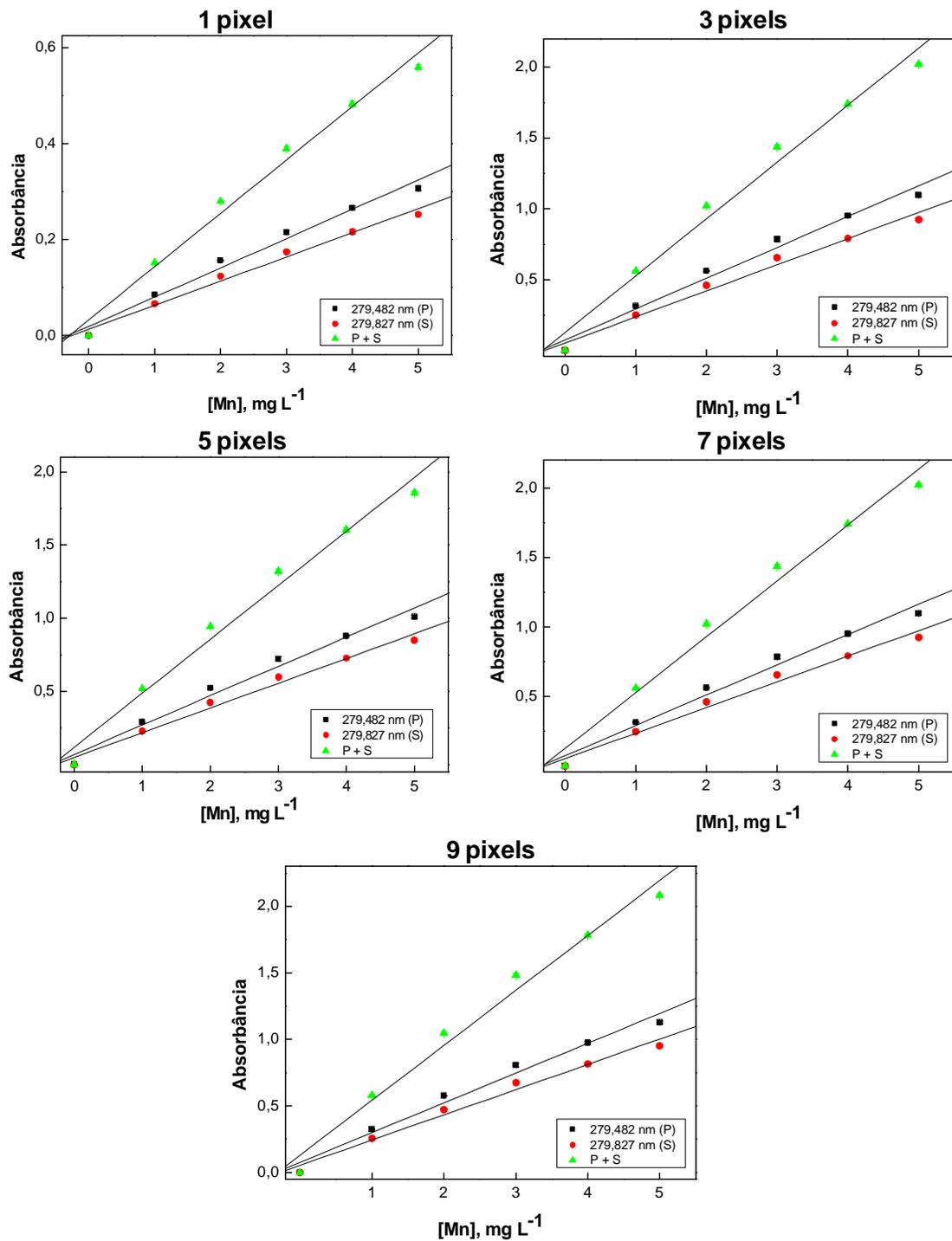
**Figura 14** - Curvas analíticas para Fe em 1% (v/v) HNO<sub>3</sub>, nos comprimentos de onda 248,327 nm (P) e 248,814 nm (S) e  $\Sigma$  linhas (P + S) com absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 1 até 9 pixels

**Tabela 12** - Inclinação da curva analítica (b), coeficiente de correlação linear (R), concentração característica  $C_o$ , limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e desvio padrão relativo (RSD) para Fe em 248,327 nm (P) e em 248,814 nm (S) com absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 1 até 9 pixels.  $\Sigma$  linhas significa soma das absorvâncias das duas linhas de Fe

1 pixel (CP)						
Linha Atômica, (nm)	b	R	$C_o$ , $\mu\text{g L}^{-1}$	LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQ, $\mu\text{g L}^{-1}$	RSD, %
248,327	0,02513	0,99885	175,1	23,8	79,6	2,4
248,814	0,01545	0,99732	284,8	38,8	129,4	3,3
$\Sigma$ linhas	0,04058	0,99849	108,4	29,6	98,6	1,7
3 pixels (CP $\pm$ 1)						
Linha Atômica, (nm)	b	R	$C_o$ , $\mu\text{g L}^{-1}$	LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQ, $\mu\text{g L}^{-1}$	RSD, %
248,327	0,06367	0,99860	69,0	9,4	31,4	2,2
248,814	0,04039	0,99782	108,9	14,9	49,5	3,2
$\Sigma$ linhas	0,10395	0,99844	42,3	8,2	27,2	1,5
5 pixels (CP $\pm$ 2)						
Linha Atômica (nm)	b	R	$C_o$ , $\mu\text{g L}^{-1}$	LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQ, $\mu\text{g L}^{-1}$	RSD, %
248,327	0,08242	0,99825	53,4	7,3	24,3	2,1
248,814	0,05743	0,99735	76,6	10,4	34,8	3,2
$\Sigma$ linhas	0,13595	0,99827	32,4	6,2	20,8	1,7
7 pixels (CP $\pm$ 3)						
Linha Atômica (nm)	b	R	$C_o$ , $\mu\text{g L}^{-1}$	LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQ, $\mu\text{g L}^{-1}$	RSD, %
248,327	0,08857	0,99824	49,7	6,8	22,6	2,9
248,814	0,05873	0,99762	74,9	10,2	34,1	3,1
$\Sigma$ linhas	0,14729	0,99808	29,9	5,8	19,2	1,7
9 pixels (CP $\pm$ 4)						
Linha Atômica (nm)	b	R	$C_o$ , $\mu\text{g L}^{-1}$	LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQ, $\mu\text{g L}^{-1}$	RSD, %
248,327	0,0908	0,99821	48,5	13,2	44,1	2,2
248,814	0,06045	0,99722	72,8	19,9	66,2	3,1
$\Sigma$ linhas	0,15089	0,99798	29,2	11,2	37,5	1,7

$C_o$  = concentração característica ( 0,0044 / inclinação da curva analítica);

LOD = limite de detecção ( $3 \times SD_{\text{branco}} / b$ ); LOQ = limite de quantificação ( $10 \times SD_{\text{branco}} / b$ )



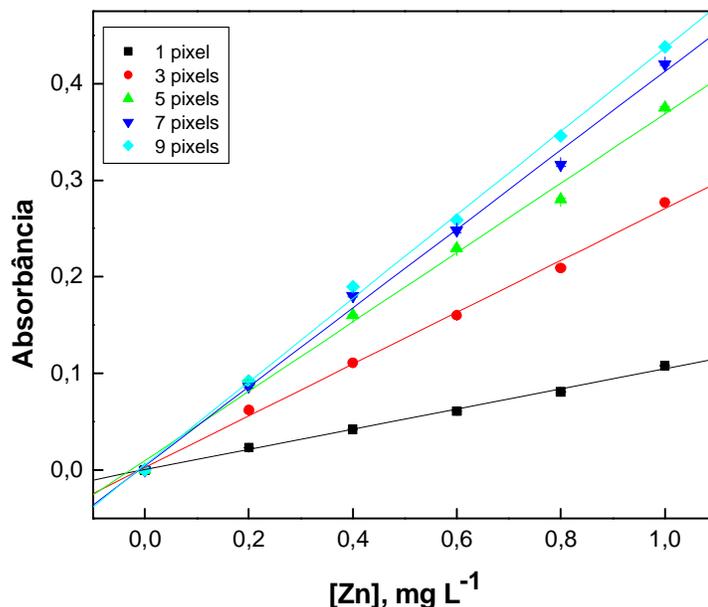
**Figura 15** - Curvas analíticas para Mn em 1% (v/v)  $\text{HNO}_3$ , nos comprimentos de onda 279,482 nm (P) e 279,827 nm (S) e  $\Sigma$  linhas (P + S) com absorbância integrada no comprimento de onda equivalente a 1 até 9 pixels

**Tabela 13** - Inclinação da curva analítica (b), coeficiente de correlação linear (R), concentração característica ( $C_o$ ), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e desvio padrão relativo (RSD) para Mn em 279,482 nm (P) e em 279,827 nm (S) com absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 1 até 9 pixels.  $\Sigma$  linhas significa soma das absorvâncias das duas linhas de Mn

1 pixel (CP)						
Linha Atômica, (nm)	b	R	$C_o$ , $\mu\text{g L}^{-1}$	LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQ, $\mu\text{g L}^{-1}$	RSD, %
279,482	0,06093	0,99151	72,2	5,9	19,7	2,0
279,827	0,05039	0,99403	87,3	5,9	19,8	1,9
$\Sigma$ linhas	0,11132	0,99271	39,5	2,7	8,9	1,2
3 pixels (CP $\pm$ 1)						
Linha Atômica, (nm)	b	R	$C_o$ , $\mu\text{g L}^{-1}$	LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQ, $\mu\text{g L}^{-1}$	RSD, %
279,482	0,15404	0,9904	28,6	1,9	6,5	1,6
279,827	0,12895	0,99303	34,1	2,3	7,8	1,6
$\Sigma$ linhas	0,2829	0,99169	15,6	1,5	5,0	1,2
5 pixels (CP $\pm$ 2)						
Linha Atômica, (nm)	b	R	$C_o$ , $\mu\text{g L}^{-1}$	LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQ, $\mu\text{g L}^{-1}$	RSD, %
279,482	0,20028	0,9900	22,0	3,0	10,0	2,0
279,8269	0,16904	0,99229	26,0	1,8	5,9	1,3
$\Sigma$ linhas	0,3691	0,9911	11,9	1,6	5,4	1,1
7 pixels (CP $\pm$ 3)						
Linha Atômica, (nm)	b	R	$C_o$ , $\mu\text{g L}^{-1}$	LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQ, $\mu\text{g L}^{-1}$	RSD, %
279,482	0,21768	0,99031	20,2	2,8	9,2	2,0
279,827	0,18419	0,99232	23,8	3,3	10,9	1,2
$\Sigma$ linhas	0,40154	0,99136	11,0	2,1	7,0	1,1
9 pixels (CP $\pm$ 4)						
Linha Atômica, (nm)	b	R	$C_o$ , $\mu\text{g L}^{-1}$	LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQ, $\mu\text{g L}^{-1}$	RSD, %
279,482	0,22372	0,99044	19,7	4,0	13,4	2,0
279,827	0,18963	0,99241	23,2	4,7	15,8	1,2
$\Sigma$ linhas	0,41267	0,99137	10,7	3,1	10,3	1,1

$C_o$  = concentração característica ( 0,0044 / inclinação da curva analítica);

LOD = limite de detecção ( $3 \times SD_{\text{branco}} / b$ ); LOQ = limite de quantificação ( $10 \times SD_{\text{branco}} / b$ )



**Figura 16** - Curvas analíticas para o Zn em 1% (v/v) HNO<sub>3</sub>, no comprimento de onda 213,857 nm (P) com absorbância integrada no comprimento de onda equivalente a 1 até 9 pixels

**Tabela 14** - Inclinação da curva analítica (b), coeficiente de correlação linear (R), concentração característica (C<sub>0</sub>), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e desvio padrão relativo (RSD) para Zn em 213,857 nm (P) com absorbância integrada no comprimento de onda equivalente a 1 até 9 pixels

Nº de pixels	b	R	C <sub>0</sub> , µg L <sup>-1</sup>	LOD, µg L <sup>-1</sup>	LOQ, µg L <sup>-1</sup>	RSD, %
CP	0.10471	0.99831	42,0	11,4	38,2	5,0
CP ± 1	0.26786	0.99843	16,4	7,5	25,1	4,2
CP ± 2	0.35871	0,99685	12,3	7,8	26,1	5,1
CP ± 3	0.40786	0,99806	10,8	8,1	27,0	8,7
CP ± 4	0.43157	0.99915	10,2	11,8	39,4	10,4

C<sub>0</sub> = concentração característica (0,0044/inclinação da curva analítica);

LOD = limite de detecção (3 x SD<sub>branco</sub> / b); LOQ = limite de quantificação (10 x SD<sub>branco</sub> / b).

Após verificar a potencialidade do espectrômetro para Cu, Fe, Mn e Zn foi feita a determinação dos mesmos nas amostras de folhas de cana-de-açúcar, após a decomposição das mesmas pelos procedimentos 1, 2, 4 e 5. Em todos os procedimentos avaliados, as reações químicas entre as amostras moídas criogenicamente e os reagentes de digestão foram mais intensas, devido ao menor

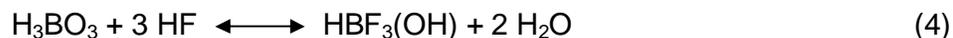
tamanho das partículas sólidas em relação as moídas em moinho de facas, o que resultou numa maior área de contato com os reagentes. Isso foi melhor visualizado nos procedimentos empregando bloco digestor.

O procedimento 1 de preparo das amostras foi feito em bloco digestor, no qual a digestão foi feita com água oxigenada ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) e ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ). Em sistemas abertos, é difícil oxidar completamente as amostras somente com ácido nítrico, pois a baixa temperatura de ebulição do azeótropo ( $120^\circ\text{C}$ ) limita o poder oxidativo. No entanto, com a adição de ácido clorídrico e peróxido de hidrogênio o poder de oxidação foi aumentado. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é bastante utilizado na remoção de produtos coloridos que permanecem em solução em alguns procedimentos, pois é um agente oxidante poderoso que pode ser encontrado com alto grau de pureza, e além disso, gera como produto de decomposição a água e oxigênio<sup>102</sup>. O inconveniente deste método foi a necessidade de filtração após a decomposição, a qual oferece risco de contaminação e perda dos analitos.

O procedimento 2 envolveu o pré-tratamento de amostras mediante o aquecimento com radiação micro-ondas que tem demonstrado ser um processo eficiente, rápido e seguro quando comparado com o sistema convencional. Além disso, as possibilidades de contaminação são minimizadas com o uso de frascos fechados e o volume de reagentes necessário é reduzido devido às altas pressões atingidas<sup>103</sup>. No entanto, dependendo do número de posições do forno de micro-ondas pode ser mais viável usar o bloco digestor, que em média tem 40 posições e pode ser mais rápido.

O procedimento 3 de preparo de amostras foi feito em forno de micro-ondas com ácido nítrico diluído. A adição de moléculas de água ao sistema micro-ondas facilita o aquecimento, devido à alta capacidade calorífica da água<sup>104</sup>. As soluções ácidas diluídas foram empregadas com o intuito de reduzir os resíduos gerados, os custos analíticos e os valores do branco analítico.

O procedimento 4 foi testado com o objetivo de eliminar os silicatos presentes nas amostras. O ácido fluorídrico é um ácido complexante utilizado na dissolução de materiais contendo silicatos<sup>83</sup>. Para complexar o excesso de HF nas soluções digeridas, utilizou-se o ácido bórico em um processo de duas etapas:



O procedimento 5 é o mais empregado em laboratórios de rotina. Este procedimento consistiu na digestão das amostras com a mistura nítrico-perclórica em bloco digestor. O ácido perclórico é altamente oxidante e esta combinação com ácido nítrico é feita para moderar esta ação oxidante.

A análise de uma das amostras demonstrou que a moagem por moinho de facas contaminou a mesma com os elementos Cu e Fe. Isso provavelmente ocorreu devido a um excesso de aquecimento das partes internas do moinho que, em atrito com a amostra acabou liberando estes metais. As moagens das demais amostras foram interrompidas a cada 20 min para resfriamento do moinho a temperatura ambiente (cerca de 25° C) e assim este tipo de contaminação foi evitada.

A Tabela 15 apresenta os teores obtidos para todos os micronutrientes em uma das amostras de folhas de cana-de-açúcar, após a mesma sofrer digestão pelos procedimentos 1, 2, 4 e 5. O procedimento 3 de preparo de amostras não foi eficiente na digestão das folhas de cana-de-açúcar e por isso, não são apresentados resultados referente a este procedimento. Várias tentativas foram feitas visando otimizar a digestão com ácido nítrico diluído em forno de micro-ondas, porém não se obteve sucesso.

**Tabela 15** - Resultados (em mg kg<sup>-1</sup>) para a determinação (*n*=4) de Cu, Fe, Mn e Zn em amostra de folhas de cana-de-açúcar do talhão n° 4 moídas em moinho criogênico e moinho de facas por HR-CS FAAS empregando os procedimentos n° 1, 2, 4 e 5

Elemento e linha atômica (nm)	Procedimento 1		Procedimento 2		Procedimento 4	Procedimento 5
	Criogênico	Facas	Criogênico	Facas	Facas	Facas
Cu 324,754	8,8 ± 0,3	10,3 ± 0,3	8,3 ± 0,3	8,4 ± 0,4	8,4 ± 0,2	10,3 ± 0,6
Cu 327,396	8,7 ± 0,4	10,4 ± 0,5	-----	-----	-----	-----
Fe 248,327	124,2 ± 1,4	123,3 ± 1,9	124,1 ± 1,4	124,0 ± 1,4	123,7 ± 1,6	123,3 ± 3,5
Fe 248,814	123,0 ± 2,2	123,3 ± 1,7	-----	-----	-----	-----
Mn 279,482	65,4 ± 0,9	66,3 ± 0,7	66,3 ± 0,7	66,4 ± 0,9	65,4 ± 0,5	66,1 ± 1,1
Mn 279,827	66,1 ± 1,0	65,4 ± 1,3	-----	-----	-----	-----
Zn 213,857	26,6 ± 0,2	26,6 ± 0,4	26,4 ± 0,7	25,9 ± 0,7	26,2 ± 0,4	26,0 ± 0,7

Como pode ser observado na Tabela 15, houve boa concordância entre os teores médios dos micronutrientes considerando todos os procedimentos de preparo de amostras (1, 2, 4 e 5). Os teores dos micronutrientes foram concordantes entre os dois tipos de moagem empregados, como pode ser visualizado na Tabela 15 para os procedimentos 1 e 2. Desta forma, concluiu-se que ambas moagens podem ser utilizadas antes de digerir as amostras, isto obviamente se os devidos cuidados com o aquecimento do moinho de facas forem observados. Ainda, os teores médios dos micronutrientes também foram concordantes com os teores adequados segundo a literatura (Tabela 3).

A determinação dos micronutrientes Cu, Fe e Mn também foi feita nas linhas secundárias destes elementos e os resultados foram concordantes com os obtidos nas linhas principais. Não foi necessário somar as linhas atômicas principal e secundária na determinação destes micronutrientes, pois as linhas principais foram suficientemente sensíveis para a determinação desses elementos. Desta forma, apenas as linhas atômicas principais foram usadas.

Diante da concordância entre os resultados encontrados com os procedimentos 1, 2, 4 e 5 (Tabela 15) é possível afirmar que estes quatro procedimentos de preparo de amostra poderiam ser empregados para os propósitos deste trabalho. Escolheu-se utilizar o procedimento 2 para os estudos seguintes, pois este procedimento foi mais rápido que os demais, sofre menor risco de contaminação por ser feito em sistema fechado, e, ainda, ofereceu maior segurança para o analista, pois não emprega os ácidos perclórico e fluorídrico.

Estudos de adição e recuperação foram feitos em dois níveis de adição para todas as amostras de folhas de cana-de-açúcar, empregando o procedimento 2. A recuperação variou de 90 a 111% para todos os micronutrientes demonstrando a eficiência do método para a determinação por HR-CS FAAS. Os materiais de referência certificados foram digeridos pelo procedimento 2 e os resultados encontrados estão na Tabelas 16. Os teores encontrados são comparáveis com os valores certificados ao nível de 95% de confiança demonstrando a exatidão deste método proposto. Além disso, este método pode ser aplicado para outros tipos de folhas, pois bons resultados foram obtidos para os cinco materiais de referência.

**Tabela 16 - Resultados (em mg kg<sup>-1</sup>) para a determinação (n=4) de Cu, Fe, Mn e Zn nos materiais certificados Tomato Leaves, Apple Leaves, Spinach Leaves, Peach Leaves e Citrus Leaves por HR-CS FAAS empregando o procedimento n° 2**

Elemento e linha atômica (nm)	Tomato Leaves		Apple Leaves		Spinach Leaves		Peach Leaves		Citrus Leaves	
	Encontrado	Certificado	Encontrado	Certificado	Encontrado	Certificado	Encontrado	Certificado	Encontrado	Certificado
Cu 324,754	4,80 ± 0,15	4,70 ± 0,14	5,55 ± 0,10	5,64 ± 0,24	11,7 ± 0,4	12,2 ± 0,6	3,9 ± 0,3	3,7 ± 0,4	16,3 ± 0,5	16,5 ± 1,0
Fe 248,327	373 ± 4	368 ± 7	81 ± 2	83 ± 5	ND	ND*	222 ± 7	218 ± 14	90 ± 6	90 ± 10
Mn 279,482	250 ± 3	246 ± 8	54 ± 2	54 ± 3	76,2 ± 1,2	75,9 ± 1,9	96 ± 2	98 ± 3	23 ± 1	23 ± 2
Zn 213,857	29,8 ± 0,8	30,9 ± 0,7	12,1 ± 0,3	12,5 ± 0,3	82 ± 2	82 ± 3	17,2 ± 0,6	17,9 ± 0,4	29 ± 1	29 ± 2

\* Não Disponível

Algumas figuras de mérito para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn usando o equipamento de fonte contínua estão compiladas na Tabela 17.

**Tabela 17** - Inclinação da curva analítica (b), coeficiente de correlação linear (R), concentração característica ( $C_o$ ), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e precisão (RSD) para Cu, Fe, Mn e Zn com absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 3 pixels ( $CP \pm 1$ ) obtidos por HR-CS FAAS

Elemento e linha atômica (nm)	b	R	$C_o$ , $\mu\text{g L}^{-1}$	LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQ, $\mu\text{g L}^{-1}$	RSD, %
Cu 324,754	0,2136	0,99928	20,6 (18)*	4,2	14,0	4,3
Cu 327,396	0,1022	0,99931	43,1	5,9	19,6	4,8
Fe 248,327	0,0784	0,99820	56,1 (44)*	3,8	12,8	1,8
Fe 248,814	0,0469	0,99959	93,8	12,8	42,6	3,4
Mn 279,482	0,1909	0,9918	22,2 (12)*	1,6	5,2	2,7
Mn 279,827	0,1521	0,99719	28,9	2,0	6,6	3,6
Zn 213,857	0,3488	0,99829	12,6 (7)*	8,3	27,8	2,6

\* Concentrações características ( $C_o$ ) fornecidas por Welz et al., 2005.

A técnica HR-CS FAAS apresentou grande potencial na determinação conjunta de Cu, Fe, Mn e Zn em folhas de cana-de-açúcar sendo sensível e rápida para determinar estes micronutrientes em folhas. O equipamento de fonte contínua é capaz de fazer a leitura em triplicata de 3 linhas atômicas (9 medidas) em aproximadamente 120 s. Ainda, como pode ser observado na Tabela 17, todas as linhas atômicas apresentaram boa precisão e baixos valores de limite de detecção.

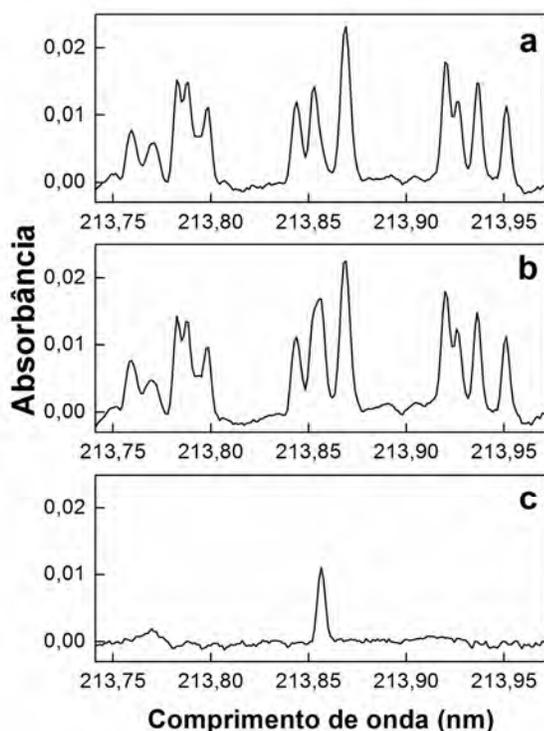
Na determinação dos micronutrientes Cu, Fe, Mn e Zn uma estratégia foi adotada para corrigir interferência espectral na linha atômica principal do Zn (213,857 nm), que sofre sobreposição espectral pela banda de absorção molecular de NO produzida em chama ar/acetileno. A molécula de NO é resultado do emprego de ácido nítrico nas soluções analíticas e na digestão das amostras. Quando uma solução 5% (v/v)  $\text{HNO}_3$  é analisada, usando como referência água desionizada, o espectro da banda de NO pode ser visualizado entre 200 nm e 235 nm, sendo que entre 210 e 215 nm a absorção molecular é forte<sup>12</sup>. LE BIHAN et al., 1992, observaram bandas de absorção molecular nas vizinhanças da linha atômica principal do Zn, e as atribuíram à molécula de  $\text{NO}^{105}$ . HUANG et al., 2001 apud WELZ,

2005, p. 216, também observaram bandas de absorção molecular de NO na vizinhança da linha atômica do Zn. Neste caso, a interferência foi removida utilizando a correção de fundo com os mínimos quadrados, sendo o perfil das bandas observadas pelos autores, muito semelhante com o obtido neste trabalho, confirmando que a origem desta interferência é o HNO<sub>3</sub>.

Utilizou-se o branco da curva analítica - 1% (v/v) HNO<sub>3</sub>, como referência na correção do fundo durante a construção da curva analítica e no caso das amostras, empregaram-se os respectivos brancos. O procedimento utilizado neste caso foi a correção de fundo pelo método dos mínimos quadrados (LSBC).

O programa do espectrômetro permite registrar e salvar um espectro de referência. O procedimento matemático envolvido na correção por mínimos quadrados é uma correlação linear entre os espectros de referência e o da amostra. O espectro de referência é então aumentado ou diminuído pela multiplicação por um fator de correção<sup>14</sup>. As diferenças entre o espectro de referência e o espectro da amostra, bem como seus quadrados, são calculados pixel a pixel, e a soma dos valores quadrados sobre todos os pixels é calculada. Depois disto, o fator de correção é variado com a finalidade de minimizar a soma dos quadrados ou em outras palavras, encontrar os mínimos quadrados. Finalmente, o espectro de referência é subtraído do espectro da amostra e o fundo estruturado é eliminado<sup>14,106</sup>. O espectro da molécula de NO referente ao branco da amostra (Figura 17 a) é subtraído de cada amostra (Figura 17 b) usando o algoritmo dos mínimos quadrados, produzindo então o espectro corrigido (Figura 17 c).

