

JOÃO PAULO RODRIGUES ROMERA

**Proposição de um método multivariado para determinação do teor de fibra em
cana-de-açúcar utilizando a espectroscopia de emissão com plasma induzido por
laser (LIBS)**

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

Orientador: Prof^a Dr^a Fabíola Manhas Verbi Pereira

Araraquara

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

R763p Romera, João Paulo Rodrigues
Proposição de um método multivariado para determinação do teor de fibra em cana-de-açúcar utilizando a espectroscopia de emissão com plasma induzido por laser (LIBS) / João Paulo Rodrigues Romera – Araraquara : [s.n], 2015
65 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Fabíola Manhas Verbi Pereira

1. Bagaço de cana. 2. Fibras. 3. Biomassa vegetal.
4. Espectroscopia de emissão com plasma induzido por laser.
5. Quimiometria. I. Título.

Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

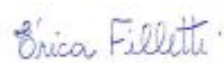
JOÃO PAULO RODRIGUES ROMERA

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

Araraquara, 20 de agosto de 2015.

BANCA EXAMINADORA


Prof^a. Dr^a. Fabíola Manhas Verbi Pereira - (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP


Prof^a. Dr^a. Érica Regina Filletti Nascimento
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP


Prof. Dr. Pedro Sérgio Fadini
Universidade Federal de São Carlos / UFSCar / São Carlos – SP

DADOS CURRICULARES

1. Dados pessoais

1.1 Nascimento: 30 de novembro de 1990.

1.2 Nacionalidade: Brasileiro.

1.3 Naturalidade: São José do Rio Preto – SP.

1.4 Filiação: Rubens Romera

Conceição Aparecida Rodrigues Romera

2. Formação Acadêmica

2.1 Bacharel em Química Ambiental

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE

Universidade Estadual Paulista UNESP

Período : 03/2009 a 12/2013

3. Produção Bibliográfica

3.2 Artigos publicados e submetidos para publicação

CAMPANHA, M. B.; ROMERA, J. P.; COELHO, J.; PEREIRA FILHO, E. R.; MOREIRA, A. B.; BISINOTI, M. C. Use of chemometrics tools to determine the source of metals in sediments of the rivers of the Turvo/Grande Hydrographical Basin, São Paulo state, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 4, p. 665-674, 2014.

ROMERA, J. P. R.; PEREIRA, F. M. V. Expeditious prediction of fiber content in sugarcane: a possibility with Laser-Induced Breakdown Spectroscopy and Chemometrics. Submetido para publicação.

4. Principais trabalhos apresentados

4.1 PEREIRA, F. M. V.; ROMERA, J. P. R. Evaluation of the fiber content in sugar cane using laser-induced breakdown spectroscopy with chemometrics for proposition of calibration models. SciX, 2014, Reno, Nevada.

4.2 ROMERA, J. P. R.; PEREIRA, F. M. V. Otimização multivariada dos parâmetros instrumentais da espectroscopia de emissão com plasma induzido por laser (LIBS) para medidas diretas em amostras vegetais. II Escola de Inverno de Quimiometria, 2015, Campinas, São Paulo.

4.3 ROMERA, J. P. R.; BISINOTI, M. C. Correlação entre Granulometria e bário em sedimentos da represa de São José do Rio Preto. XXV CIC 2013, São José do Rio Preto, São Paulo.

4.4 ROMERA, J. P. R.; CAMPANHA, M. B.; BISINOTI, M. C. Caracterização granulométrica dos sedimentos dos rios da Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande. 18º Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química – IPWS. 2011, São José do Rio Preto, São Paulo.

Dedico este trabalho ...

à Deus, aos meus pais, minha namorada, meus familiares e amigos.

Agradecimentos

A Deus pelo dom da vida.

À Professora Dr^a Fabíola Manhas Verbi Pereira, pela orientação, pelos ensinamentos de química e de vida e pela dedicação.

Aos meus pais, pelo apoio e carinho em todos os momentos de dificuldade.

À minha namorada, Daniela, por estar sempre presente e me apoiando.

Aos meus amigos, pela companhia, incentivo e carinho nos melhores e piores momentos.

Ao Grupo de Abordagens Analíticas Alternativas, pelas amizades feitas.

Ao Grupo de Análise Instrumental Aplicada, da UFSCar, por permitir a utilização do equipamento LIBS.

Ao Grupo de Eletroanalítica de Araraquara, pelas discussões e opiniões.

Aos funcionários do Instituto de Química, por toda atenção e dedicação.

Ao Instituto de Química, pela oportunidade deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Resumo

A determinação do teor de fibras é um parâmetro relevante para a indústria sucroalcooleira, pois está diretamente relacionado com o processo de rendimento da extração do caldo de cana-de-açúcar, que é a matéria-prima para a produção de açúcar e de etanol. Diversas estratégias quimiométricas foram utilizadas para este estudo de mestrado, tais como planejamento de experimentos e modelos de calibração multivariada com a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, *Partial Least Squares*). No planejamento de experimentos realizado, foi possível avaliar as melhores condições experimentais da espectroscopia de emissão com plasma induzido por laser (LIBS, *Laser Induced Breakdown Spectroscopy*) para efetuar medidas nas amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. Um total de 5327 espectros LIBS foram adquiridos e compuseram a matriz de dados, como variáveis independentes, para a investigação dos modelos multivariados de calibração com PLS. Os valores de referência que correspondem ao teor de fibras, sendo o parâmetro que foi previsto pelo modelo PLS, foram obtidos utilizando o método recomendado pelo Conselho dos Produtores de Cana-de-açúcar, Açúcar e Alcool do estado de São Paulo (CONSECANA). Um melhor modelo PLS foi alcançado por meio da seleção de 119 variáveis com valores de erros quadráticos médios (RMSE, *Root Mean Square Error*) em % para os conjuntos de treinamento (RMSE *of calibration*) e de validação (RMSE *of validation*) de 2,1 de 2,2, respectivamente. Para o método desenvolvido neste estudo de mestrado pode ser evidenciada a possibilidade inédita na determinação do teor de fibras com características tais como: ausência de geração de resíduos tóxicos, redução do uso de energia elétrica e aumento considerável da frequência analítica.

Palavras-Chave: Bagaço de cana-de-açúcar, teor de fibras, bionenergia, LIBS, quimiometria, planejamento experimental.

Abstract

The determination of the fiber content is an important parameter to sugar factory because it is directly linked to the yield of process for juice extraction, that is raw material in sugar and ethanol production. Several chemometrics strategies were used in this study such as design of experiments and multivariate calibration models with regression by Partial Least Squares. In the design of experiments, was possible to evaluate the best experimental conditions in Laser Induced Breakdown Spectroscopy to perform the measurements *in natura* in bagasse sugarcane samples. A total of 5327 LIBS spectra were acquired and composed the data matrix, as independent variables, to investigation of the multivariate calibration models by PLS. The reference values corresponding to the fiber content, the parameter that was predicted by PLS models, were obtained using the method recommended by the sugarcane, sugar and alcohol producers of the São Paulo states (CONSECANA). A better PLS model was achieved through the 119 variables selection with Root Mean Square Error (RMSE) in % to training set (RMSE of calibration) and validation (RMSE of validation) of 2.1 and 2.2, respectively. The developed method in this master's degree study show the inedited possibility in the determination of the fiber content with characteristics such as: no toxic waste generation, less use of electricity and increasing in the analytical frequency.

Keywords: Sugarcane bagasse, fiber content, bioenergy, LIBS, chemometrics, design of experiments.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplo de amostra de bagaço de cana-de-açúcar utilizada neste estudo. .	35
Figura 2: Porta-amostra utilizado para o mapeamento das amostras de bagaço de cana com a técnica LIBS, onde os círculos amarelos exemplificam possíveis pontos de incidência do laser.	37
Figura 3: Gráfico de probabilidade dos valores de efeito e de suas interações para cada variável avaliada com um planejamento fatorial completo 2^3	41
Figura 4: Comparação das intensidades dos espectros LIBS após otimização das condições instrumentais com o planejamento fatorial completo 2^3	43
Figura 5: Espectro LIBS normalizado e centrado na média para amostra de bagaço de cana com teor de fibras 12,5%.	45
Figura 6: Gráfico de <i>scores</i> para as amostras de bagaço de cana utilizando as 12288 variáveis.....	46
Figura 7: Gráfico dos valores de <i>loadings</i> para as amostras de bagaço de cana utilizando as 12288 variáveis.	47
Figura 8: Exemplo de um espectro LIBS evidenciando os 5 intervalos com comprimentos de onda distintos que foram combinados para os modelos i-PLS.	52
Figura 9: Valores de RMSECV para os 30 modelos avaliados no i-PLS.	54
Figura 10: Comparação entre os valores de referência e aqueles previstos pelo modelo PLS utilizando a seleção de 119 variáveis para o conjunto de treinamento.	56
Figura 11: Comparação entre os valores de referência e aqueles previstos pelo modelo PLS utilizando a seleção de 119 variáveis para o conjunto de validação.	57
Figura 12: Valores de resíduos para os conjuntos de treinamento (a) e de validação (b), em relação aos valores previstos pelo modelo PLS, utilizando a seleção de 119 variáveis.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Especificações do equipamento LIBS utilizado nas medidas.....	36
Tabela 2: Experimentos e variáveis testadas utilizando um planejamento fatorial completo 2^3	40
Tabela 3: Descrição das linhas de emissão detectadas e seus respectivos valores de intensidade relativa.....	44
Tabela 4: Descrição das faixas espectrais e linhas de emissão detectadas nos intervalos avaliados nos modelos i-PLS.....	53
Tabela 5: Resumo dos modelos mais promissores calculados pelo i-PLS.	55
Tabela 6: Comparação de todos os modelos investigados neste estudo de mestrado.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviatura	Nome em Inglês	Tradução/Descrição
ABNT	---	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CCD	<i>Charged Couple Device</i>	Dispositivo de carga acoplada
CONSECANA	---	Conselho dos Produtores de Cana-de-açúcar, Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo
IB	<i>Inverse Bremsstrahlung</i>	Bremsstrahlung inverso
ICP OES	<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>	Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente
IR	<i>Infrared</i>	Infravermelho
i-PLS	<i>Interval-Partial Least Squares</i>	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais por Intervalo
LIBS	<i>Laser Induced Breakdown Spectroscopy</i>	Espectroscopia de emissão com plasma induzido por laser
LTE	<i>Local Thermodynamic Equilibrium</i>	Equilíbrio Termodinâmico Local
LV	<i>Latent Variable</i>	Variável latente
NBR	---	Norma Brasileira
NIR	<i>Near Infrared Spectroscopy</i>	Espectroscopia de Infravermelho Próximo
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>	---
PBS	---	Peso Bagaço Seco
PBU	---	Peso Bagaço Úmido
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>	Análise de Componentes Principais
PLS	<i>Partial Least Squares</i>	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais
RMSEC	<i>Root Mean Square Error of Calibration</i>	Erro quadrático médio de calibração
RMSECV	<i>Root Mean Square Error of Cross-Validation</i>	Erro quadrático médio de validação cruzada
RMSEV	<i>Root Mean Square Error of Validation</i>	Erro quadrático médio de validação
SIMCA	<i>Soft Independent Modelling of Class Analogy</i>	Modelagem de classe por componentes principais
UNICA	---	União da Indústria de Cana-de-Açúcar
UV	<i>Ultraviolet</i>	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 Introdução	14
2 Revisão bibliográfica.....	16
2.1 Fundamentos da técnica LIBS.....	16
2.1.1 <i>Instrumentação</i>	16
2.1.2 <i>Princípio analítico</i>	21
2.2. A importância do teor de fibras na produção de açúcar e etanol.....	25
2.3 Aplicações da técnica LIBS em matrizes de material vegetal.....	31
3 Parte experimental.....	35
3.1 Amostras	35
3.2 Espectroscopia de Emissão com Plasma Induzido por Laser (LIBS)	36
3.3 Porta-amostra	37
3.4 Programas computacionais utilizados	37
4 Resultados e discussão	38
5 Conclusões.....	61
Referências.....	62

1 Introdução

A cana-de-açúcar é um dos produtos mais comercializados pelo Brasil, que lidera o ranking mundial em produção. A cana tem sido largamente utilizada como matéria-prima para fabricação do açúcar e do etanol que também possuem destaque no mercado nacional e internacional [1].

Segundo a União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA) a safra de 2013/2014 teve uma produção de 653 mil toneladas de cana-de-açúcar, produzindo 27,5 mil m³ de etanol e 37,7 mil toneladas de açúcar [2].

O teor de fibras é um dos principais parâmetros rotineiramente monitorados pelas usinas sucroalcooleiras, no que resulta como forma de pagamento da cana-de-açúcar, além de estar diretamente relacionado ao rendimento do processo de extração do caldo, na fabricação de dois produtos de projeção nos mercados nacional e internacional - o açúcar e o etanol [3].

O bagaço da cana-de-açúcar é o resíduo fibroso resultante do processo de extração da cana, sendo este material composto por celulose, lignina e hemicelulose, visto que a relação entre as proporções varia de acordo com cada espécie. Relatos na literatura apontam que os teores de celulose podem ser encontrados na faixa de 26 a 54%, para lignina entre 17 e 27%, enquanto para a hemicelulose entre 16 e 25% [4-6].

A utilização da técnica de Espectroscopia de emissão com plasma induzido por laser (LIBS, *Laser Induced Breakdown Spectroscopy*) apresenta potencial como alternativa ao método existente por via úmida, que é laborioso e de baixa frequência analítica. Algumas vantagens desta técnica para as medidas do bagaço de cana merecem ser destacadas tais como, o preparo de amostras

é mínimo, as medidas podem ser realizadas na ordem de segundos, propicia resolução espacial para efetuar mapeamentos nas amostras e consegue contornar efeitos de geometria da amostra. Estas características podem apontar a LIBS como uma técnica que atende os preceitos da química verde, melhorando a frequência analítica, diminuindo ou eliminando o consumo de reagentes no preparo da amostra e a geração de resíduos tóxicos pode ser mínima e até inexistente [7].

