



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Raiane Cristina Velozo Silva

**Avaliação da técnica de espectrometria de emissão óptica em plasma
induzido por laser (LIBS) para determinação de nitrogênio em diferentes
matrizes**

**Araraquara- SP
2023**

Raiane Cristina Velozo Silva

Avaliação da técnica de espectrometria de emissão óptica em plasma induzido por laser (LIBS) para determinação de nitrogênio em diferentes matrizes

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

Orientadora: Prof. Dra. Edilene Cristina Ferreira

Araraquara- SP

2023

S586a

Silva, Raiane Cristina Velozo

Avaliação da técnica de espectrometria de emissão óptica em plasma induzido por laser (LIBS) para determinação de nitrogênio em diferentes matrizes / Raiane Cristina Velozo Silva. -- Araraquara, 2023
43 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Química, Araraquara

Orientadora: Edilene Cristina Ferreira

1. Espectroscopia de emissão com plasma induzido por laser. 2.
Nitrogênio. 3. Carbono. 4. Composição. 5. Calibração. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Avaliação da técnica de espectrometria de emissão óptica em plasma induzido por laser (LIBS) para determinação de nitrogênio em diferentes matrizes"

AUTORA: RAIANE CRISTINA VELOZO SILVA

ORIENTADORA: EDILENE CRISTINA FERREIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Química, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. EDILENE CRISTINA FERREIRA (Participação Virtual) 
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. FERNANDA SANTIAGO CHAVES SOARES (Participação Virtual)
Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas / Campus de Rio Paranaíba - UFV - Rio Paranaíba, MG

Prof. Dr. JOSE ANCHIETA GOMES NETO (Participação Virtual)
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 23 de janeiro de 2023

Dados curriculares

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Raiane Cristina Velozo Silva

Data de nascimento: 20 de dezembro de 1989

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Ipatinga- MG

Filiação: Ivone Regina da Silva

Orlando Velozo Junior

Nome em citações bibliográficas: SILVA, R.C.V.; SILVA, RAIANE C. VELOZO.

Endereço eletrônico: raianevelozo@gmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Graduação:

Bacharelado em Química Universidade Federal de Viçosa - UFV, Rio Paranaíba- MG,
Período: 03/2014 - 08/2018.

Mestrado em Química

Universidade Estadual Paulista - UNESP, Instituto de Química, Araraquara - SP.
Período: 08/2019 - 01/2023

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

III CONDEQUI- Congresso Online Nacional de Química, no período de 15 a 18 de junho de 2021 com duração de 40 horas.

XII Workshop de Quimiometria- evento online, nos dias 08 e 09/11/2021 com duração de 12 horas, realizado pela Universidade Federal da Bahia, Feira de Santana-BA.

19º ENQA- Encontro Nacional de Química Analítica, realizado na cidade de Caldas Novas- GO, no período de 16 a 19 de setembro de 2018. Apresentação do trabalho científico “Estudo da capacidade adsorvente do coentro (*Coriandrum sativum*) para remoção de metais potencialmente tóxicos em solução aquosa” na forma de pôster.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me dar sabedoria, esperança e bênçãos na minha vida. E ter me concedido a oportunidade de realizar mais um desejo profissional.

Agradeço aos meus pais por serem grandes incentivadores do meu desenvolvimento profissional e pessoal. Obrigada por todo amor, conselhos e ensinamentos em cada etapa da minha vida.

Aos amigos Letícia, Lucas, Givaldo e Edelson, obrigada pelos cafés, passeios e bate-papos para aliviar o stress do dia a dia, amenizar a ansiedade e a saudade da família. Vocês estão no meu coração e são as melhores lembranças.

Aos amigos do GEA, Evilim, João, Carol, Maisa e Alan, vocês se tornaram a minha família científica. Muito obrigada pelos ensinamentos, pela troca de experiência e pelas risadas na hora do café. Vocês fizeram esse processo ser prazeroso. Vou levar todos vocês no meu coração para sempre.

Agradeço ao professor Anchieta por compartilhar sempre o seu conhecimento científico e de mundo, e pelas contribuições na minha formação em mestre.

Agradeço imensamente à professora Edilene por me orientar durante o mestrado. Saiba que você é um exemplo de professora, que compartilha ensinamentos e conhecimento, sempre didática e coerente. Você será referência e inspiração profissional para mim.

Ao Instituto de Química da UNESP sou grata por todo suporte e infraestrutura para o desenvolvimento deste trabalho e pelas oportunidades de aprendizado e de crescimento pessoal e profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Resumo

A determinação do teor de N auxilia no controle de qualidade de produtos alimentícios e fertilizantes, além de ser um importante parâmetro para o controle e manutenção dos ecossistemas. O método mais utilizado para a determinação de N, requer elevados volumes de soluções e um grande volume de resíduos é gerado pós-análise. A espectrometria de emissão óptica em plasma induzido por laser (LIBS) constitui uma alternativa para determinação de N de forma direta, simples, rápida e sem geração de resíduo pós-análise. No presente trabalho o desempenho da técnica LIBS foi avaliado para determinar N em diferentes amostras. Intensidades de linhas de emissão de N iônico e bandas moleculares diatômicas de CN foram avaliados como sinais analíticos. Após a otimização das condições operacionais para aquisição espectral, diferentes compostos químicos (whey protein, glutamina, fosfato de amônio dibásico) foram avaliados como padrão de calibração para obtenção de curvas analíticas, com o objetivo de propor um único método de calibração capaz de determinar o teor de N em diferentes amostras (fertilizante amoniacal, farinhas, carne e leite em pó). Os resultados mostraram que o padrão contendo N inorgânico apresentou resultados satisfatórios somente para determinação de N amoniacal na amostra de fertilizante. Entre os padrões que continham N na forma orgânica/proteica, o aminoácido glutamina foi o que mostrou melhores resultados, apesar da exatidão não ter sido alcançada com modelos de calibração univariados. Dessa forma, o uso da glutamina foi avaliado para o ajuste de modelo de regressão linear múltipla e o método M5 para selecionar variáveis. Os resultados mostraram que bandas moleculares de CN apresentaram forte contribuição para o modelo ajustado e que embora esse modelo não tenha sido validado para a determinação de N inorgânico, foi exato para a determinação de N orgânico/proteico em diferentes matrizes.

Palavras-chaves: LIBS; N; CN; Compatibilização de matriz; Calibração multivariada.

Abstract

The determination of the N content helps in the quality control of food products and fertilizers, in addition to being an important parameter for the control and maintenance of ecosystems. The most used method for N determination requires high volumes of solutions and a large volume of waste is generated post-analysis. Laser-induced plasma optical emission spectrometry (LIBS) is an alternative for direct, simple and fast determination of N without generating post-analysis waste. In the present work, the performance of the LIBS technique was evaluated to determine N in different samples. Ionic N emission line intensities and CN diatomic molecular bands were evaluated as analytical signals. After optimizing the operational conditions for spectral acquisition, different chemical compounds (whey protein, glutamine, dibasic ammonium phosphate) were evaluated as a calibration standard to obtain analytical curves, with the aim of proposing a single calibration method capable of determining the N content in different samples (ammonium fertilizer, flour, meat and powdered milk). The results showed that the standard containing inorganic N presented satisfactory results only for the determination of ammoniac N in the fertilizer sample. Among the standards containing N in the organic/protein form, the amino acid glutamine showed the best results, although accuracy was not achieved with univariate calibration models. Thus, the use of glutamine was evaluated for the adjustment of a multiple linear regression model and the M5 method for selecting variables. The results showed that CN molecular bands made a strong contribution to the adjusted model and that, although this model has not been validated for the determination of inorganic N, it was accurate for the determination of organic/protein N in different matrices.

Keywords: LIBS; N; CN; Matrix compatibility; Multivariate calibration.

Lista de abreviaturas

| | |
|----------------|---|
| ANOVA | Análise de Variância |
| AOAC | Association of Official Agricultural Chemists |
| CRM | Certified Reference Materials |
| LIBS | Laser induced breakdown spectroscopy |
| MASER | Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation |
| Nd:YAG | Neodymium-doped yttrium aluminium garnet |
| NIST | National Institute of Standards and Technology |
| r | Coeficiente de correlação r de Pearson |
| SD | Spark discharge |
| SD-LIBS | Spark discharge- laser induced breakdown spectroscopy |
| WEKA | Waikato Environment for Knowledge Analysis |

Sumário

| | |
|--|-----------|
| 1. Introdução..... | 9 |
| 2. Revisão Bibliográfica..... | 11 |
| 2.1 A técnica LIBS..... | 11 |
| 2.2 Efeito de matriz | 15 |
| 2.3 Determinação de nitrogênio usando LIBS | 16 |
| 3. Objetivos..... | 18 |
| 4. Metodologia | 19 |
| 4.1 Instrumentação | 19 |
| 4.2 Amostras e padrões | 20 |
| 4.3 Determinação de valores de referência..... | 21 |
| 4.4 Otimização das condições analíticas | 22 |
| 4.5 Determinação do teor de Nitrogênio..... | 23 |
| 4.5.1 Modelagem univariada para predição do teor de N..... | 24 |
| 4.5.2 Modelagem Multivariada para predição do teor de N..... | 24 |
| 4.5.3 Exatidão dos métodos..... | 25 |
| 5. Resultados e discussões | 26 |
| 5.1 Otimização das condições analíticas | 26 |
| 5.2 Avaliação de modelagem univariada para predição do teor de N | 31 |
| 5.3 Modelagem Multivariada para predição do teor de N..... | 36 |
| 6. Conclusão..... | 40 |
| 7. Referências Bibliográficas | 41 |

1. Introdução

O N é o elemento químico mais abundante da atmosfera, está presente em diversas substâncias químicas essenciais para a manutenção dos seres vivos (fauna e flora), nas proteínas consumidas pelo ser humano, e em teor considerável nos fertilizantes e agrotóxicos.

O mercado alimentício possui grande variedade de alimentos e suplementos alimentares proteicos de origem animal (carnes, ovos e leite), vegetal ou sintéticos para atender o consumo humano. Segundo a *Food and Agriculture Organization* (OECD, 2022), a demanda do mercado para atender o consumo de proteínas vem aumentando e a ingestão *per capita* de proteína deverá aumentar até 2031. Desse modo, a determinação do teor de proteínas em produtos alimentícios é importante para conferir significados nutricionais, tecnológicos e funcionais, para o controle de qualidade e rotulagem, além de ditar o seu valor de mercado (SÁEZ-PLAZA et al., 2013).

A determinação do N proteico pode também auxiliar na elucidação de fenômenos causais. Os estudos de Dib e colaboradores (2020), por exemplo, mostraram que bandas referentes à proteínas nos espectros Raman de amostras de milho, apresentam potencial discriminativo para sementes transgênicas e não transgênicas, sugerindo que a modificação genética afeta o teor de proteínas nas amostras.

Os fertilizantes nitrogenados, a base de amônio e ureia são utilizados para adubação agrícola como fonte controlada de nitrogênio (COSTA et al., 2004), sendo a ureia é instável, pois em contato com solo hidrolisa gerando o gás amônia, o qual é liberado na atmosfera. O excesso de N no meio ambiente provoca danos ao ciclo de vida das plantas, contaminação do solo e dos corpos d'água, e agrava o efeito estufa por meio da formação de NO. Portanto, avaliar o teor de N em diferentes tipos de amostra garante o controle de qualidade dos produtos alimentícios e fertilizantes, permite melhor compreensão de processos químicos e biológicos, além de ser uma forma de controle e manutenção do ecossistema.