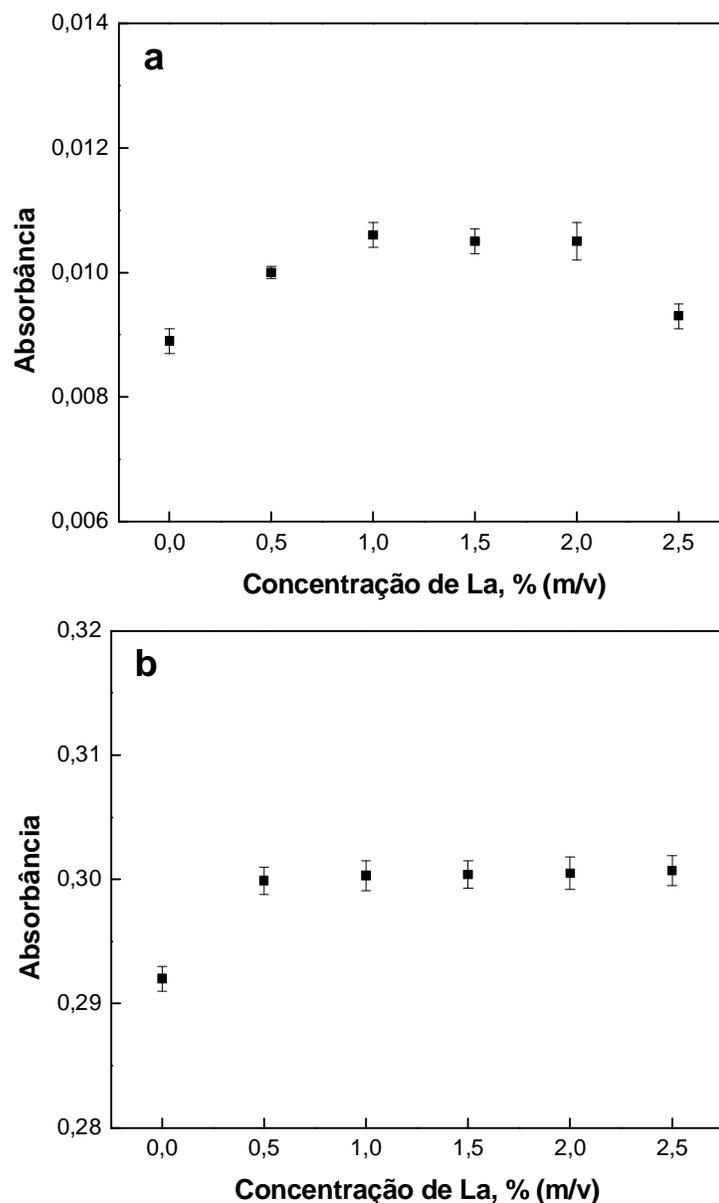
É importante ressaltar que a simples subtração do branco das amostras dos valores das amostras pode gerar erros aos resultados, visto que, a quantidade de ácido nítrico presente nos digeridos das amostras é geralmente menor do que a presente no branco, e além disso, nunca é exatamente igual entre uma replicata e outra. Assim, os teores de Zn nas amostras podem sofrer supercorreção.



**Figura 17** - Correção de fundo com mínimos quadrados para Zn em 213,857 nm: **(a)** branco do digerido da amostra usado como referência, **(b)** digerido da amostra – interferência da banda molecular do NO e **(c)** espectro do Zn após correção pelos mínimos quadrados

As determinações de Ca, Mg e K foram feitas nos digeridos das amostras preparadas pelos procedimentos 1, 2, 4 e 5. Os digeridos foram diluídos 125 vezes e a concentração ótima de La para determinar Ca e Mg foi avaliada de 0 à 2,5% (m/v) La. Os íons fosfato formam compostos estáveis com Ca e Mg em chama ar/acetileno e o lantânio é frequentemente usado para eliminar esta interferência. O lantânio se liga preferencialmente aos íons fosfato, liberando Ca e Mg para serem atomizados<sup>56</sup>.

Observando a Figura 18, constata-se que houve um acréscimo na absorbância de Ca em cerca de 10% quando a concentração de La aumentou de 0,5 para 1% (m/v), permanecendo constante em concentrações maiores. Para Mg a absorbância permaneceu constante mesmo com o aumento da concentração de La. Então, a concentração de La selecionada para a continuidade dos experimentos foi de 1% (m/v).



**Figura 18** - Influência da concentração de La na absorbância de **(a)** Ca e **(b)** Mg em uma amostra de folhas de cana-de-açúcar digerida pelo procedimento 2

Para estabelecer os intervalos lineares de trabalho, curvas analíticas para Ca, Mg e K foram construídas em 1 % (v/v) de HNO<sub>3</sub> e 1% La (m/v) sob as condições citadas no item 4.2.1. As curvas analíticas com absorbância integrada no comprimento de onda equivalente a 1 (CP) e 3 pixels (CP ± 1) estão ilustradas na Figura 19. As curvas analíticas foram construídas somente para os comprimentos de

onda principais inicialmente, pois a idéia era diluir as amostras e determinar Ca, Mg e K. Como alta sensibilidade não era requerida para estes macronutrientes devido as suas altas concentrações em folhas, a integração da absorbância ficou limitada de 1 a 3 pixels.

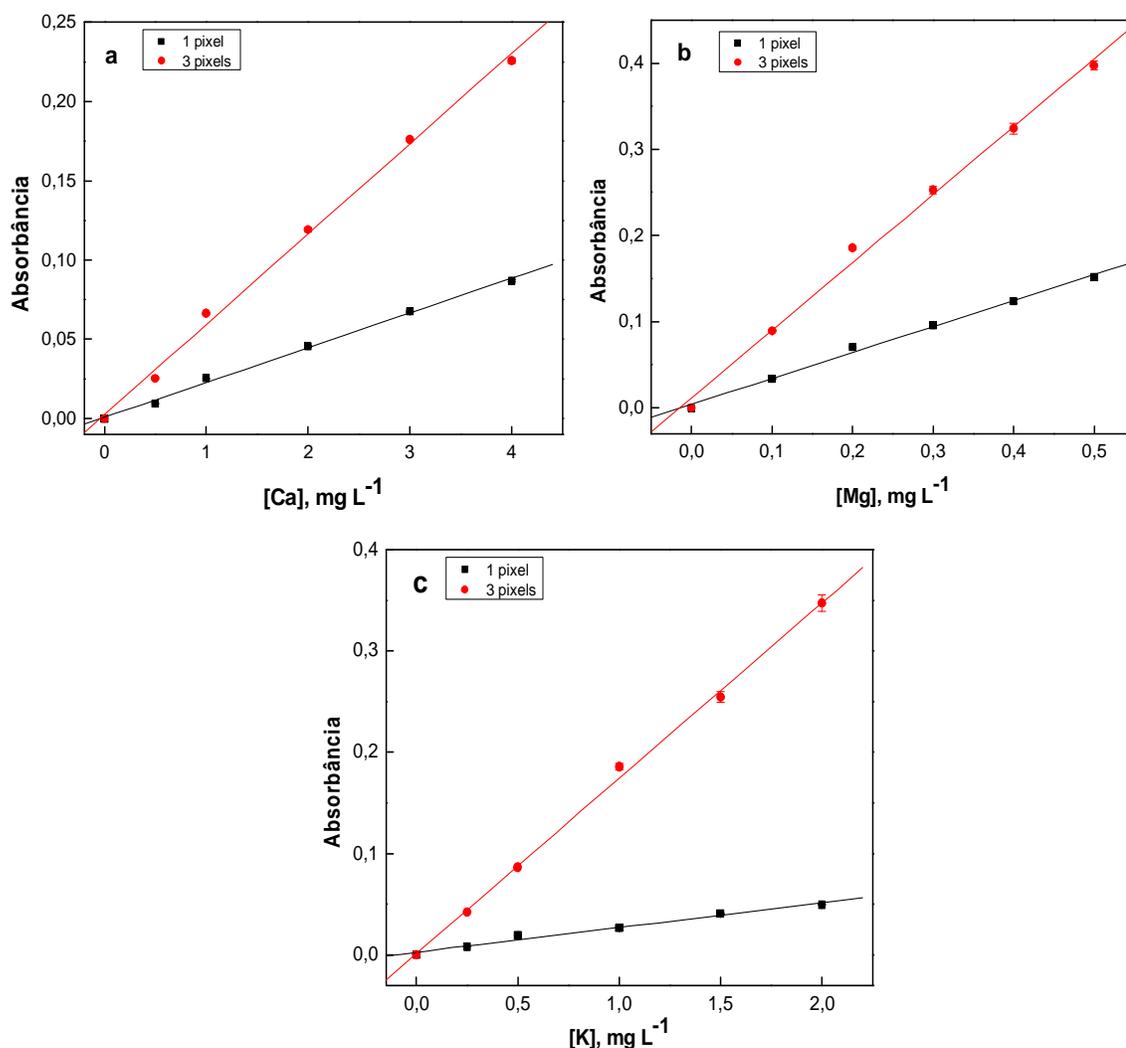
A Figura 19 ilustra a influência da área de integração na sensibilidade e a Tabela 18 resume as características para estas condições. Como pode ser observado, as inclinações das curvas analíticas foram maiores para 3 pixels, assim como as concentrações características foram menores, para todos os macronutrientes. Não foi possível estender o intervalo linear para estes elementos usando apenas 1 pixel, pois a redução de sensibilidade não foi suficiente para isso. Considerando que o intervalo linear foi o mesmo para 1 e 3 pixels e que a precisão foi melhor para 3 pixels, escolheu-se a área de integração equivalente a 3 pixels para determinar Ca, Mg e K conjuntamente.

**Tabela 18** - Inclinação da curva analítica (b), coeficiente de correlação linear (R), concentração característica ( $C_o$ ), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e desvio padrão relativo (RSD) para Ca 422,673 nm; (b) Mg 285,213 nm e (c) K 766,491 nm em 1% (v/v)  $HNO_3$  e 1% (v/v) La e absorbância integrada no comprimento de onda equivalente a 1 e 3 pixels

1 pixel (CP)						
Elemento e linha atômica (nm)	b	R	$C_o$ , $\mu g L^{-1}$	LOD, $\mu g L^{-1}$	LOQ, $\mu g L^{-1}$	RSD %
Ca 422,673 nm	0,02194	0,99862	201,0	41,0	137,0	2,1
Mg 285,213 nm	0,30092	0,99795	14,0	8,0	26,6	2,1
K 766,491 nm	0,02435	0,9905	181,0	49,2	164,0	5,6
3 pixels (CP $\pm$ 1)						
Elemento e linha atômica (nm)	b	R	$C_o$ , $\mu g L^{-1}$	LOD, $\mu g L^{-1}$	LOQ, $\mu g L^{-1}$	RSD %
Ca 422,673 nm	0,05696	0,99844	77,7	31,6	105,0	2,0
Mg 285,213 nm	0,788	0,99768	5,5	3,0	10,2	1,9
K 766,491 nm	0,17315	0,99899	25,4	20,8	69,3	2,2

$C_o$  = concentração característica (0,0044 / inclinação da curva analítica);

LOD = limite de detecção ( $3 \times SD_{branco} / b$ ); LOQ = limite de quantificação ( $10 \times SD_{branco} / b$ )



**Figura 19** - Curvas analíticas para **(a)** Ca 422,673 nm; **(b)** Mg 285,213 nm e **(c)** K 766,491 nm em 1% (v/v) HNO<sub>3</sub> e 1% (m/v) La com absorbância integrada no comprimento de onda equivalente a 1 e 3 pixels

Na Tabela 19 estão apresentados os resultados obtidos para a amostra do talhão 4 nos diferentes procedimentos de preparo de amostras (1, 2, 4 e 5). Os resultados para os macronutrientes foram concordantes entre os procedimentos de preparo de amostra utilizados, exceto para o Ca que apresentou concentração um pouco maior no procedimento 2. Além disso, houve concordância com os teores médios encontrados na literatura (Tabela 3). Os teores dos macronutrientes foram concordantes entre os dois tipos de moagem empregados, e assim ambas moagens podem ser utilizadas antes de digerir as amostras. Os 4 procedimentos de digestão

podem ser considerados eficientes e assim como no caso dos micronutrientes, recomenda-se utilizar o procedimento 2 pelos motivos citados.

**Tabela 19** - Resultados (em mg kg<sup>-1</sup>) para a determinação ( $n=4$ ) de Ca, Mg e K em amostra de folhas de cana-de-açúcar do talhão n° 4 moídas em moinho criogênico e moinho de facas por HR-CS FAAS empregando os procedimentos n° 1, 2, 4 e 5

Elemento e linha atômica (nm)	Procedimento 1		Procedimento 2		Procedimento 4	Procedimento 5
	Criogênico	Facas	Criogênico	Facas	Facas	Facas
Ca 422,673	3,8 ± 0,1	3,9 ± 0,1	4,2 ± 0,1	4,2 ± 0,1	3,8 ± 0,1	4,2 ± 0,1
Mg 285,213	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1
K 766,491	15,7 ± 0,3	15,9 ± 0,2	15,8 ± 0,3	16,0 ± 0,2	15,8 ± 0,4	15,9 ± 0,4

Estudos de adição e recuperação também foram feitos em dois níveis de adição para todas as amostras de folhas de cana-de-açúcar, empregando o procedimento 2. A recuperação variou de 82 a 113% para todos os macronutrientes demonstrando a eficiência do procedimento de digestão e do método de determinação por HR-CS FAAS. Os materiais de referência certificados foram digeridos pelo procedimento 2 e os resultados encontrados estão na Tabelas 20. Os teores médios encontrados são comparáveis com os valores certificados ao nível de 95% de confiança, com exceção para K em folhas de pessegueiro (Peach Leaves) e para Ca, Mg e K em folhas de Citrus (Citrus leaves). Os resultados também foram precisos.

**Tabela 20 - Resultados (em g 100g<sup>-1</sup>) para a determinação (n=4) de Ca, Mg e K nos materiais certificados Tomato Leaves, Apple Leaves, Spinach Leaves, Peach Leaves e Citrus Leaves por HR-CS FAAS empregando o procedimento n° 2**

Elemento e linha atômica (nm)	Tomato Leaves		Apple Leaves		Spinach Leaves		Peach Leaves		Citrus Leaves	
	Encontrado	Certificado	Encontrado	Certificado	Encontrado	Certificado	Encontrado	Certificado	Encontrado	Certificado
Ca 422,673	5,13±0,15	5,05±0,09	1,510±0,020	1,526±0,015	1,505±0,019	1,527±0,041	1,60 ± 0,05	1,56 ± 0,02	3,00 ± 0,09	3,15 ± 0,10
Mg 285,213	ND	ND*	0,272±0,010	0,271± 0,008	ND	ND*	0,433±0,006	0,432± 0,008	0,54 ± 0,02	0,58 ± 0,03
K 766,491	2,65±0,07	2,70±0,05	1,67±0,04	1,61±0,02	2,899±0,040	2,903±0,052	2,06 ± 0,05	2,43 ± 0,03	1,76 ± 0,03	1,82 ± 0,06

\* Não Disponível

Algumas figuras de mérito para as determinações de Ca, Mg e K por HR-CS FAAS estão apresentadas na Tabelas 21. A técnica HR-CS FAAS também apresentou forte potencial na determinação conjunta de Ca, Mg e K em folhas de cana-de-açúcar.

**Tabela 21** - Inclinação da curva analítica (b), coeficiente de correlação linear (R), concentração característica ( $C_o$ ), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e precisão (RSD) para Ca, Mg e K com absorbância integrada no comprimento de onda equivalente a 3 pixels ( $CP \pm 1$ ) obtidos por HR-CS FAAS

Elemento e linha atômica (nm)	b	R	$C_o, \mu\text{g L}^{-1}$	LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQ, $\mu\text{g L}^{-1}$	RSD, %
Ca 422,673	0,0604	0,99958	72,9	9,9	33,1	2,4
Mg 285,213	1,2651	0,99949	3,5	2,0	6,6	3,2
K 766,491	0,3213	0,99934	13,7	3,9	13,2	2,3

Apesar da determinação de Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K em folhas de cana-de-açúcar por HR-CS FAAS ser viável e conduzida de modo a determinar primeiramente os micronutrientes, e, em seguida, os macronutrientes (após diluição das amostras e adição de lantânio), avaliou-se a possibilidade de determinar estes 7 elementos conjuntamente empregando linhas secundárias para os macronutrientes e assim dispensar a etapa de diluição e reduzir o tempo total de análise.

O procedimento 2 selecionado para o preparo de amostras em forno de micro-ondas com seis posições foi adaptado para um outro forno de micro-ondas de 48 posições (procedimento 6). Neste caso, a ordem de adição dos reagentes foi a seguinte:  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HNO}_3$  e  $\text{HCl}$ . É importante seguir esta ordem de adição dos reagentes, pois o diâmetro dos frascos é pequeno (2 cm) e se o  $\text{HNO}_3$  ou o  $\text{HCl}$  forem adicionados diretamente sobre as amostras, as reações químicas são intensas e podem levar a perda de massa.

O uso de linhas analíticas alternativas e menos sensíveis é a melhor maneira de reduzir a sensibilidade e estender o intervalo linear de calibração para determinar elementos majoritários, evitando os erros acarretados pelas altas diluições. Neste contexto, as linhas secundárias para a Ca, Mg e K foram avaliadas com intuito de

determinar estes elementos juntamente com os demais do grupo. As linhas secundárias para Ca (239,856 nm), Mg (202,582 nm) e K (404,414 nm) foram investigadas após a construção de curvas de calibração de 0,0 – 100,0 mg L<sup>-1</sup> Ca, 0,0 – 40,0 mg L<sup>-1</sup> Mg e 0,0 – 250,0 mg L<sup>-1</sup> K com absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 3 pixels. As curvas para Ca e K apresentaram coeficientes de correlação lineares melhores que 0,9994 e desvios padrão relativos de 2,8 e 1,6%, respectivamente (Tabela 22 e Figura 20).

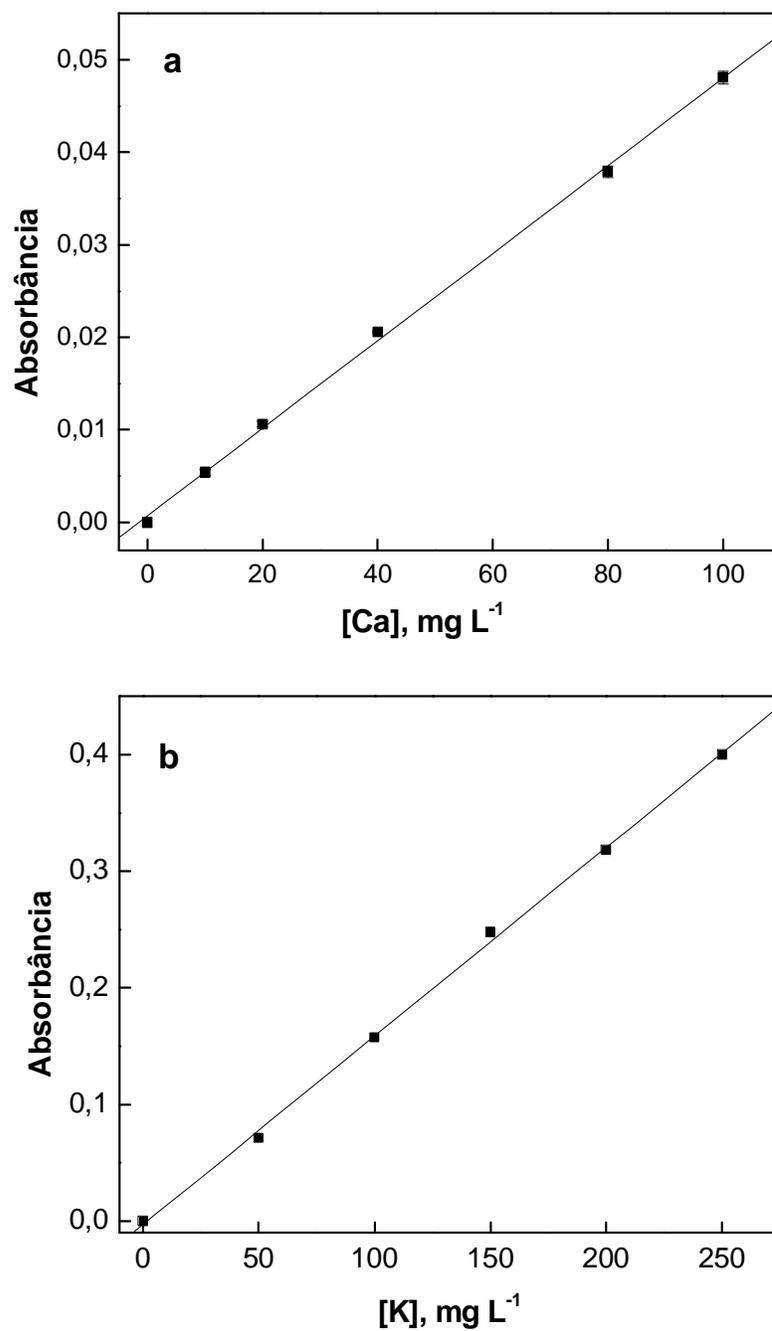
**Tabela 22** - Características analíticas das linhas secundárias (Ca, Mg, K) e alternativas (Mg) obtidas por HR-CS FAAS com absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 3 pixels (CP ± 1)

Elemento e linha atômica (nm)	b, L mg <sup>-1</sup>	R <sup>a</sup>	C <sub>0</sub> , mg L <sup>-1</sup>	LOD <sup>b</sup> , mg L <sup>-1</sup>	RSD, %
Ca 239,856	0,00047	0,99943	9,4	0,6	2,8
Mg 202,588	0,00401	0,99872	1,1	0,4	2,7
Mg 202,587	0,00667	0,98449	0,7	0,8	3,1
Mg 202,586	0,01247	0,99088	0,4	0,4	2,3
Mg 202,585	0,0181	0,99161	0,2	0,2	2,2
Mg 202,582	0,02122	0,98500	0,2	0,1	1,6
Mg 202,580	0,00922	0,97868	0,5	1,0	3,8
Mg 202,578	0,00482	0,98742	0,9	0,6	3,2
Mg 202,577	0,00278	0,9966	1,6	0,6	5,8
Mg 202,576	0,00129	0,99766	3,4	1,2	8,1
K 404,414	0,00162	0,99944	2,7	0,4	1,6

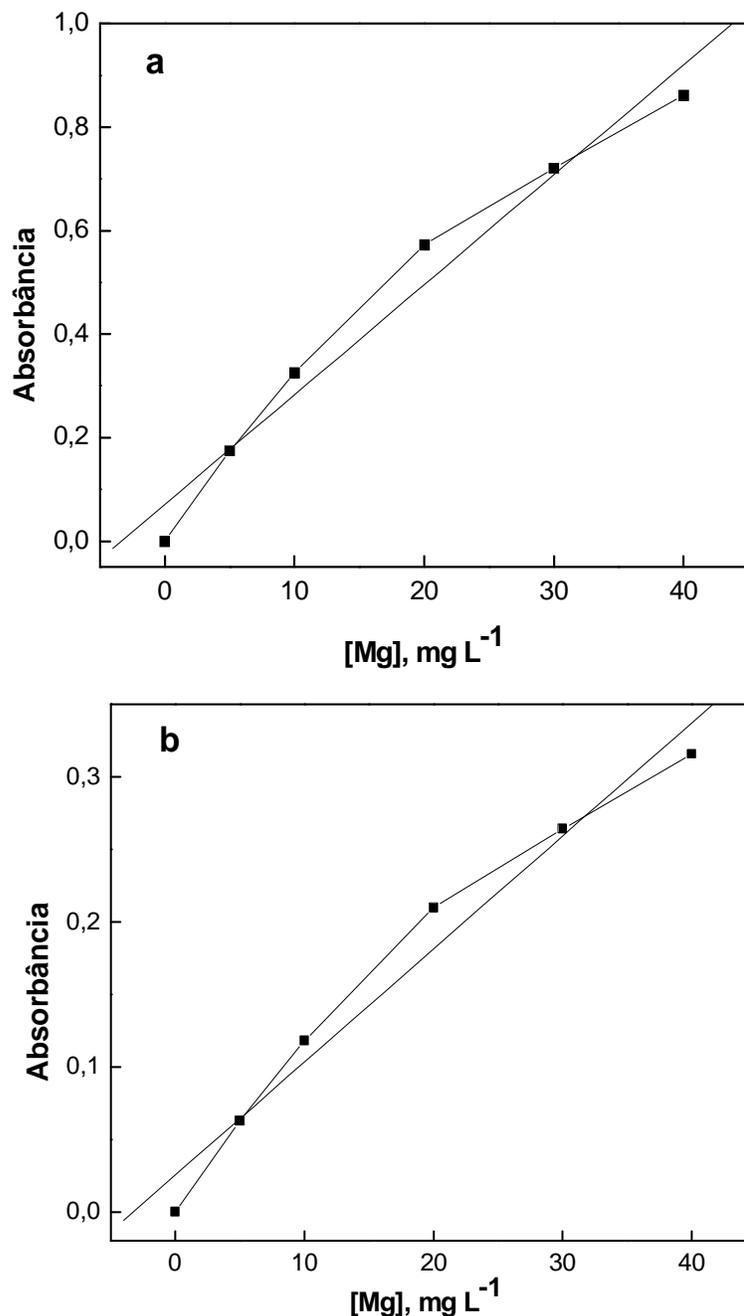
<sup>a</sup> Coeficiente de correlação linear;

<sup>b</sup> Limite de detecção.

Para Mg, a curva de calibração apresentou coeficiente de correlação linear de 0,9850. Como é possível observar na Figura 21a o intervalo dinâmico linear para o Mg nesta linha vai até aproximadamente 20 mg L<sup>-1</sup>, com coeficiente de correlação de 0,9964. Na tentativa de estender o intervalo linear de trabalho para Mg, foi feita a medida com absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 1 pixel. Usando 1 pixel foi possível reduzir levemente a sensibilidade, mas não o suficiente para impedir o desvio da linearidade como pode ser observado na Figura 21b. O coeficiente de correlação linear obtido para 1 pixel foi 0,9854.



