



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO EM ANÁLISES DE
SOLOS E PLANTAS**

ANA PAULA DOS SANTOS

ANA PAULA DOS SANTOS

ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO EM ANÁLISES DE
SOLOS E PLANTAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-
graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração
em Solos, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Gaspar Henrique Körndorfer

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

ANA PAULA DOS SANTOS

ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO EM ANÁLISES DE SOLOS
E PLANTAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-
graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração
em Solos, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 06 de junho de 2011.

Prof. Dr. Waldomiro Borges Neto

UFU

Prof. Dr. Hamilton Seron Pereira

UFU

Prof. Dr. Guilherme Bossi Buck

UNEMAT

Prof. Dr. Gaspar Henrique Körndorfer
ICIAG-UFU
(Orientador)

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

DEDICATÓRIA

À minha mãe,
Maria Santana Pereira dos Santos
e ao meu esposo,
Valter Antonio Silva.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda graça concedida

A minha mãe e avó, por todo amor e carinho

Ao meu esposo Valter, pelo apoio e paciência

A minha amiga e irmã em Cristo: Josefa, pelas orações

Aos laboratórios LAFER, LABAS, LAMAS, e UBERSOLO seus técnicos e funcionários

A professora Adriane Andrade, professor Elias Nascentes e ao professor Lísias Coelho

Aos professores Guilherme Buck e Hamilton pela importante participação na banca

À FEMTO e seu técnico Francisco pelos esclarecimentos e treinamento

Aos amigos de pós-graduação: Robson, Ivaniele, Lilian, Lucélia...

Aos amigos do Grupo de Pesquisa sobre Silício na Agricultura - GPSi, pelo apoio na realização do trabalho: Gustavo, Douglas, Mariana, Giovanna...

Ao professor Dr Heitor Cantarella do IAC pela gentileza em fornecer amostras

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, pelo apoio financeiro

Agradeço especialmente ao Professor Dr. Gaspar Henrique Korndörfer, pela oportunidade e ao Prof. Dr. Waldomiro pelas sugestões no decorrer da redação do trabalho, assim como seus orientados Hery e Paulo Pimenta pela ajuda no desenvolvimento dos modelos.

Obrigada!

EPÍGRAFE

“... Ao transferir bens materiais, o doador perde a sua posse. Há, porém, alguns atributos intrínsecos que não podem ser transferidos de um indivíduo para o outro, como a beleza e a coragem. O conhecimento, por outro lado, é algo tão importante que Deus decidiu que o doador pode retê-lo mesmo que o tenham transmitido...”.

Adaptado de Pitágoras de Samos, cerca de 2.500 anos atrás.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO	04
2.1 Silício no solo.....	04
2.2 Matéria orgânica no solo.....	07
2.3 Argila no solo.....	08
2.4 Nitrogênio foliar.....	10
2.5 Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR).....	11
2.5.1 Princípios da Espectroscopia NIR.....	12
2.5.2 Aplicações da Espectroscopia NIR.....	15
2.6 Métodos de análise multivariada	17
2.6.1 Quimiometria.....	18
2.6.2 Calibração multivariada.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Obtenção das amostras.....	24
3.2 Equipamento NIR.....	25
3.3 Procedimentos analíticos.....	27
3.3.1 Análise de solos.....	27
3.3.2 Análises foliares.....	29
3.4 Análise de dados.....	30
3.4.1 Cálculo dos erros.....	30
3.4.2 Linearidade dos modelos e Teste de hipóteses.....	31

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Desenvolvimento de modelos em Espectroscopia NIR para análise de solos.....	33
4.1.1 Calibração e validação de modelos para análises de silício solúvel, matéria orgânica e argila em solos.....	34
4.2 Desenvolvimento de modelos em Espectroscopia NIR para análises foliares.....	46
4.2.1 Calibração de modelos para análise de nitrogênio total em folhas de milho e soja.....	46
5 CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	54

RESUMO

SANTOS, ANA PAULA DOS. **Espectroscopia de infravermelho próximo em análises de solos e plantas**. 2011. 63 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Solos) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia¹.