Diante das características em destaque e possibilidade de análise direta, o objetivo deste estudo de mestrado foi avaliar a potencialidade da técnica LIBS para determinar o teor de fibras em cana-de-açúcar através de modelos multivariados com técnicas quimiométricas. Por meio destes modelos foi possível selecionar linhas atômicas e/ou iônicas de elementos específicos, que estavam efetivamente contribuindo para a determinação do teor de fibras em cana-de-açúcar. Os espectros de LIBS foram treinados com valores de referência do teor de fibras gerados via método padrão, descrito no manual CONSECANA (Conselho dos Produtores de Cana-de-açúcar, Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo) [8].

2 Revisão bibliográfica

2.1 Fundamentos da técnica LIBS

Nesta seção serão discutidos alguns aspectos importantes da técnica LIBS, como cada componente presente no equipamento e suas respectivas funções, além de discutir também o princípio analítico da técnica.

2.1.1 Instrumentação

A LIBS é composta por um sistema de laser, um conjunto óptico, uma unidade de detecção e um computador para coleta de dados [9]. Algumas especificações como a potência do laser, a duração do pulso, o comprimento de onda de excitação e a resolução espectral, podem variar em função da análise a ser realizada [10].

O laser é o componente mais crítico, pois ele determina a interação da energia com a amostra [9], o pulso precisa ser forte o suficiente para que ocorra a atomização, excitação e subsequentemente a formação do plasma com os constituintes da amostra. O tipo mais comum é o Nd:YAG com comprimento de 1064 nm, pois é confiável, compacto, e produz pulso de alta densidade (irradiância, que pode ser medida em W/cm^2). Outros lasers como excímeros (XeCl, KrF e ArF) e CO_2 são pouco utilizados, pois necessitam de periódicas trocas de gases [10, 11].

Dentre o parâmetro duração do pulso, estes podem ser classificados como nanosegundos, picosegundos e femtosegundos. A principal característica

que os define, é que quanto menor for a duração, melhor será a transferência de energia do laser para a amostra, pulsos mais longos podem sofrer perdas térmicas. Sendo assim, lasers de femtosegundos e picosegundos possibilitam a obtenção de uma maior razão sinal ruído, quando comparado àqueles de nanosegundos, devido ao efeito de blindagem, que é reduzido em lasers de menor duração [10, 12, 13].

Outro importante critério na escolha do laser é o comprimento de onda, para alguns tipos de amostras, a interação laser amostra pode não ter uma boa eficácia com o de 1064 nm, assim, menores comprimento de excitação podem resultar em uma melhor interação [14].

Em um estudado realizado por Kasem et al. [14], foram analisadas amostras arqueológicas de ossos de quatro dinastias egípcias: Reino médio, segundo período intermediário, Período Greco-Romano e o Período tardio. Nesse trabalho foram avaliados dois lasers com comprimentos de onda diferentes, um na região do ultravioleta (UV, *Ultraviolet*) (266 nm) e o outro naquela do infravermelho (IR, *Infrared*) (1064 nm). Pôde-se observar que o laser com comprimento de onda na região do UV foi capaz de remover uma massa ablada maior, quando comparado ao com comprimento de onda na região do IR, cerca de uma ordem de magnitude maior. Esta diferença foi atribuída a maior energia dos fótons do laser de 266 nm em relação ao de 1064 nm (4,66 e 1,16 eV respectivamente).

O laser de Nd:YAG com comprimento de onda de 1064 nm é um dos mais utilizados na LIBS, pois nas situações onde a interação do laser com a amostra não for a de melhor desempenho, ele pode facilmente ser convertido em

comprimentos menores (532 nm, 355 nm, 255 nm), este evento é chamado de geração de harmônico [10].

Lasers de menores comprimentos de onda são capazes de remover uma maior quantidade de massa no processo de ablação, uma vez que, seus fótons possuem maior energia quando comparado aos de maiores comprimentos de onda [14, 15]. Lasers UV favorecem uma maior taxa de temperatura na superfície da amostra, e os lasers em IR permitem que o plasma atinja uma maior temperatura, promovendo assim uma maior densidade eletrônica e uma maior expansão do plasma [12].

Existe também a possibilidade que a LIBS seja configurada com duplo ou múltiplos pulsos, resultando em um aumento das intensidades das linhas de emissões observadas. Os múltiplos pulsos podem ser operados pelo mesmo ou diferentes lasers, há a alternativa de que esses sejam colineares ou ortogonais, ampliando assim, a variedade de combinações de lasers com diferentes durações e comprimentos de onda [10, 16]. Quando o tempo de separação entre os pulsos é menor que o tempo de vida do plasma, há um aumento da sensibilidade. Neste caso, o segundo pulso auxilia o processo de ionização iniciado pelo primeiro [9].

Sistemas ópticos mais simples podem ser empregados através do uso de lentes, estas devem transmitir com eficiência os comprimentos de onda observados [9, 10, 12]. Sistemas mais sofisticados possibilitam a utilização de lentes objetivas e microscópios que permitem uma focalização mais precisa na área onde o pulso de laser será incidido. Com a utilização de telescópios, é possível que a amostra seja posicionada a alguns metros de distância do equipamento. Fibras ópticas podem ser empregadas para direcionar o pulso do

laser, assim como, na coleta da radiação emitida pelo plasma [12]. A utilização na coleta da radiação pode ser feita simplesmente apontando-a na direção, ou com o auxílio de lentes focalizadoras. A aplicação de fibras ópticas permitiu que a amostra e o espectrômetro pudessem estar distantes, possibilitando que análises *in loco*, em locais de difícil acesso e de materiais perigoso fossem realizadas [9, 10, 12, 16].

Algumas propriedades importantes do espectro são: a resolução e a faixa espectral. A resolução pode ser definida como o comprimento de onda mínimo em que dois espectros podem ser observados como linhas distintas. A faixa espectral é definida como região do espectro que pode ser observada, essas características são influenciadas pelo espectrômetro e detector. Espectrômetros com uma melhor resolução, minimizam possíveis interferências espectrais. O método mais adequado de resolução espectral depende principalmente das necessidades da análise, como: a complexidade da amostra, número de elementos a ser monitorados, se mais de um elemento será analisado simultaneamente e a região de emissão de cada elemento no espectro não deve se sobrepor, ou deve haver resolução espectral necessária para que esses elementos possam ser distinguidos [9, 10, 12].

Devido à complexidade espectral apresentada pela LIBS, onde são encontradas múltiplas linhas de emissão em uma ampla faixa, desde o ultravioleta até o começo do infravermelho próximo, um espectrômetro ideal deve ter a capacidade de cobrir toda a faixa espectral analisada com boa resolução, a fim de evitar a sobreposição de linhas de emissão, o que resultaria em perda de informações. Em estudos onde poucas linhas são avaliadas e essas possuem uma certa distância no espectro, pode-se fazer o uso de uma resolução

mais simples, porém que seja satisfatória para a necessidade do trabalho. Para monitoramento simultâneo de vários elementos, pode ser necessário uma ampla faixa espectral [10, 12, 17]. A resolução de um espectro de emissão não é apenas limitada a resolução do espectrômetro, mas também ao número de sensores presentes no detector [12].

Os detectores menos empregados são aqueles que possuem apenas um sensor por dispositivo, como os tubos fotomultiplicadores, pois seu uso restringe o número de linhas de emissão que podem ser simultaneamente observadas [12].

Com o surgimento dos detectores sólidos de alta qualidade, foi possível a aquisição simultânea de linhas de emissão ao longo de uma ampla faixa espectral, como os detectores CCD (*Charge Couple Device*) que são constituídos por vários sensores, sendo compostos por três eletrodos em um substrato comum de silício do tipo p [12].

Os detectores CCDs modernos possuem uma alta capacidade de propagação, chamados de *gated* CCD, permitindo assim que exista um atraso no começo da detecção em relação a incidência do pulso de laser. Esse atraso é chamado de tempo de atraso (*delay time*), possibilitando que seja removido o sinal de alta intensidade do contínuo que está presente no início da formação do plasma. *Gated* CCD viabiliza não apenas o controle no tempo de atraso, mas também o tempo de integração após o início da detecção do sinal analítico, chamado de tempo de integração [12].

2.1.2 Princípio analítico

A técnica LIBS apresenta vantagens importantes, quando comparada às técnicas tradicionais, algumas delas são: capacidade de realizar análises rápidas, necessitar de mínimo, ou nenhum, preparo da amostra, permitir análise multi-elementar simultânea, obtenção de uma grande gama de informações químicas, possibilitar a análise em materiais sólidos, líquidos e gasosos. Além da existência de equipamentos portáteis, tornando a análise *in loco* uma realidade [9, 10, 16].

O princípio desta técnica está na detecção de emissões de espécies excitadas, moléculas neutras ou ionizadas. O funcionamento ocorre com sucessivos pulsos de laser de curta duração (≈ 10 ns), focalizados em direção à amostra para promover a formação de micro plasma (pode atingir temperaturas superiores a 10.000 K) [9]. Cada elemento ou íon excitado possui linhas de emissão bem definidas, em comprimentos de onda específicos. Com o resfriamento do plasma as espécies excitadas começam a voltar ao seu estado fundamental, e assim emitem energia na forma de radiação em diversos comprimentos de onda. A radiação emitida passa por uma lente que a focaliza em fibras ópticas em um ou mais espectrômetros. A radiação é conduzida até o detector, que por sua vez, converte a radiação em sinal elétrico, que é registrado no computador na forma de espectro [10, 11].

A técnica LIBS pode ser empregada em análises qualitativas e quantitativas geradas em uma ampla faixa espectral, como exemplo neste estudo de mestrado, as medidas foram efetuadas desde a região do ultravioleta até o infravermelho próximo, entre 186 a 1042 nm. Como pode ser observado,

uma gama de informações químicas é gerada, assim, para a exploração dos dados é importante que ferramentas multivariadas sejam aplicadas para uma melhor interpretação e extração de informação útil [18].

O processo de ablação é iniciado assim que o pulso do laser atinge a superfície da amostra, seguido da vaporização das espécies no local, acompanhado pelo forte aquecimento e ionização do vapor, consequentemente formando o plasma. Esse efeito é atribuído principalmente ao *Bremsstrahlung* inverso (IB, *Inverse Bremsstrahlung*), onde elétrons livres são acelerados pelo pulso do laser, ocorrendo assim a excitação através de colisão entre espécies excitadas e neutras. A formação do plasma atua como um escudo (efeito de blindagem), limitando assim a eficiência do IB, pois uma parcela do laser não atingirá a superfície da amostra, sendo o IB mais eficiente em lasers de baixos comprimentos de onda quando comparado a de maiores comprimentos [9, 10, 12, 15, 16].

A princípio, o efeito de blindagem que o plasma pode causar, pode ser visto como um ponto negativo, uma vez que isso diminui a interação do laser com a amostra, diminuindo também a massa removida por ablação. Entretanto, deve ser ressaltado que, a interação da blindagem com a radiação proveniente do pulso de laser aumenta a temperatura do plasma, que por sua vez, aumenta a intensidade de emissão e a dissociação de pequenas partículas que foram removidas no processo de ablação [12].

O termo “*breakdown*” de *Laser Induced Breakdown Spectroscopy* refere-se a ruptura das ligações dos constituintes da amostra, para que isso ocorra, deve haver ou gerar alguns elétrons livres no local atingido pelo pulso de laser, que serão os responsáveis por atuarem como receptores iniciais de energia

através de colisão. Em decorrência disso, uma onda de ionização no ponto atingido será formada, os elétrons serão acelerados pelo campo elétrico associado com o pulso, aumentando assim a energia cinética, ocasionando mais colisões que gerarão mais elétrons, como consequência mais energia será absorvida e assim ocorre a avalanche de elétrons [9, 16].

O plasma é constituído por átomos, íons e elétrons livres, com cargas elétricas neutras. Podendo ser caracterizado por vários parâmetros, o mais simples seria o grau de ionização, onde um plasma fracamente ionizado é aquele onde a razão de elétrons por outras espécies é menor que 10%. Já no plasma altamente ionizado, são encontrados átomos deficientes em elétrons, resultando numa alta razão átomo/íon [10].

As recombinações entre íons e elétrons geram uma radiação contínua de fundo que decai com o tempo mais rapidamente que as linhas espectrais de emissão, originando moléculas e átomos neutros, este evento é denominado de *Bremsstrahlung*. No *Bremsstrahlung* os fótons são emitidos por elétrons acelerados ou desacelerados na colisão. A recombinação ocorre quando um elétron livre é capturado em um nível de energia atômico ou iônico, e libera o excesso de energia cinética na forma de fóton [10].

Para que as propriedades do plasma como, níveis de energia da população relativa e a distribuição das velocidades das partículas, possam ser descritas através do conceito da temperatura, deve-se assumir que exista um equilíbrio termodinâmico. Porém, o conceito de equilíbrio termodinâmico é raramente completo, então tem-se adotado o conceito de equilíbrio termodinâmico local (LTE, *Local Thermodynamic Equilibrium*), onde este ocorre em uma pequena região [10-12].

Para que exista LTE no plasma, a densidade eletrônica deve ser alta suficiente para que as taxas de colisão sejam maiores que as taxas de radiação [19]. Entretanto, espécies diferentes podem estar em equilíbrios termodinâmicos diferentes, sendo comum que espécies mais densas como íons e átomos e espécies leves como elétrons, entrem em equilíbrio em tempos e velocidades diferentes uns dos outros, uma vez que a energia da colisão é melhor dividida em espécies com massa mais similares [10-12].