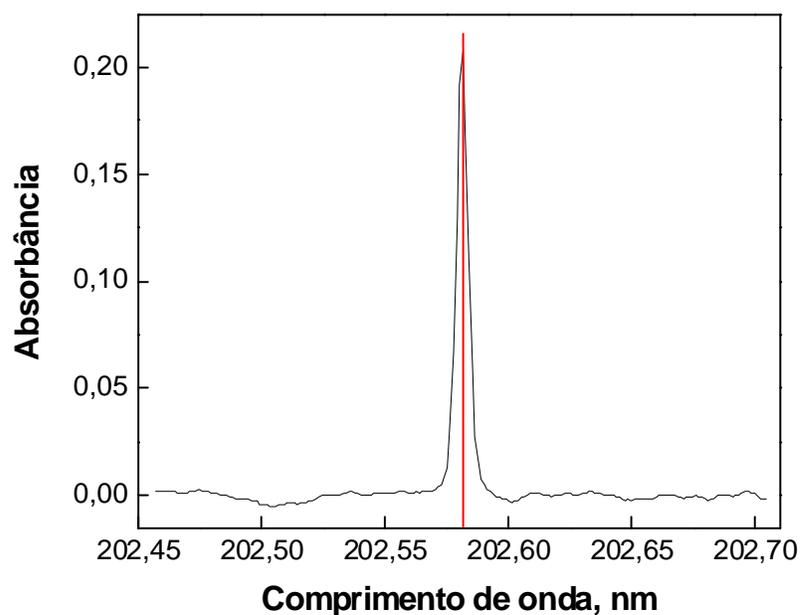
**Figura 20** - Curva de calibração nas linhas secundárias para **(a)** Ca em 239,856 nm e para **(b)** K em 404,414 nm com absorbância integrada no comprimento de onda equivalente a 3 pixels



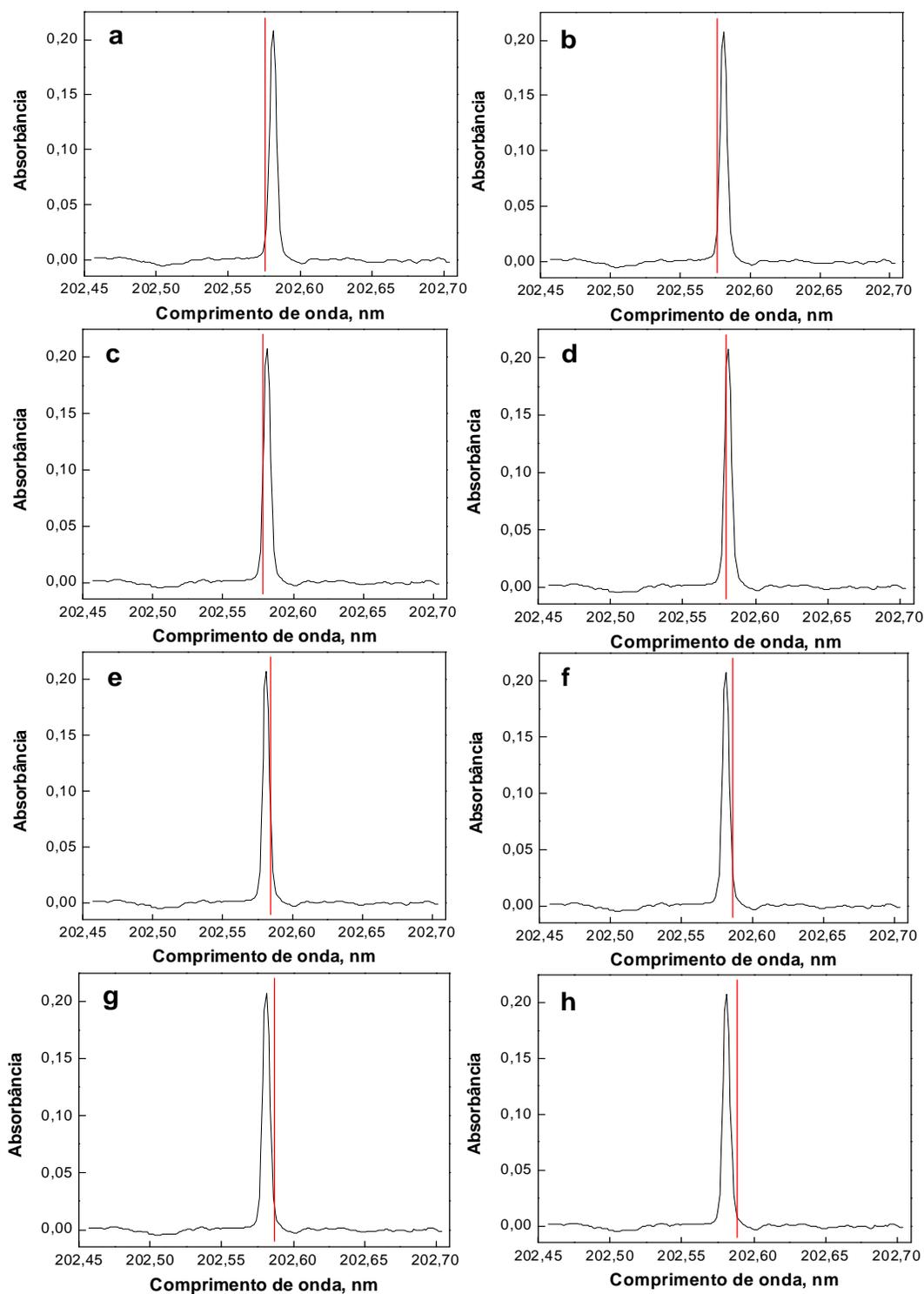
**Figura 21** - Curva de calibração para Mg na linha secundária 202,582 nm: **(a)** 3 pixels e **(b)** 1 pixel

A possibilidade de selecionar comprimentos de onda alternativos nas "asas" de uma linha analítica foi investigada para reduzir sensibilidade e ampliar o intervalo linear de trabalho para Mg. Foi avaliada a medida nos comprimentos de onda 202,576 nm, 202,577 nm, 202,578 nm, 202,580 nm, 202,584 nm, 202,586 nm;

202,587 nm e 202,588 nm. Estes comprimentos de onda foram selecionados de modo a se apresentarem equidistantes (à esquerda e à direita) da linha secundária do Mg (202,582 nm). O mesmo intervalo linear anteriormente avaliado (0,0 – 40,0 mg L<sup>-1</sup>) e área de integração (3 pixels) foram empregados. Nas Figuras 22 e 23 estão apresentados os espectros de absorção atômica para Mg na linha secundária (202,582 nm) e nos comprimentos de onda alternativos escolhidos.



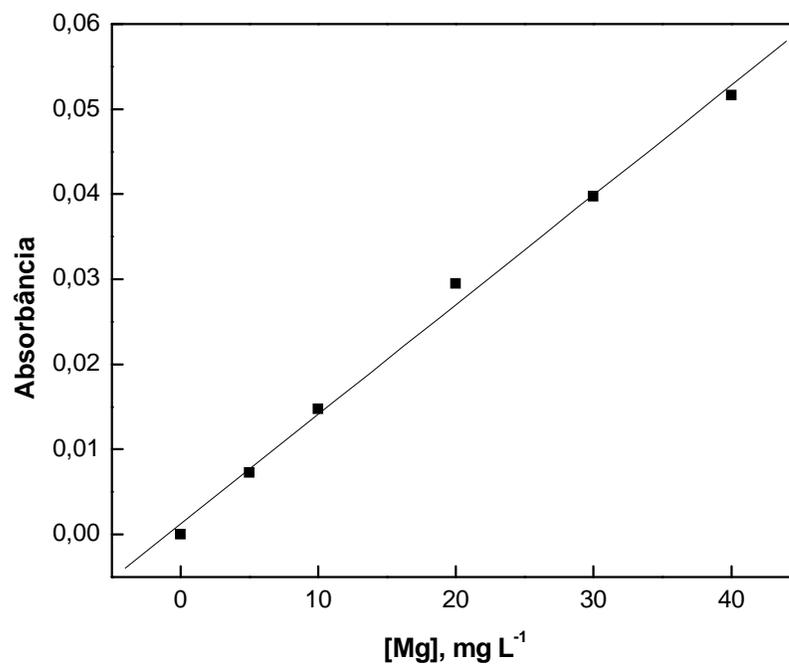
**Figura 22** - Espectro de absorbância *versus* comprimento de onda para Mg na linha secundária 202,582 nm para uma solução contendo 20 mg L<sup>-1</sup> de Mg



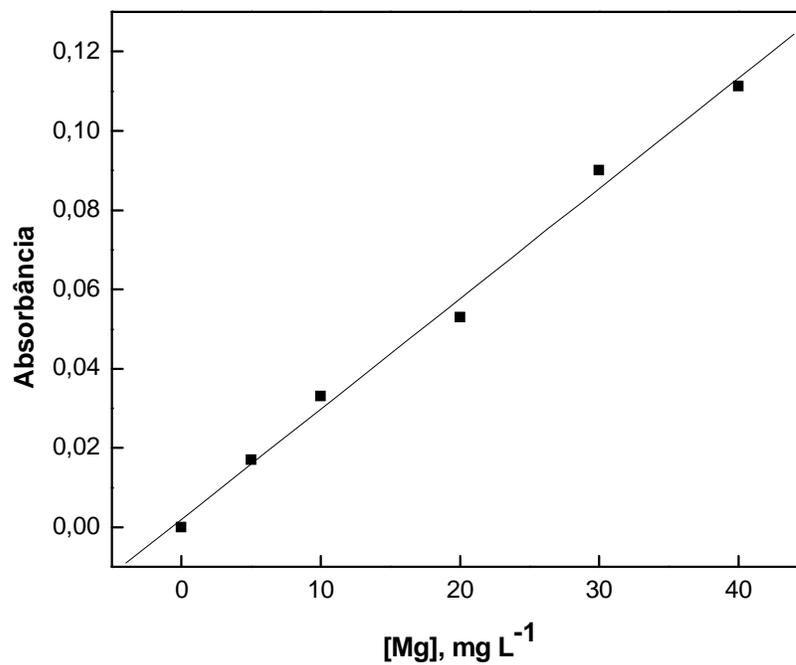
**Figura 23** - Espectro de absorvância versus comprimento de onda para Mg nos comprimentos de onda alternativos: **(a)** 202,576 nm; **(b)** 202,577 nm; **(c)** 202,578 nm; **(d)** 202,580 nm; **(e)** 202,585 nm; **(f)** 202,586 nm; **(g)** 202,587 nm; **(h)** 202,588 nm

Inclinação da curva analítica ( $b$ ), coeficiente de correlação ( $R$ ), concentração característica ( $C_0$ ), limite de detecção (LOD) e valores de RSD obtidos para cada comprimento de onda alternativo avaliado para Mg estão descritos na Tabela 22. A análise desta Tabela revela que a maior sensibilidade ( $b= 0,02122 \text{ L mg}^{-1}$ ;  $C_0= 0,2 \text{ mg L}^{-1}$ ) e o menor LOD ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) para Mg estão associados à linha secundária (202,582 nm). No entanto, esta linha forneceu um coeficiente de correlação linear baixo (0,9850). Redução gradativa da sensibilidade e maiores limites de detecção foram encontrados à medida que o comprimento de onda selecionado estivesse mais afastado do comprimento de onda secundário (ou seja, com o aumento da distância do pixel central).

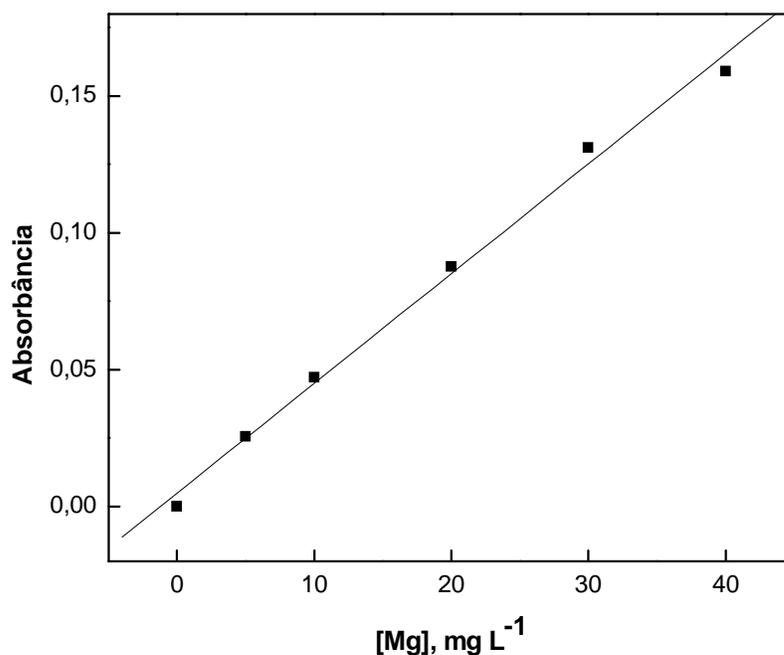
A análise da Tabela 22 revela que medir em comprimentos de onda alternativos na "asa esquerda" é diferente de medir em comprimentos de onda alternativos na "asa direita", mesmo quando estes comprimentos de onda estiverem equidistantes um do outro. Isto pode ser observado pelos valores das inclinações das curvas analíticas e das concentrações características. As linhas analíticas alternativas e menos sensíveis para Mg em 202,576 nm, 202,577 nm e 202,588 nm permitiram ampliar a resposta linear até  $40,0 \text{ mg L}^{-1}$  com coeficientes de correlação linear maiores que 0,9966 (Figuras 24-26). No entanto, as medidas feitas no comprimento de onda 202,588 nm forneceram um desvio padrão relativo de no máximo (2,7%), e assim, este foi selecionado para a determinação direta de Mg nos digeridos de folhas (juntamente com Ca, K, Cu, Fe, Mn, Zn) como uma boa condição de compromisso entre boa precisão e adequado limite de detecção. Estes comprimentos de onda alternativos também foram avaliados integrando 1 pixel, no entanto, a precisão foi menor com esta área de integração.



**Figura 24** - Curva de calibração para Mg em 202,576 nm



**Figura 25** - Curva de calibração para Mg em 202,577 nm



**Figura 26** - Curva de calibração para Mg em 202,588 nm

O estabelecimento dos intervalos lineares de trabalho para Ca e K nas linhas secundárias, assim como a extensão do intervalo para Mg foram relevantes para viabilizar a medida de absorbância destes analitos diretamente nos digeridos de folhas. Com o método otimizado, fez-se a determinação multielementar de Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K nas amostras de folhas de cana-de-açúcar. Curvas analíticas de 0,0 – 100,0 mg L<sup>-1</sup> Ca, 0,0 – 40,0 mg L<sup>-1</sup> Mg, 0,0 – 250,0 mg L<sup>-1</sup> K, 0,0 – 0,5 mg L<sup>-1</sup> Cu, 0,0 – 4,0 mg L<sup>-1</sup> Fe, 0,0 – 4,0 mg L<sup>-1</sup> Mn e 0,0 - 1,0 mg L<sup>-1</sup> Zn em meio de 1% (m/v) La e 1% (v/v) HNO<sub>3</sub> foram obtidas com coeficientes de correlação linear maiores que 0,998. As figuras de mérito para Cu, Fe, Mn Zn, Ca, Mg e K neste método, inclinação da curva analítica (b), coeficiente de correlação (R), concentração característica (C<sub>0</sub>), limite de detecção (LOD) e valores de RSD estão descritos na Tabela 23.

**Tabela 23** - Características analíticas das linhas principais (Cu, Fe, Mn e Zn), linhas secundárias (Ca e K) e alternativa (Mg) obtidas por HR-CS FAAS com absorvância integrada no comprimento de onda equivalente a 3 pixels (CP± 1)

Elemento e linha atômica (nm)	b, L mg <sup>-1</sup>	R <sup>a</sup>	C <sub>o</sub> , µg L <sup>-1</sup>	LOD <sup>b</sup> , µg L <sup>-1</sup>	RSD, %
Cu 324,754	0,1180	0,99978	37,3 (18)*	7,7	2,1
Fe 248,327	0,0444	0,99974	99,1 (44)*	7,7	2,2
Mn 279,482	0,1229	0,99827	35,8 (12)*	1,5	1,6
Zn 213,857	0,2530	0,99816	17,4 (7)*	5,9	1,4
Ca 239,856**	0,00047	0,99943	9,4	0,6	2,8
Mg 202,588**	0,00401	0,99872	1,1	0,4	2,7
K 404,414**	0,00162	0,99944	2,7	0,4	1,6

\* Concentrações características (C<sub>o</sub>) fornecidas por Welz et al., 2005, em condição monoelementar;

\*\* C<sub>o</sub> e LOD em mg L<sup>-1</sup>;

<sup>a</sup> Coeficiente de correlação linear;

<sup>b</sup> Limite de detecção.

As concentrações médias dos macro e micronutrientes nas amostras dos três talhões de cana-de-açúcar estão nas Tabelas 24-26. As concentrações encontradas variaram de 3,7-4,2 g kg<sup>-1</sup> Ca, 1,8-2,6 g kg<sup>-1</sup> Mg, 13,1-18,0 g kg<sup>-1</sup> K, 8,2 -44,0 mg kg<sup>-1</sup> Cu, 86,1-142,5 mg kg<sup>-1</sup> Fe, 48,1-66,5 mg kg<sup>-1</sup> Mn e 26,6-42,3 mg kg<sup>-1</sup> Zn, considerando a moagem criogênica e por facas. Estes teores são concordantes com aqueles encontrados na literatura para cana-de-açúcar (Tabela 3), com exceção do K e Cu, que ficaram acima dos normalmente encontrados. Para a amostra do talhão 2, os teores de Cu e Fe encontrados foram maiores nas amostras que foram moídas em moinho de facas devido a problemas de aquecimento do moinho, como já comentado.

As amostras foram também analisadas por LS FAAS como técnica comparativa e os resultados obtidos (Tabelas 27-29) foram concordantes com os obtidos por HR-CS FAAS ao nível de 95% de confiança (*teste t*), considerando os dois tipos de moagens empregados. Os teores de Cu e Fe na amostra do talhão 2, e de Zn na amostra do talhão 4 não foram concordantes entre as moagens. Os desvios padrão para a determinação por HR-CS FAAS e LS FAAS foram comparados (*teste F*), e considerando as duas moagens, constatou-se que não houve uma diferença significativa entre as duas precisões ao nível de 95% de confiança.

**Tabela 24** - Resultados (média  $\pm$  desvio padrão) para Ca, Mg e K ( $\text{g kg}^{-1}$ ) e para Cu, Fe, Mn e Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) determinados ( $n=4$ ) em amostra de folhas de cana-de-açúcar (talhão n° 2) e recuperação (em %) pelo método multielementar proposto (HR-CS FAAS)

Elemento e linha atômica (nm)	Teores		Criogênico*		Facas*	
	Criogênico	Facas	Rec 1	Rec 2	Rec 1	Rec 2
Cu 324,754	8,5 $\pm$ 0,4	44,0 $\pm$ 0,6	92	94	92	97
Fe 248,327	86,1 $\pm$ 2,2	142,5 $\pm$ 3,7	92	92	96	92
Mn 279,482	49,0 $\pm$ 1,4	49,6 $\pm$ 2,2	114	102	112	102
Zn 213,857	42,2 $\pm$ 0,9	42,3 $\pm$ 1,6	114	104	109	106
Ca 239,856	3,7 $\pm$ 0,2	3,7 $\pm$ 0,1	91	92	98	97
Mg 202,588	2,5 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,1	107	92	98	93
K 404,414	17,9 $\pm$ 0,2	18,0 $\pm$ 0,5	96	87	87	88

\* Recuperações (Rec 1 e Rec 2) após adições dos analitos as amostras sólidas visando incrementar as concentrações em 0,10 e 0,25  $\text{mg L}^{-1}$  Cu, 0,5 e 2,0  $\text{mg L}^{-1}$  Fe e Mn, 0,2 e 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  Zn, 10 e 40  $\text{mg L}^{-1}$  Ca, 5 e 20  $\text{mg L}^{-1}$  Mg e 50 e 150  $\text{mg L}^{-1}$  K.

**Tabela 25** - Resultados (média  $\pm$  desvio padrão) para Ca, Mg e K ( $\text{g kg}^{-1}$ ) e para Cu, Fe, Mn e Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) determinados ( $n=4$ ) em amostra de folhas de cana-de-açúcar (talhão n° 3) e recuperação (em %) pelo método multielementar proposto (HR-CS FAAS)

Elemento e linha atômica (nm)	Teores		Criogênico*		Facas*	
	Criogênico	Facas	Rec 1	Rec 2	Rec 1	Rec 2
Cu 324,754	8,7 $\pm$ 0,5	8,5 $\pm$ 0,2	97	85	100	99
Fe 248,327	111,0 $\pm$ 0,9	110,9 $\pm$ 2,2	92	96	98	86
Mn 279,482	48,8 $\pm$ 0,6	48,1 $\pm$ 2,0	91	95	104	91
Zn 213,857	39,0 $\pm$ 1,5	39,0 $\pm$ 1,4	102	96	103	92
Ca 239,856	4,0 $\pm$ 0,2	4,1 $\pm$ 0,1	98	99	95	97
Mg 202,588	2,6 $\pm$ 0,1	2,6 $\pm$ 0,1	84	85	93	95
K 404,414	13,4 $\pm$ 0,3	13,1 $\pm$ 0,1	95	95	94	102

\* Recuperações (Rec 1 e Rec 2) após adições dos analitos as amostras sólidas visando incrementar as concentrações em 0,10 e 0,25  $\text{mg L}^{-1}$  Cu, 0,5 e 2,0  $\text{mg L}^{-1}$  Fe e Mn, 0,2 e 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  Zn, 10 e 40  $\text{mg L}^{-1}$  Ca, 5 e 20  $\text{mg L}^{-1}$  Mg e 50 e 150  $\text{mg L}^{-1}$  K.

**Tabela 26** - Resultados (média  $\pm$  desvio padrão) para Ca, Mg e K ( $\text{g kg}^{-1}$ ) e para Cu, Fe, Mn e Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) determinados ( $n=4$ ) em amostra de folhas de cana-de-açúcar (talhão n° 4) e recuperação (em %) pelo método multielementar proposto (HR-CS FAAS)

Elemento e linha atômica (nm)	Teores		Criogênico*		Facas*	
	Criogênico	Facas	Rec 1	Rec 2	Rec 1	Rec 2
Cu 324,754	8,3 $\pm$ 0,3	8,2 $\pm$ 0,4	103	105	101	100
Fe 248,327	124,8 $\pm$ 3,0	125,0 $\pm$ 1,9	102	106	103	106
Mn 279,482	66,5 $\pm$ 0,9	66,5 $\pm$ 0,9	92	101	101	104
Zn 213,857	26,6 $\pm$ 1,1	26,7 $\pm$ 0,3	104	103	98	102
Ca 239,856	4,2 $\pm$ 0,1	4,2 $\pm$ 0,2	103	89	104	97
Mg 202,588	1,8 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,1	102	101	101	102
K 404,414	15,9 $\pm$ 0,5	15,9 $\pm$ 0,1	103	97	102	93

\* Recuperações (Rec 1 e Rec 2) após adições dos analitos as amostras sólidas visando incrementar as concentrações em 0,10 e 0,25  $\text{mg L}^{-1}$  Cu, 0,5 e 2,0  $\text{mg L}^{-1}$  Fe e Mn, 0,2 e 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  Zn, 10 e 40  $\text{mg L}^{-1}$  Ca, 5 e 20  $\text{mg L}^{-1}$  Mg e 50 e 150  $\text{mg L}^{-1}$  K.

**Tabela 27** - Resultados (média  $\pm$  desvio padrão) para Ca, Mg e K ( $\text{g kg}^{-1}$ ) e para Cu, Fe, Mn e Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) determinados ( $n=4$ ) em amostra de folhas de cana-de-açúcar (talhão n° 2) e recuperação (em %) pelo método monoelementar (LS FAAS)

Elemento e linha atômica (nm)	Teores em $\text{mg kg}^{-1}$		Criogênico*		Facas*	
	Criogênico	Facas	Rec 1	Rec 2	Rec 1	Rec 2
Cu 324,8	8,5 $\pm$ 0,5	42,9 $\pm$ 1,2	104	107	101	103
Fe 248,3	82,7 $\pm$ 2,5	145,1 $\pm$ 2,9	102	95	105	108
Mn 279,5	49,6 $\pm$ 1,2	49,7 $\pm$ 1,3	104	102	103	99
Zn 213,9	40,7 $\pm$ 2,9	40,9 $\pm$ 2,3	106	105	107	104
Ca 422,7	3,7 $\pm$ 0,1	3,7 $\pm$ 0,1	95	101	98	94
Mg 285,2	2,5 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,1	94	102	98	92
K 766,5	18,2 $\pm$ 0,2	18,1 $\pm$ 0,4	102	93	96	90

\* Recuperações (Rec 1 e Rec 2) após adições dos analitos as amostras sólidas visando incrementar as concentrações em 0,10 e 0,25  $\text{mg L}^{-1}$  Cu, 0,5 e 2,0  $\text{mg L}^{-1}$  Fe e Mn, 0,2 e 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  Zn, 0,5 e 2,5  $\text{mg L}^{-1}$  Ca, 0,15 e 0,30  $\text{mg L}^{-1}$  Mg e 0,25 e 1,5  $\text{mg L}^{-1}$  K.

**Tabela 28** - Resultados (média  $\pm$  desvio padrão) para Ca, Mg e K ( $\text{g kg}^{-1}$ ) e para Cu, Fe, Mn e Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) determinados ( $n=4$ ) em amostra de folhas de cana-de-açúcar (talhão n° 3) e recuperação (em %) pelo método monoelementar (LS FAAS)

Elemento e linha atômica (nm)	Teores		Criogênico*		Facas*	
	Criogênico	Facas	Rec 1	Rec 2	Rec 1	Rec 2
Cu 324,8	8,5 $\pm$ 0,3	8,39 $\pm$ 0,41	96	98	103	104
Fe 248,3	109,1 $\pm$ 3,0	109,7 $\pm$ 2,9	97	98	98	92
Mn 279,5	51,3 $\pm$ 1,9	48,8 $\pm$ 1,8	101	98	100	102
Zn 213,9	37,2 $\pm$ 1,0	37,3 $\pm$ 0,5	107	109	106	105
Ca 422,7	4,1 $\pm$ 0,1	4,1 $\pm$ 0,12	92	95	96	91
Mg 285,2	2,6 $\pm$ 0,1	2,6 $\pm$ 0,1	104	102	97	102
K 766,5	13,0 $\pm$ 0,3	13,1 $\pm$ 0,3	97	105	102	90

\* Recuperações (Rec 1 e Rec 2) após adições dos analitos as amostras sólidas visando incrementar as concentrações em 0,10 e 0,25  $\text{mg L}^{-1}$  Cu, 0,5 e 2,0  $\text{mg L}^{-1}$  Fe e Mn, 0,2 e 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  Zn, 0,5 e 2,5  $\text{mg L}^{-1}$  Ca, 0,15 e 0,30  $\text{mg L}^{-1}$  Mg e 0,25 e 1,5  $\text{mg L}^{-1}$  K.

**Tabela 29** - Resultados (média  $\pm$  desvio padrão) para Ca, Mg e K ( $\text{g kg}^{-1}$ ) e para Cu, Fe, Mn e Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) determinados ( $n=4$ ) em amostra de folhas de cana-de-açúcar (talhão n° 4) e recuperação (em %) pelo método monoelementar (LS FAAS)

Elemento e linha atômica (nm)	Teores		Criogênico*		Facas*	
	Criogênico	Facas	Rec 1	Rec 2	Rec 1	Rec 2
Cu 324,8	9,0 $\pm$ 0,6	9,0 $\pm$ 0,5	100	97	95	103
Fe 248,3	123,8 $\pm$ 4,0	122,6 $\pm$ 3,7	102	98	98	104
Mn 279,5	65,3 $\pm$ 1,7	65,4 $\pm$ 0,7	89	96	99	101
Zn 213,9	24,6 $\pm$ 0,2	25,0 $\pm$ 0,7	106	105	106	104
Ca 422,7	4,2 $\pm$ 0,2	4,2 $\pm$ 0,1	96	94	91	90
Mg 285,2	1,8 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,1	98	99	104	93
K 766,5	16,0 $\pm$ 0,2	16,1 $\pm$ 0,2	105	102	103	103

\* Recuperações (Rec 1 e Rec 2) após adições dos analitos as amostras sólidas visando incrementar as concentrações em 0,10 e 0,25  $\text{mg L}^{-1}$  Cu, 0,5 e 2,0  $\text{mg L}^{-1}$  Fe e Mn, 0,2 e 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  Zn, 0,5 e 2,5  $\text{mg L}^{-1}$  Ca, 0,15 e 0,30  $\text{mg L}^{-1}$  Mg e 0,25 e 1,5  $\text{mg L}^{-1}$  K.