O método proposto por Kjeldahl em 1883, é amplamente utilizado para determinar o teor de N em diferentes amostras, por apresentar resultados exatos (NARDO et al., 2012). Este método se baseia na conversão do N da amostra em sulfato de amônio, através da digestão com ácido sulfúrico, conversão do íon amônio à gás amônia através da alcalinização do meio e posterior destilação e fixação do N

em solução ácida (na forma do íon amônio), cuja determinação é feita por meio de uma análise volumétrica (NOGUEIRA et al., 2015). Por se tratar de uma análise em solução, o método de Kjeldahl demanda preparo das amostras e utiliza grandes quantidades de reagentes químicos, gerando resíduos pós-análise. Assim, desenvolver um método rápido e direto para a determinação de N em diferentes matrizes, que demande o mínimo ou nenhum preparo de amostra, consiste em importante contribuição para a demanda de qualidade nutricional e investigação de diferentes processos em amostras.

A espectrometria de emissão óptica em plasma induzido por laser, conhecida pelo acrônimo LIBS, (do inglês: *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*), é uma técnica espectroanalítica de emissão óptica, multielementar que pode ser uma alternativa interessante para análise de N em diferentes amostras (VADILLO; PUROHIT; LASERNA, 2018). A LIBS atende diretamente os propósitos de determinação direta, simples, rápida e sem geração de resíduo pós-análise. Contudo, o desenvolvimento de métodos quantitativos utilizando a LIBS é deveras desafiador, uma vez que os severos efeitos de matriz dificultam a proposição de padrões adequados para calibração e conseqüentemente a obtenção de exatidão analítica.

Considerando a importância da determinação limpa e direta de N em diferentes matrizes e as atrativas contribuições que a técnica LIBS pode agregar aos métodos analíticos, os estudos aqui desenvolvidos tiveram por objetivo avaliar o potencial da técnica para viabilização de métodos quantitativos para determinação do teor de N em matrizes diversas.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 A técnica LIBS

As técnicas analíticas têm se mostrado cada vez mais sensíveis e com obtenção de dados precisos de maneira simplificada e eficaz, afim de equacionar e responder questões essenciais da humanidade (COSTA et al., 2019). O interesse pela LIBS pode ser comprovado pelo número crescente de publicações nas última duas décadas (VADILLO; PUROHIT; LASERNA, 2018). A Figura 1 mostra o gráfico gerado a partir de dados extraídos da plataforma *ISI Web of Science*, em que foi usada a palavra-chave “Laser-Induced Breakdown Spectroscopy”.

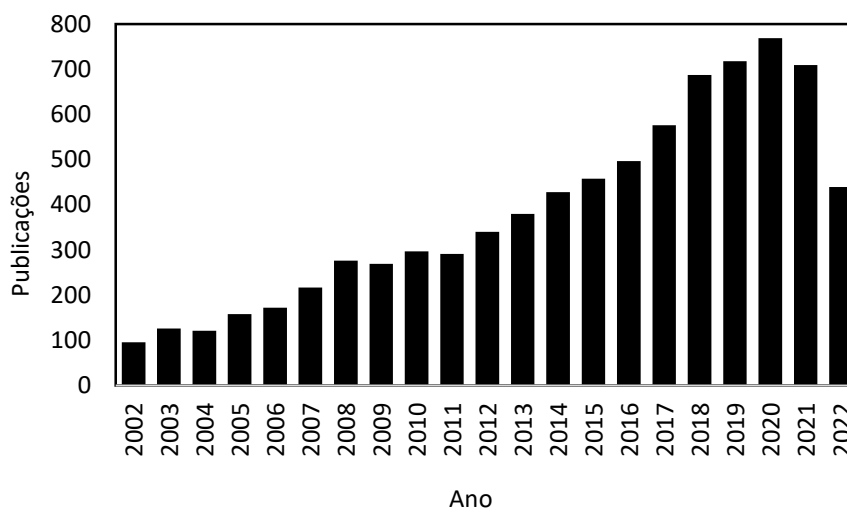


Figura 1: Número de publicações nos periódicos ISI Web of Science com a palavra-chave “Laser Induced Breakdown Spectroscopy” entre os anos de 2002 e 2022.
Fonte: do Autor.

A fundamentação da técnica LIBS se iniciou no século XX quando Albert Einstein propôs as teorias de emissão estimulada (KLEPPNER, 2015), para que em 1958 Charles Townes e Arthur Schawlow propusessem a *Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (MASER), um dispositivo que produz ondas eletromagnéticas (CREMERS; RADZIEMSKI, 2013). Já em 1960, Theodore Maiman desenvolveu o laser de rubi, sendo o primeiro laser óptico proposto. Brech e Cross utilizaram esse mesmo dispositivo para demonstrar a utilidade do plasma induzido por laser em 1962 (BERNATSKYI; KHASKIN, 2021). No ano de 1963, consagrou-se o surgimento da técnica LIBS a partir do desenvolvimento do laser *Q-switched*, técnica utilizada para gerar pulsos energéticos curtos (MIZIOLEK; PALLERCHI; SCHECHTER, 2006).

No decorrer da década de 1970, houve progressos no arranjo instrumental da LIBS, equipamentos comerciais e lasers menores, mas com alta potência, começaram a ser produzidos. Com isso, a técnica LIBS vem sendo explorada e aprimorada com o passar das décadas, se consolidando como uma promissora técnica espectroanalítica de análises elementares e multielementares (CREMERS; RADZIEMSKI, 2013).

LIBS é uma técnica de análise direta baseada na emissão de espécies excitadas em um plasma induzido por laser (MIZIOLEK; PALLESCHI; SCHECHTER, 2006), que gera espectros de linhas de emissão correspondentes aos elementos presentes na amostra.

A primeira etapa da análise em LIBS se inicia com a incidência de um pulso de laser de alta energia sobre a superfície da amostra, com a interação laser-superfície ocorre a amostragem de massas de ordem de $\mu\text{g-ng}$ (ablação). Em seguida ocorre o *breakdown*, neste processo a massa amostrada é vaporizada e a interação entre laser e a amostra na fase vapor provoca a ruptura dielétrica das ligações moleculares e ionização. Os elétrons livres produzidos pelos processos de ionização absorvem fótons do laser e ganham energia cinética suficiente para ionizar outros átomos por colisão (ionização em cascata). Este processo resulta na formação de um plasma com temperaturas da ordem de 20.000K (MIZIOLEK; PALLESCHI; SCHECHTER, 2006). A temperatura do plasma e os processos de colisão entre as partículas promovem a excitação de átomos, íons e espécies moleculares diatômicas presentes no plasma. Com o resfriamento do plasma, as espécies excitadas retornam ao estado de menor energia, emitindo radiação eletromagnética em comprimentos de onda característicos (COSTA et al., 2019). A radiação emitida no plasma é conduzida à espectrômetros, onde é separada em função dos comprimentos de onda, e detectada para gerar um espectro de emissão (MIZIOLEK; PALLESCHI; SCHECHTER, 2006). Na Figura 2 é mostrada a configuração da instrumentação básica de um sistema LIBS.

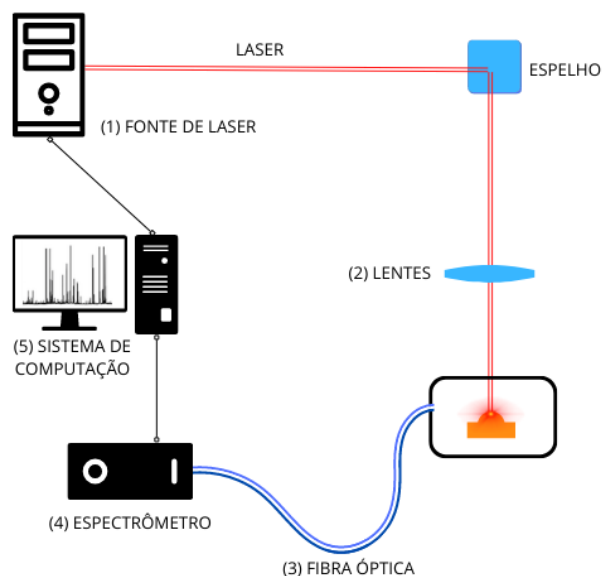


Figura 2: Configuração básica de um instrumento LIBS
Fonte: Do autor

A fonte do laser (1) produz pulsos de alta energia. Diferentes lasers podem gerar pulsos com duração diferente, sendo mais comumente utilizados os lasers que geram pulsos com duração de ns. O pulso é focalizado na superfície da amostra através do uso de lentes (2), que estão acopladas a um sistema de fibras ópticas (3), estas são utilizadas para conduzir a radiação emitida no plasma até o espectrômetro (4), e um sistema computacional (5) controla o disparo do pulso, o tempo para iniciar a aquisição dos sinais, o tempo durante o qual o sinal é adquirido e também registra o espectro.

Os espectros obtidos podem ser bastante complexos com um grande número de linhas de emissão, uma vez que quando há formação do plasma, pode se alcançar a energia de excitação de muitos átomos e íons. Outro fato importante é que o plasma em LIBS é temporal, ou seja, é extinto após curto intervalo de tempo. A Figura 3 ilustra a evolução e os processos que ocorrem em cada fase do plasma.

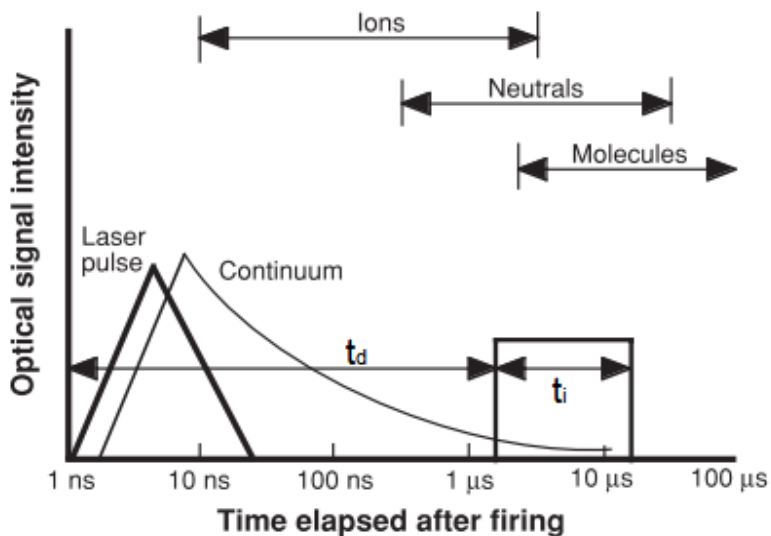


Figura 3: Histórico temporal do plasma
 Fonte: Adaptado de MIZIOLEK; PALLESCI; SCHECHTER, 2006.

Inicialmente, o plasma emite uma intensa radiação branca e brilhante, denominada contínuo onde, as emissões elementares e moleculares no plasma não podem ser discriminadas do sinal do contínuo. Após o decaimento do contínuo, as emissões de interesse se pronunciam e nesse momento o detector deve iniciar a aquisição dos sinais. O tempo entre o disparo do pulso e o início da aquisição dos sinais é denominado *delay time* (t_d) e o tempo durante o qual se faz a aquisição dos sinais é chamado de tempo de integração (t_i). Quanto maior o tempo de integração, maior o ganho em sensibilidade. Entretanto, em tempos muito longos predominam os processos de recombinação que geram espécies moleculares, uma vez que há o resfriamento do plasma. Assim, o sinal médio de emissão de átomos e íons são reduzidos quando se considera a integração de sinais em plasma frio.

Em muitas análises utilizando a técnica LIBS é preciso superar sua baixa detectabilidade, exigindo aprimoramento da técnica (HAHN; OMENETTO, 2012). A adição de outro laser (HAHN; OMENETTO, 2012) ou uma fonte de alta tensão para descarga elétrica contribui energeticamente na excitação dos átomos e conseqüentemente, para aumentar a intensidade das linhas de emissão (LI et al., 2018). De acordo com Zhou et al.(2012) o incremento de energia proporciona o aumento do tempo de vida do plasma e da quantidade de espécies excitadas.