As propriedades do plasma estão diretamente relacionadas com as características dos espectros de emissão, as larguras das linhas são influenciadas pela temperatura e a densidade eletrônica no plasma. Sob condições normais, um dos principais efeitos que afetam a largura das linhas de emissão na LIBS, é o efeito Stark, que é causado principalmente pelo campo elétrico gerado pelas colisões com os elétrons, e uma pequena parcela das colisões com íons [10, 11].

O plasma deve ser opticamente fino, para que as radiações emitidas atravessem sem absorção ou espalhamento. Existem algumas formas de se observar a opacidade do plasma, uma delas é através das linhas espectrais de alta intensidade. No caso em que a reabsorção ocorre, nota-se um afastamento da intensidade observada com relação a esperada, devido ao saturamento das linhas de maiores intensidades, apresentando perfis de emissão achatados, que evidenciam a auto absorção [10,11].

2.2 A importância do teor de fibras na produção de açúcar e etanol

O interesse no cultivo da cana-de-açúcar não se restringe apenas a produção de açúcar e etanol, uma vez que a cana possui alto poder calorífico, cerca de 7,4 GJ por tonelada [20], possibilitando assim, que o resíduo da extração do caldo, conhecido como bagaço da cana, possa ser utilizado na geração de energia elétrica. O rendimento da cana-de-açúcar pode ser calculado através do peso dos colmos por área plantada, onde a produtividade mundial é estimada em 53 t/ha, sendo que a produtividade média do teor de sacarose apresenta variações de 7 a 13%, enquanto o teor de fibras fica entre 11 e 16% [21].

Os nutrientes necessários para o bom desenvolvimento da planta, diferem de acordo com as variedades. Os minerais exigidos em maiores quantidades são nitrogênio (N), potássio (K) e cálcio (Ca), seguidos do magnésio (Mg), enxofre (S) e fósforo (P), e elementos em menores concentrações como o ferro (Fe), zinco (Zn), manganês (Mn), boro (B) e cobre (Cu).

Alguns fatores afetam diretamente o crescimento da planta, como a temperatura, que deve ser média entre 25°C e 35°C, a exposição à radiação solar deve ser por um período de aproximadamente 12 horas, e a distribuição hídrica deve ser positiva, como nas regiões brasileiras de plantações canavieira, mesmo na região nordestina. A cana consome cerca de 3,3 mm/dia de água, que correspondem a 3,3 l/dia [21].

O bagaço é composto basicamente por lignina, celulose e hemicelulose. Estas proporções são dependentes do tipo de vegetal, além de fatores como, condições de crescimento, tempo de colheita e outros [5].

A lignina é uma substância amorfa, hidrofóbica, de natureza aromática e de estrutura extremamente complexa, apresenta um papel fundamental no transporte de água, nutrientes e metabólitos, além de conferir resistência mecânica ao vegetal e proteger o tecido contra o ataque de micro-organismos. A complexidade de sua composição está relacionada a diversidade de sua estrutura, que é influenciada pelas variações climáticas e de solo, além das diferentes espécies vegetais. É um polímero derivado das unidades fenilpropanóides denominadas C_6C_3 ou C_9 , repetidas de forma irregular e sua origem é dada na polimerização desidrogenativa do álcool coniferílico [5, 22].

A celulose é um homopolissacarídeo constituído por moléculas de glicose ligadas através da ligação glicosídica (β 1 $\rightarrow$ 4) [23], é rígida e muito resistente a hidrólise. É o material mais abundante da parede celular vegetal [5].

A hemicelulose é uma classe de polissacarídeos heterogêneos, de baixa massa molecular, composta por açúcares pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose), ácidos urônicos e grupos acetila. É mais reativa a hidrólise quando comparada com a celulose, devido ao seu menor grau de polimerização [5, 23].

Ogata [5] avaliou a composição do bagaço em 207 genótipos da cana-de-açúcar, os valores variaram entre 26 a 54% para a celulose, com valor médio de 44%. Para a hemicelulose, os valores foram de 16 a 25%, com valor médio de 21%, e para lignina os resultados variaram de 17 a 27%, com valor médio de 23%.

Moretti et al. [6] também estudaram a caracterização do bagaço da cana-de-açúcar e encontraram valores de celulose de 46,9%, hemicelulose de 16,3% e lignina de 27,1%. Em trabalho realizado por Kim e Day [4], os valores obtidos para a celulose foram de 41,6%, para a hemicelulose foi de 25,1% e 20,3% para a lignina.

Dessa forma, o teor de fibra do bagaço da cana-de-açúcar se destaca como sendo um dos principais parâmetros na avaliação da qualidade da cana, entre outros, pode-se citar o °Brix (grau Brix), o Pol do caldo, a pureza e os açúcares redutores.

O °Brix pode ser definido como a porcentagem em massa de sólidos solúveis totais, incluindo a sacarose, outros açúcares e sais dissolvidos [24]. O Pol do caldo é o teor de sacarose aparente em porcentagem, presente no caldo extraído. A pureza pode ser determinada através da relação porcentual entre os valores de Pol e o °Brix [25]. Já os açúcares redutores são medidos pela quantidade de glicose e frutose presente na cana-de-açúcar, visto que, elevada quantidade é prejudicial na recuperação da sacarose [8, 26].

O método de referência para a determinação dos parâmetros de qualidade da cana-de-açúcar é recomendado pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Dentre estas normas estão à que dispõe de procedimentos para determinar a qualidade da cana-de-açúcar destinada à produção de açúcar e álcool [27]. O método de Tanimoto para determinação do teor de fibras em cana-de-açúcar é descrito pela Norma Brasileira (NBR) 16225:2013 [28]. O método de determinação do Pol por sacarimetria é retratado na NBR 16224:2013 [29]. A determinação do °Brix por refratometria é encontrado na NBR 16223:2013 [30]. O método de extração do caldo de cana-de-açúcar

pela prensa hidráulica é relatado na NBR 16221:2013 [31]. Além de outras normas que descrevem o preparo e a homogeneização da amostra [32], o cálculo dos açúcares redutores em função da pureza [33], a determinação das constantes da equação para o cálculo da fibra [34], o cálculo dos açúcares redutores em caldo [35], a extração do caldo pelo método extrator a frio é recomendado pela NBR 16222:2013 [36], o índice de preparo pode ser determinado de acordo com a NBR 16227:2013 [37] e a terminologia é descrita na NBR 16225:2013 [28].

O método de referência utilizado foi de Tanimoto [8, 28]. Para a realização das análises são necessários equipamentos como balança de precisão com capacidade máxima de 2 kg e resolução de 0,1 g, estufa elétrica com circulação e renovação forçada de ar, onde as amostras são secas em cesto de tela com furos de 0,5 mm. Na determinação do teor de fibras em cana-de-açúcar, a amostra de cana passa por um desintegrador, em seguida, é prensada durante um minuto por uma prensa hidráulica com pressão mínima e constante de 24,5 MPa (250 kgf/cm²). O caldo extraído é analisado quanto ao °Brix e Pol. [8, 30] O bagaço resultante da extração é retirado da prensa e pesado (PBU, Peso Bagaço Úmido) colocado nos cestos tarados e levados para estufa a 105°C por três horas. Após esse tempo, retira-se o material, sendo novamente pesado e posteriormente, levado a estufa por mais uma hora a 105°C. Este procedimento repete-se até que o PBS (Peso Bagaço Seco) apresente valores constantes de massa ou que a sua variação não seja significativa [8, 28].

O cálculo do teor de fibras em cana-de-açúcar é representado pela Equação (1):

$$\text{Fibra de cana (\%)} = \frac{[(100 \times \text{PBS}) - (\text{PBU} \times B)]}{[5 \times (100 - B)]} \quad \textbf{Equação (1)}$$

O PBS refere-se ao peso do bagaço seco, o PBU é dado pelo peso do bagaço úmido e B é o valor do °Brix.

Como pode ser verificado, o cálculo do teor de fibras além de ser laborioso, ainda envolve a determinação de outro parâmetro, como o valor do °Brix.

Na literatura científica são encontrados estudos que adotaram métodos alternativos na determinação de parâmetros importantes para a indústria sucroalcooleira. Como exemplo aquele realizado por Sorol et al. [38]. Estes autores utilizaram a espectroscopia do infravermelho próximo (NIR, *Near Infrared Spectroscopy*) para determinar o teor de sólidos solúveis em caldo de cana, os valores variaram de 11,7 a 23,1 °Brix.

Mat et al. [39] avaliaram o teor de sólidos solúveis (°Brix) e o teor de umidade em amostras de cana-de-açúcar através da espectroscopia NIR. Os modelos de calibração multivariada foram construídos utilizando o PLS (*Partial Least Squares*), os erros RMSEC (*Root Mean Square Error of Calibration*) e RMSEV (*Root Mean Square Error of Validation*) foram de 1,04 e 1,19 °Brix respectivamente, sendo que os valores estavam entre 11 a 22 °Brix. Os erros para os conjuntos de treinamento e de validação foram de 0,99 e 0,86% respectivamente, para o teor de fibras, a faixa variou de 0,2 a 12%. O teor de

umidade das amostras variou de 66 a 84% e os erros para os conjuntos de treinamento e de validação foram de 1,56 e 1,70%, respectivamente.

A espectroscopia NIR foi empregada por Valderrama et al. [40] na determinação dos teores de sólidos solúveis (°Brix), açúcares polarizáveis (POL) e os açúcares redutores em amostras de caldo de cana através de modelos de calibração multivariada.

Os valores dos erros de RMSEC e RMSEV para o °Brix foram de 0,3 e 0,28 °Brix respectivamente, para os valores de POL foram de 0,44 e 0,42% respectivamente, e 0,28 e 0,26% respectivamente para os valores de açúcares redutores. Mesmo com a baixa magnitude dos valores de RMSE apresentados pelos modelos, os resíduos para a determinação de açúcares redutores não seguiram uma distribuição normal, o que reforça a suspeita de não linearidade do conjunto de dados. Entretanto, com a utilização do teste de Jarque-Berra, apenas os resíduos apresentados pelo modelo de °Brix seguiam uma distribuição normal. Os níveis de confiança obtidos para °Brix, POL e RS foram de 96,9, 95,8 e 95,6, respectivamente, condizendo com a concordância observada entre os valores de referência e os previstos pelo método proposto.

Desse modo, concluíram que os modelos desenvolvidos para determinação de °Brix, POL e açúcares redutores utilizando o método NIR combinado com quimiometria, podem ser implementados nas indústrias sucroalcooleiras como uma alternativa aos métodos aplicados atualmente [40].

2.3 Aplicações da técnica LIBS em matrizes de material vegetal

Dentre diversos estudos que mostraram a contribuição da técnica LIBS para matrizes analíticas de material vegetal, pode ser citada, aquele realizado por Souza et al. [41] que propuseram um método utilizando a técnica LIBS para determinação de Silício (Si) diretamente em pastilhas produzidas a partir de material de plantas. No estudo dos referidos autores foram utilizadas folhas de 24 variedades de cana-de-açúcar, onde essas passaram por processo de moagem em moinho criogênico e prensadas em formato de pastilhas. Os resultados encontrados da curva de calibração utilizando a linha de emissão do Si em 212,412 nm, com um valor de correlação de 0,9807 entre a área do pico e a fração de massa na amostra. Os valores obtidos por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) quando comparado aos valores encontrados por LIBS, não apresentaram diferença significativa aplicando o teste t de *Student's* com 95% de confiança. Assim, os autores consideraram que a partir dos resultados obtidos, a técnica LIBS pode ser empregada na determinação de silício em folhas de cana-de-açúcar de forma rápida e eficiente, contribuindo para a química verde, pois não há a geração de resíduos.

Tripathi et al. [16] realizaram um trabalho onde a técnica LIBS foi empregada na distribuição espacial de silício em folhas de cana-de-açúcar de três espécies diferentes *Saccharum officinarum*, *Saccharum spontaneum* e *Saccharum bengalense*. A investigação da distribuição espacial de silício nas folhas foi realizada em vários pontos, como na nervura central, nas marginais e nas regiões das veias. Com os resultados obtidos, foi possível observar que a

concentração de silício é maior na região da nervura central, seguida pelas regiões marginais e das veias. Também foi possível afirmar, que a espécie *S. officinarum* é a que apresenta maior teor de silício, seguida pelas espécies *S. spontaneum* e *S. bengalense*. Desse modo, foi inferido pelos autores que a técnica LIBS se apresentou de forma satisfatória para a análise *in loco* da distribuição espacial de silício em folhas de plantas [16].

Nunes et al. [42] utilizaram a técnica LIBS na determinação de macronutrientes como fósforo (P), potássio (K), magnésio (Mg) e cálcio (Ca) e micronutrientes como boro (B), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn) em folhas de cana-de-açúcar. Nesse estudo foram utilizadas 6 amostras de material de referência certificado e 41 amostras de folhas de cana, onde as folhas foram secas e moídas para que se fossem feitas pastilhas. Vários modelos de calibração para cada elemento foram avaliados, por método univariado foi utilizado a área do pico de emissão e na calibração multivariada o PLS por intervalos (i-PLS, *Interval PLS*). As amostras foram analisadas também em ICP OES para comparação dos resultados encontrados com LIBS. Os erros encontrados para os modelos multivariados foram menores quando comparados aqueles univariados, com exceção para o K e o Mg. Comparando os valores obtidos por LIBS com aqueles por ICP OES, através de um teste t pareado, foi avaliado que houve diferença significativa, com 95% de confiança, apenas para os valores de Mg, entretanto, com 99% de confiança não foi observada diferença significativa. Deste modo, Nunes et al. concluíram que a técnica LIBS apresentou bons resultados, principalmente quando utilizada com ferramentas quimiométricas como PLS e i-PLS na determinação de macro e micronutrientes em folhas de plantas.