Estudos de adição de analito foram feitos para verificar a exatidão do método proposto por HR-CS FAAS e os intervalos variaram de 89 - 104% (Ca), 84 - 107% (Mg), 87 - 103% (K), 85 - 107% (Cu), 86 - 108% (Fe), 91 - 114% (Mn) e 92 - 114% (Zn) (Tabelas 24-26). As recuperações obtidas via LS FAAS variaram de 90 - 107% (Ca), 92 - 104% (Mg), 90 - 105% (K), 95 - 107% (Cu), 92 - 108% (Fe), 89 - 104% (Mn) e 104 - 109% (Zn) (Tabelas 27-29). Os valores de desvios padrão relativos

( $n=12$ ) para uma amostra contendo  $4,2 \text{ g kg}^{-1}$  Ca,  $1,8 \text{ g kg}^{-1}$  Mg,  $15,9 \text{ g kg}^{-1}$  K,  $8,3 \text{ mg kg}^{-1}$  Cu,  $124,8 \text{ mg kg}^{-1}$  Fe,  $66,4 \text{ mg kg}^{-1}$  Mn e  $26,6 \text{ mg kg}^{-1}$  Zn foram 2,8% (Ca), 1,8% (Mg), 1,6% (K), 2,1% (Cu), 2,2% (Fe), 1,6% (Mn) e 1,4% (Zn), demonstrando a boa precisão do método. As características analíticas obtidas para Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K na determinação pela técnica comparativa LS FAAS estão na Tabela 30.

**Tabela 30** - Características analíticas das linhas principais para Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K obtidas por LS FAAS no modo monoelementar

Elemento e linha atômica (nm)	b, L $\text{mg}^{-1}$	R <sup>a</sup>	C <sub>0</sub> , $\mu\text{g L}^{-1}$	LOD <sup>b</sup> , $\mu\text{g L}^{-1}$	RSD, %
Cu 324,8	0,052	0,99926	84,6 (77)*	23,0	5,6
Fe 248,3	0,03143	0,9996	140,0 (110)*	9,5	3,4
Mn 279,5	0,07499	0,99951	59,0 (52)*	8,0	2,9
Zn 213,9	0,1930	0,99855	22,7 (18)*	9,3	3,5
Ca 422,7	0,0586	0,99958	72,9	9,9	2,4
Mg 285,2	0,6095	0,995	7,2	19,7	4,0
K 766,5	0,2794	0,998	----	10,7	2,7

\* Valores de C<sub>0</sub> fornecidos pelo fabricante do espectrômetro.

A exatidão do método proposto foi também avaliada após a análise de 5 materiais de referência (SRM 1573a Tomato Leaves; SRM 1572 Citrus Leaves; SRM 1515 Apple Leaves; SRM 1547 Peach Leaves; SRM 1570 Spinach leaves) e as médias encontradas para Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K são comparáveis com os valores certificados ao nível de 95% de confiança, com exceção do Zn em folhas de maçã (Apple Leaves). Os resultados foram precisos de acordo com o teste F, com exceção para Cu e Fe em folhas de pessegueiro (Peach leaves), Fe, Mn e Zn em folhas de citrus (citrus leaves), Mn e Zn em folhas de espinafre (Spinach leaves) e Mn em folhas de tomate (tomato leaves) (Tabela 31).

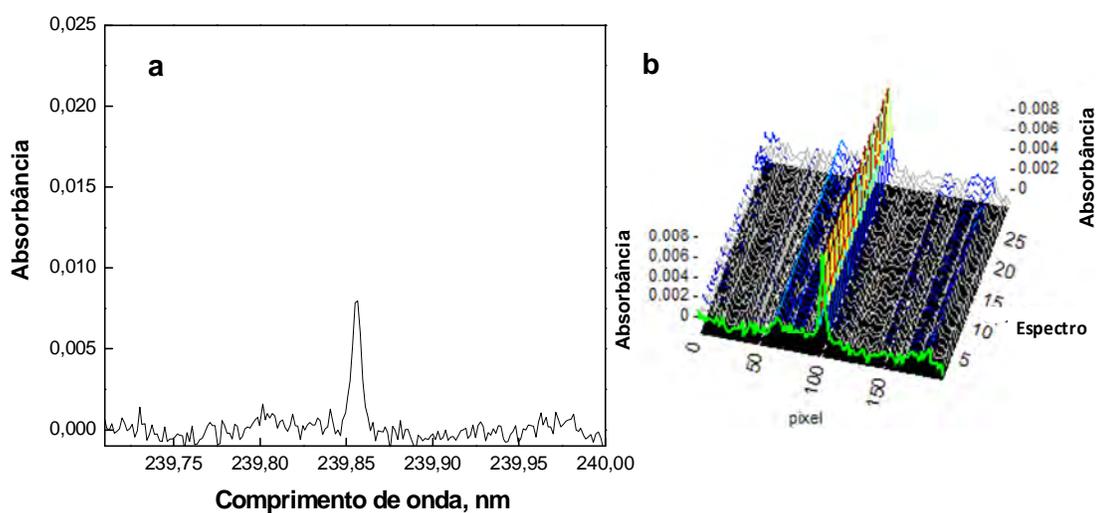
**Tabela 31 - Resultados (média  $\pm$  desvio padrão) para Ca, Mg e K (% m/m ) e para Cu, Fe, Mn e Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) determinados ( $n=4$ ) nos materiais certificados Tomato Leaves, Apple Leaves, Spinach Leaves, Peach Leaves e Citrus Leaves pelo método multielementar proposto (HR-CS FAAS)**

Elemento e linha atômica (nm)	Tomato Leaves		Apple Leaves		Spinach Leaves		Peach Leaves		Citrus Leaves	
	Encontrado	Certificado	Encontrado	Certificado	Encontrado	Certificado	Encontrado	Certificado	Encontrado	Certificado
Cu 324,754	4,69 $\pm$ 0,23	4,70 $\pm$ 0,14	5,67 $\pm$ 0,15	5,64 $\pm$ 0,24	11,9 $\pm$ 0,5	12,2 $\pm$ 0,6	3,8 $\pm$ 0,1	3,7 $\pm$ 0,4	16,2 $\pm$ 0,4	16,5 $\pm$ 1,0
Fe 248,327	371 $\pm$ 7	368 $\pm$ 7	83 $\pm$ 3	83 $\pm$ 5	ND	ND	220 $\pm$ 4	218 $\pm$ 14	90 $\pm$ 1	90 $\pm$ 10
Mn 279,482	249 $\pm$ 2	246 $\pm$ 8	55 $\pm$ 1	54 $\pm$ 3	76,1 $\pm$ 0,6	75,9 $\pm$ 1,9	98 $\pm$ 1	98 $\pm$ 3	23 $\pm$ 1	23 $\pm$ 2
Zn 213,857	30,7 $\pm$ 0,4	30,9 $\pm$ 0,7	11,8 $\pm$ 0,4	12,5 $\pm$ 0,3	82 $\pm$ 1	82 $\pm$ 3	17,7 $\pm$ 0,4	17,9 $\pm$ 0,4	29 $\pm$ 1	29 $\pm$ 2
Ca 239,856	5,09 $\pm$ 0,09	5,05 $\pm$ 0,09	1,510 $\pm$ 0,040	1,526 $\pm$ 0,015	1,540 $\pm$ 0,050	1,527 $\pm$ 0,041	1,59 $\pm$ 0,02	1,56 $\pm$ 0,02	3,10 $\pm$ 0,04	3,15 $\pm$ 0,10
Mg 202,588	ND*	ND	0,280 $\pm$ 0,010	0,271 $\pm$ 0,008	ND	ND	0,440 $\pm$ 0,009	0,432 $\pm$ 0,008	0,56 $\pm$ 0,02	0,58 $\pm$ 0,03
K 404,4140	2,68 $\pm$ 0,03	2,70 $\pm$ 0,05	1,65 $\pm$ 0,04	1,61 $\pm$ 0,02	2,920 $\pm$ 0,030	2,903 $\pm$ 0,052	2,45 $\pm$ 0,02	2,43 $\pm$ 0,03	1,79 $\pm$ 0,05	1,82 $\pm$ 0,06

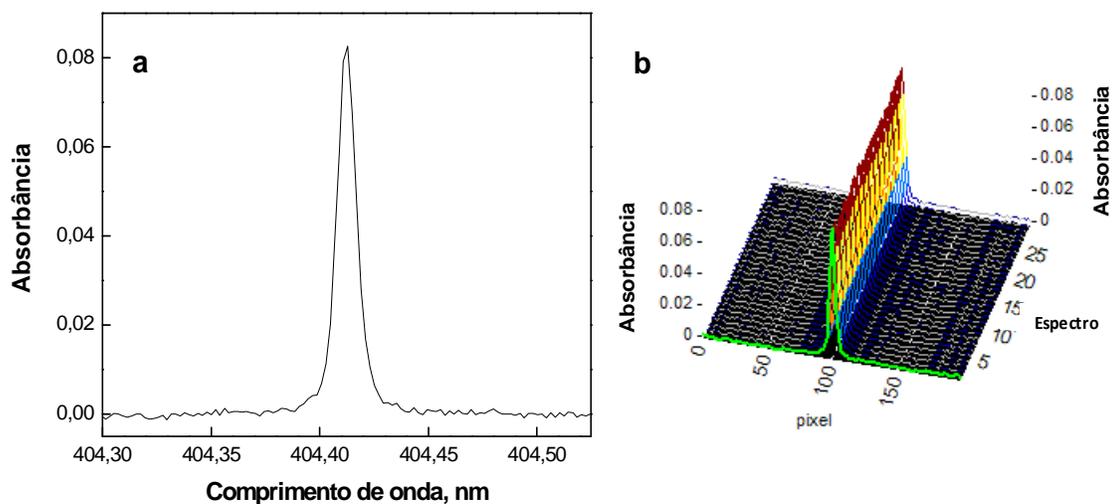
\* Não disponível

A interferência espectral do NO sobre a linha atômica principal do Zn também foi corrigida usando a correção de fundo pelos mínimos quadrados. Quando o material certificado de folhas de tomate (Tomato leaves) contendo  $30,9 \text{ mg kg}^{-1}$  Zn foi analisado, os teores encontrados foram  $30,7$  e  $37,6 \text{ mg kg}^{-1}$  com e sem a correção por LSBC, respectivamente. Isto reforça a necessidade de utilizar este tipo de correção na determinação de Zn.

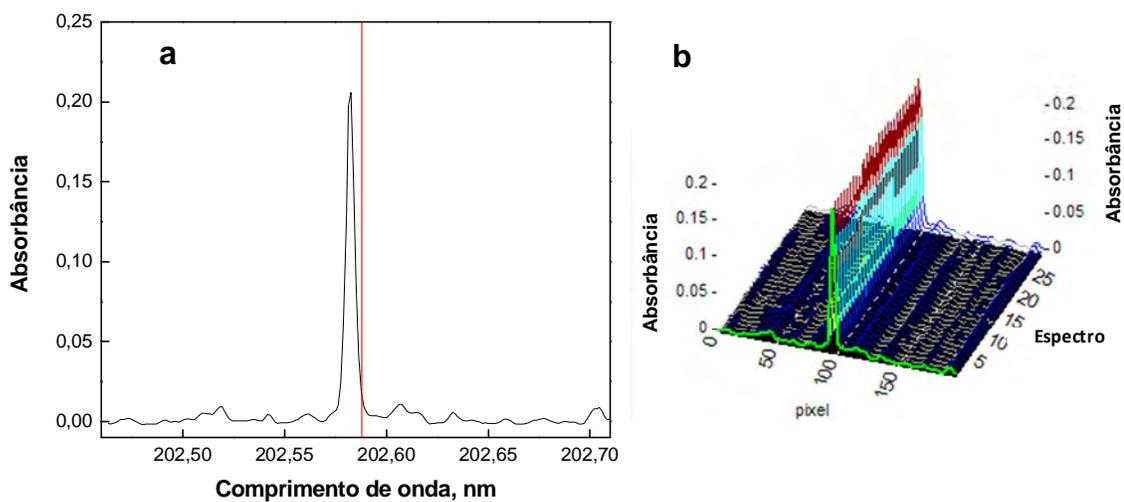
Os espectros de absorvância integrada *versus* comprimento de onda sem descontar o branco (espectro bruto, exceto para Zn) para Ca e K (linhas secundárias), Mg (linha alternativa), Cu, Fe, Mn e Zn (linhas principais) nos digeridos de folhas de cana-de-açúcar, estão ilustrados nas Figuras 27-33.



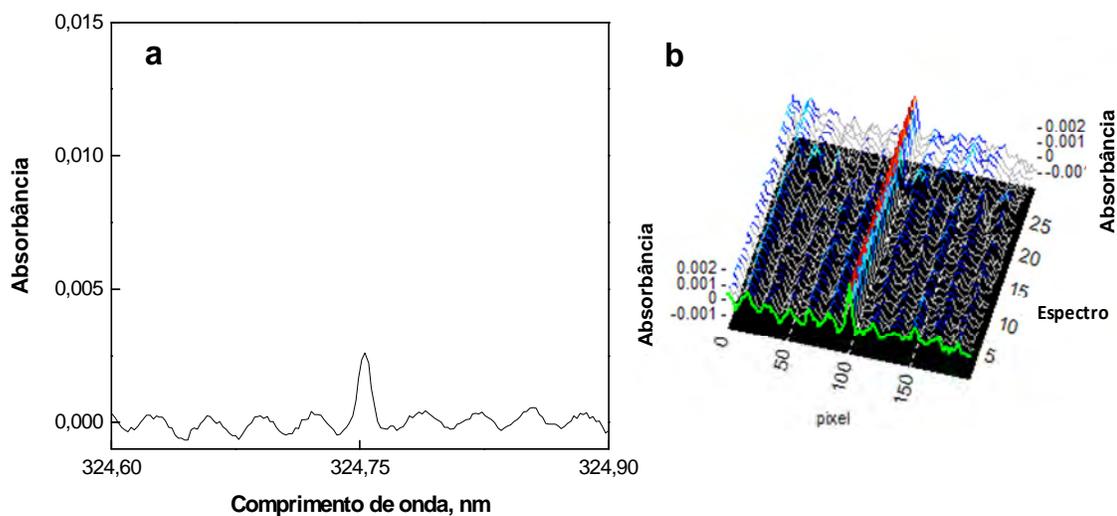
**Figura 27** - Espectro de absorvância *versus* comprimento de onda **(a)** e espectro tridimensional **(b)** para Ca na linha secundária 239,856 nm em amostra de folhas de cana-de-açúcar



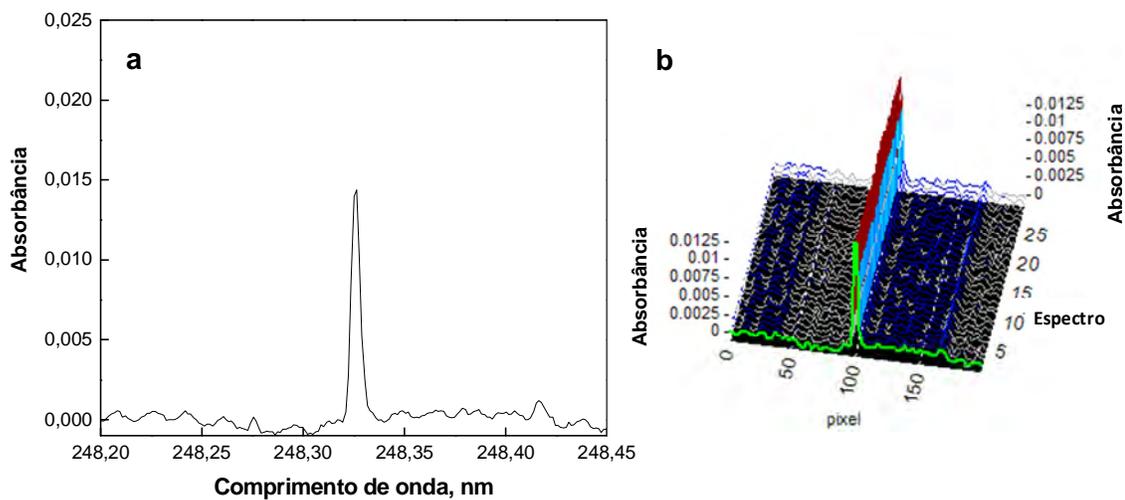
**Figura 28** - Espectro de absorbância *versus* comprimento de onda **(a)** e espectro tridimensional **(b)** para K na linha secundária 404,414 nm em amostra de folhas de cana-de-açúcar



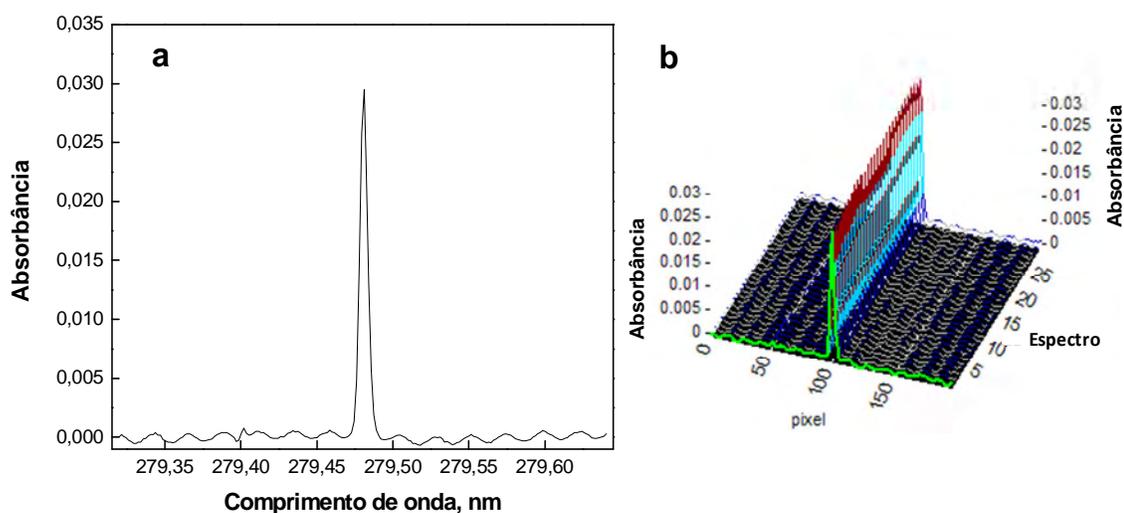
**Figura 29** - Espectro de absorbância *versus* comprimento de onda **(a)** e espectro tridimensional **(b)** para Mg na linha alternativa (“asa”) 202,588 nm em amostra de folhas de cana-de-açúcar



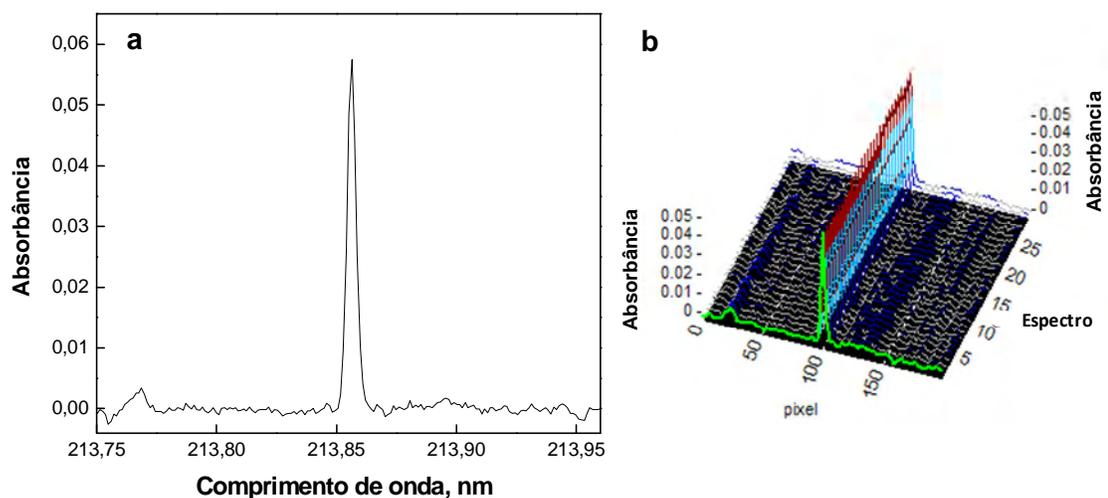
**Figura 30** - Espectro de absorvância *versus* comprimento de onda (a) e espectro tridimensional (b) para Cu na linha principal 324,750 nm em amostra de folhas de cana-de-açúcar



**Figura 31** - Espectro de absorvância *versus* comprimento de onda (a) e espectro tridimensional (b) para Fe na linha principal 248,327 nm em amostra de folhas de cana-de-açúcar



**Figura 32** - Espectro de absorbância *versus* comprimento de onda (a) e espectro tridimensional (b) para Mn na linha principal 279,482 nm em amostra de folhas de cana-de-açúcar



**Figura 33** - Espectro de absorbância *versus* comprimento de onda (a) e espectro tridimensional (b) para Zn na linha principal 213,857 nm em amostra de folhas de cana-de-açúcar (após aplicar LSBC)

Análise das Figuras 27-33 revela a existência de boas razões sinal/ruído para os 7 elementos determinados, independentemente dos teores dos analitos na amostra, demonstrando que o método otimizado foi eficiente.

A técnica HR-CS FAAS apresentou potencial na determinação conjunta de Cu, Fe, Zn, Mn, Zn, Ca, Mg e K em folhas de cana-de-açúcar, sendo mais sensível (quando linhas principais são comparadas) e rápida em relação LS FAAS. O uso de linhas secundárias para Ca e K e a medida em comprimento de onda alternativo para Mg, apresentaram bons resultados na redução de sensibilidade e ampliação do intervalo linear de calibração. Ainda, o modo de correção pelos mínimos quadrados foi eficaz na remoção da interferência espectral causada por NO.

## 5.2 Determinação de B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, P, S e Zn por HR-CS FAAS em folhas de cana-de-açúcar e de laranja

A determinação de P e S pode ser feita em chama ar/acetileno via absorção molecular de PO e CS ou SH, respectivamente. No entanto, incluir P e S no conjunto dos 7 elementos do item 5.1 é inviável, em função da alta afinidade do lantânio ( $\text{La}^{3+}$ ) por ânions fosfatos e hidrogenofosfatos. Além disso, as baixas sensibilidades para P e S exigem um preparo de amostra diferente do procedimento 6 utilizado.

As concentrações de B e Mo em folhas digeridas em micro-ondas pelo procedimento 6 são muito baixas e determinar estas concentrações com confiança por HR-CS FAAS é inviável, dada a limitada sensibilidade da técnica para estes elementos.

A idéia então, foi resolver o problema de limitada sensibilidade da HR-CS FAAS para B, Mo, P e S empregando uma maior massa de amostra. Como em sistemas fechados as massas geralmente empregadas vão até no máximo 500 mg, optou-se por um sistema aberto para digerir as amostras (bloco digestor), no qual uma massa de 2 g foi usada (procedimento 7). Com 2 g de amostra e diluição final de 25 mL, as concentrações típicas de B, Mo, P e S, de acordo com a literatura (Tabela 3), seriam  $2,4 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $16 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $240 \text{ mg L}^{-1}$  e  $240 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente, indicando a possível viabilidade da determinação.

Considerando que a determinação de P e S também pode ser feita em chama óxido nitroso/acetileno e que esta chama é a recomendada para B e Mo, otimizou-se um método de determinação multielementar de B, Mo, P e S em folhas de cana-de-açúcar (digeridas pelo procedimento 7), utilizando as linhas principais de B e Mo, a linha atômica do P e a linha molecular de CS para o S. A digestão em meio nítrico-

perclórico foi empregada (procedimento 7) devido ao seu alto poder oxidante, que se apresentou muito mais eficiente na digestão desta maior massa de amostra, do que outras combinações de ácidos e agentes oxidantes.

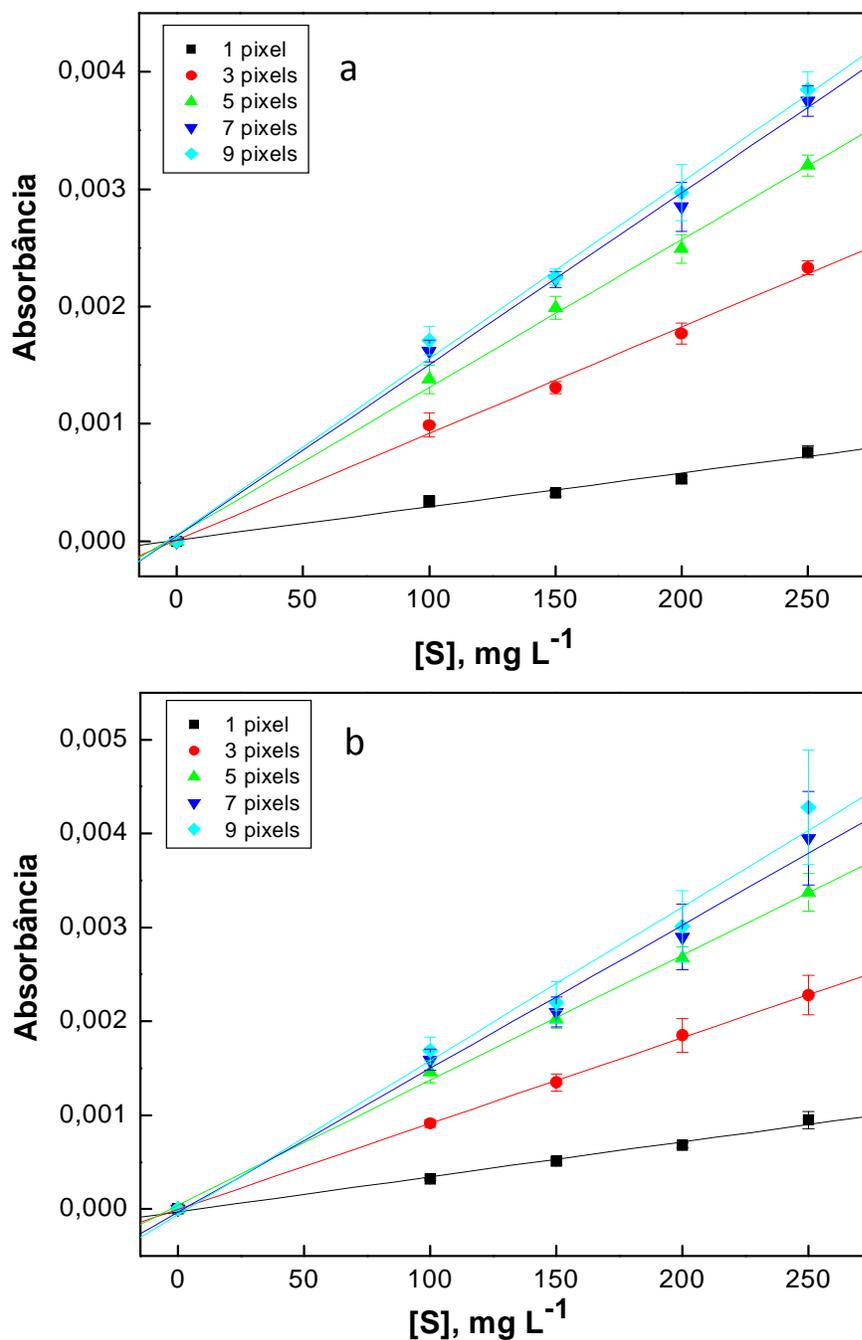
Um estudo preliminar foi feito para avaliar as linhas de absorção molecular correspondentes à molécula diatômica CS. Inicialmente foi avaliado o intervalo de 20 a 250 mg L<sup>-1</sup> S com absorbâncias integradas no comprimento de onda equivalentes a 1-9 pixels nos comprimentos de onda 257,594 nm, 257,958 nm e 258,055 nm. Somente nos dois últimos comprimentos de onda foi possível obter calibração linear, sendo esta a partir de 100 mg L<sup>-1</sup> (Figura 34).