As análises de solos e plantas, essenciais no manejo da adubação das culturas, estão baseadas em metodologias que consomem tempo e reagentes. A espectroscopia de infravermelho próximo (NIR – *Near-infrared*) tem se mostrado uma alternativa mais rápida e limpa para quantificação simultânea de compostos. Objetivou-se nesse trabalho avaliar as metodologias baseadas na região NIR, aliada a métodos de calibração multivariada para estimar teores de silício (Si), matéria orgânica (M.O.) e argila em solos e, nitrogênio total (N-Total) em folhas de milho e soja. Para isto, 170 amostras de solos foram utilizadas para a calibração de modelos de análises de solos e 109 amostras de folhas (58 de milho e 51 de soja), sendo seus espectros obtidos em um espectrofotômetro de infravermelho próximo modelo NIR 900PLS pertencente ao Laboratório de Fertilizantes da Universidade Federal de Uberlândia (LAFER), em Uberlândia-MG, onde os modelos foram construídos. O método matemático utilizado foi o de mínimos quadrados parciais: PLS (*Partial Least Squares*). A validação dos modelos foi cruzada e o número de variáveis latentes variaram entre 5 e 8. Os métodos de referência comparados foram: colorimétrico com extração por cloreto de cálcio ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) para análise do Si solúvel no solo, Walkley-Black colorimétrico para análise de M.O. e o método da Pipeta para análise da argila. Os modelos para determinação do N-Total foram comparados ao método Semimicro-Kjeldahl. Após a calibração e validação cruzada, foi feita a previsão dos modelos onde os resultados foram avaliados através do coeficiente de correlação (r), pelos erros de calibração (RMSEC) e previsão (RMSEP), e erro relativo percentual (ER), além disso, um teste “t” de student a 0,05 de significância foi aplicado para testar a igualdade entre as médias. Correlações de 0,71, 0,84 e 0,85 foram obtidas na calibração de modelos para análise do teor de Si no solo, M.O. e argila, respectivamente. A previsão a partir desses modelos apresentou correlações baixas (menores que 0,5) com teste “t” significativo para silício e argila. O RMSEC obtido na análise de Si foi de 2,03, RMSEP de 5,74 e ER de 59,2%. Para M.O. o RMSEC foi de 0,81, RMSEP=1,03 e ER=39,3%. A análise de argila teve RMSEC=11,2, RMSEP=16,55 e ER=34,7%. Na análise do N foliar em milho e soja, foram obtidas na calibração correlações de 0,85 e 0,88, respectivamente. Na previsão de amostras foram conseguidas boas correlações para milho ($r=0,80$) e soja (0,76), com teste “t” não significativo, indicando que para análises foliares os valores previstos pelos modelos NIR-PLS não diferiram dos obtidos pelos métodos de referência. Os erros de calibração e previsão para N em milho e soja foram menores que $5,0 \text{ g kg}^{-1}$, sendo o ER para análise de N em milho (8,3%) maior do que o de soja (5,7%). Os resultados observados demonstram uma maior eficiência no uso do infravermelho próximo NIR-PLS para análises foliares do que para análises de solos.

Palavras-Chave: calibração multivariada, *near-infrared* e métodos de análises.

¹Comitê Orientador: Gaspar Henrique Korndörfer - UFU (Orientador)

ABSTRACT

SANTOS, ANA PAULA DOS. **Near-Infrared Spectroscopy in Analysis of soils and plants**. 2011. 63 p. Dissertation (Master in Agronomy / Soils) - Federal University of Uberlandia, Uberlândia¹.

Analyses of soils and plants, essential for crop fertilization management, are based on methodologies that are time and reagent consuming. Near infrared spectroscopy (NIR - Near-infrared) has proven as a faster and cleaner alternative for simultaneous quantification of compounds. This study evaluates the methodologies based on NIR combined with multivariate calibration methods to estimate levels of silicon (Si), organic matter (O.M.) and clay in soils, and total nitrogen (N-Total) in maize and soybean leaves. Calibration of models for soil analysis was done with 170 soil samples while that for leaf analysis used 109 (58 maize and 51 soybean), obtaining their spectra in a near infrared spectroscopy NIR model 900PLS belonging to the Laboratory Fertilizers, Federal University of Uberlandia (Lafer), Uberlândia-MG, where the models were built. The mathematical method used was the partial least squares: PLS. The model validation has been crossed and the number of latent variables ranged between 5 and 8. The reference methods for comparison were: colorimetric-extraction with calcium chloride ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) for analysis of soluble Si in the soil, Walkley-Black Colorimetric analysis of O.M. and the pipette method for clay analysis. The models for determination of N-Total were compared to the Semimicro-Kjeldahl method. After calibration and cross validation, the models were tested and the results evaluated using the correlation coefficient (r), the calibration (RMSEC) and the prediction errors (RMSEP), and relative error (ER). Also, Student's t test at 0,05 significance was used to test for equality between averages. Correlations of 0,71, 0,84 and 0,85 were obtained in the calibration of models for analysis of Si content in the soil, O.M. and clay, respectively. The prediction from these models showed low correlations (lower than 0,5) with significant t test for silicon and clay. The RMSEC obtained from Si analysis was 2,03, RMSEP of 5,74 and ER of 59,2%. To O.M. the RMSEC was 0,81, RMSEP = 1,03 and ER = 39,3%. The analysis of clay presented RMSEC = 11,2, RMSEP = 16,55 and ER = 34,7%. In the analysis of maize and soybean leaf nitrogen calibration correlations of 0,85 and 0,88 were obtained, respectively. Good correlations were obtained for prediction of maize ($r = 0,80$) and soybean (0,76) samples, with non significant t-test, indicating that leaf analysis for the values predicted by the models NIR/PLS did not differ from those of the reference methods. Calibration and prediction errors for N in maize and soybean were smaller than $5,0 \text{ g kg}^{-1}$, and the ER for N analysis in maize (8,3%) greater than that of soybean (5,7%). The observed results demonstrate greater efficiency in the use of near infrared analysis for leaf than for soil analysis.