Vieira e colaboradores (2018) determinaram P em fertilizantes, quando um sistema gerador de descarga elétrica foi acoplado ao LIBS. Os resultados mostraram que aplicação de uma descarga elétrica no momento da ablação melhorou a

sensibilidade das medidas, permitindo a identificação das linhas de emissão de P e sua quantificação.

2.2 Efeito de matriz

Segundo Miziolek et. al (2006) o efeito de matriz ocorre quando as propriedades físicas e a composição da amostra podem afetar o sinal do elemento, ou seja, as intensidades de sinal de um elemento podem apresentar valores diferentes em amostras de matrizes distintas, mesmo que a concentração do elemento seja a mesma.

Existem dois tipos de efeitos de matriz em análises LIBS: físico e químico (CREMERS; RADZIEMSKI, 2013). O efeito de matriz físico se relaciona com a etapa de ablação e as propriedades físicas das amostras (calor específico, calor latente, condutividade térmica etc.) que possuem diferentes matrizes (MIZIOLEK; PALLERCHI; SCHECHTER, 2006). O efeito de matriz químico acontece quando um elemento, presente na composição matricial da amostra, é capaz de afetar as características de emissão do elemento de interesse, o que afeta diretamente nas análises quantitativa por LIBS (HAHN; OMENETTO, 2012).

Sánchez-Esteva e colaboradores (2021) avaliaram os efeitos de matriz físico na determinação de P total em amostras de solo com diferentes diâmetros de grãos utilizando análise LIBS. Houve diferença significativa nos sinais analíticos em que as amostras moídas apresentaram sinais analíticos de P maiores que as amostras não moídas. De acordo com os autores, em amostras heterogêneas como o solo, a moagem melhora a homogeneidade e, a vaporização e atomização de partículas menores resultam em um plasma mais uniforme.

A obtenção de padrões de calibração é um grande desafio quando se trata de desenvolvimento de métodos analíticos quantitativos usando a LIBS e, por ser uma análise direta de sólidos, os sinais analíticos são fortemente influenciados pela matriz. (AUGUSTO; CASTRO; SPERANÇA, 2019; CASTRO; BABOS; PEREIRA-FILHO, 2020). A calibração por compatibilização de matriz utilizando padrões de calibração (JANTZI et al., 2016) e um adequado processamento espectral, em conjunto, podem minimizar o efeito de matriz.

A compatibilização de matriz consiste em uma alternativa de calibração para amenizar os efeitos de matriz químico, utilizando padrões de calibração com concentrações estabelecidas por uma técnica de referência, ou materiais de

referência certificado (AUGUSTO; CASTRO; SPERANÇA, 2019). No trabalho de Moraes e colaboradores (2017) o teor de Ca em fertilizantes a base de biocarvão foi avaliado empregando compatibilização de matriz. Os resultados mostraram que além da compatibilização de matriz, foi necessário utilizar a padronização interna, para que a exatidão fosse alcançada.

Gu e colaboradores (2021) desenvolveram um método de pré-processamento espectral baseado na compatibilização de matrizes, a fim de reduzir o efeito de matriz químico. O método baseia-se na criação de um grupo de subconjuntos com base na similaridade das propriedades da matriz das amostras, a partir disso é criado um modelo de calibração capaz de prever o teor de C e de N, através da emissão da banda CN em 387,3 nm.

2.3 Determinação de nitrogênio usando LIBS

As linhas de emissão de N são muito importantes para acessar a composição orgânica das amostras (VADILLO; PUROHIT; LASERNA, 2018). Contudo, existe a dificuldade em obter boas linhas de N até 600 nm e também, há diversos fatores que influenciam o aparecimento dessas linhas.

Segundo, Lu et al. (2012) as formas primárias de N podem ser excitadas por laser facilmente, em contrapartida as linhas de emissão mais intensas só podem ser observadas durante os microssegundos iniciais após formação do plasma (HARRIS et al., 2004). De acordo com Ilyin et al. (2016), as linhas de emissão do N iônico podem ser observadas quando o plasma atinge densidades eletrônicas acima de 1 eV e em presença de um fluxo de argônio.

Assim, quando há limitações instrumentais para aquisição espectral em comprimentos de onda superiores a 600 nm, a utilização de bandas de emissão de moléculas diatômicas de CN pode ser uma alternativa para identificar e mensurar o N presente na matriz. Dib e colaboradores (2020), adquirindo espectros LIBS somente até 600 nm, desenvolveram um método para determinação de N em amostras de fertilizantes a base de biocarvão. A partir dos sinais de emissão diatômica da banda de CN em 388,3 nm.

A formação do CN pode acontecer via fragmentação direta de uma espécie que contenha em sua estrutura química ligações CN e baixa energia de excitação eletrônica (ZHAO et al., 2020), ou por recombinação entre C e N presentes nas

amostras e dependerá da quantidade de N e C presentes na matriz (MOUSAVI et al., 2016).

As intensidades de emissão das bandas podem ser sensíveis à irradiação do laser, ao delay time e tempo de integração, influenciando nas características dos espectros de emissão de CN (ALREBDI et al., 2022) portanto, a obtenção dessas linhas de emissão dependerá da instrumentação disponível para análise.

As linhas espectrais do sistemas de bandas de CN se encontram nos comprimentos de ondas: 388,3; 387,1; 386,1; 385,4; e 385,0 nm e as transições vibracionais correspondem a (0,0), (1,1), (2,2), (3,3) e (4,4), respectivamente (MOUSAVI et al., 2016).

3. Objetivos

Objetivo Principal

Avaliar o potencial da técnica LIBS para determinação de N em diferentes matrizes.

Objetivos Específicos

- Obter condições instrumentais otimizadas para obtenção dos sinais analíticos;
Selecionar linhas de emissão de N de CN;
- Selecionar processamento espectral adequado;
- Selecionar padrão de calibração que atenda diferentes matrizes;
- Estabelecer um procedimento para calibração do método;
- Verificar a exatidão do método proposto.

4. Metodologia

4.1 Instrumentação

O instrumento LIBS utilizado para as análises, consiste em um sistema montado em laboratório, que é composto por um laser Nd:YAG Q-switched que emite pulsos em 1064 nm, com potência máxima de 50 mJ e duração de pulso de 20 ns; câmara de amostragem com amostrador móvel que permite o deslocamento da amostra nas direções x e y; uma mini câmera para monitoramento da análise em tempo real; quatro espectrômetros que permitem resolução óptica de 0,1 nm (FWHM) e que juntos cobrem a faixa espectral de 200-600 nm. O sistema está conectado a um computador que controla o tempo entre o disparo do pulso de laser e o início da aquisição dos sinais analíticos, o tempo de integração do sinal analítico e registra os espectros de emissão através do software OOILIBS (*Ocean Optics*).

Na Figura 4 é mostrada uma fotografia do sistema LIBS utilizado, na qual os principais componentes são representados por números (1 a 5).

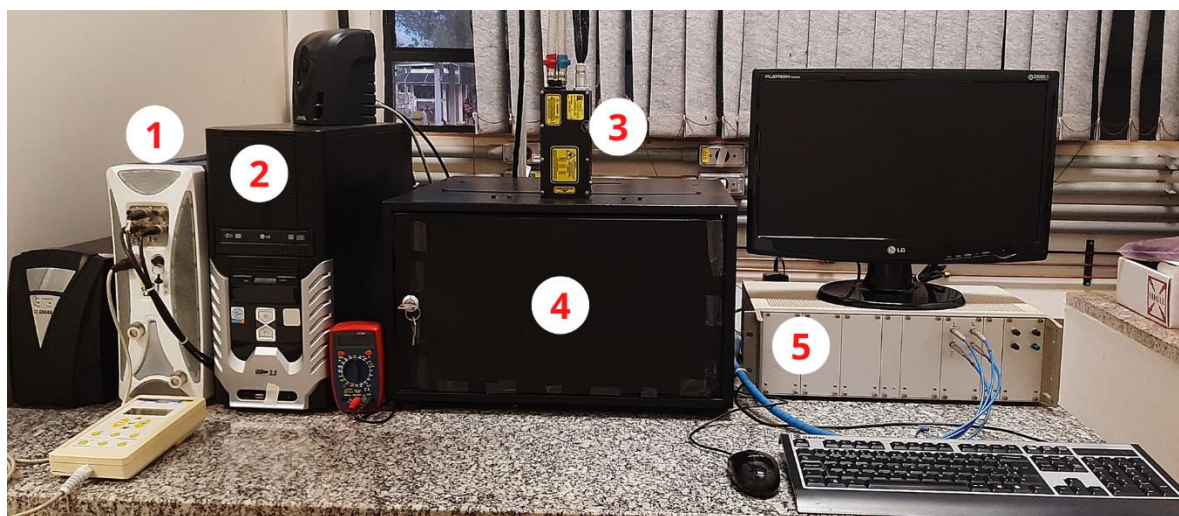


Figura 4: Instrumento LIBS utilizado na condução do trabalho: 1) Fonte do laser, 2) computador, 3) laser, 4) câmara de amostragem, 5) Espectrômetros.

Fonte: Autora

Para o aumento da sensibilidade analítica, foi acoplado ao sistema LIBS um gerador de descargas elétricas (SD), previamente proposto por Vieira e colaboradores (2018). O SD consiste em dois eletrodos de tungstênio (100 x 2,6 mm) com 4 mm de separação entre as pontas, circuito elétrico e um voltímetro para monitoramento das descargas. Na Figura 5 é mostrada uma imagem interna da câmara de amostragem do sistema LIBS, onde é possível visualizar os eletrodos do sistema SD (1)

posicionados sobre o amostrador (2), à uma distância milimétrica da superfície da amostra. Na imagem também é possível observar a lente responsável pela captura dos sinais de emissão (3), a mini câmera utilizada para monitoramento das análises em tempo real (4) e o dispositivo utilizado para inserir argônio na região analítica (5).

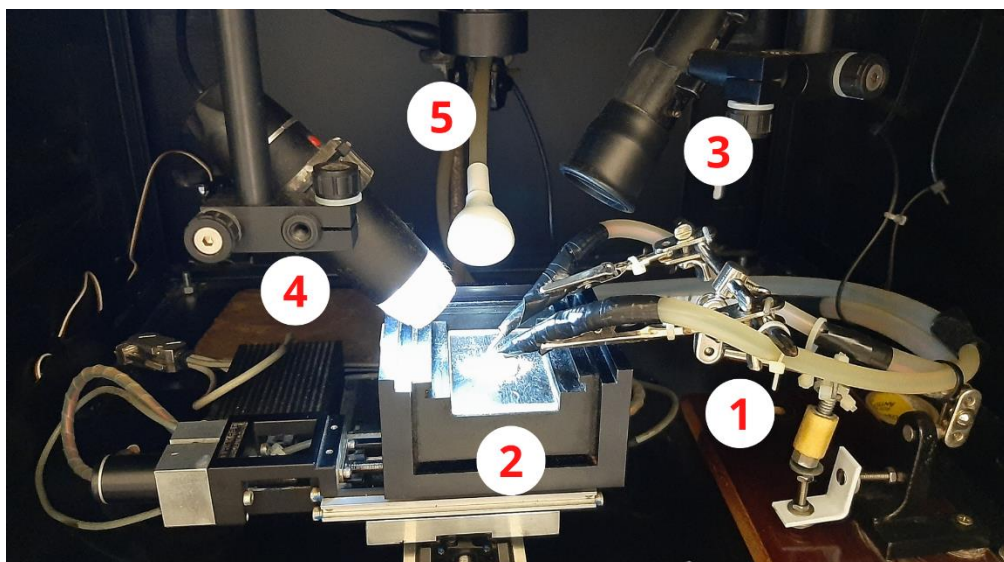


Figura 5: Vista interna da câmara de amostragem do equipamento LIBS 1) eletrodos de tungstênio, 2) porta amostras, 3) lente coletora de radiação, 4) câmera de monitoramento e 5) dispositivo carreador do fluxo de argônio.