Devey et al. [43] utilizaram a técnica LIBS para a determinação de sódio (Na), potássio (K), manganês (Mn), magnésio (Mg), cálcio (Ca), ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn), boro (B), fósforo (P) e enxofre (S) em amostras de pastagem na Nova Zelândia, Azevém perene (*Lolium perenne*) e Trevo branco (*Trifolium repens*), com um total de 100 amostras, onde elas foram moídas e prensadas em formato de pastilha. Para a calibração, utilizou-se a ferramenta PLS com os picos de emissão correspondente para cada elemento com suas respectivas linhas atômicas em nm como segue: Na 819,4; K 696,4; Zn 213,8; B 249,7; P 214,9; Cu 324,7; S 921,3 nm; e as linhas iônicas em nm para Mg 882,4; Ca 212,3; Mn 257,6 e Fe 248,5. Os valores de referências utilizados nos cálculos para os modelos foram obtidos por análise em ICP OES. Os elementos Na, K, Mg, Ca, B, Mn, Fe e P apresentaram uma boa correlação entre os valores encontrados por LIBS e ICP OES (R^2 maior que 0,8). O modelo obtido para o Zn e Cu tiveram uma correlação relativamente pobre, com R^2 de 0,64 e 0,03, respectivamente. Isto foi atribuído às baixa concentração desses elementos nas amostras. A baixa correlação obtida no modelo do S (R^2 de 0,3) foi associada com a linha de emissão utilizada, onde a melhor opção seriam linhas menores que 190 nm, porém o instrumento não possibilitou sua aquisição. Os autores ainda concluíram que os elementos Na, K, Mg, Ca e P apresentaram boa acurácia quando comparados os resultados obtidos por LIBS e ICP OES, Mn, Fe e B se mostraram aptos para as análises, enquanto Zn, Cu e S apresentaram altos valores de incerteza, não podendo ser considerados adequados.

Pereira et al. [44] empregaram a técnica LIBS com ferramentas quimiométricas na proposição de um método para o diagnóstico precoce da doença *Citrus Greening* ou *Huanglongbing* (HLB) causada pela bactéria

Candidatus Liberibacter asiaticus (CLas) em variedades de citrus, principalmente em pomares de laranja. As medidas foram realizadas diretamente na região da nervura central das folhas provenientes de árvores de laranjeira, sem qualquer tipo de pré tratamento das amostras. No referido estudo, as plantas sadias foram discriminadas daquelas inoculadas com a bactéria CLas ainda em fase assintomática. As linhas dos elementos que foram responsáveis pela caracterização das amostras pertencentes ao grupo saudável foram aqueles a seguir: C, Fe, Mn, H, S, N, K e O. Assim sendo, a técnica LIBS foi combinada com a ferramenta quimiométrica SIMCA (*Soft Independent Modelling of Class Analogy*) para proposição de modelos de classificação que foram capazes de diferenciar uma planta saudável daquela assintomática com taxas de acerto entre 82 e 100%.

3 Parte experimental

3.1 Amostras

O bagaço de cana-de-açúcar foi objeto de trabalho deste estudo de mestrado. Um total de 53 amostras foram gentilmente cedidas no mês de junho de 2014 pela usina Tonon Bioenergia S/A que fica localizada no município de Bocaina no estado de São Paulo.

As amostras de bagaço de cana-de-açúcar apresentavam uma faixa de teor de fibras em (%) (g/100g) da ordem de 10,4 a 21,6. A Figura 1 mostra o material avaliado neste estudo.



Figura 1: Exemplo de amostra de bagaço de cana-de-açúcar utilizada neste estudo.

Os parâmetros necessários para fins de determinação do teor de fibras no bagaço, através do método de referência, foram os seguintes: teor de sólidos

solúveis totais (grau Brix), peso do bagaço úmido e peso do bagaço seco. Os procedimentos para medida destes parâmetros estão descritos no Manual CONSECANA [8] e seguem as normas recomendadas pela ABNT [28].

3.2 Espectroscopia de Emissão com Plasma Induzido por Laser (LIBS)

O equipamento utilizado para efetuar as medidas LIBS foi um modelo J200 produzido pela Applied Spectra (Fremont, Califórnia, EUA) constituído de um espectrômetro de 6 canais que estão acoplados a um detector CCD, com faixa espectral que se estende desde a região do ultravioleta até o início do infravermelho próximo. Os intervalos para cada canal em comprimentos de onda são: (1) entre 186 e 309 nm, (2) entre 309 e 466 nm, (3) entre 460 e 588 nm, (4) entre 588 e 692 nm, (5) entre 692 e 834 nm e (6) entre 834 e 1042 nm, correspondendo a um total de 12288 variáveis. Na Tabela 1 podem ser verificadas as principais configurações deste instrumento.

Tabela 1: Especificações do equipamento LIBS utilizado nas medidas.

Fonte do laser	Nd:YAG
Comprimento de onda do laser (nm)	1064
Duração média do pulso (ns)	8
Frequência (Hz)	10
Espectrômetro	CCD 6 canais
Resolução dos canais (nm)	0,06 a 0,12
Janela espectral (nm)	186,87 e 1042,03
Programa computacional	Axiom 2.5
Potência máxima do laser (mJ)	100
Tempo de atraso (<i>Delay time</i>) (µs)	0,5 – 2,0
Tempo de integração (ms)	1,05
Tamanho do <i>spot</i> (<i>Spot size</i>) (µm)	50 – 250

3.3 Porta-amostra

Um porta-amostra específico foi confeccionado para as medidas com LIBS, cujas dimensões são 6,0 cm de profundidade, 10,5 cm de largura e 2,5 cm de altura, constituído de 3 compartimentos, um para cada amostra como ilustrado na Figura 2. Nesta mesma figura é possível verificar também que foi acoplada uma tampa metálica móvel com quatro retângulos para compactar o material e facilitar a identificação dos pontos durante o mapeamento, evitando qualquer tipo de movimentação em decorrência do impacto do laser sobre a amostra. Vantagem adicional que merece destaque, é que uma massa representativa do material pôde ser avaliada com este tipo de porta-amostra.

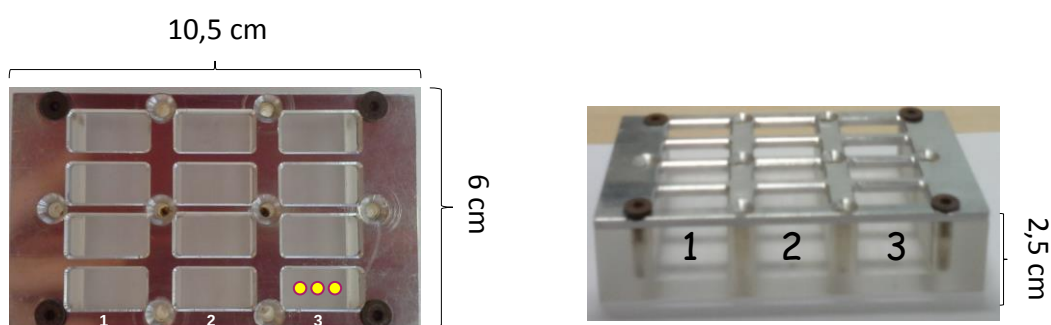


Figura 2: Porta-amostra utilizado para o mapeamento das amostras de bagaço de cana com a técnica LIBS, onde os círculos amarelos exemplificam possíveis pontos de incidência do laser.

3.4 Programas computacionais utilizados

O programa Excel 2013 (Microsoft, Redmond, EUA) foi utilizado para o cálculo dos espectros médios e a realização do planejamento experimental. O

programa Matlab 2010 7.11.0 (R2010b) (The MathWorks, Natick, EUA) foi empregado para análise exploratória e também na seleção das variáveis para os modelos de calibração multivariada. Para os cálculos multivariados também foi utilizado o programa computacional Pirouette 4.0 (Infometrix, Bothel, EUA). Para a identificação das linhas presente nos espectros, foi utilizado o programa Aurora (Applied Spectra), que possui uma biblioteca ampla, atualizada e foi construída especificamente para o equipamento LIBS, sob condições reais de trabalho. A base de dados disponibilizada pelo NIST (*National Institute of Standards and Technology*) [45] também foi consultada.

4 Resultados e discussão

As amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* analisadas foram resultantes da moagem de cana-de-açúcar crua. Este material pode apresentar em sua composição centesimal, aproximadamente 46% de fibra, 50% de água e os 4% restantes correspondem ao caldo residual [46].

Durante o desenvolvimento deste estudo, dois fatores tiveram que ser contornados. O primeiro está relacionado com a presença de interferentes na matriz analítica tais como, folhas, palhas, resíduos de solo, entre outros, que é inerente ao processo de colheita. O segundo está relacionado com o desenvolvimento do método que se depara com a ausência de material de referência certificado, o que promove um desafio analítico adicional ao estudo, e ao mesmo tempo, um caráter de ineditismo aos resultados que serão discutidos nesta seção.

Assim, o intuito foi medir as amostras *in natura*, sem qualquer pré tratamento do material utilizando um instrumento LIBS. Para que fossem atingidas as melhores condições dos parâmetros instrumentais na aquisição dos espectros foi efetuado um planejamento experimental. As condições que eram passíveis de serem variadas no equipamento eram potência do laser, tempo de atraso na aquisição dos espectros e tamanho do *spot*.

O parâmetro do instrumento LIBS - tempo de atraso pode ser definido como o tempo entre a incidência do pulso de laser e o início do registro do espectro das linhas de emissão [10], ou seja, o pulso é incidido e a emissão não é simultaneamente registrada, pois a radiação do contínuo nesta fase ainda é elevada. Assim, o tempo de atraso é necessário para permitir uma maior relação sinal/ruído, já que um tempo de atraso muito curto permite a detecção de linhas moleculares, um período mais longo propicia, além destas, o registro de linhas de emissão iônicas e atômicas [11].

O tipo de planejamento foi um fatorial completo 2^3 , ou seja, dois níveis foram testados (baixo e alto) com 3 variáveis, gerando um total de 8 experimentos. Os valores dos níveis mais baixos para aqueles mais altos estão descritos a seguir: potência do laser (mJ) 50 e 75, tempo de atraso (μ s) 0,5 e 1,0 e tamanho do *spot* (μ m) 75 e 125.

Para cada experimento do planejamento fatorial 2^3 foi utilizada como resposta a norma que foi calculada a partir de um espectro proveniente da média de 30 medidas. A melhor condição experimental foi aquela com o maior valor da norma. Este critério possibilitou selecionar a condição experimental, que proporcionou adquirir os espectros com características tais como, maior número de linhas de emissão e sinais com magnitude mais intensa. Para a realização do

planejamento experimental, os espectros foram avaliados sem qualquer tipo de pré-processamento ou transformação.

O cálculo da norma foi feito conforme mostra a Equação 2.

$$\|b\| = \sqrt{b_1^2 + b_2^2 + b_3^2 \dots + b_n^2} \quad \text{Equação (2)}$$

Onde b_1 , b_2 , b_3 e b_n são as respostas instrumentais obtidas em cada comprimento de onda [47].

A matriz de planejamento de experimentos pode ser verificada na Tabela 2, onde os valores são codificados em -1 para o nível baixo e 1 para o nível alto.

Tabela 2: Experimentos e variáveis testadas utilizando um planejamento fatorial completo 2^3 .

Experimento	Potência do laser	Tempo de atraso	Tamanho do <i>spot</i>	Resposta (Norma)
1	-1	-1	-1	6381,6
2	1	-1	-1	21073,1
3	-1	1	-1	2119,5
4	1	1	-1	4319,6
5	-1	-1	1	9514,5
6	1	-1	1	23594,0
7	-1	1	1	3159,2
8	1	1	1	11863,4

Para uma melhor investigação sobre as variáveis estudadas, a contribuição dos efeitos de cada variável e de suas interações foram avaliadas, em função dos valores de z [48, 49], que são representados por um gráfico de probabilidade, conforme mostra a Figura 3.

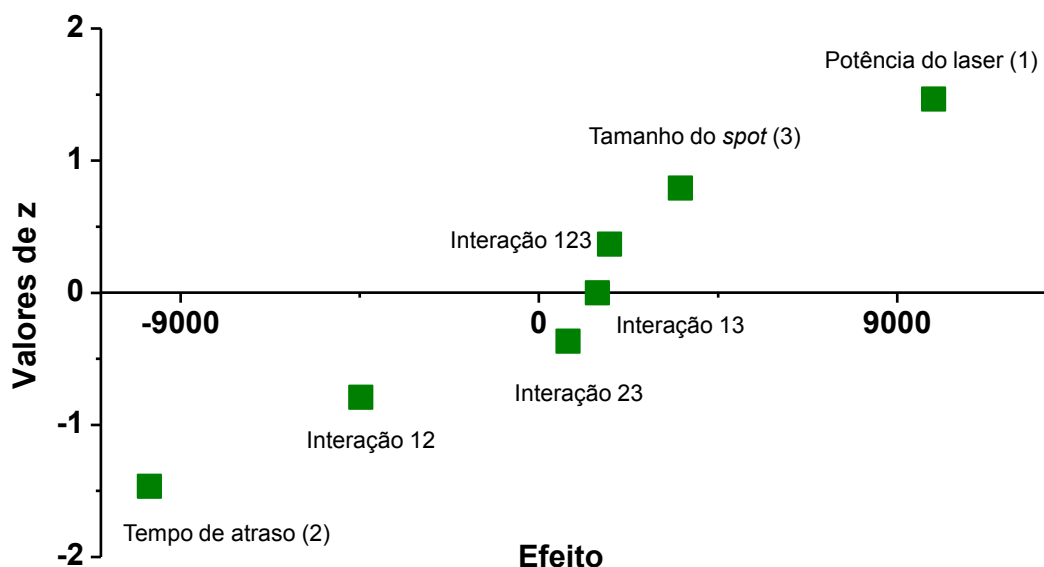


Figura 3: Gráfico de probabilidade dos valores de efeito e de suas interações para cada variável avaliada com um planejamento fatorial completo 2^3 .