A molécula CS é considerada termicamente estável, embora altamente reativa<sup>58</sup>. A composição da chama e a altura de queimador são importantes para a observação e medida desta molécula e foram automaticamente otimizadas para a obtenção da maior absorbância. A formação desta molécula foi favorecida por uma chama rica em acetileno. Isto acontece porque em uma chama rica em acetileno uma quantidade maior de carbono livre está presente na chama, pois não foi consumido na combustão. Além disso, quando a chama é rica em acetileno a reação de decomposição da molécula de CS não é favorecida:

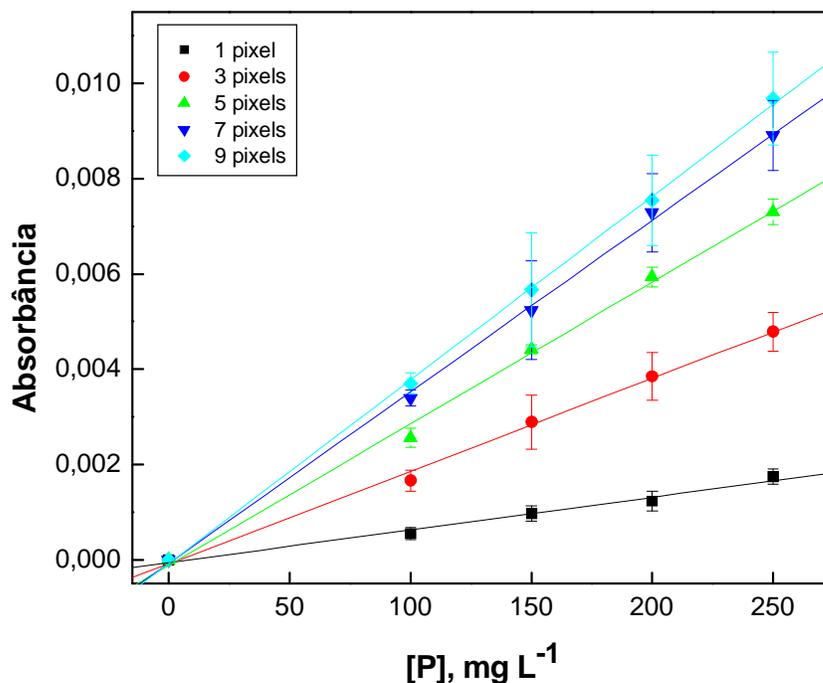


Para avaliar as linhas de absorção atômica de P, o intervalo de 20 a 250 mg L<sup>-1</sup> P também foi avaliado com absorbâncias integradas no comprimento de onda equivalentes a 1-9 pixels nos comprimentos de onda 213,547 nm, 213,618 nm e 214,911 nm. Das linhas atômicas investigadas para P, somente a linha 213,6175 nm possibilitou construir curva de calibração (Figura 35). O primeiro ponto da curva que foi lido com confiança foi 100 mg L<sup>-1</sup>.

O aumento do número de pixels causou um aumento de sensibilidade para P e S, porém as áreas de integração maiores que 5 pixels também favoreceram ao aumento do desvio padrão relativo. No caso do S, a linha mais sensível foi a 258,055 nm e então esta foi selecionada para os estudos posteriores, visto que ambas as linhas tiveram precisão similares.



**Figura 34** - Curvas de calibração para S nos comprimentos de onda **(a)** 257,958 nm e **(b)** 258,055 nm correspondentes a molécula diatômica CS com absorbância integrada no comprimento de onda equivalente a 1 até 9 pixels



**Figura 35** - Curva de calibração para o P na linha atômica 213,618 nm com absorbância integrada no comprimento de onda equivalente a 1 até 9 pixels

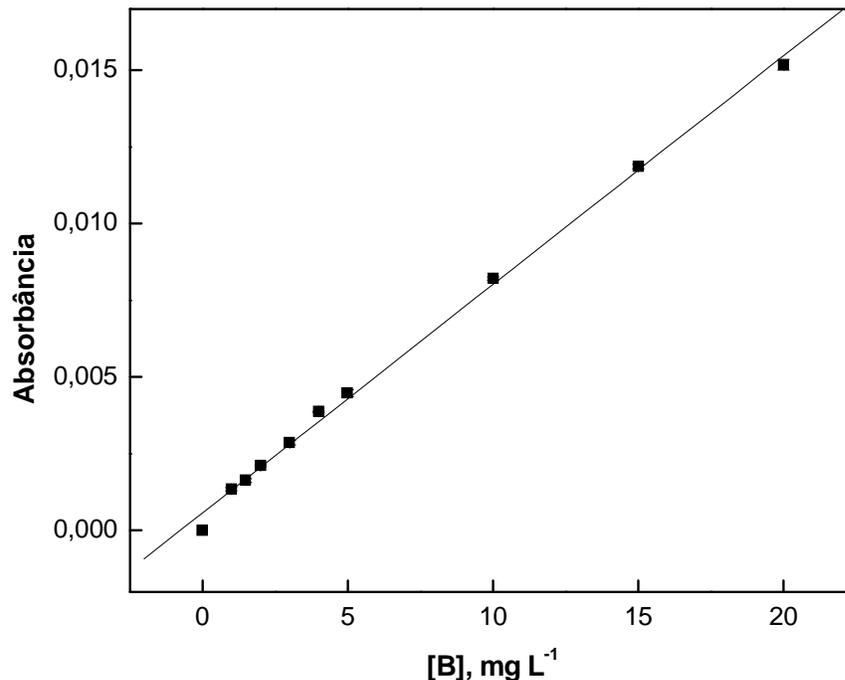
Os efeitos da altura de observação e composição de chama na sensibilidade foram automaticamente otimizadas pelo programa do equipamento. As condições otimizadas selecionadas para a determinação foram aquelas associadas com a absorbância máxima obtida. A influência área de integração na sensibilidade de B, Mo, P e S foi avaliada com a construção de curvas analíticas nos intervalos de 1,0-20 mg L<sup>-1</sup> B, de 0,1-4,0 mg L<sup>-1</sup> Mo, de 100-2000 mg L<sup>-1</sup> P e S. As inclinações e os coeficientes de correlação lineares das curvas analíticas, as concentrações características, os limites de detecção e quantificação e os desvios padrão para B (249,773 nm), Mo (313,259 nm), P (213,618 nm) e S (258,055 nm), usando diferentes áreas de integração estão apresentados na Tabela 32.

**Tabela 32** – Influência da área de integração na inclinação (b) e no coeficiente de correlação linear (R) das curvas analíticas, concentração característica ( $C_o$ ), limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ), e desvios padrão relativo (RSD) para B, Mo, P e S ( $n=4$ )

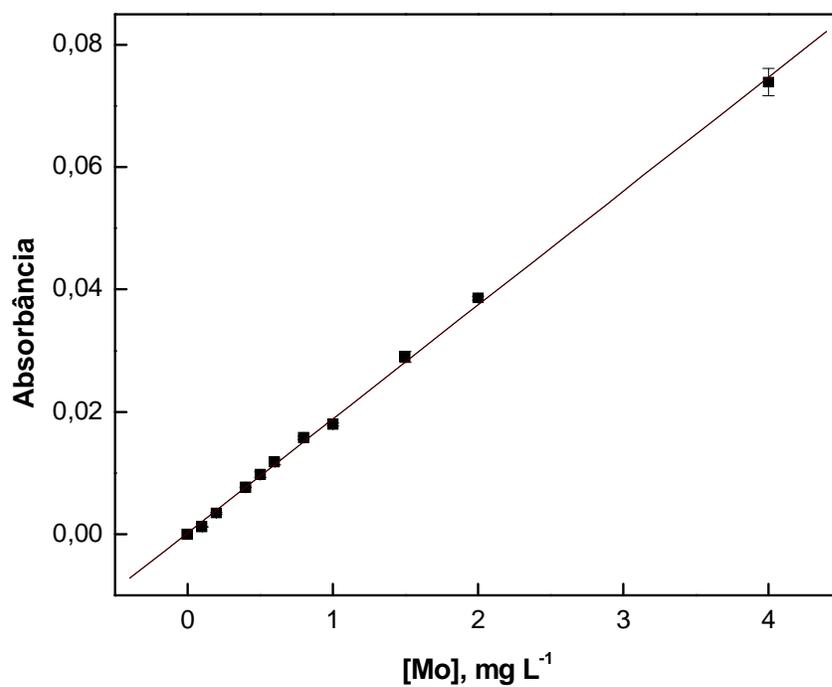
1 pixel (CP)						
Elemento e linha atômica (nm)	b, L mg <sup>-1</sup>	R	$C_o$ , mg L <sup>-1</sup>	LOD, mg L <sup>-1</sup>	LOQ, mg L <sup>-1</sup>	RSD, %
B 249,773	1,95x10 <sup>-4</sup>	0,9990	22,6	0,5	1,5	1,1 – 16,5
Mo 313,259	0,00526	0,9994	0,8	0,01	0,04	0,3 – 9,4
P 213,618	1,17x10 <sup>-5</sup>	0,9988	374,8	63,9	212,9	0,6 – 17,2
S (CS) 258,055	2,91x10 <sup>-6</sup>	0,9986	1512,0	113,4	378,0	0,8 – 11,3
3 pixels (CP ± 1)						
Elemento e linha atômica (nm)	b, L mg <sup>-1</sup>	R	$C_o$ , mg L <sup>-1</sup>	LOD, mg L <sup>-1</sup>	LOQ, mg L <sup>-1</sup>	RSD, %
B 249,773	5,34x10 <sup>-4</sup>	0,9986	8,2	0,2	0,7	0,6 – 12,3
Mo 313,259	0,01386	0,9994	0,3	0,02	0,07	0,8 – 6,9
P 213,618	3,15x10 <sup>-5</sup>	0,9989	139,7	55,2	184,1	0,2 – 16,3
S (CS) 258,055	7,82x10 <sup>-6</sup>	0,9981	562,9	92,1	307,1	0,2 – 11,7
5 pixels (CP ± 2)						
Elemento e linha atômica (nm)	b, L mg <sup>-1</sup>	R	$C_o$ , mg L <sup>-1</sup>	LOD, mg L <sup>-1</sup>	LOQ, mg L <sup>-1</sup>	RSD, %
B 249,773	7,45x10 <sup>-4</sup>	0,9986	5,9	0,2	0,5	0,6 – 5,8
Mo 313,259	0,01862	0,9994	0,2	0,01	0,04	0,7 – 4,5
P 213,618	4,32x10 <sup>-5</sup>	0,9989	102,0	29,2	69,4	0,3 – 4,1
S (CS) 258,055	1,06x10 <sup>-5</sup>	0,9989	415,0	22,4	94,3	0,3 – 3,5
7 pixels (CP ± 3)						
Elemento e linha atômica (nm)	b, L mg <sup>-1</sup>	R	$C_o$ , mg L <sup>-1</sup>	LOD, mg L <sup>-1</sup>	LOQ, mg L <sup>-1</sup>	RSD, %
B 249,773	8,52x10 <sup>-4</sup>	0,9987	5,2	0,2	0,6	0,3 – 13,2
Mo 313,259	0,0204	0,9995	0,2	0,05	0,2	0,5 – 11,2
P 213,618	4,94x10 <sup>-5</sup>	0,9989	89,1	73,4	244,9	0,6 – 17,4
S (CS) 258,055	1,15x10 <sup>-5</sup>	0,9946	382,6	106,9	356,5	0,6 – 7,8
9 pixels (CP ± 4)						
Elemento e linha atômica (nm)	b, L mg <sup>-1</sup>	R	$C_o$ , mg L <sup>-1</sup>	LOD, mg L <sup>-1</sup>	LOQ, mg L <sup>-1</sup>	RSD, %
B 249,773	8,83x10 <sup>-4</sup>	0,9990	5,0	0,2	0,6	0,4 – 13,0
Mo 313,259	0,02104	0,9995	0,2	0,04	0,1	0,3 – 20,6
P 213,618	5,20x10 <sup>-5</sup>	0,9986	84,6	84,8	282,7	0,8 – 17,7
S (CS) 258,055	1,15x10 <sup>-5</sup>	0,9924	382,6	130,4	434,8	0,1 – 9,4

De modo geral, as inclinações e as concentrações características melhoraram com o aumento do número de pixels. Os limites de detecção para B, P e S decresceram de 0,5 para 0,2 mg L<sup>-1</sup>, 63,9 para 29,2 mg L<sup>-1</sup> e de 113,4 para 22,4 mg L<sup>-1</sup> quando o número de pixels aumentou de 1 para 5. Nesta situação, o limite de detecção para o Mo não mudou significativamente. Exceto para B, áreas de

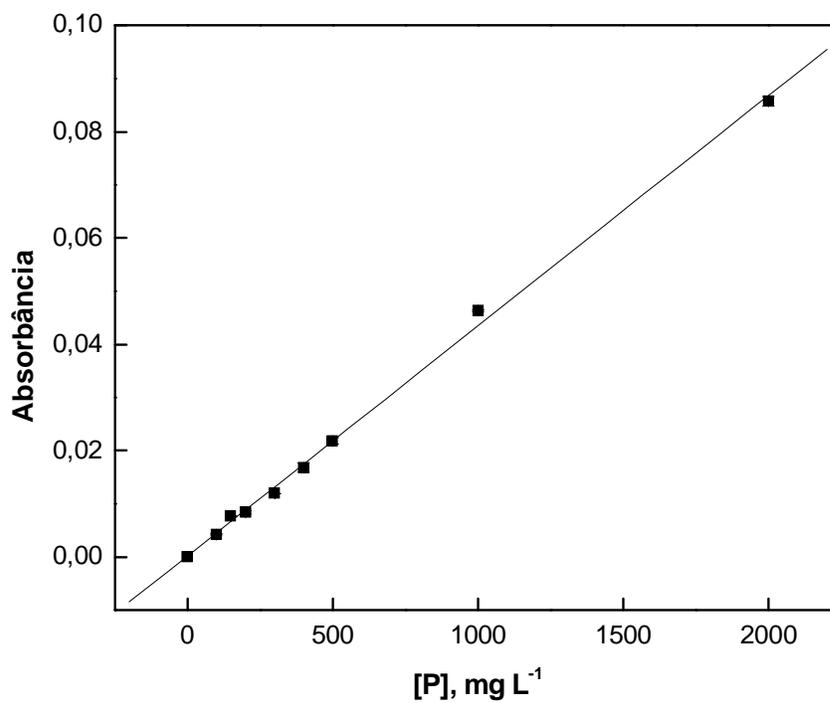
integração maiores que 5 pixels depreciaram os limites de detecção devido ao aumento de ruído que é integrado. Além disso, as inclinações das curvas analíticas não aumentaram significativamente quando área de integração variou de 5 para 7 pixels. Os menores limites de detecção para todos os elementos foram obtidos com 5 pixels. Considerando o compromisso entre sensibilidade, limites de detecção e precisão, a área de integração selecionada foi 5 pixels para B, Mo, P e S. As curvas analíticas para B, Mo, P e S com área de integração de 5 pixels apresentaram coeficientes de correlação linear maiores que 0,996 (Figuras 36-39).



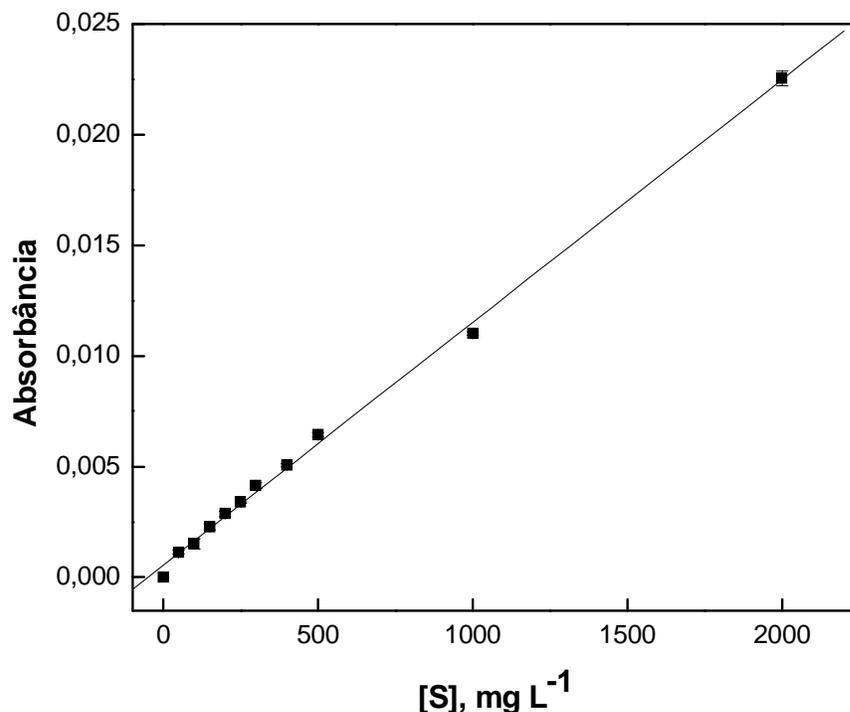
**Figura 36** - Curva de calibração para o B na linha atômica 249,773 nm



**Figura 37** - Curva de calibração para o Mo na linha atômica 313,249 nm



**Figura 38** - Curva de calibração para o P na linha atômica 213,618 nm



**Figura 39** - Curva de calibração para o S (via CS) em 258,055 nm

Em relação a influência da presença de Ca e Mg na absorbância de P, deve ser comentado que concentrações desses elementos tipicamente encontradas em folhas de cana-de-açúcar (400 mg L<sup>-1</sup> Ca e 300 mg L<sup>-1</sup> Mg) não interferiram nos resultados.

Os teores médios encontrados para P, S, B e Mo nas amostras de cana-de-açúcar estão nas Tabelas 33-35. As recuperações variaram de 97-124% para P e 84-96% para S.

**Tabela 33** - Resultados (média ± desvio padrão) para P e S (g kg<sup>-1</sup>) e para B e Mo (mg kg<sup>-1</sup>) determinados ( $n=4$ ) em amostra de folhas de cana-de-açúcar (talhão n<sup>o</sup> 2) e recuperação (em %) pelo método multielementar (HR-CS FAAS)

Elemento e linha atômica (nm)	Teores		Facas*	
	Criogênico	Facas	Rec 1	Rec 2
P 213,618	1,85 ± 0,09	2,54 ± 0,15	98	106
S 258,055	1,38 ± 0,08	1,49 ± 0,06	86	89
B 249,773	< LOD	< LOD	-	-
Mo 313,259	< LOD	< LOD	-	-

\* Recuperações (Rec 1 e Rec 2) após adições dos analitos as amostras sólidas visando incrementar as concentrações em 100 e 200 mg L<sup>-1</sup> P e S.

**Tabela 34** - Resultados (média  $\pm$  desvio padrão) para P e S ( $\text{g kg}^{-1}$ ) e para B e Mo ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) determinados ( $n=4$ ) em amostra de folhas de cana-de-açúcar (talhão n° 3) e recuperação (em %) pelo método multielementar (HR-CS FAAS)

Elemento e linha atômica (nm)	Teores		Facas*	
	Criogênico	Facas	Rec 1	Rec 2
P 213,618	1,92 $\pm$ 0,08	1,70 $\pm$ 0,05	98	124
S 258,055	1,34 $\pm$ 0,04	1,49 $\pm$ 0,06	84	85
B 249,773	< LOD	< LOD	-	-
Mo 313,259	< LOD	< LOD	-	-

\* Recuperações (Rec 1 e Rec 2) após adições dos analitos as amostras sólidas visando incrementar as concentrações em 100 e 200  $\text{mg L}^{-1}$  P e S.

**Tabela 35** - Resultados (média  $\pm$  desvio padrão) para P e S ( $\text{g kg}^{-1}$ ) e para B e Mo ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) determinados ( $n=4$ ) em amostra de folhas de cana-de-açúcar (talhão n° 4) e recuperação (em %) pelo método multielementar (HR-CS FAAS)

Elemento e linha atômica (nm)	Teores		Facas*	
	Criogênico	Facas	Rec 1	Rec 2
P 213,618	1,37 $\pm$ 0,07	1,45 $\pm$ 0,08	97	120
S 258,055	1,66 $\pm$ 0,05	1,64 $\pm$ 0,04	86	94
B 249,773	< LOD	< LOD	-	-
Mo 313,259	< LOD	< LOD	-	-

\* Recuperações (Rec 1 e Rec 2) após adições dos analitos as amostras sólidas visando incrementar as concentrações em 100 e 200  $\text{mg L}^{-1}$  P e S.

Com exceção das amostras dos talhões 2 e 3, os teores de P foram concordantes entre as moagens criogênica e por moinho de facas. Os teores encontrados para P também foram concordantes com os geralmente encontrados na literatura (1,5-3,0  $\text{g kg}^{-1}$ ), com exceção da amostra do talhão 4 que apresentou concentração de P um pouco menor. Com exceção das amostras dos talhões 2 e 4, os teores de S foram concordantes entre as moagens criogênica e por moinho de facas. Os teores encontrados de S foram mais baixos que os geralmente encontrados na literatura em folhas de cana-de-açúcar (1,5-3,0  $\text{g kg}^{-1}$ ). As baixas recuperações encontradas para B, demonstram que o método de preparo de amostras usado não foi adequado para este elemento. Isto foi confirmado quando o material de referência Spinach leaves foi analisado (Tabela 36), pois o teor de B encontrado foi inferior ao certificado.

**Tabela 36** - Resultados (média  $\pm$  desvio padrão) para P (% m/m) e B (mg kg<sup>-1</sup>) determinados ( $n=4$ ) no material certificado Spinach Leaves pelo método multielementar proposto (HR-CS FAAS)

Elemento e linha atômica (nm)	Spinach Leaves	
	Encontrado	Certificado
B 249,773	22,3 $\pm$ 1,5	37,6 $\pm$ 1,0
P 213,618	0,513 $\pm$ 0,029	0,518 $\pm$ 0,011

Mesmo aumentando a massa de amostra para 3 g, não foi possível determinar B e Mo, nos digeridos de folhas via bloco digestor, pois os teores obtidos foram  $<$  LOD. Uma hipótese é que a digestão por via úmida provavelmente provocou a perda de boro por volatilização do ácido bórico<sup>1</sup> e isso impediu sua determinação. Outra hipótese é que tenha ocorrido um efeito combinado de perda por volatilização e contaminação pelo B componente dos frascos de digestão. No caso do Mo a massa de 3 g ainda era insuficiente frente à sensibilidade do equipamento (o primeiro ponto da curva para Mo é 0,1 mg L<sup>-1</sup>). Devido ao insucesso na determinação de B e Mo, um outro procedimento de preparo das amostras de folhas (procedimento 8) foi avaliado, visando à determinação dos 11 analitos.

O procedimento 8 consistiu na incineração de 5 g de amostra em forno tipo mufla com posterior recuperação das cinzas em ácido clorídrico. O solubilizado obtido para cada amostra foi dividido em duas frações iguais (A e B) de 12,5 mL. Os analitos P, B e S foram determinados diretamente na fração A. Os analitos Ca, Mg, K, Cu, Fe, Mn e Zn foram determinados após diluição de 16 vezes da fração A. Na fração B, o analito Mo foi determinado após extração com MIBK (Figura 12). Nesta estratégia, a maior massa de amostra utilizada possibilitou a determinação de B e Mo. Além disso, a digestão por via seca evitou as perdas de B por volatilização.

Em relação à influência da presença de Ca e Mg na absorvância de P, deve ser comentado que concentrações desses elementos tipicamente encontradas em 5g de folhas de cana-de-açúcar (2000 mg L<sup>-1</sup> Ca e 1000 mg L<sup>-1</sup> Mg) não interferiram.

Os coeficientes de correlação linear obtidos para as curvas analíticas de B, P e S foram maiores que 0,996. As mesmas condições utilizadas anteriormente para determinar B, Mo, P e S foram utilizadas. Somente o meio em que as curvas analíticas foram preparadas que mudou para 0,8 mol L<sup>-1</sup> HCl, visto que esta é a concentração de HCl presente nos solubilizados das amostras.

A determinação de Mo foi feita após o extrato ser submetido a um procedimento de extração com metil isobutil cetona – MIBK<sup>11</sup>. O Mo presente no extrato é complexado com tiocianato de amônio em meio ácido, sendo este complexo reduzido pelo cloreto estanoso e extraído com metil isobutil cetona. A extração líquido-líquido pode simultaneamente concentrar e separar o Mo de possíveis interferentes da matriz da amostra<sup>89</sup>. O Mo contido em 12,5 mL do extrato da amostra (em 2,5 g de amostra) foi extraído para um volume final de 5 mL (volume da fração orgânica) que foi aspirado pelo equipamento para fazer as medidas. A influência do MIBK nas medidas de Mo foram corrigidas preparando todos os brancos, padrões e amostras nas mesmas condições.

A influência da área de integração na sensibilidade de Mo em meio do solvente orgânico MIBK foi avaliada no intervalo de 0,1-0,5 mg L<sup>-1</sup>. As inclinações e os coeficientes de correlação lineares das curvas analíticas, as concentrações características, os limites de detecção e quantificação e os desvios padrão para Mo em 313,259 nm estão apresentados na Tabela 37.

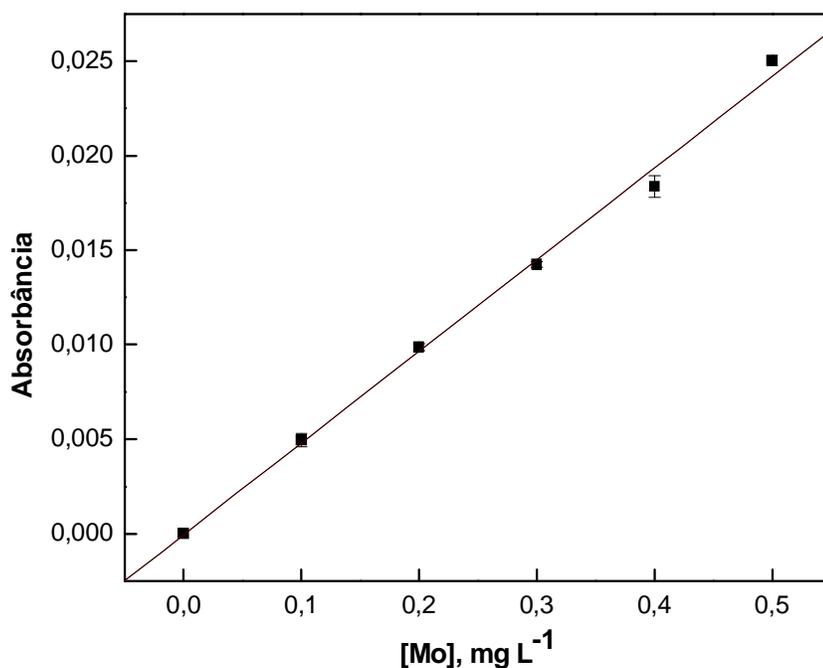
**Tabela 37** - Influência da área de integração na inclinação (b) e no coeficiente de correlação linear (R) das curvas analíticas, concentração característica (C<sub>o</sub>), limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ), e desvios padrão relativo (RSD) para Mo em 313,259 nm extraído com solvente orgânico MIBK (*n* = 4)

Área de integração	b, (L mg <sup>-1</sup> )	R	C <sub>o</sub> , mg L <sup>-1</sup>	LOD, mg L <sup>-1</sup>	LOQ, mg L <sup>-1</sup>	RSD, %
1 pixel	0,01415	0,9958	0,3	0,02	0,07	8,0
3 pixels	0,03654	0,9969	0,1	0,01	0,05	7,7
5 pixels	0,04848	0,9978	0,1	0,02	0,05	3,1
7 pixels	0,05371	0,9980	0,1	0,02	0,07	9,4
9 pixels	0,05583	0,9976	0,08	0,03	0,09	9,9

O intervalo da curva analítica para o Mo foi reduzido para 0,1-0,5 mg L<sup>-1</sup> na presença do solvente orgânico MIBK. Houve um aumento da inclinação da curva analítica e diminuição da concentração característica a medida que o número de pixels aumentou, demonstrando a melhoria da sensibilidade com maiores áreas de integração (Tabela 37). O limite de detecção diminuiu quando o número de pixels variou de 1 para 3, mas aumentou novamente com 5 ou mais pixels, provavelmente

devido ao aumento de ruído integrado. Como um compromisso entre sensibilidade, LOD e precisão, a área de integração selecionada para Mo em MIBK foi 5 pixels. A curva analítica para Mo em MIBK está apresentada na Figura 40.