Fonte: Autora

4.2 Amostras e padrões

A escolha das amostras para o desenvolvimento desse trabalho foi guiada por diferenças de matrizes e de espécies de N. Assim, amostras de farinha de aveia, farinha de trigo e leite em pó integral foram escolhidas por representarem matrizes distintas e conterem N na forma proteica (orgânica). As amostras supramencionadas foram obtidas no comércio local de Araraquara. Para avaliar a exatidão do método proposto, além das amostras comerciais também foram utilizados materiais de referência certificados (Certified Reference Materials – CRM): CRM 8435a- Leite em Pó e CRM 1577b- Fígado Bovino. Para contar com amostra contendo N na forma não proteica (inorgânica), foi selecionado um material de referência certificado BCR 178- Fertilizante, amoniacal e sem a presença de uréia em sua composição.

Com o objetivo de aumentar a precisão das medidas, as amostras comerciais foram homogeneizadas através de procedimento de trituação manual, empregando almofariz e pistilo de ágata. Em seguida todas as amostras foram convertidas em

pastilhas pela aplicação de 8 ton de pressão durante 2 minutos, utilizando uma prensa hidráulica da Solab SL-10/15 (Piracicaba-SP) e um molde de aço carbono, para posterior análise.

Para a padronização do método foi avaliado o uso de L-glutamina (Gln), aminoácido comercialmente disponível na forma de suplemento alimentar, *whey protein*, disponível comercialmente como suplemento proteico, e fosfato de amônio dibásico $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (J.T. Baker). Celulose microcristalina (Sigma-Aldrich) foi utilizada como agente diluidor para o preparo dos padrões de calibração.

4.3 Determinação de valores de referência

Para fins de avaliação da exatidão dos métodos propostos e avaliação da pureza dos reagentes Gln e *whey protein* a serem utilizados como padrão, todas as amostras e a Gln e *Whey* foram submetidos à análise do teor de N pelo método de Kjeldahl (método oficial AOAC), exceto a amostra de fertilizante BRC 178, cujo teor de N refere-se ao valor de referência certificado.

Para esse propósito 250 mg de cada amostra foram digeridas em sistema aberto no bloco digestor com aproximadamente 15 mL de H_2SO_4 e 2,5 g de mistura catalítica constituída por Na_2SO_4 , K_2SO_4 e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. As amostras e os padrões digeridos passaram pelo processo de destilação em um destilador Kjeldahl, em que NaOH concentrado e aquecido foi adicionado e o NH_3 liberado foi recolhido em solução de H_3BO_3 . A solução resultante do processo de destilação, foi titulada com H_2SO_4 padronizado. O procedimento foi conduzido em triplicata.

Os teores de N e proteína foram calculados usando as equações 1 e 2, citadas no Método de Ensaio para determinação de Nitrogênio Total em leite e derivados lácteos pelo método Micro-Kjeldahl, elaborado pelo Ministério da Agricultura (MAPA, 2013).

$$\%NT = \frac{V_{\text{ácido}} * N * 0,014 * 100}{m_{\text{amostra}}} \quad (1)$$

$$\%Pr = \%NT * F_c \quad (2)$$

Onde NT corresponde ao teor de N total, V o volume em mL da solução de H_2SO_4 utilizado na titulação, N a normalidade teórica da solução H_2SO_4 , m

corresponde a massa da amostra em gramas, e F_c o fator de conversão da relação N/proteína, de acordo com a natureza da amostra.

Na Tabela 1 podem ser visualizadas as especificações das amostras e CRMs utilizados, assim como os valores dos teores de N e proteína calculados.

Tabela 1: Amostras utilizadas para o desenvolvimento do trabalho

| Amostra | Identificação | F_c | Teor de N (%) | Teor de Proteína (%) |
|--------------------------|---------------|-------|--------------------|----------------------|
| Farinha de Aveia | FA | 5,83 | 2,26 ^a | 13,17 |
| Farinha de trigo | FT | 5,70 | 2,01 ^a | 11,46 |
| Leite em pó Integral | LP | 6,38 | 4,36 ^a | 27,82 |
| Whey Protein | WP | 6,38 | 13,79 ^a | 87,98 |
| L-Glutamina | Gln | 5,20 | 18,99 ^a | 98,75 |
| CRM 8435a- Leite em pó | CRM 8435 | 6,38 | 4,02 ^a | 25,64 |
| CRM 1577b- Fígado Bovino | CRM1577 | 6,25 | 9,65 ^a | 60,31 |
| BCR 178- Fertilizante | BCR178 | - | 26,1 ^b | - |

Fonte: elaborada pelo Autor (2022)

F_c : Fator de conversão da relação N/proteína.

a) Valores de N obtidos por Kjeldahl; b) valor de referência certificado.

4.4 Otimização das condições analíticas

A sensibilidade do sistema LIBS disponível foi avaliada para a detecção de sinais do analito. Para esse propósito, duas pastilhas preparadas com aproximadamente 300 mg de uma mistura de *whey protein* e de celulose (80:20) foi submetida à análise nos sistemas LIBS e SD-LIBS. As condições instrumentais fixadas para esse estudo foram: energia de pulso de 50 mJ, tempo entre o pulso do laser e início da aquisição dos sinais (t_d) de 1,0 μ s e tempo de integração dos sinais (t_i) de 1 ms, fluxo de argônio de 12 L.min⁻¹ (DIB et al., 2020). Nas avaliações feitas utilizando o dispositivo SD a voltagem fixada foi de 3,2kV.

Para cada condição avaliada (LIBS e SD-LIBS) foram disparados 20 pulsos de laser à cada pastilha, em regiões diferentes da superfície (para amostragem representativa), totalizando 40 espectros por condição, os quais foram posteriormente

utilizados para comporem médias. Foram avaliadas as intensidades das linhas de emissão N e bandas CN.

Para avaliar a influência do N atmosférico no sinal analítico, um estudo similar ao conduzido por Harris e colaboradores (2004) foi realizado. Para esse propósito uma amostra de alumínio metálico, em formato de laminar, foi utilizada para avaliar a presença de sinais espectrais correspondentes a N, na ausência e presença de um fluxo de argônio ($12 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$). Foram adquiridos 20 espectros, espalhando-se 20 pulsos de laser em regiões diferentes da superfície laminar da amostra, os quais foram posteriormente utilizados para compor uma média espectral. Para estes estudos, o sistema SD foi utilizado à uma voltagem fixa de 3,2kV e t_d foi fixado em 1,0 μs , com o intuito de avaliar as linhas de emissão do N.

Para todos os estudos de otimização analítica, linhas de emissão do N observadas nos espectros LIBS foram atribuídas de acordo com a base de dados NIST (*National Institute of Standards and Techonology*). Foram avaliadas linhas de emissão atômica (N I) e iônica (N II) dentro da faixa espectral de 200-600 nm. As bandas de CN foram avaliadas de acordo com as bandas estudas nos trabalhos de Mousavi e colaboradores (2016) e nos estudos de ZHAO e colaboradores (2020).

4.5 Determinação do teor de Nitrogênio

Para o desenvolvimento de um método quantitativo para determinação de N em diferentes matrizes foram avaliados diferentes padrões (a Gln , fosfato de amônio dibásico e o *whey protein*) e modelos de calibração (univariada e multivariada). Os padrões de calibração foram obtidos pela diluição dos reagentes nitrogenados em celulose microcristalina (Sigma-Aldrich). A massa final de cada padrão foi mantida constante e igual a 300mg. Os teores de N nos padrões de calibração preparados a partir da Gln foram 0,00% (somente celulose), 1,07%, 4,27%, 8,57% e 12,97%. Nos padrões preparados a partir do $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ os teores de N foram 0,00% (somente celulose), 1,09%, 5,10%, 15,33% e 21,20% ,e nos padrões de *whey protein* foram 0,00% (somente celulose), 1,21%, 2,32%, 4,13% e 5,24%.

Os padrões foram preparados em triplicata, sendo homogeneizados em almofariz e pistilo de ágata e posteriormente convertidos em pastilhas pela aplicação de 8 ton de pressão durante 2 minutos em prensa hidráulica. As pastilhas foram analisadas por LIBS, incidindo 20 pulsos de laser em diferentes locais das duas faces

planas das pastilhas. O sistema SD foi utilizado com voltagem fixa de 3,2kV e t_d e t_i foram 1,0 μ s e 1 ms, respectivamente. Também foi utilizado um fluxo de argônio de 12 L min^{-1} .

Para as atribuições das linhas de emissão de N nos espectros LIBS foi utilizada a base de dados NIST e a atribuição das bandas de CN foi feita com base nos trabalhos de Mousavi e colaboradores (2016), onde os autores exploram o comportamento de emissão das bandas CN provenientes de diversos compostos orgânicos na análise em LIBS, e nos estudos de ZHAO e colaboradores (2020), onde são descritos os mecanismos de formação dessas bandas em ambientes inertes com purga de argônio e N_2 .

4.5.1 Modelagem univariada para predição do teor de N

Para o desenvolvimento do método univariado, foram avaliados os sinais de emissão do analito (variáveis). Dessa forma, as seguintes estratégias foram adotadas: i) averiguação da existência de interferência espectral.; ii) seleção de linhas de emissão de N e bandas CN por meio da avaliação das correlações lineares entre as intensidades emitidas e o teor de N presente nos padrões, cujo coeficiente de Pearson (r) fosse maior ou igual a 0,8.; iii) exclusão de *outliers* utilizando o teste de *Grubbs*.

As correlações lineares foram obtidas através do programa Weka (*Waikato Environment for Knowledge Analysis*) versão 3.8.4, que é um software livre e dispõe uma coleção de algoritmos que realizam mineração de dados por meio de aprendizado de máquina (*machine learning*). Este programa possui ferramentas para a preparação de dados, regressão, agrupamento, classificação etc (FRANK; HALL; WITTEN, 2016). A predição do teor de N se deu por meio de calibração externa, e a curva analítica obtida foi avaliada estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA).

4.5.2 Modelagem Multivariada para predição do teor de N

Para o desenvolvimento do método multivariado, sinais de emissão do analito (variáveis) foram utilizados. Para a seleção foram considerados exclusivamente os espectros dos padrões analíticos visando, minimizar qualquer possibilidade de enviesamento do modelo. Dessa forma, as seguintes estratégias foram adotadas: i) averiguação da existência de interferência espectral.; ii) exclusão de *outliers* utilizando

o teste de *Grubbs*. iii) seleção de linhas de emissão de N e bandas CN por meio de correlações lineares com coeficiente maior ou igual a 0,8. As correlações lineares entre as intensidades das linhas e bandas previamente selecionadas e as concentrações foram feitas utilizando o software Weka.

O software Weka também foi utilizado em um segundo processo de seleção de variáveis e para gerar o modelo de calibração multivariado.

Para esse propósito, o método M5 foi empregado tanto para encontrar um subconjunto de variáveis relevantes a partir de variáveis originais, como para ajustar o modelo de calibração (BORGES; NIEVOLA, 2012). O M5 é uma aplicação no algoritmo para execução de seleção de variáveis. Este, cria um subconjunto de variáveis que são avaliados e por fim comparados com um melhor subconjunto anterior (FRANK; HALL; WITTEN, 2017). O processo de aprendizagem termina quando nenhuma melhoria no subconjunto é observada (BORGES; NIEVOLA, 2012).

4.5.3 Exatidão dos métodos

A exatidão da predição do teor de N nas diferentes amostras, pelos modelos desenvolvidos, foi verificada por meio da comparação estatística com os teores determinados pelo método de Kjeldahl, aplicando-se o teste t pareado.