Com este mesmo gráfico, foi verificado que os efeitos das interações de 2ª e 3ª ordens ficaram próximos aos valores de zero, o que demonstrou que não foram significativos para o modelo. A variável tamanho do *spot* foi responsável por apenas 5% dos efeitos, indicando que não representa efeito significativo sobre a resposta. Assim, optou-se por manter o tamanho do *spot* no nível mais baixo, para garantir maior fluência (Energia/Área) nos pontos mapeados da amostra. Por outro lado, os efeitos principais da potência do laser e do tempo de atraso representaram um total de 83% do total. O parâmetro da variável potência do laser deve ser utilizado no seu nível alto (75 mJ) por apresentar efeito positivo;

já o tempo de atraso deve ser empregado no nível baixo (0,5 μ s), uma vez que seu efeito foi negativo, como pode ser verificado na Figura 3.

A confirmação das variáveis que foram efetivamente significativas foi realizada através do cálculo do erro crítico, com nível de 95% de confiança. Por meio deste critério, foi verificado que os efeitos que apresentam valores em módulo maiores que 5977 são significativos, caso das variáveis tempo de atraso e potência do laser, que denotaram efeitos de -9775 e 9919, respectivamente. Corroborando com estas informações, este mesmo parâmetro para o tamanho do *spot* foi de 3559, dessa forma, esta variável não apresentou efeito significativo com 95% de confiança [49].

Após a otimização multivariada, foi verificado que as melhores condições experimentais foram alcançadas quando empregada a potência do laser no nível alto (75 mJ), o tempo de atraso no nível baixo (0,5 μ s) e o tamanho do spot utilizado no nível baixo (75 μ m).

Como exemplo, a linha atômica do C (193,01 nm) aumentou em uma razão de 6 vezes com estas condições quando comparada com as outras, conforme mostrado na Figura 4. Os valores de intensidade mínima e máxima alcançados na aquisição dos espectros LIBS foram na média entre 1270 e 6200 em unidades arbitrárias (u. a.) nas condições experimentais supracitadas.

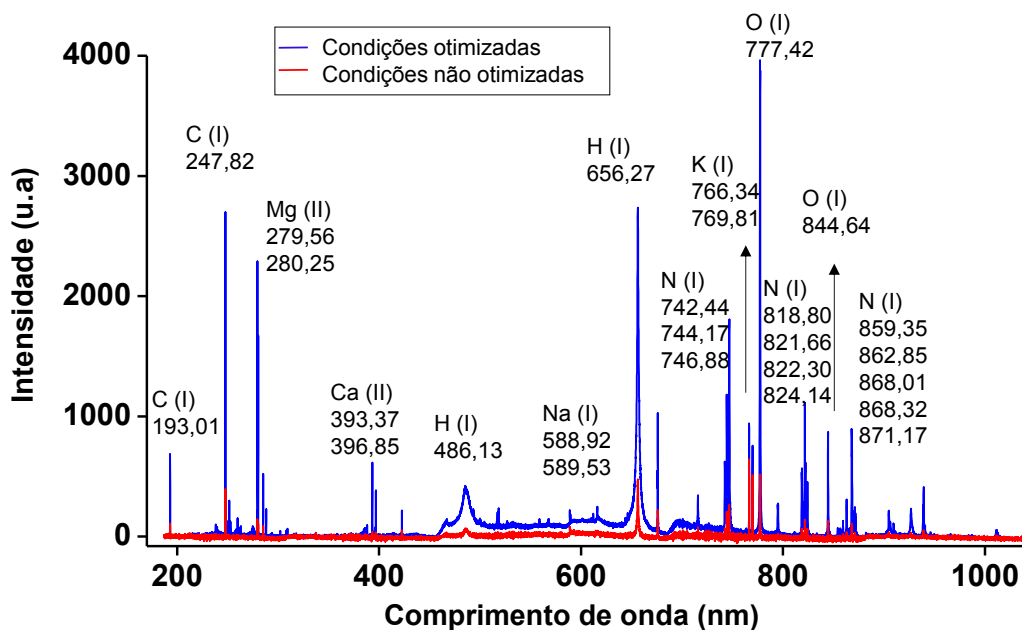


Figura 4: Comparação das intensidades dos espectros LIBS após otimização das condições instrumentais com o planejamento fatorial completo 2^3 .

Em geral, aproximadamente 120 espectros foram coletados por amostra para contornar o efeito da heterogeneidade do material. Após esta etapa, o conjunto de dados foi composto por uma matriz **X** (53 x 12288), onde cada amostra foi representada por um espectro resultante da média dos pontos mapeados (Figura 2). Os espectros médios foram normalizados de forma que todos espectros passaram a ter norma igual a 1 e pré-processados por meio da centragem na média.

A normalização dos espectros foi imprescindível, pois medidas instrumentais estão sujeitas a interferências, tais como possíveis flutuações elétricas, influência de ruído, rugosidade da amostra, dentre outras [47]. No caso dos espectros centrados na média, a média de toda a matriz passa a ser zero. E isto, pode minimizar questões em relação às flutuações da linha de base, comum a este tipo de dado [50].

Na Tabela 3 é possível verificar as linhas de emissão que foram detectadas para as amostras de bagaço de cana-de-açúcar, por meio das medidas com LIBS já com as condições instrumentais otimizadas.

Tabela 3: Descrição das linhas de emissão detectadas e seus respectivos valores de intensidade relativa.

Elemento	Comprimento de onda observado (nm)	Linhas de emissão: Atômica (I) e Iônica (II)	NIST	Aurora
			Intensidade relativa	Intensidade relativa
C	193,01	I	1000	1300
C	247,82	I	800	9029
Mg	279,56	II	13	357153
Mg	280,25	II	12	352473
Ca	393,37	II	230	850
Ca	396,85	II	220	822
H	486,13	I	180000	---
Na	588,92	I	80000	10000
Na	589,53	I	40000	10000
H	656,27	I	500000	2474
N	742,44	I	685	435
N	744,17	I	785	986
N	746,88	I	900	1369
K	766,34	I	25	3054
K	769,81	I	75	1991
O	777,42	I	870	2141
N	818,80	I	400	591
N	821,66	I	570	1141
N	822,30	I	400	605
N	824,14	I	400	413
O	844,64	I	1000	597
N	859,35	I	570	---
N	862,85	I	650	---
N	868,01	I	700	---
N	868,32	I	650	---
N	871,17	I	570	---

A Figura 5 exemplifica o perfil de um espectro com norma igual a 1 e centrado na média. Verificou-se que não houve qualquer tipo de perda de

informação analítica das linhas atômicas e iônicas existentes, e a razão entre as intensidades foram preservadas.

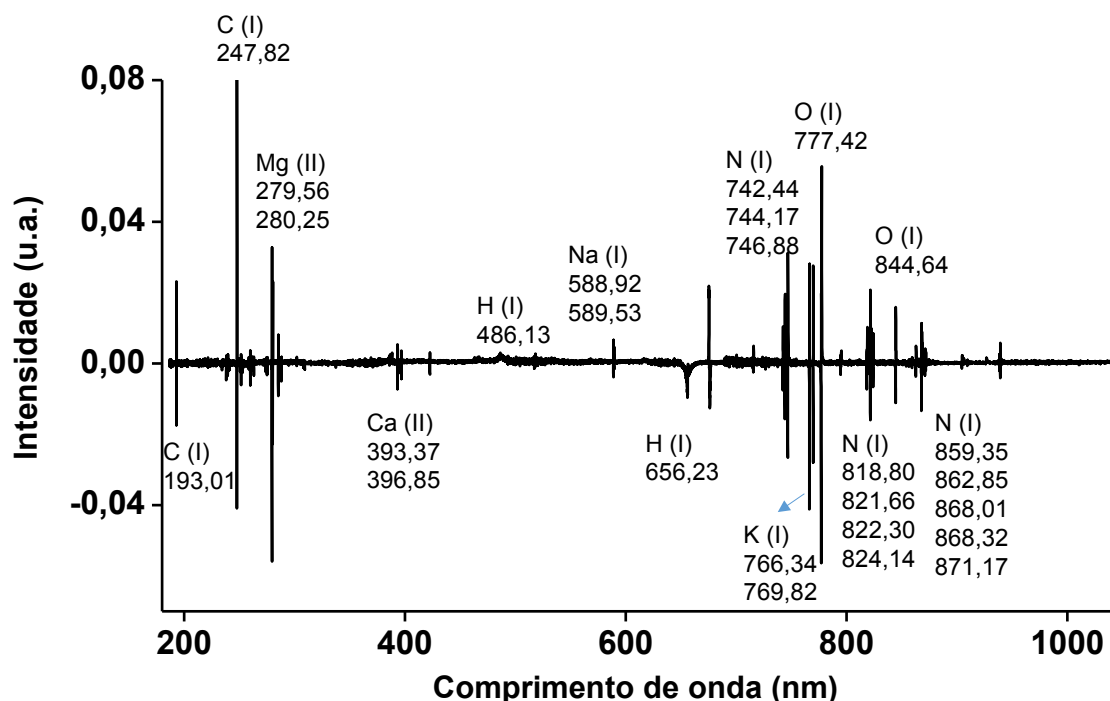


Figura 5: Espectro LIBS normalizado e centrado na média para amostra de bagaço de cana com teor de fibras 12,5%.

Para uma avaliação inicial dos dados, foi efetuada uma análise exploratória utilizando a ferramenta quimiométrica PCA (*Principal Component Analysis*) para amostras com teor de fibras (%) entre 10,4 e 21,6 utilizando toda a faixa espectral, ou seja, as 12288 variáveis, como pode ser verificado nas Figuras 6 e 7. O gráfico dos scores na Figura 6 mostrou que não houve formação de grupamentos distintos em relação aos teores de fibras, onde um total de 43% da variância foi explicada pelas PC's 1 e 2. Verificou-se também que, os scores apresentaram maior dispersão ao longo da PC1 do que em relação à PC2. Com

esta análise, não foi detectada a presença de qualquer amostra anômala (*outlier*).

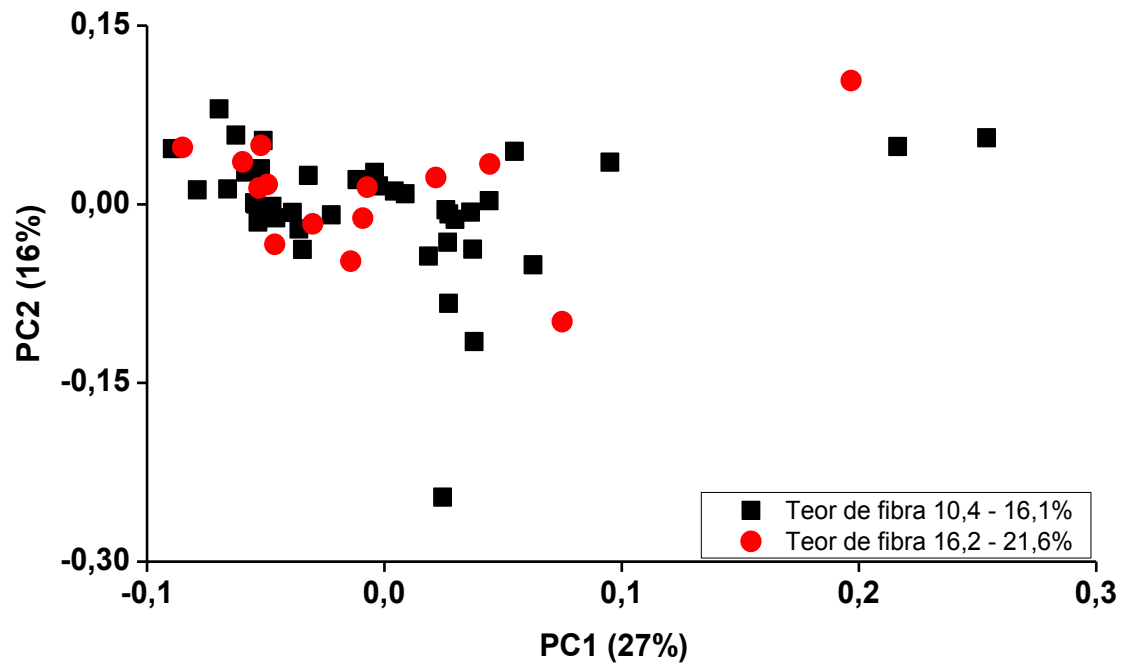


Figura 6: Gráfico de *scores* para as amostras de bagaço de cana utilizando as 12288 variáveis.

De acordo com o gráfico da Figura 7 para os valores de *loadings*, as linhas atômicas que demonstraram maior peso foram aquelas de C, N, O e K, juntamente com a linha iônica de Mg.