A determinação de Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K nas folhas de cana-de-açúcar e de laranjeira foi feita após diluir 16 vezes os solubilizados das amostras. Esta determinação foi feita sob as mesmas condições operacionais, mesmos comprimentos de onda e intervalos de concentração das curvas analíticas utilizados no método otimizado na seção 4.2.1. Os coeficientes de correlação linear obtidos para todas as curvas analíticas foram maiores que 0,995. A interferência espectral da molécula de NO sobre a linha principal do Zn não é observada neste caso, pois o solubilizado é obtido em meio de HCl. Para as folhas de laranjeira o intervalo de concentração para Ca foi expandido até  $400 \text{ mg L}^{-1}$ , devido a maior concentração deste elemento neste tipo de amostra.



**Figura 40** - Curva de calibração para Mo em MIBK na linha atômica principal 313,249 nm

A determinação dos 11 analitos foi feita em três etapas, com três métodos de determinação separados, um para B, P e S, outro para Mo e outro para Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K. Apesar da determinação dos 11 analitos não ser feita em uma

mesma fração e em um mesmo método, o equipamento ofereceu a possibilidade desta determinação ser feita de maneira sequencial rápida. O equipamento possibilita a elaboração de uma sequência de etapas, as quais são executadas na ordem que o operador desejar. Neste caso, a sequência que pode ser utilizada é a seguinte:

1) curvas analíticas para Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K e medida destes elementos nos solubilizados diluídos das amostras em chama ar/acetileno;

2) mudança de chama para a mistura óxido nitroso/acetileno, obtenção de curvas analíticas para B, P e S e medida destes elementos diretamente nos solubilizados das amostras;

3) curva analítica para Mo e medida deste elemento na fração orgânica em chama óxido nitroso/acetileno;

A diluição dos solubilizados para determinar Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K pode ser obtida via amostrador automático, onde dilui-se automaticamente cada amostra antes da aspiração. Os teores médios encontrados para os 11 analitos e as recuperações nas folhas de cana-de-açúcar e de laranja estão apresentados nas Tabelas 38-39.

**Tabela 38** - Resultados (em g kg<sup>-1</sup>) para a determinação de Ca, Mg, K, P e S e (em mg kg<sup>-1</sup>) para Cu, Fe, Mn, Zn, B e Mo (*n*=4) e recuperação (em %) em amostra de folhas de cana-de-açúcar dos talhões n<sup>o</sup> 2, 3 e 4 por HR-CS FAAS (procedimento 8)

Elemento e linha atômica (nm)	Teores					
	Talhão 2	Rec*	Talhão 3	Rec*	Talhão 4	Rec*
Cu 324,754	44,0 ± 0,3	95	8,5 ± 0,2	88	8,3 ± 0,1	94
Fe 248,327	142,6 ± 8,9	92	112,6 ± 1,8	103	128,3 ± 1,9	90
Mn 279,482	49,8 ± 0,8	87	47,9 ± 0,5	91	65,8 ± 0,9	104
Zn 213,857	42,3 ± 0,6	96	39,3 ± 0,4	82	26,9 ± 0,2	112
B 249,773	6,3 ± 0,2	96	6,0 ± 0,3	97	5,9 ± 0,4	102
Mo 313,259	0,19 ± 0,01	98	0,13 ± 0,01	105	0,25 ± 0,01	104
Ca 239,856	3,6 ± 0,1	89	4,1 ± 0,1	98	4,2 ± 0,1	98
Mg 202,588	2,5 ± 0,1	93	2,6 ± 0,1	106	1,8 ± 0,1	96
K 404,414	18,3 ± 0,4	97	14,3 ± 0,3	93	15,7 ± 0,1	105
P 213,618	1,8 ± 0,1	88	1,8 ± 0,1	82	1,5 ± 0,1	106
S 258,055	1,4 ± 0,1	96	1,3 ± 0,1	89	1,7 ± 0,1	105

\* Recuperações após adições às amostras solubilizadas visando incrementar as concentrações em 0,10 mg L<sup>-1</sup> Cu, 0,5 mg L<sup>-1</sup> Fe e Mn, 0,2 mg L<sup>-1</sup> Zn, 2,5 mg L<sup>-1</sup> B, 0,25 mg L<sup>-1</sup> Mo, 10 mg L<sup>-1</sup> Ca, 5 mg L<sup>-1</sup> Mg, 50 mg L<sup>-1</sup> K, 200 mg L<sup>-1</sup> P e 250 mg L<sup>-1</sup> S.

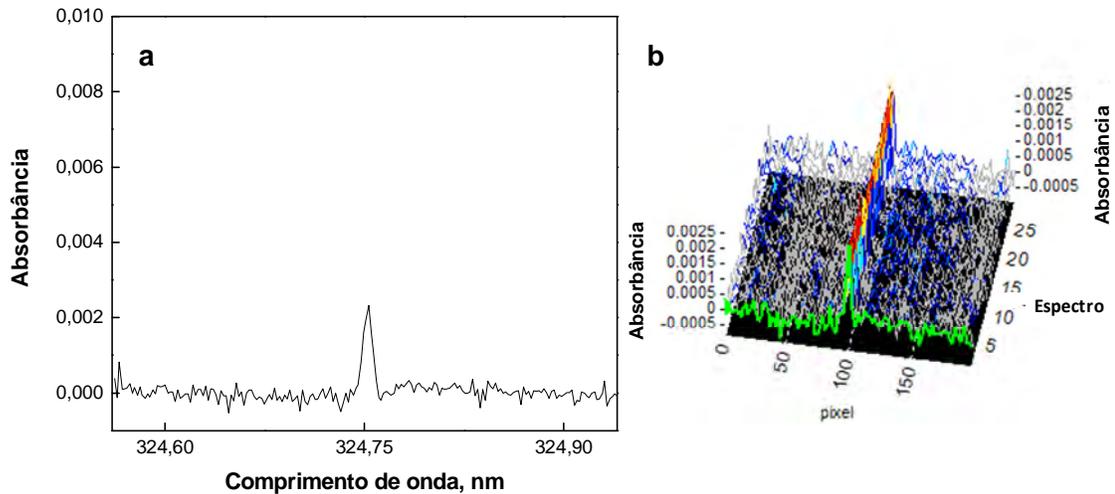
**Tabela 39** - Resultados (em g kg<sup>-1</sup>) para a determinação de Ca, Mg, K, P e S e (em mg kg<sup>-1</sup>) para Cu, Fe, Mn, Zn, B e Mo (*n*=4) e recuperação (em %) em amostra de folhas de laranjeira dos talhões n° 1 (Pêra Rio) e n° 2 (Valência) por HR-CS FAAS (procedimento 8)

Elemento e linha atômica (nm)	Teores			
	Talhão 1	Rec*	Talhão 2	Rec*
Cu 324,754	21,3 ± 0,3	93	4,2 ± 0,1	95
Fe 248,327	102,3 ± 1,4	95	94,5 ± 1,0	92
Mn 279,482	28,3 ± 0,3	101	28,8 ± 0,3	100
Zn 213,857	26,0 ± 0,5	106	32,2 ± 0,5	92
B 249,773	25,2 ± 1,0	101	24,1 ± 0,2	104
Mo 313,259	0,11 ± 0,01	103	0,12 ± 0,01	103
Ca 239,856	22,1 ± 0,4	99	23,3 ± 0,1	99
Mg 202,588	3,5 ± 0,1	100	3,4 ± 0,1	95
K 404,414	10,5 ± 0,1	102	10,9 ± 0,1	95
P 213,618	1,1 ± 0,1	104	1,2 ± 0,1	101
S 258,055	2,2 ± 0,1	97	1,8 ± 0,1	91

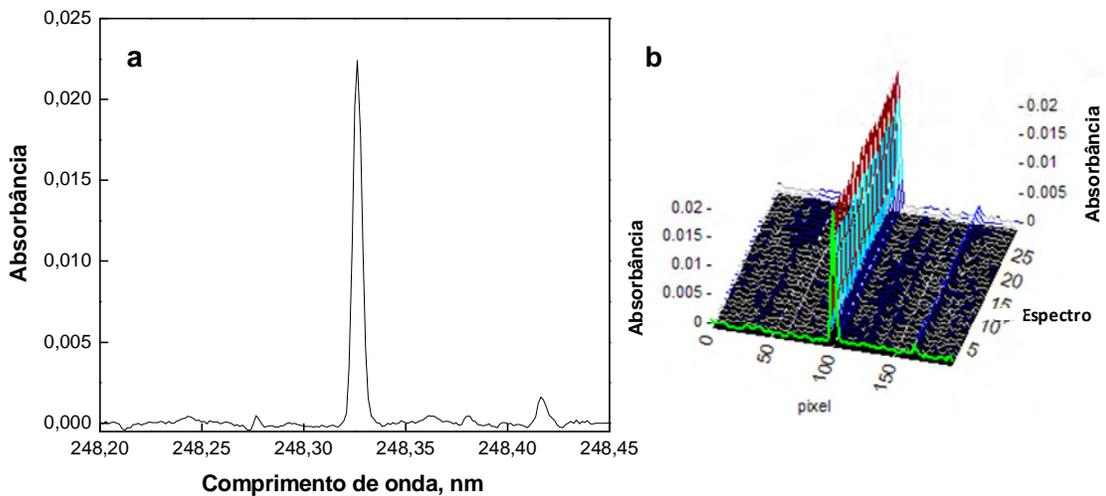
\* Recuperações após adições às amostras solubilizadas visando incrementar as concentrações em 0,10 mg L<sup>-1</sup> Cu, 0,5 mg L<sup>-1</sup> Fe e Mn, 0,2 mg L<sup>-1</sup> Zn, 2,5 mg L<sup>-1</sup> B, 0,25 mg L<sup>-1</sup> Mo, 10 mg L<sup>-1</sup> Ca, 5 mg L<sup>-1</sup> Mg, 50 mg L<sup>-1</sup> K, 200 mg L<sup>-1</sup> P e 250 mg L<sup>-1</sup> S.

Os intervalos de concentração encontrados para os analitos em amostras de folhas de cana-de-açúcar foram de 3,6 – 4,2 g kg<sup>-1</sup> Ca, 1,8 – 2,6 g kg<sup>-1</sup> Mg, 14,3 – 18,3 g kg<sup>-1</sup> K, 1,5 – 1,8 g kg<sup>-1</sup> P, 1,3 – 1,7 g kg<sup>-1</sup> S, 8,3 – 44,0 mg kg<sup>-1</sup> Cu, 112,6 – 142,6 mg kg<sup>-1</sup> Fe, 47,9 – 65,8 mg kg<sup>-1</sup> Mn, 26,9 – 42,3 mg kg<sup>-1</sup> Zn, 5,9 – 6,3 mg kg<sup>-1</sup> B e 0,13 – 0,25 mg kg<sup>-1</sup> Mo. Estes teores são concordantes com aqueles da literatura para cana-de-açúcar (Tabela 3), com exceção para K e Cu, que apresentaram teores um pouco acima dos normalmente encontrados. Para as amostras de folhas de laranjeira, os intervalos de concentração encontrados para os analitos foram de 22,1 – 23,3 g kg<sup>-1</sup> Ca, 3,4 – 3,5 g kg<sup>-1</sup> Mg, 10,5 – 10,9 g kg<sup>-1</sup> K, 1,1 – 1,2 g kg<sup>-1</sup> P, 1,8 – 2,2 g kg<sup>-1</sup> S, 4,2 – 21,3 mg kg<sup>-1</sup> Cu, 94,5 – 102,3 mg kg<sup>-1</sup> Fe, 28,3 – 28,8 mg kg<sup>-1</sup> Mn, 26,0 – 32,2 mg kg<sup>-1</sup> Zn, 24,1 – 25,2 mg kg<sup>-1</sup> B e 0,11 – 0,12 mg Kg<sup>-1</sup> Mo. Estes teores são concordantes com aqueles encontrados na literatura para folhas de laranjeira (Tabela 3), com exceção para Cu, Fe, B, Ca, P e S que apresentaram teores menores e para Mg que apresentou teor um pouco mais elevado. É importante ressaltar que a Tabela 3 contém médias geralmente encontradas para os elementos; estes teores podem variar de acordo com muitos

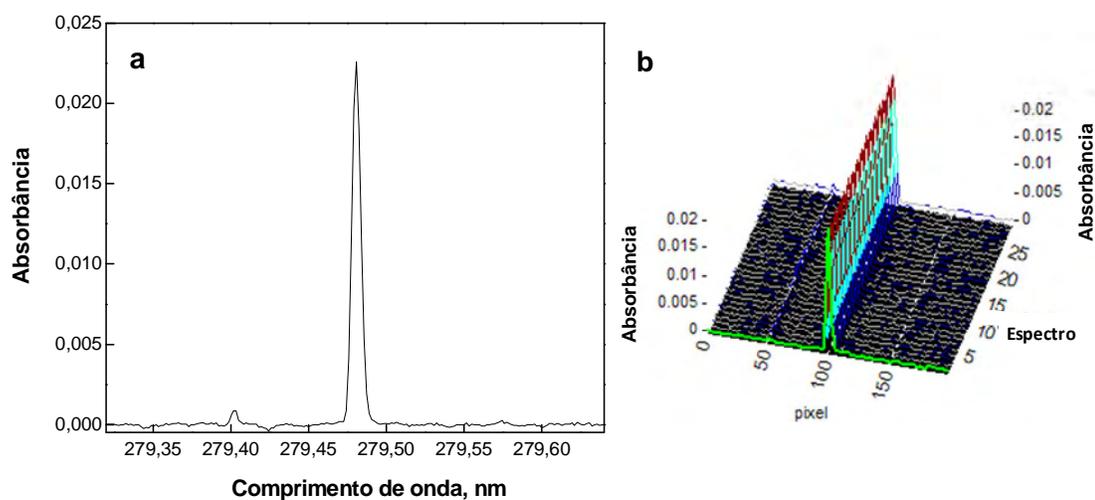
fatores de produção. Como pode ser observado nas Tabelas 38-39, as recuperações foram boas para todos os elementos indicando exatidão dos métodos. Os espectros de absorvância *versus* comprimento de onda para Cu, Fe, Mn, Zn, B, Mo, P e S (linhas principais), Ca e K (linhas secundárias), e para Mg (linha alternativa) nos digeridos de folhas de laranja, estão ilustrados nas Figuras 41-51.



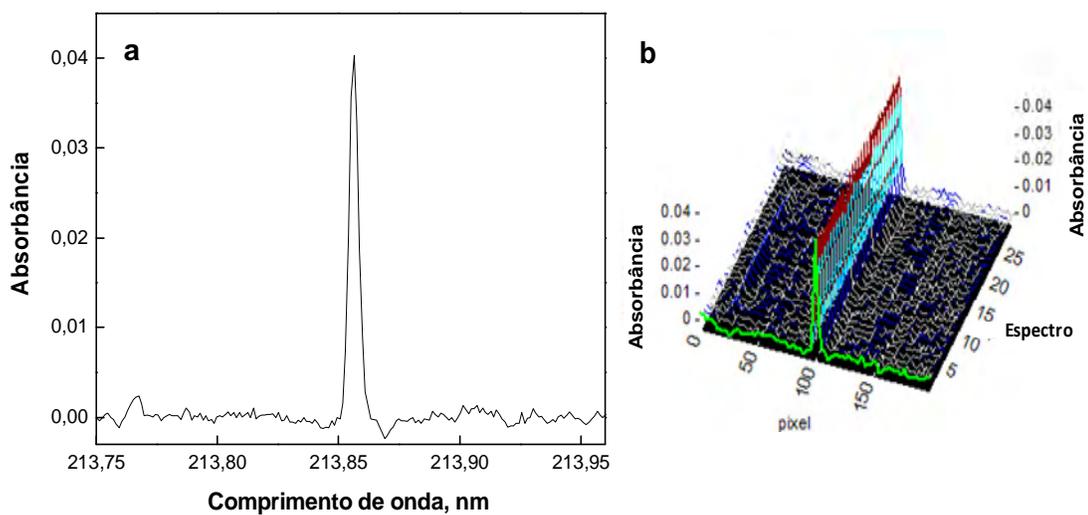
**Figura 41** - Espectro de absorvância *versus* comprimento de onda (a) e espectro tridimensional (b) para Cu na linha principal 324,754 nm em amostra de folhas de laranja



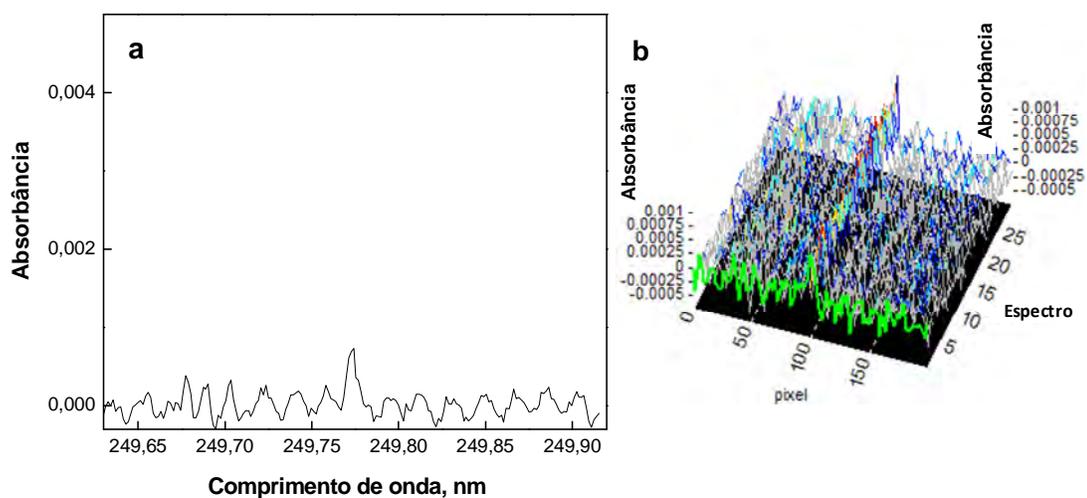
**Figura 42** - Espectro de absorvância *versus* comprimento de onda (a) e espectro tridimensional (b) para Fe na linha principal 248,327 nm em amostra de folhas de laranja



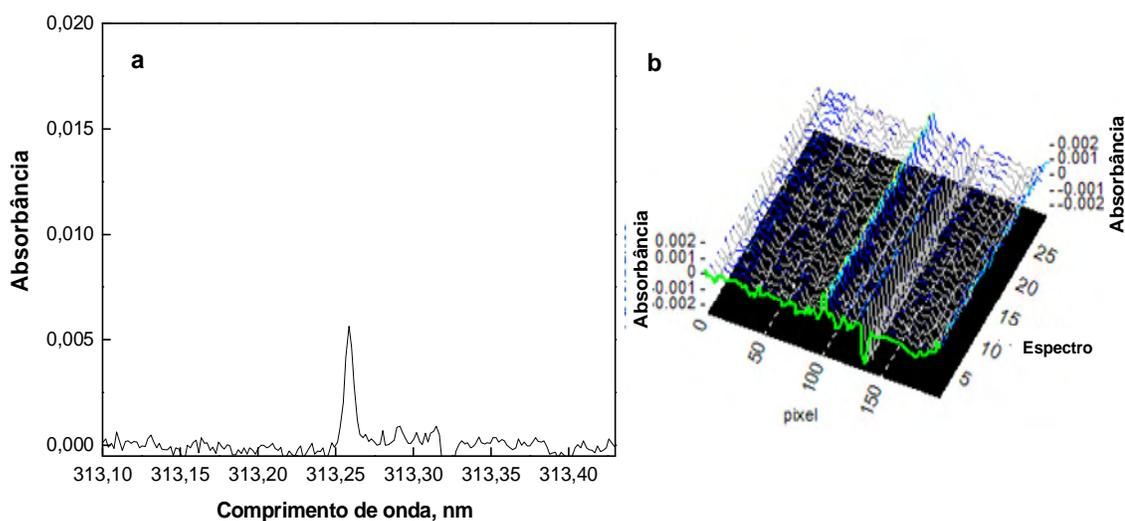
**Figura 43** - Espectro de absorvância *versus* comprimento de onda (a) e espectro tridimensional (b) para Mn na linha principal 279,482 nm em amostra de folhas de laranja



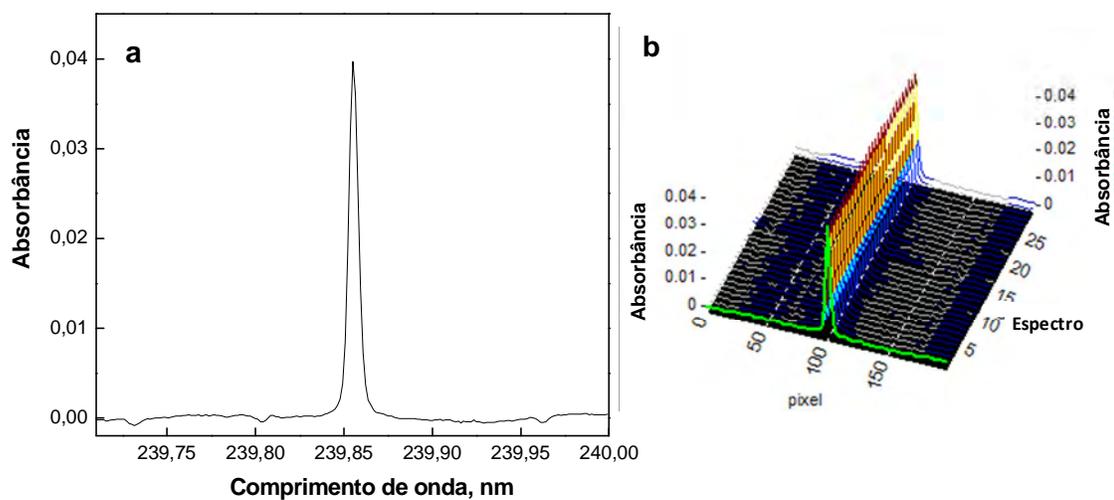
**Figura 44** - Espectro de absorvância *versus* comprimento de onda (a) e espectro tridimensional (b) para Zn na linha principal 213,857 nm em amostra de folhas de laranja



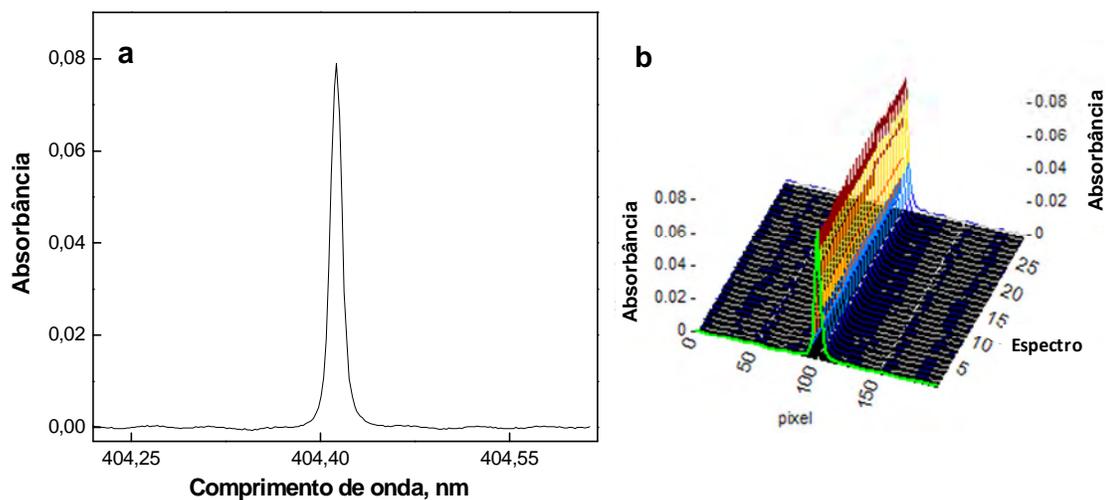
**Figura 45** - Espectro de absorbância *versus* comprimento de onda (a) e espectro tridimensional (b) para B na linha principal 249,773 nm em amostra de folhas de laranja



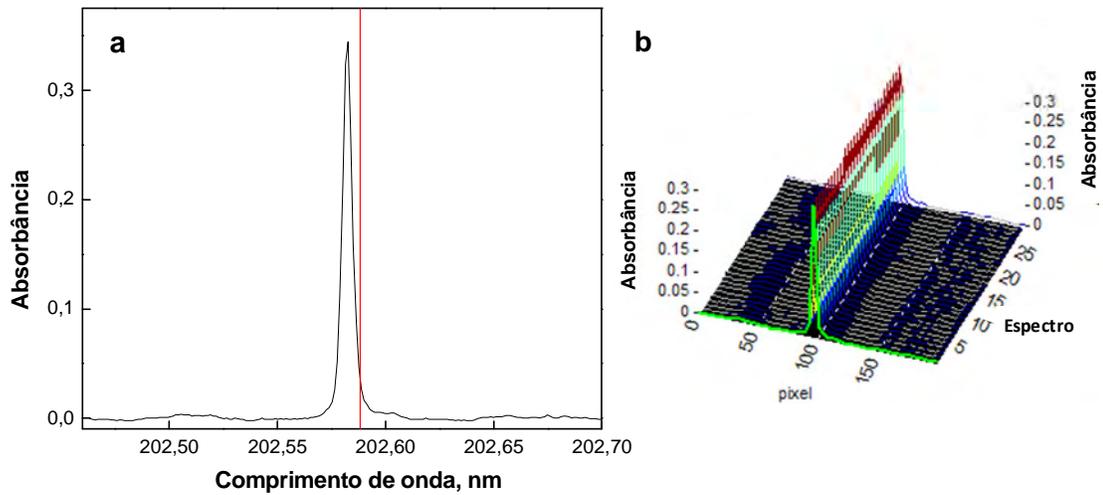
**Figura 46** - Espectro de absorbância *versus* comprimento de onda (a) e espectro tridimensional (b) para Mo na linha principal 313,259 nm em amostra de folhas de laranja



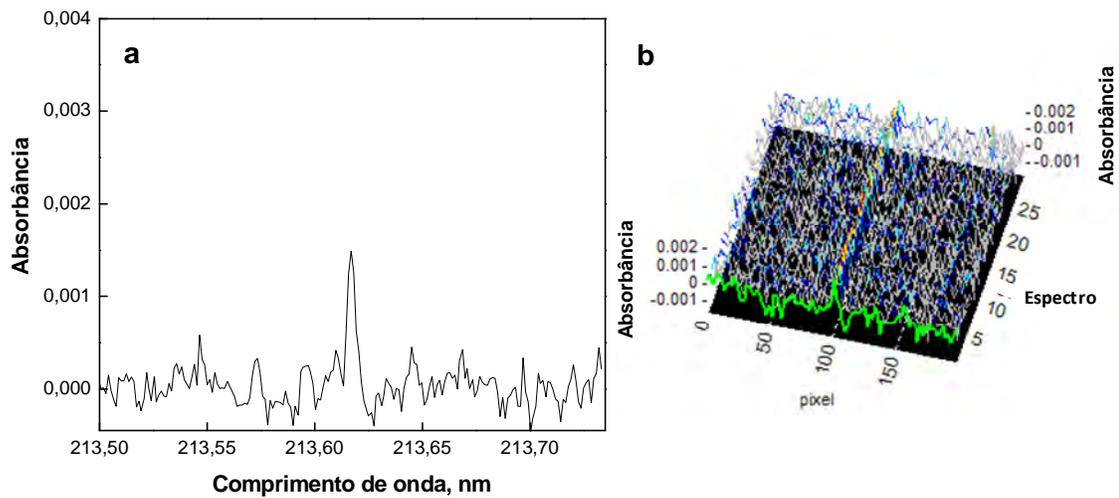
**Figura 47** - Espectro de absorbância *versus* comprimento de onda **(a)** e espectro tridimensional **(b)** para Ca na linha secundária 239,856 nm em amostra de folhas de laranja



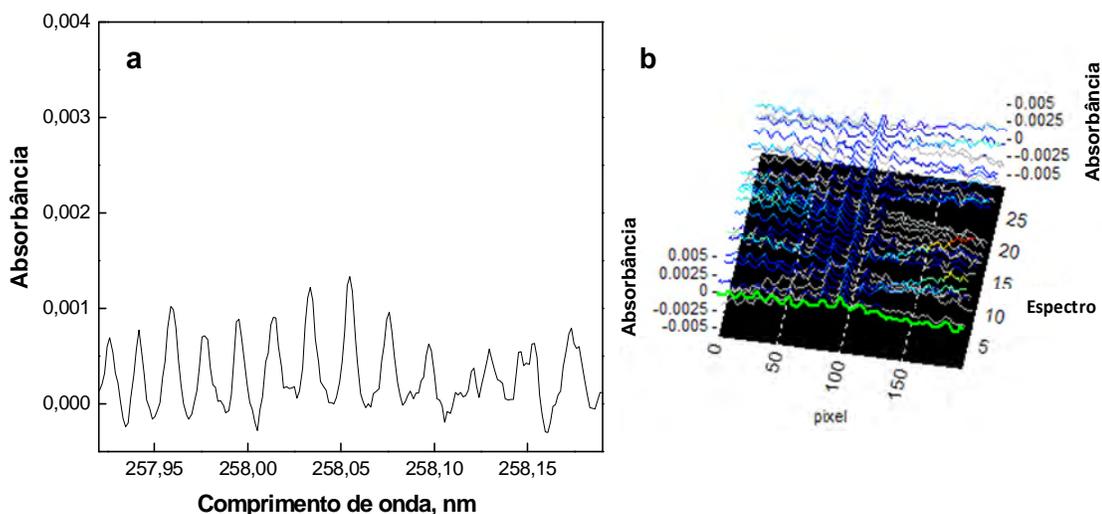
**Figura 48** - Espectro de absorbância *versus* comprimento de onda **(a)** e espectro tridimensional **(b)** para K na linha secundária 404,414 nm em amostra de folhas de laranja



**Figura 49** - Espectro de absorbância *versus* comprimento de onda (a) e espectro tridimensional (b) para Mg na linha alternativa 202,588 nm em amostra de folhas de laranja



**Figura 50** - Espectro de absorbância *versus* comprimento de onda (a) e espectro tridimensional (b) para P na linha principal 213,618 nm em amostra de folhas de laranja



**Figura 51** - Espectro de absorvância *versus* comprimento de onda **(a)** e espectro tridimensional **(b)** para S na linha de absorção molecular de CS em 258,055 nm em amostra de folhas de laranja

Análise das Figuras 41-51 revela a existência de boas razões sinal/ruído para Cu, Fe, Mn, Zn, Mo, Ca, Mg, K e S independentemente dos teores dos analitos na amostra demonstrando que o método otimizado foi eficiente. Os espectros de B e P não apresentaram boas razões sinal/ruído para as amostras de folhas de laranja (o mesmo foi observado para folhas de cana-de-açúcar) devido a limitada sensibilidade da técnica para estes elementos e a presença de alto sinal de fundo proveniente provavelmente da matriz. Apesar disso, foi possível determinar estes elementos com confiança, pois boas recuperações foram obtidas e boa concordância com materiais certificados de folhas. O espectro molecular de CS apresentou perfil típico desta molécula, ou seja, várias bandas distribuídas em todo o intervalo espectral avaliado. A sensibilidade para S também foi baixa, porém a determinação deste elemento foi realizada com confiança.