5. Resultados e discussões

5.1 Otimização das condições analíticas

Antes de iniciar estudos para calibração/modelagem julgou-se necessário estudar as condições analíticas para obtenção de maior sensibilidade e para minimização das contribuições provenientes da análise de N do ar atmosférico.

Inicialmente foi abordado o parâmetro sensibilidade e para esse propósito, o comportamento de diferentes linhas de emissão de N foi avaliado na presença ou ausência do dispositivo SD. Os espectros mostrados na Figura 6 correspondem aos espectros médios (n=40) adquiridos a partir da análise de pastilhas de *whey protein*, utilizando o sistema LIBS e o SD-LIBS.

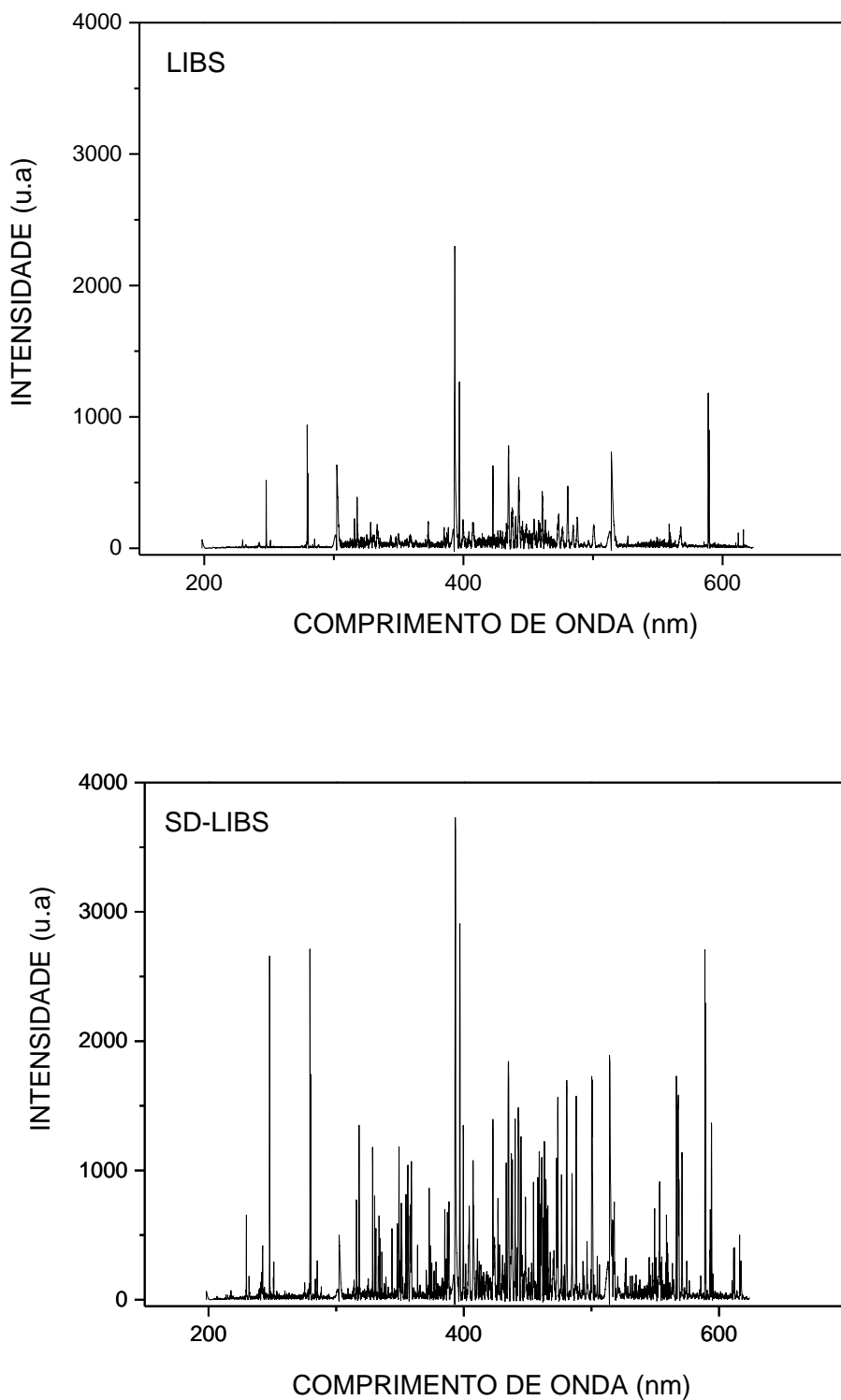
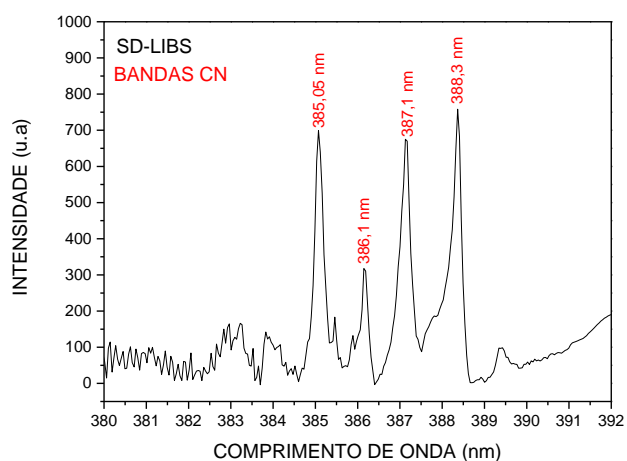
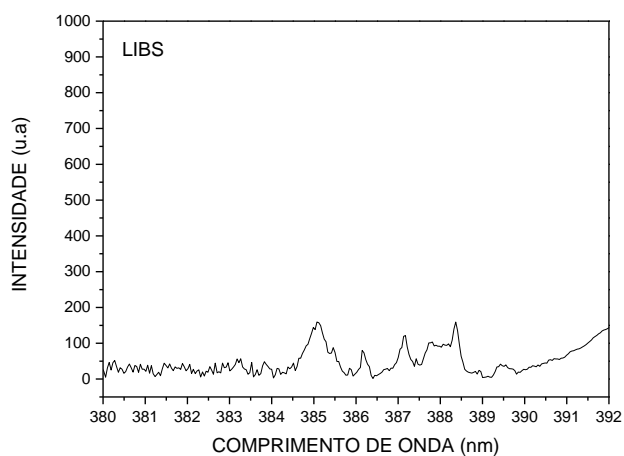
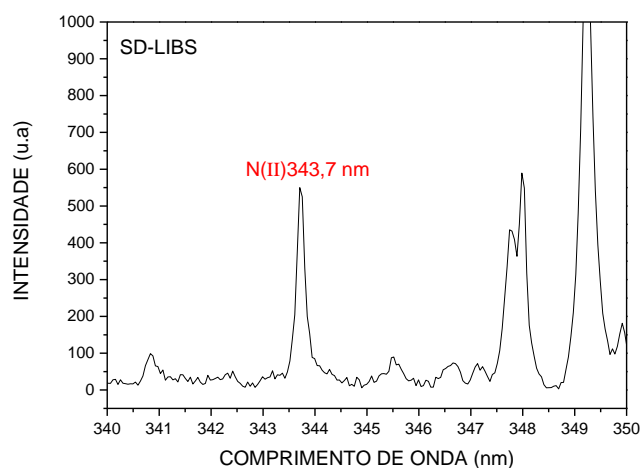
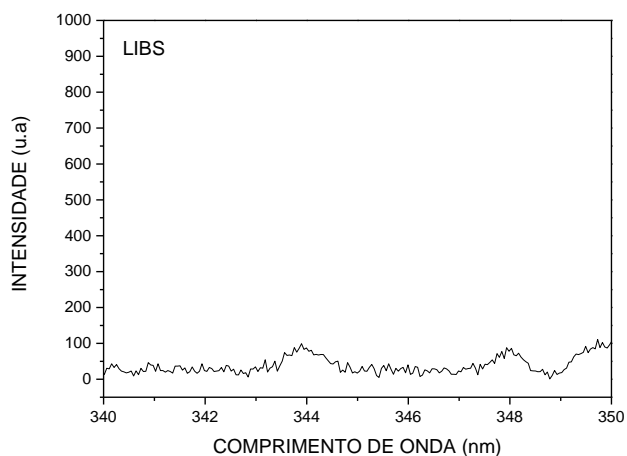


Figura 6: Espectros médios adquiridos por LIBS e SD-LIBS

A figura 6 mostra que o uso do SD aumenta a sensibilidade da técnica LIBS. No espectro obtido para a SD-LIBS é possível observar o aumento da intensidade das

linhas de emissão elementar, quando comparado ao espectro obtido utilizando a técnica LIBS.

Na Figura 7 podem ser observadas ampliações de regiões espectrais onde foram identificadas linhas de N e bandas de moléculas diatômicas de CN em espectros adquiridos utilizando SD-LIBS.



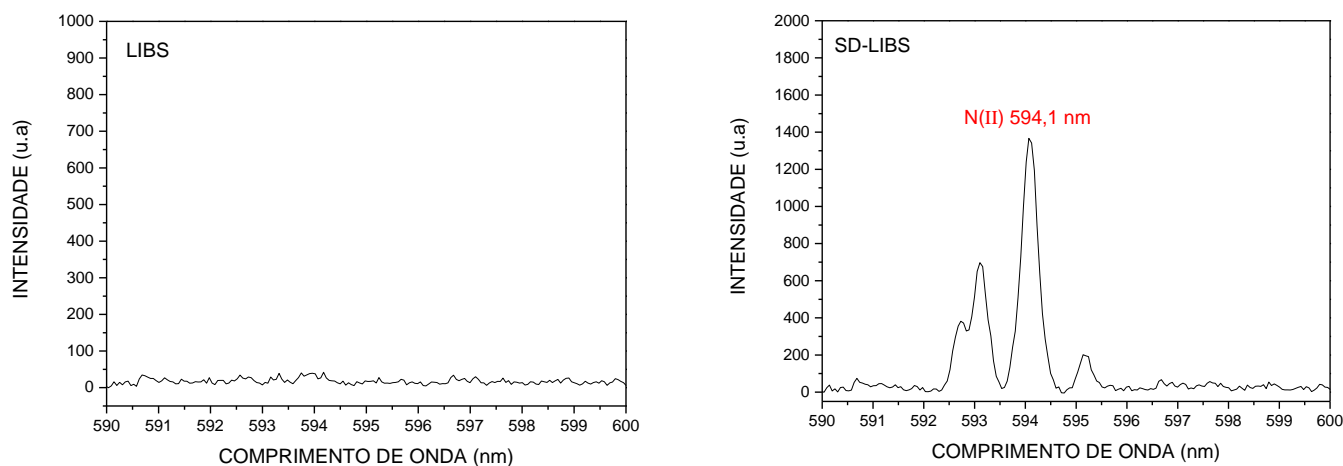


Figura 7: Ampliação de regiões dos espectros LIBS e SD-LIBS onde foram identificados sinais analíticos correspondentes a emissões de diferentes espécies de N.

Fonte: Autora

O aparecimento de linhas de emissão de N iônico pode ser justificada pelo aquecimento do plasma ao receber a descarga elétrica do sistema SD acoplado ao LIBS, aumentando a densidade eletrônica (GAUTIER et al., 2004). O incremento energético contribui nos processos de colisão entre as partículas, promovendo maior excitação das espécies (íons, átomos etc.) presentes no plasma. Considerando os resultados obtidos, o uso do dispositivo SD foi adotado para o prosseguimento dos estudos.