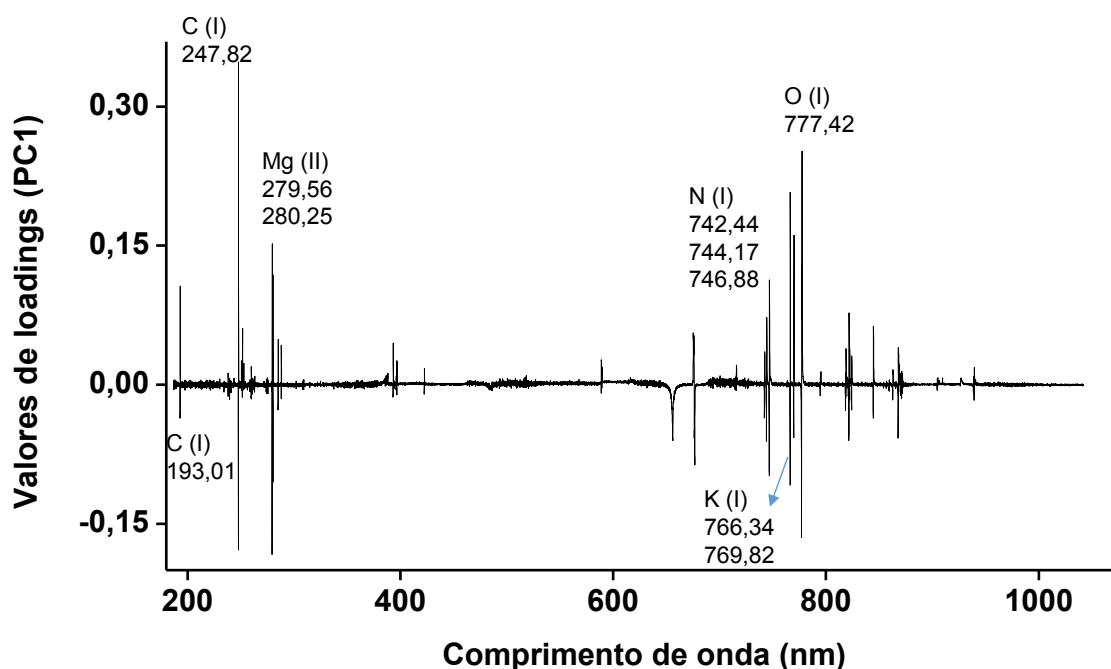


Figura 7: Gráfico dos valores de *loadings* para as amostras de bagaço de cana utilizando as 12288 variáveis.

Conforme relatado na literatura científica, a concentração de macro e micronutrientes em folhas de cana-de-açúcar, pode variar conforme as variedades, fatores ambientais e tipos de solos [51]. Em análise foliar, realizada por Moura Filho et al. [51], foram medidos em (g/kg) os elementos N (17,8), P (2,2), K (10,8), Ca (3,4), Mg (2,4) e S (1,0). As concentrações dos micronutrientes Zn, Cu e Mn em (mg/kg) foram 15, 5,0 e 5,9, respectivamente.

Segundo Benett et al. [52] é possível extrair a partir de uma tonelada de toda a planta de cana-de-açúcar, 1,2 kg de N, 0,36 kg na forma de P_2O_5 , 1,48 kg de K_2O , 1,12 kg para CaO , 0,68 kg de MgO e 0,36 kg de S.

Na construção de um modelo de calibração multivariado os dados foram dispostos de forma semelhante à PCA, onde na matriz **X** as linhas estão representadas pelas amostras e as variáveis pelas colunas. Entretanto, é

necessária uma matriz **Y**, que é o parâmetro (s) a ser previsto pelo modelo. Neste estudo os valores de referência do teor de fibras foram determinados pelo método de Tanimoto descrito no manual CONSECANA [8] e foram estes que constituíram a matriz **Y**.

O processo de modelamento se dá com a construção de dois conjuntos de dados: o de treinamento e o de validação. De um total de 53 amostras, o conjunto de treinamento foi composto por 42 amostras, sendo que 11 amostras ficaram externas a este, constituindo o conjunto de validação.

A avaliação do modelo de PLS foi realizada por meio dos valores de erros quadráticos médios (RMSE, *Root Mean Squares Error*) para o conjunto de dados da calibração (RMSEC, *RMSE of Calibration*), para validação cruzada (RMSECV, *RMSE of Cross-Validation*) e para o conjunto de validação (RMSEV, *RMSE of Validation*).

Os valores de RMSEC, RMSECV e RMSEV podem ser calculados por meio das Equações 3, 4 e 5 respectivamente:

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - k - 1}}$$

Equação (3)

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

Equação (4)

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

Equação (5)

Onde n é o número total de amostras do conjunto, y_i é o valor medido experimentalmente, $\hat{y}_i$ é o valor previsto pelo modelo e k é o número de variáveis latentes (LV, *Latent Variable*) utilizadas na construção do modelo PLS.

A transformação e o pré-processamento dos espectros LIBS foram mantidos conforme efetuado para a análise exploratória com a PCA. A diferença do PLS para o modelo da PCA é que as 53 amostras foram separadas em conjuntos de treinamento e de validação. A composição das amostras para ambos os conjuntos foi aleatória e compreendeu faixas para o teor de fibras (%) que variaram entre 10,5 e 21,6 e entre 12,0 e 17,8 para os conjuntos de treinamento e de validação, respectivamente.

A seguir serão descritos uma série de modelos que foram investigados para atingir o menor valor de RMSE para a previsão do teor de fibras. Os valores de resíduos foram outra avaliação levada a respeito, ou seja, a diferença entre o teor de fibra obtido experimentalmente e aquele previsto pelo modelo, deveriam ser os mais baixos possíveis. Para cada modelo foi utilizada uma estratégia distinta na seleção de variáveis que estavam relacionadas com as linhas de emissão dos elementos que foram detectados pela LIBS para o bagaço de cana.

O primeiro modelo foi calculado com todas as variáveis (12288), onde foram necessárias 4 LV com um total de 48% da variância explicada. Os valores de RMSE em % para o conjunto de treinamento (RMSEC) e para a validação cruzada (RMSECV) foram aproximadamente da mesma ordem, igual a 2,4 e para o de validação (RMSEV) foi de 3,1%. Os valores de RMSE apresentaram diferentes magnitudes entre os conjuntos de treinamento e validação. Este resultado indicou, que o modelo previsto não conseguiu prever apropriadamente os valores de referência, com valores de resíduos entre -6,3 e 4,0% para o conjunto de treinamento e -2,0 e 5,8% para o conjunto de validação.

No segundo modelo avaliado, utilizou-se uma seleção de variáveis baseada nos valores de *loadings* obtidos na PCA tendo como referência a linha

atômica do C em 193,01 nm. Sob este critério foram selecionadas variáveis considerando valores em módulo, maiores que 0,05, que totalizaram 114. O número de LV empregadas foram 2, cuja variância explicada atingiu 78%. Os valores em % de RMSEC, RMSECV e RMSEV foram 3,0, 2,9 e 2,6, respectivamente para este modelo. Entretanto, verificou-se que mesmo com uma menor magnitude dos erros de RMSE, quando comparado ao modelo anterior, os resíduos foram altos, da ordem entre -4,4 e 7,9% para o conjunto de treinamento e entre -2,3 e 5,2% para o de validação.

Uma terceira proposta foi aquela envolvendo as linhas de emissão dos constituintes majoritários da fibra do bagaço, sendo estes os elementos C, H e O, representados pelas linhas de C (I) 193,01 e 247,82 nm, H (I) 486,13 e 656,27 nm e O (I) 777,42 e 844,64 nm. Após a seleção destas linhas, foi gerada uma matriz de 53 x 446. Um total de 4 LV explicou 48% da variância dos dados. Os valores (em %) dos RMSECV, RMSEC e RMSEV foram 2,3, 2,4 e 3,2. Neste modelo, não foi verificada uma melhora no modelo de previsão visto que os resíduos foram entre -6,2 e 4,5% e entre -2,2 e 5,9% para o conjunto de treinamento e de validação, respectivamente.

Foi realizada uma quarta avaliação utilizando as seguintes linhas de emissão que foram detectadas para os macronutrientes: Mg (II) 279,56 e 280,25 nm, Ca (II) 393,37 e 396,85 nm, N (I) 742,44, 744,17, 746,88, 818,80, 821,66, 822,30, 859,35, 862,85, 868,01 e 868,32 nm e K (I) 766,34 e 769,81 nm com um total de 172 variáveis. Foram utilizadas 2 LV, que acumularam um total de 92% da variância explicada dos dados. Os valores encontrados de RMSECV, RMSEC e RMSEV (em %) foram de 2,7, 2,9 e 2,5, respectivamente. Os valores de

resíduos para os conjuntos de treinamento e de validação foram entre -5,2 e 6,8% e entre -1,4 e 4,3% respectivamente.

Para fins comparativos, um quinto modelo foi calculado utilizando as linhas de emissão dos micronutrientes representadas somente pelo elemento Na (I) 588,92 e 589,53 nm, totalizando 11 variáveis. Com este número de variáveis foi necessária apenas 1 LV correspondendo a 64% da variância explicada. Os valores de RMSECV e RMSEC foram aproximadamente 2,7% para ambos, e o valor de RMSEV calculado foi de 2,4%. Particularmente neste modelo, os valores previstos pelo modelo PLS ficaram entre 11,6 e 14,7% para o conjunto de treinamento. Visto que a faixa dos valores de referência era mais ampla, variando entre 10,5 e 21,6%, o que evidenciou que o modelo não refletiu as diferenças apresentadas pelos valores de referência.

Com os modelos estudados até este ponto, verificou-se que a escolha das linhas de emissão mais representativas precisariam ser melhor exploradas com um modelo mais robusto.

Assim sendo, como alternativa, optou-se também em construir os modelos multivariados utilizando um PLS por intervalos (i-PLS), onde o espectro foi dividido em n intervalos iguais que foram combinados entre si [53], configurando-se como a sexta avaliação.

Com esta ferramenta quimiométrica, cada intervalo representou uma faixa de comprimento de onda. A vantagem do i-PLS é que este pode ampliar uma possibilidade de combinações de modelos, explorando toda a informação analítica gerada pelas linhas de emissões de elementos químicos distintos, inclusive levando em consideração possíveis efeitos interelementares [42].

Neste contexto, os espectros LIBS foram divididos em 5 intervalos iguais conforme mostra a Figura 8, com os quais foram calculados 5 modelos individuais com cada uma das faixas espectrais, 10 modelos utilizando informação de comprimentos de onda de 2 faixas espectrais diferentes, 10 com combinações de 3 intervalos e 5 modelos com 4 intervalos.

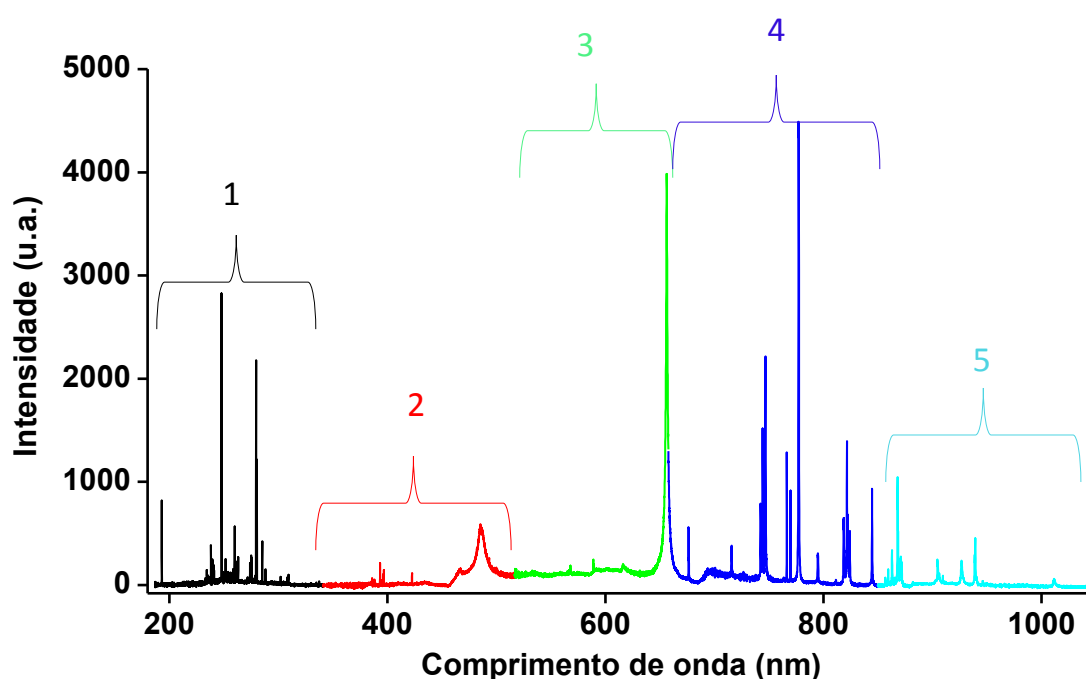


Figura 8: Exemplo de um espectro LIBS evidenciando os 5 intervalos com comprimentos de onda distintos que foram combinados para os modelos i-PLS.

Por meio destes novos modelos, duas linhas de emissão iônicas que apresentaram grande importância foram as do Mg nos comprimentos de onda (nm) de 279,56 e de 280,25. O Mg é um dos macronutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas. O referido elemento é encontrado na molécula da clorofila e atua como cofator em diversos processos enzimáticos,

sendo responsável também pela agregação de subunidades dos ribossomos necessários para a síntese proteica [54].

A Tabela 4 descreve detalhadamente a faixa espectral de cada um dos intervalos, com as respectivas linhas de emissão de cada elemento químico que foram detectadas para as amostras de bagaço de cana.

Tabela 4: Descrição das faixas espectrais e linhas de emissão detectadas nos intervalos avaliados nos modelos i-PLS.

Intervalo	Faixa (nm)	Linhas de emissão observadas (nm)
1	186,87 – 341,10	C (I) 193,01 e 247,82, Mg (II) 279,56 e 280,25
2	341,18 – 516,62	Ca (II) 393,34 e 396,85, H (I) 486,13
3	516,69 – 657,67	Na (I) 588,92 e 589,53, H (I) 656,27
4	657,72 – 849,48	N (I) 742,44, 744,17, 746,88, 818,80, 821,66 e 822,30, K (I) 766,34 e 769,81, O (I) 777,42 e 844,64,
5	849,57 – 1042,03	N (I) 859,35, 862,85, 868,01, 868,32 e 871,17

Na Figura 9 são avaliadas a magnitude dos valores de RMSECV dos 30 modelos resultantes das combinações dos intervalos determinados no i-PLS.