Keywords: Multivariate calibration, near-infrared, methods of analysis.

¹ Supervisor: Gaspar Henrique Korndörfer – UFU (Advisor)

1 INTRODUÇÃO

Durante as duas décadas finais do século XX, o Brasil assistiu a uma brutal evolução na sua produção agrícola explicada por vários fatores técnicos e comerciais. Entre os fatores técnicos destaca-se o crescimento da produtividade das lavouras conseguido graças a utilização cada vez mais racional de insumos (sementes, adubos e máquinas), entre estes, os fertilizantes e os corretivos agrícolas apresentam-se entre os maiores responsáveis pelo aumento da produtividade.

Entretanto, para promover retornos adequados sobre os investimentos, estes insumos devem ser aplicados corretamente, de modo a atingir alta eficiência. O uso eficiente exige uma diagnose correta de possíveis problemas de fertilidade do solo e nutrição de plantas antes da ação da adubação ou correção do solo. Nesse contexto, a utilização de uma ferramenta de diagnose é necessária com a análise de solo e planta.

Na mesma velocidade em que ocorre o aumento da produção agrícola, cresce também a demanda pelas análises em laboratórios. A análise de solos é uma das principais ferramentas de diagnose para se determinar qual o fertilizante ou corretivo a aplicar e em que doses, sendo considerada a base de um programa de adubação. O interesse maior na análise de solos está na avaliação de suas características químicas (concentração de metais e nutrientes, pH, capacidade de troca catiônica (CTC)), físicas (umidade, porosidade, aeração, densidade, textura) e biológicas (biomassa microbiana, matéria orgânica), os quais são um indicador de sua qualidade. A análise foliar assume um papel importante em um programa de adubação através da diagnose de problemas nutricionais, não só em culturas perenes, mas também em culturas anuais. Estas análises fornecem informações sobre o estado nutricional das plantas, permitindo ao agricultor definir qual a melhor estratégia de adubação para a próxima safra, corrigir deficiência ou toxidez de algum elemento e verificar se o fertilizante aplicado atendeu as necessidades da planta. Permite ainda distinguir sintomas de doenças e pragas que muitas vezes são similares às deficiências nutricionais.

As metodologias adotadas nos laboratórios de análises de solos e plantas são em sua maioria específicas para cada característica ou propriedade avaliada, ou seja, na determinação de um elemento ou característica “x” de uma amostra qualquer, nem sempre se consegue avaliar outro elemento/característica “y” na mesma determinação. Cada procedimento envolve um número grande de etapas, o que torna as metodologias demoradas e algumas vezes de difícil execução, e com probabilidade alta de ocorrência

de erros. Além disso, são análises que demandam a utilização de um grande número de reagentes - potencialmente tóxicos a saúde humana e ao meio ambiente – sendo estes problemas agravados quando há a necessidade de analisar muitas amostras, elevando os custos.

Novos procedimentos analíticos vêm sendo testados que consistem na utilização do sistema de infravermelho próximo (NIR - *Near Infrared*). A espectroscopia NIR efetua análises de moléculas orgânicas (e algumas inorgânicas) através do princípio de emissão de radiação eletromagnética que ao incidir sobre uma amostra sólida finamente moída ou líquida, obtém-se uma quantidade de energia capaz de fazer vibrar as ligações químicas que unem os átomos. Esta vibração difere conforme o tipo de ligação e é transformada matematicamente na concentração do nutriente que se deseja determinar.