Após estabelecer o parâmetro instrumental que permitiu a aquisição dos sinais com adequada sensibilidade, a minimização da contribuição analítica do N atmosférico foi avaliada. Para esse estudo foi selecionada uma amostra de alumínio em formato laminar. Uma vez que a amostra não contém espécies nitrogenadas, os sinais de N observados nos espectros SD-LIBS são decorrentes da excitação do N atmosférico, os quais devem ser minimizados. Então, espectros SD-LIBS da lâmina foram capturados sob condições atmosféricas e sob fluxo de argônio de 12 L min^{-1} . Nos gráficos de barras mostrados na Figura 8 as intensidade médias das linhas iônicas de N ($n=40$) em 343,7 e 594,1 nm foram obtidas sob as diferentes condições experimentais (com e sem argônio).

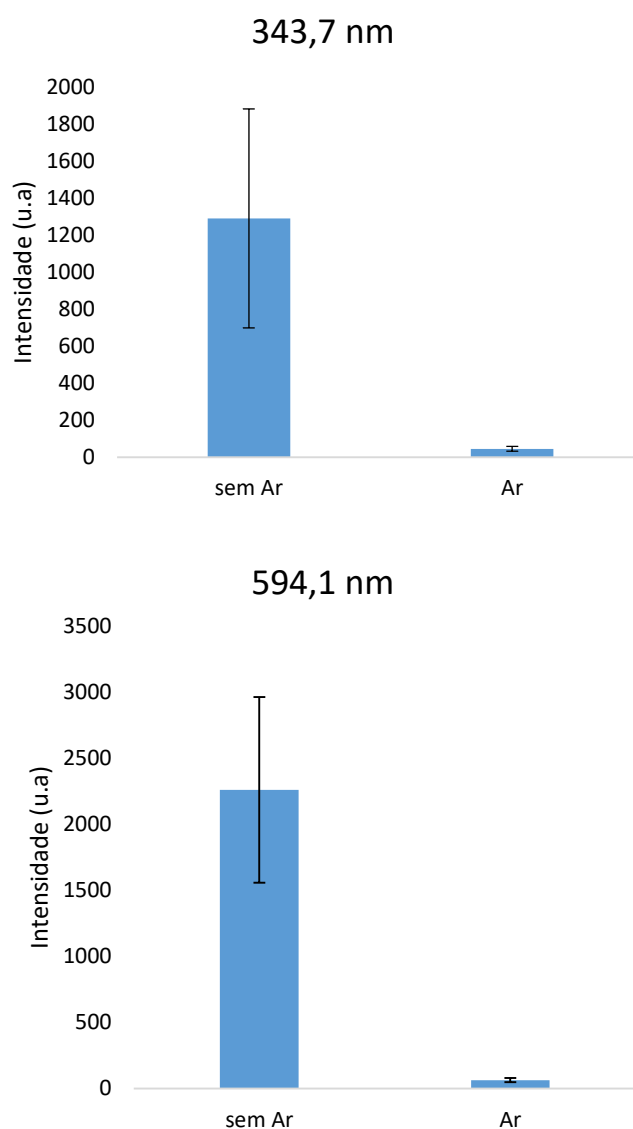


Figura 8: Intensidades das linhas de emissão de N (II) 343,7 e 594,1 nm registradas em espectros SD-LIBS de uma amostra de alumínio metálico.

Fonte: Autora

Os resultados mostram que o fluxo de argônio nas imediações da região analítica, sobre a superfície da amostra, minimiza a contribuição do N atmosférico, corroborando com as observações de Harris et al. (2004). O uso de argônio é vantajoso, pois além de reduzir interferência do N atmosférico, auxilia na remoção de material particulado que permanece suspenso no ar após cada análise e contribui para o aumento dos sinais analíticos, em decorrência do aumento das densidades iônica e eletrônica do plasma, proporcionada pela ionização do argônio (ZHAO et al., 2020). Portanto, para a continuidade dos estudos adotou-se o fluxo de argônio de $12 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ como condição analítica.

5.2 Avaliação de modelagem univariada para predição do teor de N

Tendo selecionado os parâmetros instrumentais adequados para aquisição espectral, um estudo baseado em modelagem univariada foi conduzido avaliando como padrão para calibração o WP, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e a Gln.

Os espectros obtidos após a análise por SD-LIBS dos padrões de calibração e das amostras (FA, FT, LP, BCR178, CRM8435 e CRM1577) foram pré-processados para correção de linha base e exclusão dos espectros anômalos. Para selecionar as melhores linhas de emissão de N e bandas CN, a correlação linear entre as intensidades dos sinais e o teor de N em cada padrão, foi avaliada. Modelos de calibração univariados foram ajustados individualmente para cada padrão estudado, considerando apenas as linhas e bandas que apresentaram coeficiente de correlação linear (r) superiores a 0,8 e a validade estatística dos modelos foi verificada por meio de análise de variância (ANOVA).

Na tabelas 2 são mostrados os parâmetros dos modelos lineares e o valor de F calculado para avaliação do modelo utilizando o WP como padrão.

Tabela 2: Coeficiente de correlação de Pearson (r) e valor de F calculado para a curva de calibração obtida com WP.

| Linha de Emissão | r | Valor- F | |
|------------------|------|----------|---|
| N (II) 343,7 | 0,82 | 9,86 | |
| N (II) 594,1 | 0,81 | 1,21 | Teste-F aplicado a 95% de confiança. F tabelado igual a 10,1. |
| CN 385,0 | 0,87 | 1,91 | |
| CN 386,1 | 0,80 | 3,74 | |
| CN 387,1 | 0,87 | 5,85 | |
| CN 388,3 | 0,89 | 6,71 | |

Os resultados apresentados na tabela 2 mostram que as curvas analíticas obtidas utilizando o WP, como padrão para diferentes linhas de N e bandas de CN, apesar de apresentarem fortes correlações lineares ($r > 0,8$) não geraram modelos de calibração estatisticamente significativos ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$). Dessa forma, o uso do WP como padrão de calibração foi descartado.

Tabela 3: Coeficiente de correlação de Pearson (r) e valor de F calculado para a curva de calibração obtida com $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

| Linha de Emissão | r | Valor- F | |
|------------------|-------|----------|---|
| N (II) 343,7 | 0,80 | 1,86 | |
| N (II) 594,1 | 0,94 | 39,46 | Teste-F aplicado a 95% de confiança. F tabelado igual a 10,1. |
| CN 385,0 | -0,93 | 0,20 | |
| CN 386,1 | -0,96 | 48,00 | |
| CN 387,1 | -0,84 | 48,00 | |
| CN 388,3 | -0,96 | 54,36 | |

Os resultados obtidos para o $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (tabela 3) mostraram que entre as duas linhas de N avaliadas, somente a linha de N (II) em 594,1 nm gerou um modelo linear estatisticamente significativo ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$), com coeficiente de correlação linear $r > 0,9$. A curva de calibração obtida para a linha 594,1nm pode ser visualizada na Figura 9.

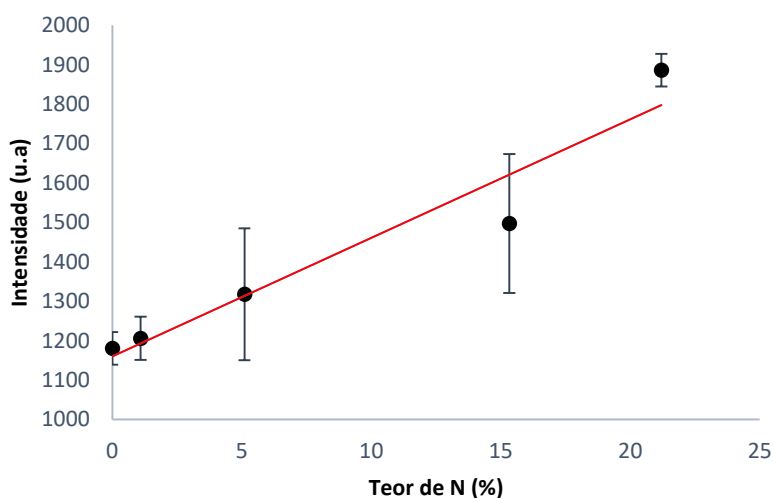


Figura 9: Curva de calibração externa univariada com padrão $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Para validar o modelo linear de predição, baseado em emissões da linha 594,1 nm dos padrões de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, o mesmo foi testado para a predição das diferentes amostras. Os resultados mostraram que somente foi possível alcançar a exatidão para a amostra de fertilizante (tabela 4), a qual foi analisada após diluição com celulose na proporção 1:1.

Tabela 4: %N determinado por SD-LIBS para a amostra de fertilizante.

| Amostra | Teor de N (%) | | | |
|---------|---------------------------|---------------------------|--------------|------------------------|
| | Valor Certificado | SD-LIBS | t- Calculado | t-Tabelado |
| BCR178 | 26,10 ± 0,01 ^a | 25,90 ± 3,07 ^a | 0,15 | 4,30 α= 0,05 n=3 |

a) %N ± desvio padrão

A maioria das bandas de CN, apesar de gerarem modelos de calibração estatisticamente significativos ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$) e altos coeficientes de correlação linear ($r > 0,8$), apresentaram correlações negativas, ou seja, a medida que se aumenta a quantidade de N nos padrões, por meio do aumento da quantidade de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, detectam-se sinais de intensidades menores para as bandas de CN, como pode ser visualizado nas curvas analíticas apresentadas na Figura 10. De acordo com Mousavi e colaboradores (2016), a formação da molécula de CN, por processos recombinativos no plasma depende das quantidades de carbono e N disponíveis. Por se tratar de um padrão inorgânico contendo somente N, não há possibilidade do CN ser nativo, e portanto, o aparecimento de sinais de emissão de CN são devidos a ocorrência de processos recombinativos no plasma. Nesse caso, o carbono disponível só pode ser proveniente da celulose, utilizada na diluição dos padrões sólidos. Assim, a medida que se aumenta a quantidade de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, para obter padrões mais concentrados em N, diminui-se a quantidade de celulose adicionada e, portanto, a quantidade de CN formada é menor, pois fica limitada a quantidade de C presente. Dessa forma, a única linha que poderá ser utilizada para calibrações com esse padrão é a linha de emissão iônica de N a 594,1nm.

Esses resultados sugerem que métodos padronizados com N proveniente de composto inorgânico, somente respondem à amostras que contenham o elemento na mesma espécie. Nesse caso, o efeito de matriz impossibilitou utilizar um padrão inorgânico, para previsão do conteúdo de N orgânico/proteico nas demais amostras selecionadas para esse estudo.