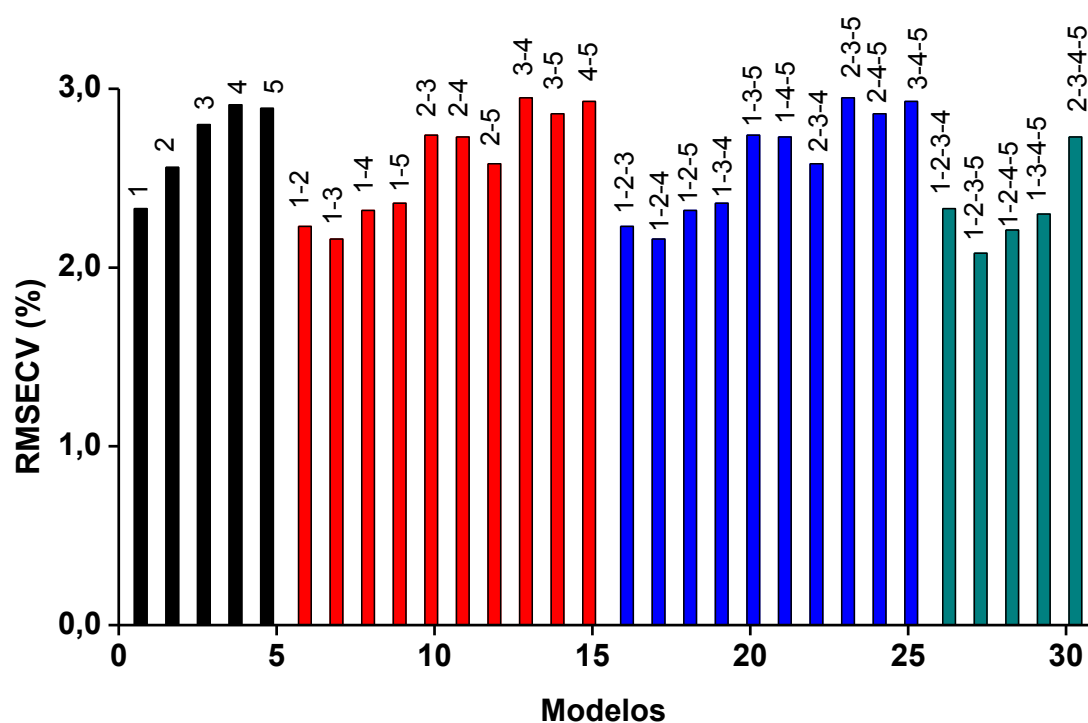


Figura 9: Valores de RMSECV para os 30 modelos avaliados no i-PLS.

Observando a Figura 9 e também a Tabela 5, onde são resumidos os resultados dos melhores modelos calculados pelo i-PLS, o modelo utilizando a combinação dos intervalos 1 e 3, apresentou a magnitude do valor de RMSECV na ordem de 2,2%, esta faixa contém as linhas atômicas de C, Na e H e a iônica de Mg. Os valores calculados foram da ordem de 2,3% para o RMSEC e 2,7% para o RMSEV. A partir dos valores obtidos, foi verificada a mesma magnitude dos erros de RMSE encontrados. Os resíduos variaram entre -4,2 e 4,9% para o conjunto de treinamento e entre -2,9 e 4,4% para o de validação.

Tabela 5: Resumo dos modelos mais promissores calculados pelo i-PLS.

Combinações	Variáveis	LV	Variância explicada (%)	RMSEC (%)	RMSECV (%)	RMSEV (%)
1-2-5	7388	3	43	2,2	2,1	2,9
1-2-3-5	9838	3	38	2,2	2,1	2,8
1-3-5	7388	3	40	2,2	2,1	2,7
1-3	4900	3	43	2,3	2,2	2,7
1-2-3	7350	3	40	2,3	2,2	2,7

Estes resultados são coerentes com a matriz analítica em questão, pois a fibra do bagaço apresenta grande quantidade de C em sua composição, e o Mg está intimamente ligado a molécula de clorofila, assim como a presença de linhas de H são explicadas devida a umidade nas amostras e também pela composição química das moléculas de celulose, hemicelulose e lignina [5, 21, 22, 51].

Desta forma, com o uso da LIBS foi possível avaliar toda a composição química da amostra, levando-se em conta as linhas de emissão referente à parte orgânica e inorgânica. Os modelos calculados empregando apenas os constituintes majoritários (linhas de C, H e O) ou somente aqueles inorgânicos (macro e micronutrientes) apresentaram bons resultados, entretanto, os valores dos resíduos foram altos. Denota-se que a utilização das informações espectrais

combinadas proporcionou uma melhora significativa em modelos com valores de resíduos mais baixos.

O sétimo e último modelo foi calculado utilizando o critério de seleção de variáveis a partir dos valores dos coeficientes de regressão obtidos pelo cálculo do PLS empregando todas as variáveis do espectro, tendo novamente como referência a linha atômica do C em 193,01 nm. A Figura 10 mostra os resultados para os teores de fibra previstos por este modelo PLS com coeficiente de correlação de 0,6. Este foi considerado o melhor dentre todos aqueles avaliados pois, com 3 LV, que acumularam um total de 41% da variância explicada foram atingidos os valores de RMSECV e RMSEC mais concordantes entre si, de 2,1% e de 2,2%, respectivamente.

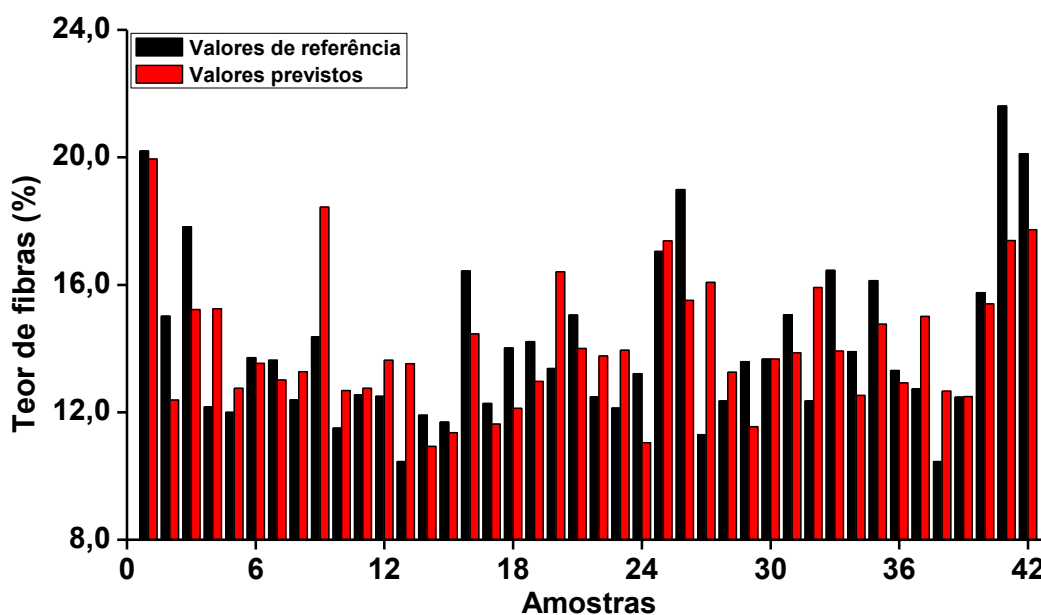


Figura 10: Comparação entre os valores de referência e aqueles previstos pelo modelo PLS utilizando a seleção de 119 variáveis para o conjunto de treinamento.

As variáveis que apresentaram valores maiores, em módulo, que 1,0 foram mantidas, dessa forma, foram selecionadas 119 variáveis. Nesta nova seleção de variáveis foram incluídas as seguintes linhas de emissão: C (I) 193,01 e 247,82 nm, Mg (II) 279,56 e 280,25 nm, Ca (II) 393,37 e 396,85 nm, Na (I) 588,92 e 589,53 nm, H(I) 656,27 nm, N (I) 744,17, 746,88, 821,66 e 868,32 nm e K (I) 766,34 e 769,81 nm.

Com a Figura 11 podem ser verificados os teores de fibras previstos pelo modelo PLS com as 119 variáveis para as amostras que compuseram o conjunto de validação com magnitude de 2,4%.

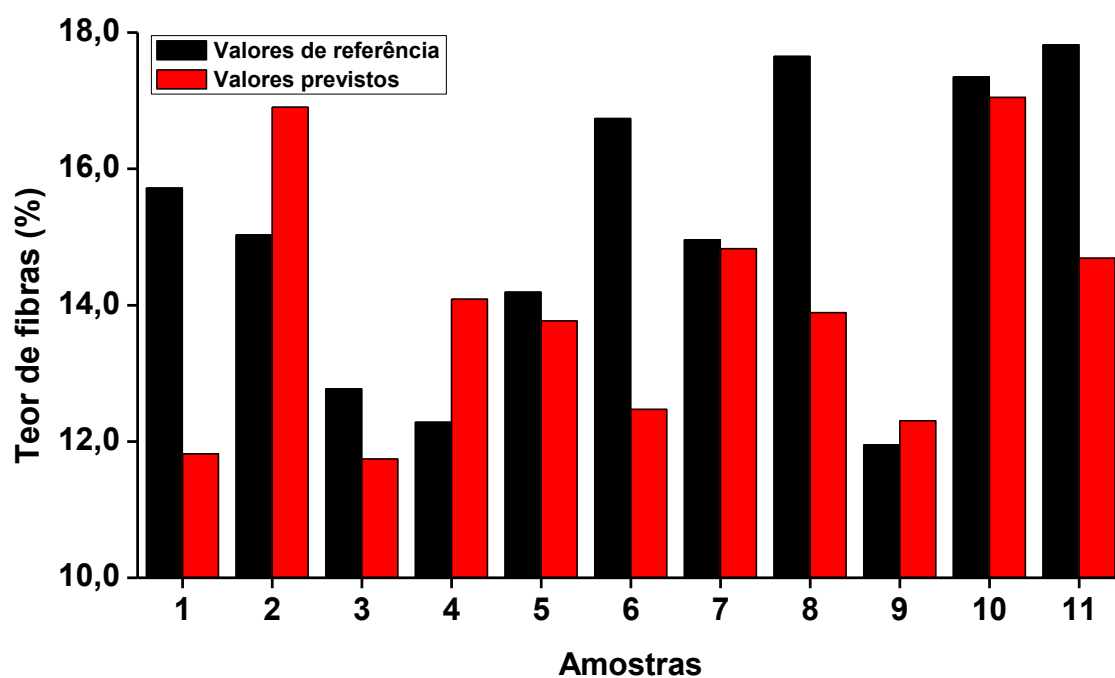


Figura 11: Comparação entre os valores de referência e aqueles previstos pelo modelo PLS utilizando a seleção de 119 variáveis para o conjunto de validação.

A distribuição dos resíduos para este último modelo foi aleatória, tanto para o conjunto de treinamento como para o de validação, como pode ser confirmado por meio das Figuras 12a e 12b.

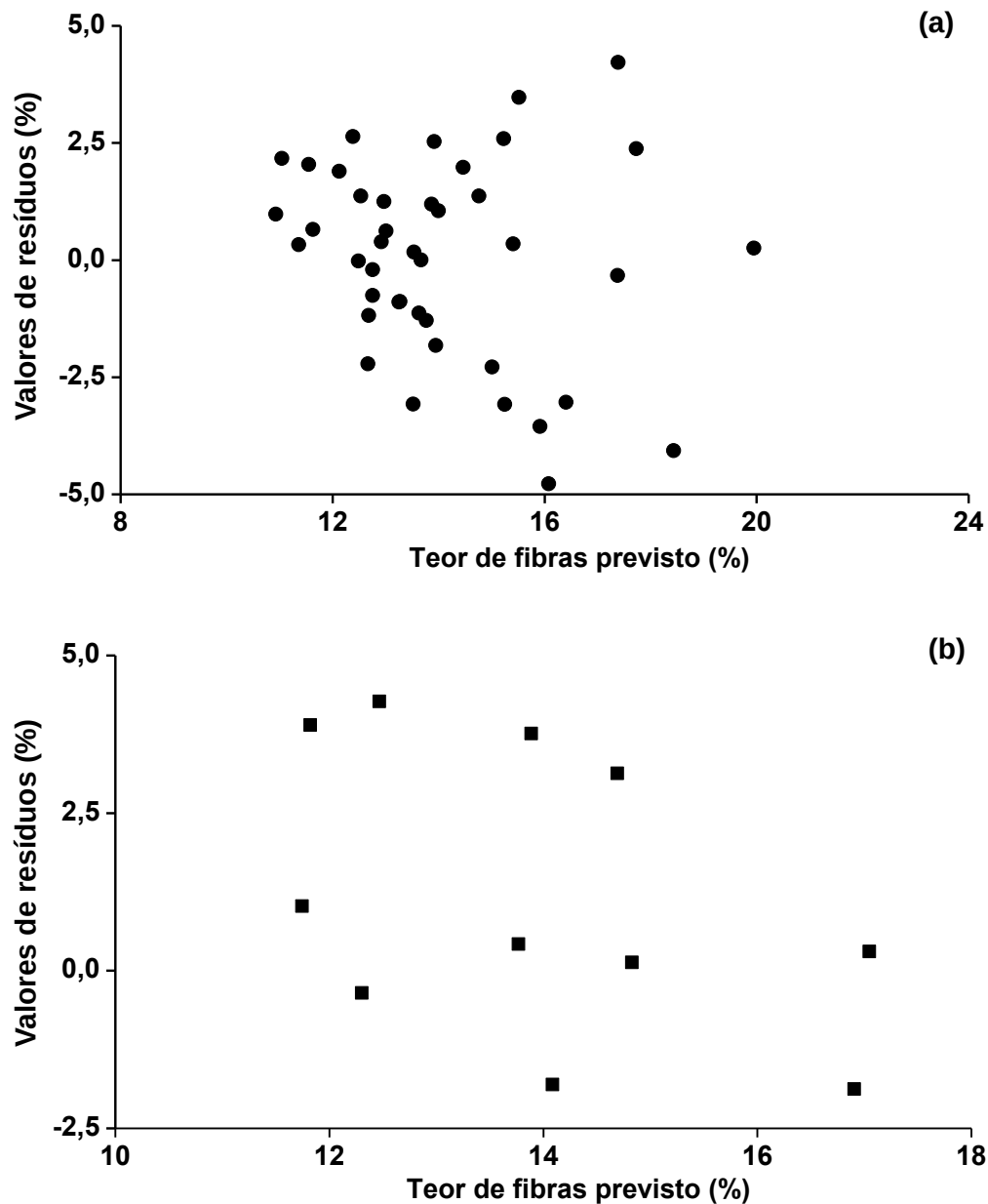


Figura 12: Valores de resíduos para os conjuntos de treinamento (a) e de validação (b), em relação aos valores previstos pelo modelo PLS, utilizando a seleção de 119 variáveis.