A determinação de B, P e S nos materiais de referência certificados (SRM 1573a Tomato Leaves, SRM 1547 Peach Leaves, SRM 1570 Spinach Leaves) foi realizada diretamente nos solubilizados e a determinação de Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K foi feita após diluição dos mesmos (Tabela 40). O Mo está certificado somente no material de referência de folhas de pessegueiro (Peach Leaves - Tabela 40) e sua determinação foi feita após procedimento de extração. Para alguns elementos, o

material de referência não apresenta teor certificado e desta forma, utilizou-se a fração de referência apresentada.

**Tabela 40** - Resultados (média  $\pm$  desvio padrão) para Ca, Mg, K, P e S (% m/m ) e para Cu, Fe, Mn, Zn, B e Mo ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) determinados (n=4) nos materiais certificados Tomato Leaves, Peach Leaves e Spinach Leaves

Elemento e linha atômica (nm)	Tomato Leaves		Peach Leaves		Spinach Leaves	
	Encontrado	Certificado	Encontrado	Certificado	Encontrado	Certificado
Cu 324,754	4,68 $\pm$ 0,11	4,70 $\pm$ 0,14	3,5 $\pm$ 0,2	3,7 $\pm$ 0,4	12,3 $\pm$ 0,3	12,2 $\pm$ 0,6
Fe 248,327	362 $\pm$ 4	368 $\pm$ 7	216 $\pm$ 6	218 $\pm$ 14	ND*	ND*
Mn 279,482	236 $\pm$ 11	246 $\pm$ 8	92 $\pm$ 4	98 $\pm$ 3	74,1 $\pm$ 1,5	75,9 $\pm$ 1,9
Zn 213,857	31,0 $\pm$ 0,4	30,9 $\pm$ 0,7	17,0 $\pm$ 0,6	17,9 $\pm$ 0,4	80 $\pm$ 2	82 $\pm$ 3
B 249,773	32,9 $\pm$ 0,9	33,3 $\pm$ 0,7	26 $\pm$ 2	29 $\pm$ 2	38,9 $\pm$ 1,3	37,6 $\pm$ 1,0
Mo 313,259	0,44	0,46**	0,058 $\pm$ 0,003	0,060 $\pm$ 0,008	ND*	ND*
Ca 239,856	5,00 $\pm$ 0,12	5,05 $\pm$ 0,09	1,51 $\pm$ 0,04	1,56 $\pm$ 0,02	1,537 $\pm$ 0,046	1,527 $\pm$ 0,041
Mg 202,588	1,2	1,2**	0,431 $\pm$ 0,007	0,432 $\pm$ 0,008	0,94	0,89**
K 404,414	2,73 $\pm$ 0,04	2,70 $\pm$ 0,05	2,39 $\pm$ 0,03	2,43 $\pm$ 0,03	2,851 $\pm$ 0,043	2,903 $\pm$ 0,052
P 213,618	0,211 $\pm$ 0,014	0,216 $\pm$ 0,004	0,138 $\pm$ 0,008	0,137 $\pm$ 0,007	0,514 $\pm$ 0,012	0,518 $\pm$ 0,011
S 258,055	0,95	0,96**	0,2	0,2*	0,44	0,46**

\* Não disponível;

\*\* Fração não certificada;

Os teores encontrados para os elementos presentes nos materiais de referência são concordantes com os certificados indicando boa exatidão dos métodos apresentados (Tabela 40). Inclinação da curva analítica (b), coeficiente de correlação (R), concentração característica ( $C_0$ ), limite de detecção (LOD) e valores de RSD obtidos para Cu, Fe, Mn, Zn, B, Mo, Ca, Mg, K, P e S estão descritos na Tabela 41.

**Tabela 41** - Características analíticas para Cu, Fe, Mn, Zn, B, Mo, Ca, Mg, K, P e S obtidas por HR-CS FAAS

Elemento e linha atômica (nm)	b, L mg <sup>-1</sup>	R <sup>a</sup>	C <sub>0</sub> , µg L <sup>-1</sup>	LOD <sup>b</sup> , µg L <sup>-1</sup>	RSD, %
Cu 324,754	0,16474	0,99977	26,70 (18)*	7,3	2,4
Fe 248,327	0,0442	0,9985	99,6 (44)*	20,4	1,6
Mn 279,482	0,12052	0,9961	36,5 (12)*	4,2	1,6
Zn 213,857	0,2559	0,9954	17,2 (7)*	8,2	1,5
**B 249, 773	8,07 x 10 <sup>-4</sup>	0,997	5,4 (4,4)*	0,2	3,0
Mo 313,259	0,04848	0,9978	90,8 (390)*	15,7	2,5
**Ca 239,856	4,79 x 10 <sup>-4</sup>	0,9996	9,18	1,9	2,3
**Mg 202,588	0,00353	0,9965	1,2	0,6	2,0
**K 404,414	0,00159	0,9999	2,7	1,5	2,3
**P 213, 618	4,72 x 10 <sup>-5</sup>	0,9969	93 (150)*	29,2	5,7
**S 258,055	2,15 x 10 <sup>-5</sup>	0,9976	204,7 (125)*	22,4	3,8

<sup>a</sup> Coeficiente de correlação linear.

<sup>b</sup> Limite de detecção.

\*Concentrações características (C<sub>0</sub>) fornecidas por WELZ et al., 2005, em condição monoelementar.

\*\* C<sub>0</sub> e LOD em mg L<sup>-1</sup>

A situação ótima para a determinar os analitos seria aquela em que o preparo da amostra fosse rápido e pouco trabalhoso e a determinação fosse multielementar em um único extrato. No entanto, a diferença nos teores encontrados entre macro e micronutrientes, a incompatibilidade química entre alguns elementos, assim como o tipo de chama necessário para cada elemento resultou numa condição real mais trabalhosa, mas nem por isso menos eficiente.

Com a finalidade de comparar os resultados obtidos para os macronutrientes P e S em folhas de cana-de-açúcar e laranja por HR-CS FAAS, foi feita a determinação destes elementos utilizando a espectrofotometria e a turbidimetria. A determinação de fósforo nas amostras de folhas de cana-de-açúcar e laranja foi feita por meio do método do amarelo de molibdênio utilizando um sistema de injeção em fluxo. Este método de análise consiste na reação do fósforo com molibdato e vanadato em meio ácido para formar um complexo amarelo (ácido molibdovanadofosfórico), que absorve radiação a 420 nm. A faixa linear de trabalho foi de 2,0 a 16,0 mg L<sup>-1</sup> P-PO<sub>4</sub> e a curva de calibração apresentou coeficiente de

correlação linear igual a 0,9994. Esta reação gera uma sensibilidade adequada em análise foliar e é a indicada pelo método oficial da AOAC<sup>70</sup>.

Os teores de fósforo presentes nas amostras de folhas de cana-de-açúcar e de laranjeira foram adequados para aplicar este método. A digestão nitro-perclórica (mais usada em digestão de plantas) foi empregada para oxidar a matéria orgânica e disponibilizar o fósforo presente nos tecidos das folhas (procedimento 5). Os teores médios de P encontrados nas amostras de folha de cana-de-açúcar e laranjeira e as recuperações obtidas (correspondentes a adição de 10 mg L<sup>-1</sup> de fosfato) estão apresentados na Tabela 42. Os resultados obtidos nas análises das amostras foram comparados com o método desenvolvido para a determinação de B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, P, S e Zn por HR-CS FAAS após preparo da amostra por incineração (Tabela 42). Avaliação comparativa dos resultados empregando teste *t* de *Student* foi feita e concluiu-se existir concordância entre os resultados ao nível de 95% de confiança. As variâncias foram comparadas por meio do teste F, o qual revelou que os resultados são precisos a 95% de confiança, com exceção para a amostra de cana-de-açúcar do talhão 3.

**Tabela 42** - Resultados ( $n=4$ ) de determinação (em g kg<sup>-1</sup>) e de recuperação (em %) de P em amostras de folhas de cana-de-açúcar e laranjeira por espectrofotometria e por HR-CS FAAS

Amostra	Espectrofotometria	HR-CS FAAS	Recuperação
Cana talhão 2	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1	91
Cana talhão 3	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1	90
Cana talhão 4	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	92
Laranja talhão 1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	89
Laranja talhão 2	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	102

As três amostras de folhas de cana-de-açúcar apresentaram teores de P concordantes com aqueles considerados adequados pela literatura para esta cultura. No caso das folhas de laranjeira, os teores encontrados para as duas amostras analisadas estão abaixo dos considerados adequados pela literatura (Tabela 3). As recuperações obtidas para as amostras em um nível de adição foram boas (Tabela 42), demonstrando que o método espectrofotométrico é exato. A determinação de P no material de referência certificado (SRM 1570 Spinach leaves) também foi feita. O

valor encontrado para P neste material de referência ( $0,516 \pm 0,010$ ) foi concordante com o certificado ( $0,518 \pm 0,011$ ) ao nível de 95% de confiança, demonstrando a exatidão desse método. O limite de detecção (LOD) encontrado foi de  $0,75 \text{ mg L}^{-1}$  P e os valores de RSD variaram de 1,1 até 5,9%.

Os teores de S presentes nas amostras de folhas de cana-de-açúcar e de laranja foram adequados para a análise turbidimétrica. A digestão nitro-perclórica (procedimento 5) foi empregada neste caso para oxidar todos os possíveis compostos de enxofre presentes nas amostras de folhas à sulfato. A faixa linear para determinar sulfato nas amostras foi previamente investigada no comprimento de onda 410 nm, obtendo-se uma ótima calibração entre  $4,2 - 42,0 \text{ mg L}^{-1}$ , com coeficiente de correlação linear igual a 0,9996.

Os teores médios de S nas amostras de folhas de cana-de-açúcar e laranja e as recuperações estão apresentados na Tabela 43. Os resultados das análises de S nas amostras foram comparados com os obtidos pelo método desenvolvido para a determinação conjunta de B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, P, S e Zn por HR-CS FAAS (Tabela 43). Análise estatística dos resultados revelou concordância dos resultados ao nível de 95% de confiança, com exceção para a amostra de folhas de laranja do talhão 2. As variâncias foram comparadas e constatou-se que os resultados são precisos ao nível de 95% de confiança.

**Tabela 43** - Resultados (em  $\text{g kg}^{-1}$ ) da determinação ( $n=4$ ) e da recuperação (em %) de S em amostras de folhas de cana-de-açúcar e laranja por turbidimetria e por HR-CS FAAS

Amostra	Turbidimetria	HR-CS FAAS	Recuperação
Cana talhão 2	$1,4 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	97
Cana talhão 3	$1,3 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$	93
Cana talhão 4	$1,7 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$	95
Laranja talhão 1	$1,8 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,1$	98
Laranja talhão 2	$2,3 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$	99

Apenas uma das amostras de cana apresentou teor de S concordante com aquele considerado adequado pela literatura. As outras duas amostras apresentaram teores menores. No caso das folhas de laranja, o teor encontrado

para uma das amostras foi concordante com o considerado adequado pela literatura e o da outra amostra foi menor (Tabela 3). Como pode ser observado na Tabela 43, as recuperações foram boas para todas as amostras indicando exatidão do método turbidimétrico. A determinação de S no material de referência certificado (SRM 1573a Tomato Leaves) foi realizada da mesma forma como para as amostras. Neste caso, o material de referência não apresenta teor certificado de enxofre, então, utilizou-se a fração não certificada apresentada. O teor encontrado no material certificado foi de 0,97, concordante com a fração não certificada (0,95), demonstrando a exatidão do método turbidimétrico. O limite de detecção (LOD) encontrado foi de 0,93 mg L<sup>-1</sup> e os valores de RSD variaram de 1,4 até 3,4%.

Diante da concordância entre os resultados obtidos pelos métodos espectrofotométrico e turbidimétrico com o método proposto por HR-CS FAAS, é possível afirmar que o método proposto é eficiente e exato para determinar P e S em folhas.

Os teores obtidos para os macros e micronutrientes em folhas de cana-de-açúcar e de laranja foram aplicados ao Sistema Integrado de Diagnóstico e Recomendação (DRIS). Este sistema é útil na avaliação do estado nutricional destas culturas. Este sistema se baseia no cálculo de índice para cada nutriente, considerando sua relação com os demais e comparando cada relação com as relações médias de uma população de referência. Uma população de alta produtividade geralmente é selecionada como a população de referência, partindo-se da premissa que existe uma relação significativa entre os nutrientes no solo e os teores nas plantas, de maneira que variações na concentração destes proporcionam variação de produção<sup>107</sup>. O sucesso da aplicação do DRIS depende da organização sistemática da população de referência em que uma ampla base de dados (valores-padrão de comparação) para cada cultura é criado, que pode ser específica por variedade, por região ou tipo de solo.

O índice DRIS para um determinado nutriente é a média das funções de todas as relações deste nutriente. Os componentes dessa média são ponderados pelas recíprocas dos coeficientes de variação das respectivas relações da população de referência. Quando um nutriente está deficiente, a sua relação com os demais se apresenta negativa; quando em excesso, o desvio é positivo, e os valores de todos os desvios para cada nutriente, ao serem somados, formam o Índice DRIS de cada

nutriente. Um nutriente menos deficiente apresenta valores menos negativos, e assim sucessivamente, havendo, para contrabalançar, valores positivos para outros nutrientes. Somando-se todos os Índices dos nutrientes, sem considerar se o seu sinal é negativo ou positivo, obtém-se o Índice de Balanço Nutricional (IBN), e a média deste valor corresponde ao Índice de Balanço Nutricional médio (IBN médio). Quanto menor o IBN, mais equilibrada ou ajustada está a planta e, portanto, com maior potencial de produção. Quanto maior o IBN, maior o desequilíbrio e, portanto, maior a possibilidade de estarem ocorrendo deficiências ou excessos de nutrientes. O DRIS é uma ferramenta poderosa que, associada a outras, pode conduzir o usuário ao uso otimizado e eficiente dos fertilizantes, reduzir custos, ajustar a fertilidade do solo e aumentar a produtividade<sup>3,107</sup>.

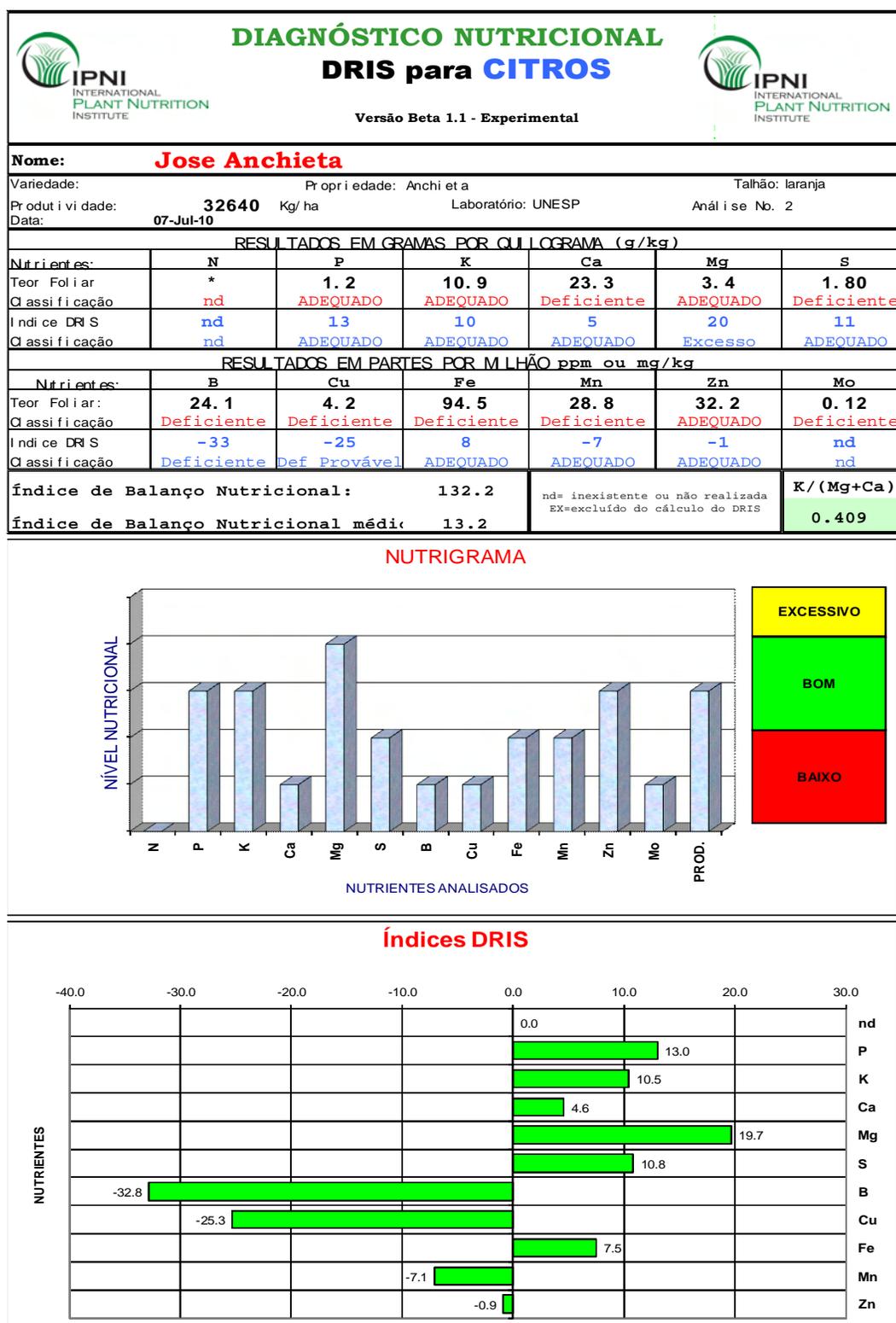
A Figura 52 apresenta a avaliação feita pelo sistema DRIS para o talhão 2 da cultura de laranja. Os resultados dos macros e micronutrientes foram aplicados em um programa disponibilizado pelo International Plant Nutritional Institute (IPNI), no qual os índices DRIS foram calculados e um diagnóstico nutricional foi gerado. É importante ressaltar que a avaliação apresentada aqui somente exemplifica a aplicação do DRIS, visto que é necessário um amplo conhecimento da região avaliada, como histórico da área e quais técnicas de manejo foram utilizadas ao longo do tempo. Além disso, para garantir um bom desempenho do DRIS, a avaliação deve ser feita por longos períodos de tempo, para que sua contribuição possa ser observada.

Como pode ser observado na Figura 52, os teores de cada nutriente foram comparados com os teores considerados adequados pelo programa, gerando-se um chamado nutrigrama, em que uma classificação foi dada, deficiente, adequada ou em excesso. O índice DRIS calculado também classificou os nutrientes em deficiente, adequado ou em excesso considerando a população de referência do programa. Desta forma, de acordo com os índices DRIS, Mg está presente em excesso, B está deficiente e Cu está com uma provável deficiência. De acordo com os valores DRIS é possível propor uma ordem de desequilíbrio, a qual deve ser considerada para a resolução dos problemas nutricionais. O índice DRIS para B é o mais crítico, visto que apresentou o maior valor negativo. Na sequência, o índice para Cu é o segundo mais preocupante, pois apresentou o segundo maior valor negativo. Em terceiro lugar está o índice para Mg que foi o mais positivo dos índices. O índice de balanço nutricional também foi calculado e apresentou um valor alto, demonstrando o desequilíbrio desta

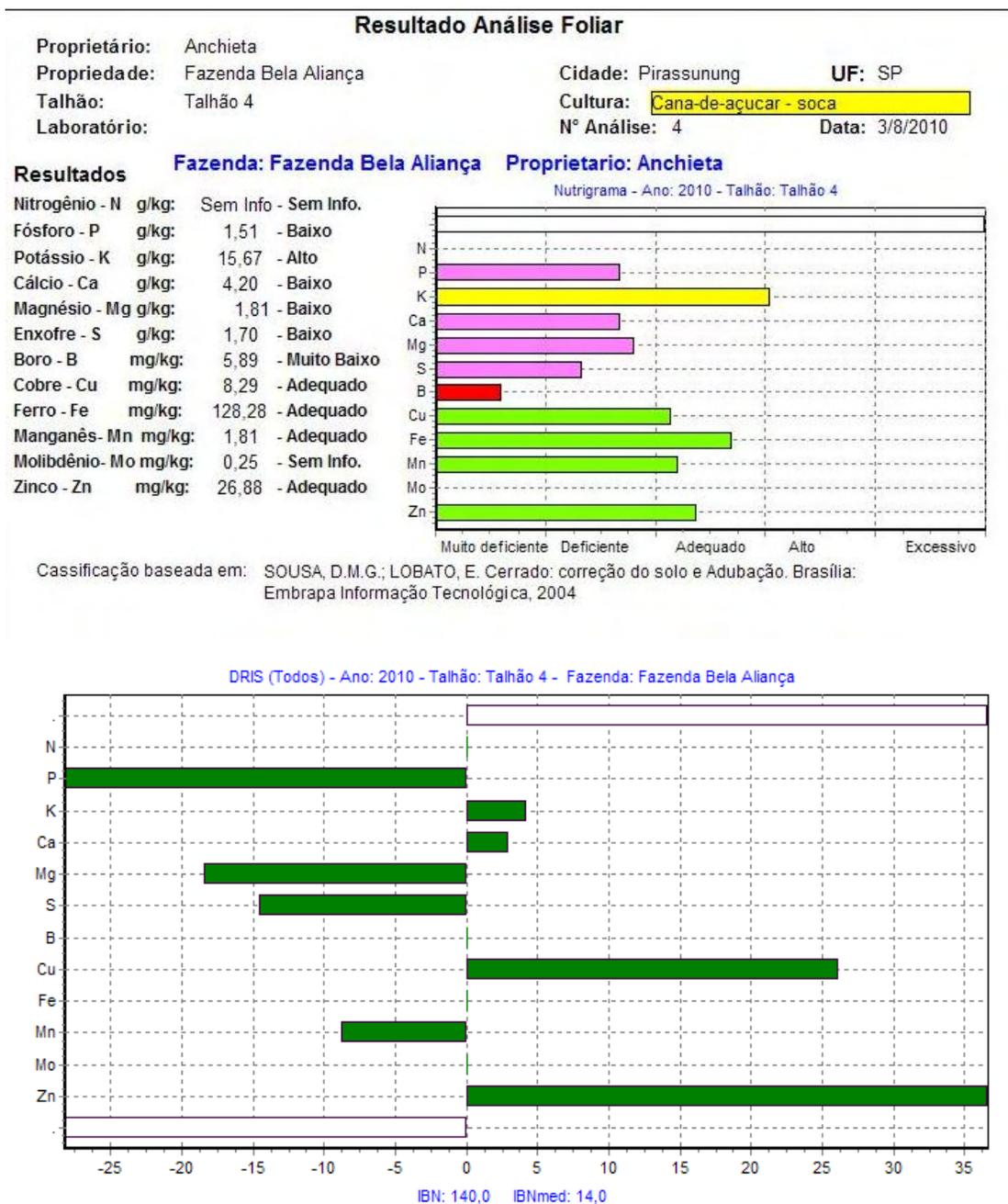
cultura no talhão avaliado. É importante ressaltar que a classificação dada pelo nutrigrama muitas vezes não equivale a dada pelo índice DRIS, como pode ser observado para o Fe, em que o nutrigrama sugere deficiência deste micronutriente, enquanto que o DRIS considera o teor adequado.