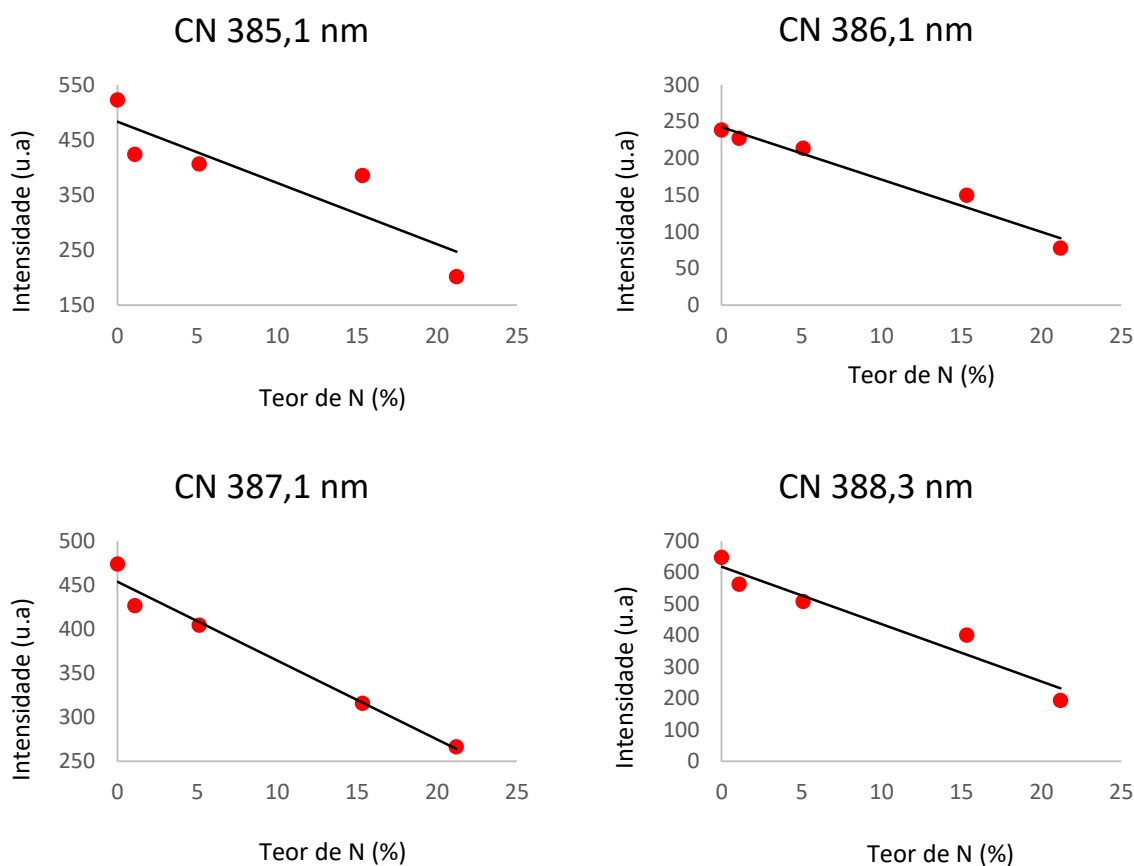


Figura 10: Curva de calibração externa univariada com padrão $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ para as bandas de CN 385,1; 386,1; 387,1 e 388,3 nm.

Os modelos lineares gerados pelo uso do padrão Gln (tabela 5), foram estatisticamente significativos ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$), exceto para a linha N (II) em 343,7 nm, a qual não produziu modelos significativos para nenhum dos padrões avaliados, sugerindo não ser uma boa linha para as determinações. Comparado aos demais padrões estudados a Gln gerou modelos de calibração com os maiores coeficientes de correlação linear ($r > 0,9$). É interessante notar que apesar do N estar presente no WP na forma proteica, esse padrão não apresentou resultados tão bons quanto a Gln, que comporta N em unidades menores (aminoácidos).

Tabela 5: Coeficiente de correlação de Pearson (r) e valor de F calculado para a curva de calibração obtida com Gln.

| Linha de Emissão | r | Valor- F | |
|------------------|------|----------|---|
| N (II) 343,7 | 0,86 | 8,36 | |
| N (II) 594,1 | 0,94 | 16,37 | Teste-F aplicado a 95% de confiança. F tabelado igual a 10,1. |
| CN 385,0 | 0,90 | 13,88 | |
| CN 386,1 | 0,98 | 23,73 | |
| CN 387,1 | 0,96 | 26,76 | |
| CN 388,3 | 0,94 | 140,05 | |

Dessa forma, todos os modelos estatisticamente significativos foram aplicados para predição do teor de N, no conjunto das amostras estudadas. Os resultados da validação dos modelos podem ser visualizados na tabela 6.

Tabela 6: Comparação entre os teores de N (%) preditos pelos modelos lineares univariados utilizando Gln como padrão analítico.

| Amostra | Teor de N (%) ^a | | | | | |
|---------|----------------------------|-------------------------|-----------|------------|------------|------------|
| | %N | SD-LIBS | | | | |
| | Referência | N(II) 594,1 | CN 385,0 | CN 386,1 | CN 387,1 | CN 388,3 |
| FA | 2,26 | 4,53± 2,63 ^b | 1,35±0,21 | 4,72±0,22 | 0,31±0,18 | 2,38±0,21 |
| FT | 2,01 | 8,34± 0,93 | 4,91±1,07 | 1,29±0,82 | 3,98±0,70 | 4,36±0,70 |
| LP | 4,36 | 1,05± 2,24 | 4,53±0,87 | 13,44±0,46 | 9,18±0,55 | 9,06±1,34 |
| CRM8435 | 4,02 | 8,08± 0,19 | 2,71±1,38 | 0,97±0,59 | 2,88±1,53 | 6,06±2,60 |
| CRM1577 | 9,65 | 1,08± 0,28 | 6,99±0,83 | 22,09±1,11 | 16,45±0,78 | 24,57±1,20 |
| BCR178 | 26,1 | 18,5±0,46 | ND | ND | ND | ND |

a) Valor médio (n=3); b) %N ± desvio padrão; ND= não detectado.

Os resultados mostram que embora a exatidão não tenha sido alcançada nos modelos individuais e não tenha sido possível encontrar um modelo geral com erros de predição sistematicamente menores para todas as amostras, os modelos individuais baseados nas diferentes bandas de CN proporcionaram predições com os menores erros para as diferentes amostras. Assim, o teor de N na amostra FA foi melhor predito pelo modelo ajustado com os sinais da banda de CN a 388,3 nm; na

amostra FT o modelo ajustado com os sinais da banda de CN a 386,1 nm; na amostra LP, o modelo ajustado com os sinais da banda a 385,0 nm; na amostra certificada (CRM8435) os modelos ajustados com os sinais das bandas 385,0 e 387,1 nm e por fim, na amostra CRM1577, o modelo ajustado com a banda a 385,0 nm. Esses resultados sugerem que quando o objetivo é determinar o teor de N proveniente de compostos orgânicos os sinais das bandas de CN são os que mais minimizam o efeito de matriz.

Conforme os resultados sugestivos apresentados na tabela 4 , de que o teor de N orgânico não pode ser predito pelo uso de padrões contendo N inorgânico, os resultados utilizando Gln sugerem que o recíproco é verdadeiro, ou seja, não houve sucesso na determinação de N inorgânico na amostra de BCR178 utilizando um padrão orgânico. Esses resultados reforçam que o efeito de matriz é muito intensificado quando se trata de espécies químicas diferentes de N. Dessa forma, considerando a ideia de obter um modelo de predição geral, aplicável a predição de N orgânico nas amostras selecionadas, decidiu-se por avaliar modelos multivariados que pudessem contar com a contribuição simultânea das linhas e bandas estudadas individualmente.

5.3 Modelagem Multivariada para predição do teor de N

A regressão linear simples (RLS) comumente utilizada como modelo de predição nas tradicionais curvas analíticas (e previamente avaliada neste trabalho) pressupõe uma relação direta entre causa e efeito, ou seja, a variação do sinal analítico mensurado é causada pela variação da concentração do analito na amostra. Embora uma relação direta entre os sinais de emissão e a concentração de um analito seja teoricamente prevista para as técnicas de emissão óptica (SKOOG,2013), o acentuado efeito de matriz que acomete as análises por LIBS, normalmente deteriora essa relação. Neste caso, uma única variável medida instrumentalmente perde o potencial de explicar tudo sobre a variável resposta (concentração do analito). Então, a contribuição de mais de uma variável pode ser uma solução para minimizar o efeito de matriz. Como a técnica LIBS permite a aquisição simultânea de diversos sinais do analito, não há inconvenientes em se utilizar mais de um sinal para as predições desejadas. Dessa forma, o modelo de regressão linear múltipla (RLM) foi avaliado para as predições do teor de N em diferentes amostras.

Devido ao melhor potencial para predição do teor de N demonstrado nos métodos univariados, somente o padrão de Gln foi selecionado para os estudos envolvendo a RLM. Também com base nos estudos de calibração univariada, foram pré-selecionadas como variáveis de entrada as intensidades de emissão nos comprimentos de onda de N (II) 343,7nm e 594,1 nm e, bandas de CN 385,1; 386,1; 387,1 e 388,3 nm foram escolhidas para compor o banco de dados.

Com o objetivo de reduzir o número de variáveis utilizadas para o ajuste da RLM, o método de seleção de variáveis M5 foi utilizado para selecionar, a partir do conjunto de variáveis de entrada apenas as que fossem realmente relevantes para as predições dos teores de N. Por meio do M5 foram selecionados os sinais de emissão de N(II) 594,1nm e das bandas de CN à 385,1; 386,1 e 387,1 nm.

A partir das variáveis selecionadas, o modelo de calibração foi ajustado considerando cada réplica dos padrões individualmente (15 instâncias, referentes as triplicatas dos 5 padrões de calibração). O modelo apresentou coeficiente de correlação linear de 0,98 e erro médio absoluto com relação aos resíduos de 0,65% de N. A descrição matemática do modelo ajustado encontra-se descrita na equação 3.

$$\%N = 0,0348 * I_{385,1} + 0,0979 * I_{386,1} - 0,037 * I_{387,1} + 0,0083 * I_{594,1} - 18,7469 \quad (3)$$

Os resultados da modelagem mostram que apesar do método M5 descartar três variáveis referentes à bandas moleculares de CN, três outras foram mantidas, o que ressalta a importância desses sinais moleculares para as predições almejadas. O método também selecionou a linha de emissão de nitrogênio iônico a 594,1 nm, sugerindo que apesar de sua menor contribuição para as predições (intensidade de sinal aparece multiplicada pelo fator de 0,0083), comparada com as das bandas de CN a 385,1nm (0,0348), 386,1 nm (0,0979) e 387,1 nm (0,037), ela é uma variável importante para obtenção de exatidão nas predições.

O modelo de calibração obtido, foi então submetido ao processo de validação, aplicando-o para a predição dos teores de N nas diferentes amostras. Na Figura 11 encontram-se sintetizados em forma gráfica os resultados de validação do modelo proposto e na tabela 7 os resultados numéricos dos teores de N determinados para cada amostra e as respectivas comparações com os valores de referência, por meio da aplicação do teste t pareado ao nível de confiança de 99%.

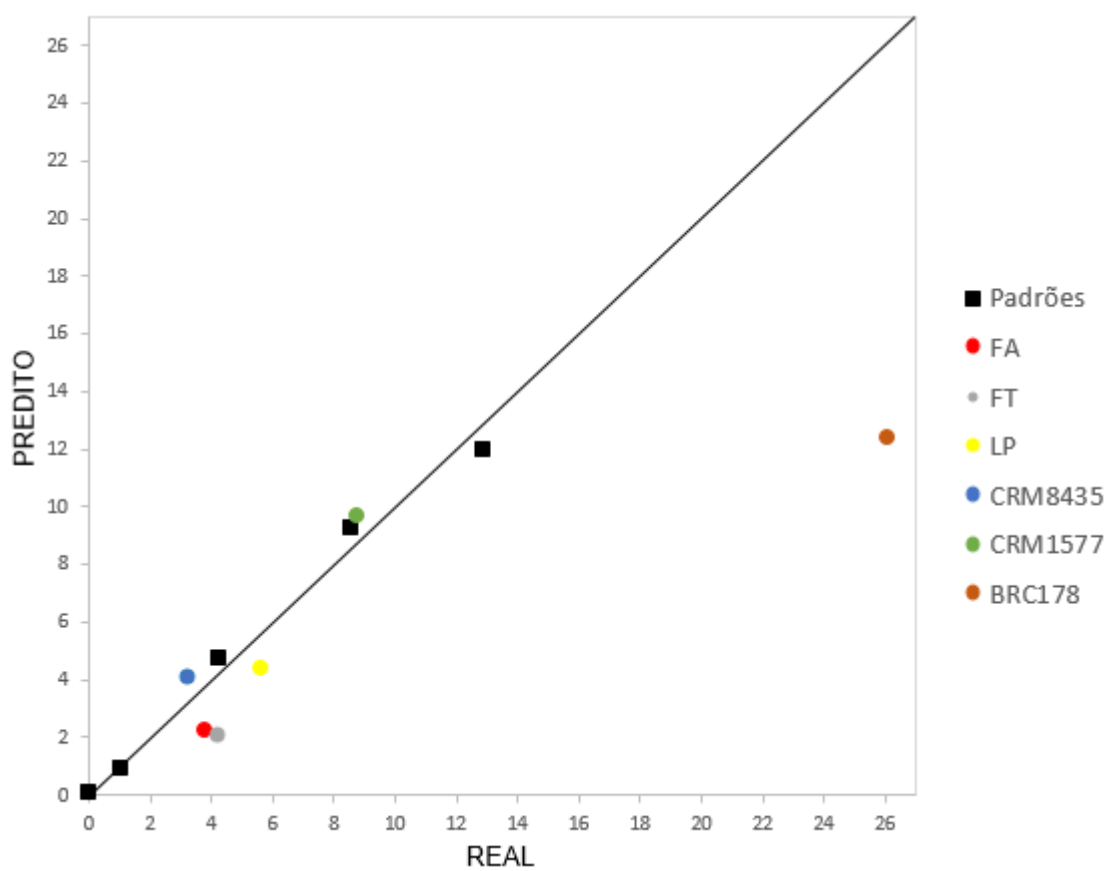


Figura 11: Teores médio de N preditos pelo modelo de RLM ajustado versus teores médios esperados.