Em ambos os casos foi verificado que os resíduos não apresentaram heterocedasticidade, o que significa que não possuíam tendência de serem altos quando os valores do teor de fibras eram maiores e vice-versa.

Vale ressaltar que estes modelos tentaram se aproximar ao máximo da realidade de uma usina sucroalcooleira. Por conseguinte, todos estes resultados demonstram potencialidade para prever o teor de fibras, com base em seus constituintes elementares detectados pela técnica LIBS e ainda considerando interferentes e umidade como abordado no início desta seção.

A Tabela 6 resume todos os parâmetros avaliados para cada um dos modelos investigados neste estudo de mestrado, na sequência em que foram discutidos, evidenciando o número de variáveis envolvidas, os valores de RMSE e os de resíduos.

Tabela 6: Comparação de todos os modelos investigados neste estudo de mestrado.

Modelo	Variáveis	RMSEC (%)	RMSECV (%)	RMSEV (%)	Faixa dos valores de resíduos (%)	
					Conjunto de treinamento	Conjunto de validação
(1) Todo espectro	12288	2,4	2,4	3,1	-6,3 e 4,0	-2,0 e 5,8
(2) Valores de <i>loadings</i> > 0,05	114	3,0	2,9	2,6	-4,4 e 7,9	-2,3 e 5,2
(3) Constituintes majoritários	446	2,4	2,3	3,2	-6,2 e 4,5	-2,2 e 5,9
(4) Macronutrientes	172	2,9	2,7	2,5	-5,2 e 6,8	-1,4 e 4,3
(5) Micronutrientes	11	2,7	2,7	2,4	-3,6 e 7,5	-2,1 e 4,8
(6) i-PLS (1-3)	4900	2,3	2,2	2,7	-4,2 e 4,9	-2,9 e 4,4
(7) Coeficientes de regressão > 1,0	119	2,2	2,1	2,4	-4,8 e 4,2	-1,9 e 4,3

5 Conclusões

Com as ferramentas quimiométricas utilizadas nesta dissertação, tais como o planejamento fatorial, pode-se verificar que o parâmetro instrumental tamanho do *spot* não apresentou efeito significativo. Já a potência do laser e o tempo de atraso, devem ser empregados nos níveis alto e baixo, respectivamente.

Ao todo foram propostos sete modelos multivariados por meio de abordagens distintas. Nestes modelos foram utilizados espectros LIBS, correlacionados aos valores de referência medidos pelo método padrão para o teor de fibras em bagaço de cana-de-açúcar.

Um melhor resultado foi alcançado com erros quadráticos da ordem de 2%, com uma seleção de variáveis a partir dos valores dos coeficientes de regressão que teve como referência a linha atômica do C (193,01 nm).

Limitações importantes da matriz analítica sob estudo foram contornadas, tais como a presença de interferentes, a umidade e principalmente o efeito da geometria da amostra.

Este estudo ampliou uma perspectiva na determinação do teor de fibras em bagaço de cana-de-açúcar para as usinas sucroalcooleiras, visto que ainda não existe um material de referência com uma boa identidade de matriz analítica.

Referências

- 1 KARP, S. G. et al. Pretreatment strategies for delignification of sugarcane bagasse: a review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 4, p. 679-689, 2013.
- 2 UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Produção**: histórico de produção e moagem: cana-de-açúcar. Disponível em:
< <http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=31&tipoHistorico=2&acao=visualizar&idTabela=1611&produto=cana&safralni=2012%2F2013&safraFim=2013%2F2014&estado=RS%2CSC%2CPR%2CSP%2CRJ%2CMG%2CES%2CMS%2CMT%2CGO%2CDF%2CBA%2CSE%2CAL%2CPE%2CPB%2CRN%2CCE%2CPI%2CMA%2CTO%2CPA%2CAP%2CRO%2CAM%2CAC%2CRR>>. Acesso em: 15 jul. 2015.
- 3 MATSUOKA, S. et al. Energy cane: its concept, development, characteristic and prospect. **Advances in Botany**, v. 2014, 2014. doi: 10.1155/2014/597275.
- 4 KIM, M.; DAY, D. F. Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 803-807, 2011.
- 5 OGATA, B. H. **Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial de uso em biorrefinarias**. 2013. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- 6 MORETTI, M. M. S. et al. Pretreatment of sugarcane bagasse with microwave irradiation and its effect on the structure and on enzymatic hydrolysis. **Applied Energy**, v. 122, p. 189-195, 2014.
- 7 EL HADDAD, J.; CANIONI, L.; BOUSQUET, B. Good practices in LIBS analysis: review and advices. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 101, p. 171-182, 2014.
- 8 CONSELHO DOS PRODUTORES DE CANA-DE-AÇÚCAR, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Manual de instruções**. 5. ed. Piracicaba, 2006. 111 p.
- 9 SANTOS JUNIOR, D. et al. Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) – fundamentos, aplicações e perspectivas. **Revista Analytica**, n. 24, p. 72-81, ago./set. 2006.
- 10 CREMERS, D. A.; RADZIEMSKI, L. J. **Handbook of laser-induced breakdown spectroscopy**. Chichester: John Wiley & Sons, 2006. 313 p.

- 11 MIZIOLEK, A. W.; PALLESCHI, V.; SCHECHTER, I. (Ed.). **Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS): fundamentals and applications**. Cambridge: Cambridge University Press, 2006. 640 p.
- 12 PASQUINI, C. et al. Laser induced breakdown spectroscopy. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 3, p. 463-512, 2007.
- 13 SOBRAL, H.; SANGINÉS, R. Comparison of plasma parameters and line emissions of laser-induced plasmas of an aluminum target using single and orthogonal double nanosecond/picosecond pulses. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 94/95, p. 1-6, 2014.
- 14 KASEM, M. A. et al. Effect of the wavelength on laser induced breakdown spectrometric analysis of archaeological bone. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 101, p. 26-31, 2014.
- 15 ELSHERBINY, N.; NASSEF, O. A. Wavelength dependence of laser induced breakdown spectroscopy (LIBS) on questioned document investigation. **Science & Justice**, v. 55, n. 4, p. 254-263, 2015.
- 16 TRIPATHI, D. K. et al. Laser-induced breakdown spectroscopy for the study of the pattern of silicon deposition in leaves of *Saccharum* species. **Instrumentation Science & Technology**, v. 39, p. 510-521, 2011.
- 17 YAO, M. et al. Assessment of feasibility in determining of Cr in Gannan Navel Orange treated in controlled conditions by laser induced breakdown spectroscopy. **Optics & Laser Technology**, v. 52, p. 70-74, 2013.
- 18 SIRVEN, J. B. et al. Feasibility study of rock identification at the surface on Mars by remote laser-induced breakdown spectroscopy and three chemometric methods. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 22, n. 12, p. 1471-1480, 2007.
- 19 AGUILERA, J. A.; ARAGÓN, C. Characterization of a laser-induced plasma by spatially resolved spectroscopy of neutral atom and ion emissions. Comparison of local and spatially integrated measurements. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 59, p. 1861-1876, 2004.
- 20 LEAL, M. R. L. V. et al. Sugarcane straw availability, quality, recovery and energy use: a literature review. **Biomass and Bioenergy**, v. 53, p. 11-19, 2013.
- 21 RODRIGUES, J. D. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, 1995. 99 p.
- 22 SALIBA, E. O. S. et al. Ligninas - métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 917-928, 2001.
- 23 CARVALHO, E. et al. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191-2195, 2009.

24 LIMA, U. de A. (Coord.). **Agroindustrialização de frutas**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 2008. 164 p. (Biblioteca de ciências agrárias Luiz de Queiroz, v. 5).

25 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16228**: cana-de-açúcar: terminologia. Rio de Janeiro, 2013. 3 p.

26 VIAN, C. E. F. **Qualidade da matéria-prima**. Campinas: Agência Embrapa de Informação Tecnológica [2009]. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_138_22122006154842.html>. Acesso em: 11 mar. 2015.

27 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16271**: cana-de-açúcar: determinação da qualidade. Rio de Janeiro, 2014. 13 p.

28 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16225**: cana-de-açúcar: determinação do teor de fibra % cana pelo método de Tanimoto. Rio de Janeiro, 2013. 3 p.

29 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16224**: cana-de-açúcar: determinação da pol por sacarimetria no visível. Rio de Janeiro, 2013. 3 p.

30 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16223**: cana-de-açúcar: determinação do brix refratométrico do caldo. Rio de Janeiro, 2013. 2 p.

31 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16221**: cana-de-açúcar: extração do caldo pelo método da prensa hidráulica. Rio de Janeiro, 2013. 2 p.

32 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16226**: cana-de-açúcar: preparo e homogeneização da amostra. Rio de Janeiro, 2013. 2 p.

33 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16252**: cana-de-açúcar: cálculo de açúcares redutores (AR) no caldo em função da pureza. Rio de Janeiro, 2013. 1 p.

34 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16251**: cana-de-açúcar: cálculo da fibra % cana: determinação das constantes da equação para uso no cálculo, pelo peso do bolo úmido. Rio de Janeiro, 2013. 2 p.

35 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16253**: cana-de-açúcar: determinação de açúcares redutores em caldo de cana. Rio de Janeiro, 2013. 7 p.

- 36 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16222**: cana-de-açúcar: extração do caldo pelo método extrator a frio. Rio de Janeiro, 2013. 1 p.
- 37 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16227**: cana-de-açúcar: determinação do índice de preparo. Rio de Janeiro, 2013, 2 p.
- 38 SOROL, N. et al. Visible/near infrared-partial least-squares analysis of Brix in sugar cane juice. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 102, p. 100-109, 2010.
- 39 MAT, N. N. et al. Prediction of sugarcane quality parameters using visible-shortwave near infrared spectroradiometer. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 2, p. 136-146, 2014.
- 40 VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Validation of multivariate calibration models in the determination of sugar cane quality parameters by near infrared spectroscopy. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 18, n. 2, p. 259-266, 2007.
- 41 SOUZA, P. F. et. al Determination of silicon in plant materials by laser induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 83/84, p. 61-65, 2013.
- 42 NUNES, L. C. et al. Optimization and validation of a LIBS method for the determination of macro and micronutrientes in sugar cane leaves. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 9, p. 1453-1460, 2010.
- 43 DEVEY, K. et al. Pasture vegetation elemental analysis by laser-induced breakdown spectroscopy. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 46, n. 9, p. 72-80, 2015.
- 44 PEREIRA, F. M. V. et al. Evaluation of the effects of *Candidatus Liberibacter asiaticus* on inoculated citrus plants using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) and chemometrics tools. **Talanta**, v. 83, n. 2, p. 351-356, 2010.
- 45 NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **NIST atomic spectra database lines form**. Disponível em: <http://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines_form.html>. Acesso em: 27 jan. 2015.
- 46 NOVACANA.COM. **Como é feito o processamento da cana-de-açúcar nas usinas**. Disponível em: <<http://www.novacana.com/usina/como-e-feito-processamento-cana-de-acucar/>>. Acesso em: 30 jun. 2015.
- 47 GELADI, P.; KOWALSKI, B. Partial least-squares regression: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**. v. 185, p. 1-17, 1986.

48 BARROS NETO, B.; SCARMINO, I. S.; BRUNS, R. E. Como variar tudo ao mesmo tempo. In: _____. **Como fazer experimentos**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. Cap. 3, p. 99-163.

49 PEREIRA FILHO, E. R. Planejamento fatorial completo. In: _____. **Planejamento fatorial em química**. São Carlos: EdUFSCar, 2015. Cap. 1, p. 11-29.

50 GELADI, P. Chemometrics in spectroscopy. Part 1: classical chemometrics. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**. v. 58, n. 5, p. 767-782, 2003.

51 MOURA FILHO, G. et al. Diagnose nutricional de variedades de cana-de-açúcar em argissolos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 11, p. 1102-1109, 2014.

52 BENETT, C. G. S. et al. Fontes e doses de manganês no acúmulo de nutrientes na palhada em cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, v. 28, p. 8-16, Mar. 2012. Supplement 1.

53 NORGAARD, L. et al. Interval Partial Least-Squares Regression (iPLS): a comparative chemometric study with an example from near-infrared Spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 54, n. 3, p. 413-419, 2000.

54 CHOU, T. S. et al. Effects of magnesium deficiency on antioxidant status and cadmium toxicity. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 10, p. 1021-1030, 2011.