A Figura 53 apresenta a avaliação feita pelo sistema DRIS para o talhão 4 da cultura de cana-de-açúcar. Os resultados dos macros e micronutrientes foram aplicados em um programa disponibilizado pela Agroprecisa, pois o International Plant Nutritional Institute (IPNI) ainda não possui uma população de referência ou banco de dados. Como pode ser observado na Figura 53, os teores de cada nutriente foram comparados com os teores considerados adequados pelo programa, em que uma classificação foi dada, muito deficiente, deficiente, adequado, alto e excessivo. O índice DRIS calculado também classificou os nutrientes em deficiente, adequado ou em excesso considerando a população de referência do programa. De acordo com os índices DRIS, Zn e Cu estão presentes em excesso e P e Mg estão deficientes. O índice DRIS para Zn é o mais crítico, visto que apresentou o maior valor positivo. Na sequência, o índice para P é o segundo mais preocupante, pois apresentou o maior valor negativo. Em terceiro lugar está o índice para Cu que foi o segundo mais positivo. O índice de balanço nutricional também foi calculado e apresentou um valor alto, demonstrando um provável desequilíbrio desta cultura no talhão avaliado.

Dispondo então de uma análise foliar rápida, eficiente e relativamente barata e de um programa de análise nutricional do tipo do DRIS, é possível corrigir problemas relativos a nutrição mineral de plantas e maximizar a produção. Ainda, para uma melhor eficiência do DRIS, recomenda-se sua utilização em conjunto com análises de solo.



**Figura 52** - Diagnóstico nutricional da cultura de laranja, variedade Valência (talhão 2) obtido pelo sistema DRIS



**Figura 53** - Diagnóstico nutricional da cultura de cana-de-açúcar (cana soca), variedade SP 81-3250 (talhão 4) obtido pelo sistema DRIS

## 6. CONCLUSÕES

A determinação dos principais nutrientes em plantas envolve o emprego de várias técnicas e métodos, tornando a tarefa do analista trabalhosa e demorada. A possibilidade de empregar apenas a HR-CS FAAS para determinar estes nutrientes abre novas perspectivas para a diagnose foliar. Os bons resultados obtidos para todos os nutrientes estudados confirmam a viabilidade desta técnica na determinação sequencial rápida de 7 elementos (Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K) e de 11 elementos (B, Cu, Fe, Mn, Zn, Mo, Ca, Mg, K, P e S) em folhas.

A determinação de Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K em folhas de cana-de-açúcar foi proposta e apresentou algumas vantagens sobre a LS FAAS: i – a determinação multielementar de Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K foi feita no modo sequencial rápido; ii – o uso de linhas secundárias e adjacente reduziu a sensibilidade e aumentou o intervalo linear para os macronutrientes (Ca, Mg e K), tornando possível a determinação de macro e micronutrientes em um único dígido sem diluições; iii – a interferência espectral causada pelas bandas de NO na linha atômica do Zn em 213,857 nm foi corrigida confiavelmente pelo método dos mínimos quadrados.

A determinação de B, Cu, Fe, Mn, Zn, Mo, Ca, Mg, K, P e S em folhas de cana-de-açúcar e de laranja por HR-CS FAAS foi possível em uma única amostra quando algumas estratégias de preparo de amostra e instrumentais foram adotadas. A amostra foi incinerada e recuperada em HCl e a determinação de B, P e S foi feita diretamente neste solubilizado. Para isso, a absorbância integrada no comprimento de onda foi equivalente a 5 pixels para aumentar a sensibilidade destes elementos e ainda, a determinação de S foi feita via absorção molecular de CS. Após a diluição do solubilizado, Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K foram determinados utilizando as mesmas condições empregadas no método para 7 elementos. O Mo foi determinado após pré-concentração e separação deste elemento com MIBK, uma etapa imprescindível devido as baixas concentrações deste elemento nas amostras.

Apesar da disponibilidade comercial recente da técnica HR-CS FAAS, ela se apresenta promissora nesse campo de aplicação tendo como principais vantagens a determinação multielementar sequencial rápida, a possibilidade de aumentar ou reduzir a sensibilidade empregando diferentes formas de medida, a possibilidade de determinar elementos não metálicos e a eficiente correção de absorção de fundo.

## REFERÊNCIAS

1 MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Livrocercos, 1997.

2 FARAGO, M. E.; MEHRA, A. **Plants and the chemical elements**. Weinheim: Wiley-VCH, 1994.

3 REIS JUNIOR, R. A.; MONNERAT, P. H. Diagnose nutricional da cana-de-açúcar em campos dos Goytacazes, RJ. **Revista Brasileira de Ciência Solo**, v. 26, p. 367-372, 2002.

4 HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

5 ANDERSON, K. Micro-digestion and ICP-AES analysis for the determination of macro and micro elements in plant tissues. **Atomic Spectroscopy**, v. 17, n. 1, p. 30-33, 1996.

6 MOKGALAKA, N. S.; McCRINDLE, R. I.; BOTHA, B. M. Multielement analysis of tea leaves by inductively coupled plasma optical emission spectrometry using slurry nebulisation (Al, Ba, Ca, Mg, Mn and Zn). **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 19, n. 10, p. 1375-1378, 2004.

7 POLIDORO, J. C.; MEDEIROS, A. F. A.; XAVIER, R. P.; MEDEIROS, J. A.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Evaluation of techniques for determination of molybdenum in sugarcane leaves. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 37, n. 1/2, p. 77-91, 2006.

8 WENG, D. FAAS determination of trace elements in tea-leaves using suspension sampling with ultrasonic agitation. **Spectroscopy and Spectral Analysis**, v. 24, n. 11, p. 1458-1460, 2004.

9 MARCZENKO, Z.; BALCERZAK, M. **Separation, preconcentration and spectrophotometry in inorganic analysis**. Amsterdam: Elsevier, 2000.

10 BATAGLIA, O. C.; FURLANI, A. M. C.; TEIXEIRA, J. P. F.; FURLANI, P. R.; GALLO, J. R. **Métodos de análise química de plantas**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1983. (Boletim técnico 78).

- 11 REIS JUNIOR, R. A.; MONNERAT, P. H. Sugarcane nutritional diagnosis with DRIS norms established in Brazil, South Africa, and The United States. **Journal of Plant Nutrition**, v. 25, n. 12, p. 2831-2851, 2002.
- 12 WELZ, B.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U. **High-resolution continuum-source AAS - the better way to do atomic absorption spectrometry**. Weinheim: VCH, 2005.
- 13 WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic absorption spectrometry**. 3rd ed. Weinheim: VCH, 1999.
- 14 WELZ, B.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; VALE, M. G. R. High-resolution continuum-source atomic absorption spectrometry – what can we expect? **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 220-229, 2003.
- 15 WELZ, B.; BORGES, D. L. G.; LEPRI, F. G.; VALE, M. G. R.; HEITMANN, U. High-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry - an analytical and diagnostic tool for trace analysis. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 62, n. 9, p. 873-883, 2007.
- 16 BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; HUANG, M. D.; OKRUSS, M.; RADZIUK, B. Continuum source atomic absorption spectrometry and detector technology: a historical perspective. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 61, n. 9, p. 1015-1030, 2006.
- 17 WALSH, A. The application of atomic absorption spectra to chemical analysis. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 7, n. 2, p. 108-117, 1955.
- 18 FASSEL, V. A. ; MOSSOTTO, V. G.; GROSSMAN, W. E. L.; KNISELEY, R. N. Evaluation of spectral continua as primary sources in atomic absorption spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 22, n. 2, p. 347-357, 1966.
- 19 HARNLY, J. M.; O'HAVER, T. C.; GOLDEN, B.; WOLF, W. R. Background-corrected simultaneous multielement atomic absorption spectrometer. **Analytical Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 2007-2014, 1979.
- 20 O'HAVER, T. C. Continuum-source atomic-absorption spectrometry: past, present and future prospects. **Analyst**, v. 109, n. 3, p. 211-217, 1984.

- 21 MARSHALL, J.; OTTAWAY, B. J.; OTTAWAY, J. M.; LITTLEJOHN, W. D. Continuum-source atomic absorption spectrometry-new lamps for old. **Analytica Chimica Acta**, v. 180, n. 1, p. 357-371, 1986.
- 22 HARNLY, J. M. Multielement atomic absorption with a continuum source. **Analytical Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 933-943A, 1986.
- 23 FERNANDO, R.; CALLOWAY, C. P. Jr.; JONES, B. T. Continuum source atomic absorption spectrometry in an air-acetylene flame with improved detection limits. **Analytical Chemistry**, v. 64, n. 14, p. 1556-1560, 1992.
- 24 BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; WEIBE, R. Influence of the spectral bandwidth of the spectrometer on the sensitivity using continuum source AAS. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v. 355, n. 3/4, p. 300-303, 1996.
- 25 HARNLY, J. M. The future of atomic absorption spectrometry: a continuum source with a charge coupled array detector. **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, v. 14, n. 2, p. 137-146, 1999.
- 26 SCHUETZ, M.; MURPHY, J.; FIELDS, R. E.; HARNLY, J. M. Continuum source-atomic absorption spectrometry using a two-dimensional charge coupled device. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 55, n. 12, p. 1895-1912, 2000.
- 27 KELIHER, N.; WOHLERS, C. C. High resolution atomic absorption spectrometry using an echelle grating monochromator. **Analytical Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 682-687, 1974.
- 28 ZANDER, A. T.; O'HAVER, T. C.; KELIHER, P. N. Continuum source atomic absorption spectrometry with high resolution and wavelength modulation. **Analytical Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 1166-1175, 1976.
- 29 O'HAVER, T. C.; MESSMAN, J. D. Continuum source atomic absorption spectrometry. **Progress in Analytical Spectroscopy**, v. 9, n. 4, p. 483-503, 1986.
- 30 MOULTON, G. P.; O'HAVER, T. C.; HARNLY, J. M. Continuum source atomic absorption spectrometry with a pulsed source and a photodiode array detector. **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, v. 4, n. 7, p. 673-674, 1989.

- 31 MOULTON, G. P.; O'HAVER, T. C.; HARNLY, J. M. Signal to noise ratios for continuum source atomic absorption spectrometry using a linear photodiode array to monitor sub-nanometre wavelength intervals. **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, v. 5, n. 2, p. 145-150, 1990.
- 32 HARNLY, J. M. Graphite furnace atomic absorption spectrometry using a linear photodiode array and a continuum source. **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, v. 8, n. 2, p. 317-324, 1993.
- 33 HARNLY, J. M. The effect of spectral bandpass on signal-to-noise ratios for continuum source atomic absorption spectrometry with a linear photodiode array detector. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 48, n. 6/7, p. 909-924, 1993.
- 34 SMITH, C. M. M.; HARNLY, J. M. Sensitivities and detection limits for graphite furnace atomic absorption spectrometry using a continuum source and linear photodiode array detection. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 49, n. 4, p. 387-398, 1994.
- 35 HARNLY, J. M.; SMITH, C. M. M.; RADZIUK, B. Extended calibration ranges for continuum source atomic absorption spectrometry with array detection. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 51, n. 9/10, p. 1055-1079, 1996.
- 36 HARNLY, J. M.; SMITH, C. M. M.; WICHEMS, D. N.; IVALDI, J. C.; LUNDBERG, P. L.; RADZIUK, B. Use of a segmented array charge coupled device detector for continuum source atomic absorption spectrometry with graphite furnace atomization. **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, v. 12, n. 6, p. 617-627, 1997.
- 37 HARNLY, J. M. Instrumentation for simultaneous multielement atomic absorption spectrometry with graphite furnace atomization. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v. 355, n. 5/6, p. 501-509, 1996.
- 38 HIEFTJE, G. M. Atomic-absorption spectrometry - Has it gone or where is it going. **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, v. 4, n. 2, p. 117-122, 1989.
- 39 SCHMIDT, K. P.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, A. Combination of a pulsed continuum light source, a high-resolution spectrometer, and a charge coupled device detector for multielement atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 45, n. 11, p. 1203-1210, 1990.

40 BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; TISCHENDORF, R.; SCHMECHER, G. R. Flashlamp continuum AAS: time-resolved spectra. **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, v. 10, n. 1, p. 61-64, 1995.

41 FLOREK, S.; BECKER-ROSS, H. High-resolution spectrometer for atomic spectrometry. **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, v. 10, n. 2, p. 145-147, 1995.

42 FLOREK, S.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S. Adaptation of an echelle spectrograph to a large CCD detector. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v. 355, n. 3/4, p. 269-271, 1996.

43 HEITMANN, U.; SCHUETZ, M.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S. Measurements on the Zeeman-splitting of analytical lines by means of a continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometer with a linear charge coupled device array. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 51, n. 9/10, p. 1095-1105, 1996.

44 BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S. Echelle spectrometers and charge coupled devices. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 52, n. 9/10, p. 1367-1375, 1997.

45 BORGES, D. L. G.; CURTIUS, A. J.; WELZ, B.; HEITMANN, U. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Revista Analytica**, v. 18, p. 58-67, 2005.

46 WELZ, B.; LEPRI, F. G.; ARAUJO, R. G. O.; FERREIRA, S. L. C.; HUANG, M. D.; OKRUSS, M.; BECKER-ROSS, H. Determination of phosphorus, sulfur and the halogens using high-temperature molecular absorption spectrometry in flames and furnaces-A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 647, n. 2, p. 137-148, 2009.

47 HARAGUCHI, H.; FUWA, K. Determination of phosphorus by molecular absorption flame spectrometry using phosphorus monoxide band. **Analytical Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 784-786, 1976.

48 DITTRICH, K. Molecular absorption spectrometry by electrothermal volatilization in a graphite furnace .1. Basis of method and studies of molecular absorption of gallium and indium halides. **Analytica Chimica Acta**, v. 97, n. 1, p. 59-68, 1978.

- 49 HUANG, M. D.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; OKRUSS, M. High-resolution continuum source electrothermal absorption spectrometry of AlBr and CaBr for the determination of bromine. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 63, n. 5, p. 566-570, 2008.
- 50 HEITMANN, U.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HUANG, M. D.; OKRUSS, M. Determination of non-metals via molecular absorption using high-resolution continuum source absorption spectrometry and graphite furnace atomization. **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, v. 21, n. 11, p. 1314-1320, 2006.
- 51 HUANG, M. D.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; OKRUSS, M. Determination of halogens via molecules in the air-acetylene flame using high-resolution continuum source absorption spectrometry, Part II: Chlorine. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 61, n. 8, p. 959-964, 2006.
- 52 HUANG, M. D.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; OKRUSS, M. Determination of halogens via molecules in the air-acetylene flame using high-resolution continuum source absorption spectrometry: Part I. Fluorine. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 61, n. 5, p. 572-578, 2006.
- 53 HUANG, M. D.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; MICHAEL OKRUSS, M.; WELZ, B.; MORÉS, S. Determination of iodine via the spectrum of barium monoiodide using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in a graphite furnace. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 64, n. 7, p. 697-701, 2009.
- 54 HUANG, M. D.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; OKRUSS, M.; WELZ, B.; FERREIRA, H. S. High-resolution continuum source molecular absorption spectrometry of nitrogen monoxide and its application for the determination of nitrate. **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 2, p. 163-168, 2010.
- 55 HUANG, M. D.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; OKRUSS, M. Determination of phosphorus by molecular absorption of phosphorus monoxide using a high-resolution continuum source absorption spectrometer and an air-acetylene flame. **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, v. 21, n. 3, p. 338-345, 2006.
- 56 HUANG, M. D.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; OKRUSS, M. The influence of calcium and magnesium on the phosphorus monoxide molecular absorption signal in the determination of phosphorus using a continuum source absorption spectrometer and an air-acetylene flame. **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, v. 21, n. 3, p. 346-349, 2006.

- 57 HUANG, M. D.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; OKRUSS, M. Direct determination of total sulfur in wine using a continuum-source atomic-absorption spectrometer and an air-acetylene flame. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, n. 8, p. 1877-1881, 2005.
- 58 HUANG, M. D.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; OKRUSS, M. Determination of sulfur by molecular absorption of carbon monosulfide using a high-resolution continuum source absorption spectrometer and an air-acetylene flame. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 61, n. 2, p. 181-188, 2006.
- 59 AMORIM FILHO, V. R.; FRANZINI, V. P.; GOMES NETO, J. A. Exploring potentialities of the HR-CS FAAS technique in the determination of Ni and Pb in mineral waters. **Eclética Química**, v. 33, n. 1, p. 49-56, 2008.
- 60 AMORIM FILHO, V. R.; GOMES NETO, J. A. Different lubricating oil treatments for the determination of Cu, Cr, Fe, Ni, Sb, Pb and Zn by HR-CS FAAS. **Analytical Letters**, v. 41, n. 9, p. 1555-1570, 2008.
- 61 RAPOSO JUNIOR, J. L.; OLIVEIRA, S. R.; NOBREGA, J. A.; GOMES NETO, J. A. Internal standardization and least-squares background correction in high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry to eliminate interferences on determination of Pb in phosphoric acid. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 63, n. 9, p. 992-995, 2008.
- 62 RAPOSO JUNIOR, J. L.; OLIVEIRA, S. R.; CALDAS, N. M.; GOMES NETO, J. A. Evaluation of alternate lines of Fe for sequential multi-element determination of Cu, Fe, Mn and Zn in soil extracts by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 627, n. 2, p. 198-202, 2008.
- 63 OLIVEIRA, S. R.; RAPOSO JUNIOR, J. L.; GOMES NETO, J. A. Fast sequential multi-element determination of Ca, Mg, K, Cu, Fe, Mn and Zn for foliar diagnosis using HR-CS FAAS: feasibility of secondary lines, side pixel registration and least-squares background correction. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 64, n. 6, p. 593-596, 2009.
- 64 AMORIM FILHO, V. R.; GOMES NETO, J. A. Evaluation of lubricating oil preparation procedures for the determination of Al, Ba, Mo, Si and V by high-resolution continuum source FAAS. **Analytical Sciences**, v. 25, n. 1, p. 95-100, 2009.

- 65 WILTSCHE, H.; PRATTES, K.; ZISCHKA, M.; KNAPP, G. Estimation of boron isotope ratios using high resolution continuum source atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 64, n. 4, p. 341-346, 2009.
- 66 MATUSIEWICZ, H.; KRAWCZYK, M. Sequential multi-element determination of hydride-forming elements (As, Bi, Cd, In, Pb, Se, Te, Tl) by high-resolution source atomic trapping-flame atomic absorption spectrometry. **Chemia Analityczna**, v. 54, n. 5, p. 949-973, 2009.
- 67 OLIVEIRA, S. R.; GOMES NETO, J. A.; NOBREGA, J. A.; JONES, B. T. Determination of macro- and micronutrients in plant leaves by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry combining instrumental and sample preparation strategies. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 65, n. 4, p. 316-320, 2010.
- 68 BRANDAO, G. C.; JESUS, R. M.; SILVA, E. G. P.; FERREIRA, L. C. Use of slurry sampling for the direct determination of zinc in yogurt by high resolution-continuum source flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 81, n. 4/5, p. 1357-1359, 2010.
- 69 RAPOSO JUNIOR, J. L.; OLIVEIRA, S. R.; NOBREGA, J. A.; GOMES NETO, J. A. Mathematical equation correction to spectral and transport interferences in high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry: determination of lead in phosphoric acid. **Eclética Química**, v. 35, n. 1, p. 19-24, 2010.
- 70 ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists International**. 18th ed. Gaithersburg, 2006. Cap. 3.
- 71 REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G.; JACINTHO, A. O.; KRUG, F. J.; BERGAMIN, H. Merging zones in flow-injection analysis .4. Simultaneous spectrophotometric determination of total nitrogen and phosphorus in plant-material. **Analytica Chimica Acta**, v. 119, n. 2, p. 305-311, 1980.
- 72 KONIECZYNSKI, P.; WESOLOWSKI, M. Total phosphorus and its extractable form in plant drugs. Interrelation with selected micro- and macroelements. **Food Chemistry**, v. 103, n. 1, p. 210-216, 2007.

73 MATEJOVIC, I.; DURACKOVA, A. Comparison of microwave digestion, wet and dry mineralization, and solubilization of plant-sample for determination of calcium, magnesium, potassium, phosphorus, sodium, iron, zinc, copper, and manganese. **Communications In Soil Science And Plant Analysis**, v. 25, n. 9/10, p. 1277-1288, 1994.

74 MINGORANCE, M. D. Focused microwave-assisted digestion of vegetal materials for the determination of essential mineral nutrients. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 373, n. 3, p. 153-158, 2002.

75 ROYSET, O. Determination of phosphate species in nutrient solutions and phosphorus in plant-material as phosphovanadomolybdic acid by flow-injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 178, n. 2, p. 217-221, 1985.

76 STEWART, J. W. B.; RUZICKA, J. Flow injection analysis .5. simultaneous determination of nitrogen and phosphorus in acid digests of plant material with a single spectrophotometer. **Analytica Chimica Acta**, v. 82, n. 1, p. 137-144, 1976.

77 ZAGATTO, E. A. G.; KRUG, F. J.; BERGAMIN, F.; JORGENSEN, S. S.; REIS, B. F. Merging zones in flow injection analysis. Part 2. determination of calcium, magnesium and potassium in plant material by continuous flow injection atomic absorption and flame emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 104, n. 2, p. 279-284, 1979.

78 BALL, D. F.; PERKINS, D. F. Plant analysis by X-ray fluorescence spectrography - determination of calcium and potassium. **Nature**, v. 194, n. 4834, p. 1163-1165, 1962.

79 BASTA, N. T.; TABATABAI, M. A. Determination of total potassium, sodium, calcium, and magnesium in plant materials by ion chromatography. **Soil Science Society of America Journal**, v. 49, n. 1, p. 76-81, 1985.

80 GOYAL, S. S.; HAFEZ, A. A. R.; RAINS, D. W. Simultaneous determination of total sodium, potassium, magnesium, and calcium in plant-tissues using acid digestion and ion chromatography. **Agronomy Journal**, v. 85, n. 6, p. 1192-1197, 1993.

81 MALMSTADT, H. V.; HADJIIOANNOU, T. P. Rapid and accurate automatic titration method for determination of calcium and magnesium in plant material with EDTA titrant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 7, n. 6, p. 418-420, 1959.

- 82 DERDERIAN, N. Determination of calcium and magnesium in plant material with EDTA. **Analytical Chemistry**, v. 33, n. 12, p. 1796-1798, 1961.
- 83 SAPKOTA, A.; KRACHLER, M.; SCHOLZ, C.; CHEBURKIN, A. K.; SHOTYK, W. Analytical procedures for the determination of selected major (Al, Ca, Fe, K, Mg, Na, and Ti) and trace (Li, Mn, Sr, and Zn) elements in peat and plant samples using inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 540, n. 2, p. 247-256, 2005.
- 84 GARRIDO, M. L. Determination of sulfur in plant material. **Analyst**, v. 89, n. 105, p. 61-66, 1964.
- 85 SAH, R. N.; BROWN, P. H. Boron determination – a review of analytical methods. **Microchemical Journal**, v. 56, n. 3, p. 285-304, 1997.
- 86 BERGAMIN FILHO, H.; MEDEIROS, J. X.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G. Solvent extraction in continuous flow injection analysis: determination of molybdenum in plant material. **Analytica Chimica Acta**, v. 101, n. 1, p. 9-16, 1978.
- 87 COMITRE, A. L. D.; REIS, B. F. Liquid-liquid extraction procedure exploiting multicommutation in flow system for the determination of molybdenum in plants. **Analytica Chimica Acta**, v. 479, n. 2, p. 185-190. 2003.
- 88 SSEKAALO, H. Rapid and accurate method for the determination of molybdenum in plant materials with toluene-3,4-dithiol. **Analyst**, v. 96, n. 1146, p. 346-348, 1971.
- 89 LAJUNEN, L. H. J.; KUBIN, A. Determination of trace amounts of molybdenum in plant-tissue by solvent-extraction atomic-absorption and direct-current plasma emission-spectrometry. **Talanta**, v. 33, n. 3, p. 265-270, 1986.
- 90 FERREIRA, J. R.; ZAGATTO, E. A. G.; ARRUDA, M. A. Z.; BRIENZA, S. M. B. Determination of zinc in plants by flow injection spectrophotometry with ion-exchange separation. **Analyst**, v. 115, n. 6, p. 779-782, 1990.
- 91 MASSON, P.; ESVAN, J. M. Simultaneous determination by inductively coupled plasma spectrometry N, P, K, Ca, Cu, Mg, Fe, Mn and Zn in plant samples. **Analisis**, v. 23, n. 9, p. 437-440, 1995.

92 SUN, D. H.; WATERS, J. K.; MAWHINNEY, T. P. Microwave digestion for determination of aluminum, boron, and 13 other elements in plants by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 80, n. 3, p. 647-650, 1997.

93 FENG, X. B.; WU, S. L.; WRARMBY, A.; WITTMEIER, A. Microwave digestion of plant and grain standard reference materials in nitric and hydrofluoric acids for multi-elemental determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 14, n. 6, p. 939-946, 1999.

94 MASSON, P.; DALIX, T.; BUSSIERE, S. Determination of major and trace elements in plant samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 41, n. 3, p. 231-243, 2010.

95 WU, B.; ZORIY, M.; CHEN, Y. X.; BECKER, J. S. Imaging of nutrient elements in the leaves of *Elsholtzia splendens* by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry LA-ICP-MS. **Talanta**, v. 78, n. 1, p. 132-137, 2009.

96 TREVIZAN, L. C.; SANTOS JUNIOR, D.; SAMAD, R. E.; VIEIRA JUNIOR, N. D.; NOMURA, C. S.; NUNES, L. C.; RUFINI, I. A.; KRUG, F. J. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for the determination of macronutrients in plant materials. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 63, n. 10, p. 1151-1158, 2008.

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

98 POUZAR, M.; CERNOHORSKY, T.; PRUSOVA, M.; PROKOPCAKOVA, P.; KREJCOVA, A. LIBS analysis of crop plants. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 24, n. 7, p. 953-957, 2009.

99 MENESATTI, P.; ANTONOCCI, F.; PALOTTINO, F.; ROCCUZZO, G.; ALLEGRA, M.; STAGNO, F.; INTRIGLIOLO, F. Estimation of plant nutritional status by Vis-NIR spectrophotometric analysis on orange leaves [*Citrus sinensis* (L) Osbeck cv Tarocco]. **Biosystems Engineering**, v. 105, n. 4, p. 448-454, 2010.

100 MALAVOLTA, E.; PRATES, H. S.; CASALE, H.; LEÃO, H. C. Seja o doutor do seu citrus. **Informações Agronômicas**, v. 65, n. 4, p. 1-22, 1994.

- 101 RAIJ, B.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: Instituto Agrônomo & Fundação IAC, 1996.
- 102 ANDERSON, R. **Sample pretreatment and separation**. Chichester: John Wiley, 1991.
- 103 ARRUDA, M. A. Z.; SANTELLI, R. E. Mecanização no preparo de amostras por microondas: o estado da arte. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 638-643, 1997.
- 104 CHOW, P. Y. T.; CHUA, T. H.; TANG, K. F.; OW, K. F. B. Y. Dilute-acid procedure for the determination of lead, copper, and mercury in traditional chinese medicines by atomic absorption. **Analyst**, v. 120, n. 4, p. 1221-1223, 1995.
- 105 LE BIHAN, A.; CABON, J. Y.; ELLEOUT, C. spectral interference related to the presence of nitrate and nitrogen monoxide in zeeman-corrected atomic-absorption spectrometry with electrothermal atomization. **Analisis**, v. 20, n. 10, p. 601-604, 1992.
- 106 BOHRER, D.; HEITMANN, U.; HUANG, M. D.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; WELZ, B.; BERTAGNOLLI, D. Determination of aluminum in highly concentrated iron samples: study of interferences using high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 62, n. 9, p. 1012-1018, 2007.
- 107 NACHTIGALL, G. R. **Sistema integrado de diagnose e recomendação (DRIS) para avaliação do estado nutricional da macieira no sul do Brasil**. 2004. 141 f. Tese (Doutorado em Agronomia) –Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.