Tabela 7: %N determinado por SD-LIBS e o método de referência Kjeldahl n=3 em ambos os métodos)

| Teor de N (%) | | | | |
|----------------------|--------------------------|----------------|---------------------|-------------------|
| Amostra | Método | | t- Calculado | t-Tabelado |
| | Kjeldahl | SD-LIBS | | |
| FA | 2,26 ± 0,04 ^a | 3,78 ± 1,59 | 2,46 | |
| FT | 2,01 ± 0,13 | 4,23 ± 0,78 | 7,31 | |
| LP | 4,36 ± 0,33 | 5,61 ± 1,09 | 2,98 | |
| CRM8435 | 4,02 ± 0,06 | 3,27 ± 0,24 | 7,96 | 9,92 |
| CRM1577 | 9,65 ± 0,04 | 8,77 ± 1,32 | 1,72 | α= 0,01 n=3 |
| | Valor Certificado | | | |
| BCR178 | 26,1 ± 0,01 | 12,36 ± 0,05 | 249,90 | |

a) %N ± desvio padrão

Os resultados mostram que foi possível determinar o teor de N orgânico com exatidão em diferentes matrizes usando o padrão de Gln e um modelo de calibração ajustado por RLM, o qual leva em conta majoritariamente bandas de emissão moleculares de CN. Apesar da exatidão não ter sido alcançada para a determinação de N inorgânico presente na amostra de fertilizante, os severos efeitos de matriz referentes às distintas composições das demais amostras estudadas pôde ser minimizado utilizando o aminoácido glutamina. Esse aminoácido contém ligações peptídicas C-N, o que sugere sua maior compatibilidade com o N orgânico/proteico presente nas diferentes amostras escolhidas para esse estudo. Contudo, além da maior compatibilidade química, os resultados mostraram que foi necessário contar com a contribuição de diferentes sinais analíticos para alcançar a exatidão.

6. Conclusão

O desempenho da técnica LIBS para determinação de N em diferentes matrizes foi avaliado. As condições analíticas operacionais foram sistematicamente estudadas e otimizadas para obtenção de sinais confiáveis, com alta sensibilidade e eliminação da contribuição do N presente no ar atmosférico.

Os resultados mostraram que a exatidão de predição por modelos lineares, os quais consideram uma relação de proporcionalidade direta entre um único sinal de emissão, não pôde ser alcançada devido aos severos efeitos de matriz que acometem as análises por LIBS. Para minimizar o efeito de matriz e alcançar a exatidão, a seleção de padrão que contenha espécie de N compatível com a espécie presente nas amostras foi fundamental.

No contexto das amostras selecionadas para esse estudo foi possível obter um método exato para determinação de N amoniacal em amostra de fertilizante utilizando um padrão contendo N inorgânico ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$). Além disso, para esse método o uso de um único sinal analítico (N (II) 594,1 nm) foi suficiente para ajustar um modelo de calibração, sugerindo que os efeitos de matriz são menos drásticos para amostras menos complexas, contendo o analito na forma inorgânica. Ressalta-se que para melhor avaliar esse modelo, outras amostras contendo N inorgânico precisam ser analisadas.

Para as matrizes mais complexas, as quais contêm o analito na forma orgânica/proteica, além da escolha do padrão adequado foi necessário contar com a contribuição de diferentes sinais espectrais para que a concentração fosse predita com exatidão. Nesse contexto, as bandas de emissão moleculares de CN contribuíram efetivamente para o bom desempenho do modelo de predição. Entre os padrões contendo N orgânico, o aminoácido glutamina foi o que mostrou maior efetividade para minimizar o efeito de matriz.

Os resultados desse estudo permitiram aprofundar o conhecimento sobre o desempenho da técnica LIBS para determinação de N em diferentes matrizes e também propor dois métodos simples, rápidos e limpos para a determinação de N orgânico e inorgânico em diferentes matrizes.

7. Referências Bibliográficas

ALREBDI, T. A. et al. Vibrational Emission Study of the CN and C 2 in Nylon and ZnO / Nylon Polymer Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS). 2022.

AUGUSTO, A. S.; CASTRO, J. P.; SPERANÇA, A. Combination of Multi-Energy Calibration (MEC) and Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) for Dietary Supplements Analysis and Determination of Ca, Mg and K. v. 30, n. 4, p. 804–812, 2019.

BERNATSKYI, A.; KHASKIN, V. The history of the creation of lasers and analysis of the impact of their application in the material processing on the development of certain industries. v. 11, n. 1, p. 125–149, 2021.

BORGES, H. B.; NIEVOLA, J. C. Comparing the dimensionality reduction methods in gene expression databases. *Expert Systems with Applications*, vol. 39, p. 10780–10795, 2012

CASTRO, J. P.; BABOS, D. V.; PEREIRA-FILHO, E. R. Calibration strategies for the direct determination of rare earth elements in hard disk magnets using laser-induced breakdown spectroscopy. *Talanta*, v. 208, n. October 2019, p. 120443, 2020.

COSTA, A. C. S. DA et al. Perdas de nitrogênio por volatilização da amônia em três solos argilosos tratados com uréia. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 26, n. 4, 2004.

COSTA, V. et al. LASER INDUCED-BREAKDOWN SPECTROSCOPY (LIBS): HISTÓRICO, FUNDAMENTOS, APLICAÇÕES E POTENCIALIDADES. *Química Nova*, v. 42, n. 5, p. 527–545, 2019.

CREMERS, David A.; RADZIEMSKI, Leon J. *Handbook of laser-induced breakdown spectroscopy*. John Wiley & Sons, 2013.

DE MORAIS, Carla Pereira et al. Calcium determination in biochar-based fertilizers by laser-induced breakdown spectroscopy using sodium as internal standard. *Microchemical Journal*, v. 134, p. 370-373, 2017.

DIB, Samia R. et al. CN diatomic emission for N determination by LIBS. *Microchemical Journal*, v. 157, p. 105107, 2020.

FRANK, Eibe; HALL, Mark A.; WITTEN, Ian H. *The WEKA workbench*. Morgan Kaufmann, 2016.

GAUTIER, C. et al. Study of the double-pulse setup with an orthogonal beam geometry for laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, v. 59, n. 7, p. 975–986, 2004.

GU, Weilun et al. A data preprocessing method based on matrix matching for coal analysis by laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 180, p. 106212, 2021.

HAHN, D. W.; OMENETTO, N. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), Part II : Review of Instrumental and Methodological Approaches to Material Analysis and Applications to Different Fields. *Applied Spectroscopy*, n. 66, p. 347–419, 2012.

HARRIS, R. D. et al. Determination of nitrogen in sand using laser-induced breakdown spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, v. 58, n. 7, p. 770–775, 2004.

ILYIN, A. A. The impossibility of recording emission lines of nitrogen ions in filament plasma. *Technical Physics Letters*, v. 42, n. 10, p. 1024-1026, 2016.

JANTZI, S. C. et al. Sample treatment and preparation for laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, v. 115, p. 52– 63, 2016.

KLEPPNER, D. Rereading Einstein. v. 30, n. 2005, 2015.

SÁNCHEZ-ESTEVA, Sara et al. Total phosphorus determination in soils using laser-induced breakdown spectroscopy: evaluating different sources of matrix effects. *Applied Spectroscopy*, v. 75, n. 1, p. 22-33, 2021.

LI, Y. et al. A review of laser-induced breakdown spectroscopy signal enhancement. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 53, n. 1, p. 1–35, 2018.

LU, Cuiping et al. Analysis of total nitrogen and total phosphorus in soil using laser-induced breakdown spectroscopy. *Chinese Optics Letters*, v. 11, n. 5, p. 053004, 2013.

MAPA. Determinação de Nitrogênio Total em Leite e derivados Lácteos pelo método de Micro-Kjedahl, 2013. Disponível em: Acesso em: 05 out. 2021.

MIZIOLEK, A. W.; PALLESCI, V.; SCHECHTER, I. LASER- INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY (LIBS). Cambridge: Cambridge University Press, 2006.

MOUSAVI, S. J. et al. CN and C 2 vibrational spectra analysis in molecular LIBS of organic materials. *Applied Physics B*, n. May, 2016.

NARDO, A. E. et al. Avaliação de métodos químicos para determinação de nitrogênio em amostras de grãos de soja. In: Embrapa Soja-Resumo em anais de congresso (ALICE). In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, 7., 2012, Londrina. Resumos expandidos. Londrina: Embrapa Soja, 2012. p. 11-18.(Embrapa Soja. Documentos, 333). Editado por Paula Gerón Saiz de Mello., 2012.

NIST Atomic Spectra Database Line. Disponível em: < https://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines_form.html > Acesso em: 04 out.2022

NIST LIBS Database. Disponível em: < <https://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/LIBS/lib-form.html> > Acesso em: 04 out.2022

NOGUEIRA, A. R. DE A. . et al. Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos. São Carlos: EMBRAPA, 2015.

OECD. *Food and Agriculture Organization. Agricultural Outlook 2022-2031*. 2022.

SÁEZ-PLAZA, Purificación et al. An overview of the Kjeldahl method of nitrogen determination. Part I. Early history, chemistry of the procedure, and titrimetric finish. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 43, n. 4, p. 178-223, 2013.

SÁNCHEZ-ESTEVA, Sara et al. Total phosphorus determination in soils using laser-induced breakdown spectroscopy: evaluating different sources of matrix effects. ***Applied Spectroscopy***, v. 75, n. 1, p. 22-33, 2021.

SKOOG, Douglas A. et al. ***Fundamentals of analytical chemistry***. Cengage learning, 2013.

VADILLO, M.; PUROHIT, P.; LASERNA, J. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS): Fast , Effective , and Agile Leading Edge Analytical Technology. v. 72, p. 35–50, 2018.

VIEIRA, A. L. et al. Determinations of phosphorus in fertilizers by spark dischargeassisted laser-induced breakdown spectroscopy. *Microchemical Journal*, v. 139, p. 322–326, 2018.

ZHAO, Y. L. et al. CN and C 2 formation mechanisms in fs-laser induced breakdown of nitromethane in Ar or N 2 atmosphere. v. 393, n. October 2019, 2020.

Zhou, W.; Li, K.; et al. Effect of voltage and capacitance in nanosecond pulse discharge enhanced laser-induced breakdown spectroscopy. *Applied optics*, v. 51, n. 7, p. 42–48, 2012.