A metodologia baseia-se na aplicação da matemática, estatística e lógica à química (quimiometria) integrando a espectroscopia e computação de dados. Métodos quimiométricos, mais especificamente, os métodos de calibração multivariada de dados, permitem a determinação de propriedades químicas e físicas de amostras ativas na região do infravermelho, isso tem sido feito principalmente pela regressão de quadrados mínimos parciais (PLS – *Partial Least Squares*) (BORGES NETO, 2005). Pelo modelo estatístico dos métodos multivariados muitas características ou propriedades podem ser analisadas simultaneamente, permitindo em um único procedimento obter múltiplas informações de um mesmo material.

O sistema NIR pode vir a substituir grande parte das metodologias comumente adotadas nos laboratórios, garantindo a qualidade e as especificidades necessárias para cada análise. As maiores vantagens da técnica NIR são velocidade de análise, simplicidade em preparação de amostra, menor mão de obra, não utilização de reativos químicos, e, principalmente a multiplicidade de análise (OSBORNE et al., 1993; DEAVILLE; FLINN, 2000). Ao contrário das análises químicas convencionais, as análises espectroscópicas são análises não destrutivas, simples e rápidas que podem ser executadas sem mão de obra especializada.

A espectroscopia no NIR preenche praticamente todos os quesitos citados para atender a crescente demanda de análises nos laboratórios, sendo utilizada cada vez mais como uma ferramenta analítica. Tem sido uma tecnologia largamente aplicada na análise de alimentos, de produtos farmacêuticos, produtos da indústria de polímeros e petróleo e na agricultura. Embora alguns trabalhos demonstrem a capacidade do NIR em prever propriedades químicas e biológicas, bem como o teor de nutrientes em

plantas e também alguns constituintes (matéria orgânica, argila, alumínio e fósforo, por exemplo) e propriedades (capacidade de troca catiônica, pH e saturação por bases) de solos, a pesquisa ainda necessita de suporte, pois a técnica NIR ainda não é comumente utilizada como análise de rotina.

Objetivou-se nesse trabalho avaliar as metodologias baseadas na região do infravermelho próximo, aliada ao método de calibração multivariada por quadrados mínimos parciais, para estimar (determinar) teores de silício, matéria orgânica e teor de argila em diferentes tipos de solos e, nitrogênio em folhas de milho e soja.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Silício no solo

O silício é um elemento extremamente abundante na crosta terrestre, sobrepujado apenas pelo oxigênio. Na natureza, é encontrado na forma de silicatos ($\text{Si}_a\text{O}_b\text{X}_c$), sendo X representando um ou mais cátions tais como alumínio (aluminossilicatos), magnésio (talco) e cálcio (wollastonita), e principalmente na forma de sílica (SiO_2). A sílica (dióxido de silício) ocorre na forma cristalina (quartzo, cristobalita e tridimita) e na forma amorfa (alofanas e sílicas hidratadas – fitólitos).

Enquanto o quartzo, minerais silicatados, argilas silicatadas e sílica amorfa dominam a fase sólida dos solos, as formas solúveis de silício são constituídas principalmente por ácido monossilícico [H_4SiO_4 ou $\text{Si}(\text{OH})_4$], ácidos polisilícico e complexos orgânicos e inorgânicos de silício (PEREIRA et al., 2010). O ácido monossilícico é a forma absorvida pela planta e sua faixa de concentração típica na solução dos solos é de 0,1 a 0,6 mmol L⁻¹ (EPSTEIN; BLOOM, 2006; BIRCHALL, 1995).

Os principais drenos de silício solúvel para o solo são: a precipitação do silício em solução, formando minerais; a polimerização do ácido silícico; lixiviação; adsorção em óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio e a absorção pelas plantas. As principais fontes incluem a decomposição de resíduos vegetais; dissociação do ácido silícico polimérico; liberação de silício dos óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio; adição de fertilizantes silicatados; água de irrigação e dissolução de minerais cristalinos e não cristalinos (SAVANT et al., 1997).

Conhecer a dinâmica deste elemento no solo e na planta é fundamental para o adequado manejo da adubação silicatada. A fertilização com silício tem mostrado efeitos agronomicamente importantes para várias espécies principalmente para monocotiledôneas como o arroz (*Oryza sativa*) (MA; TAKAHASHI, 1990; KORNDORFER et al., 1999b; FARIA, 2000), a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (DATNOFF et al., 2001; SILVEIRA JÚNIOR et al., 2003) e o trigo (*Triticum aestivum*) (COSTA et al., 2009) e também para algumas dicotiledôneas como soja (*Glycine max*) (NOLLA et al., 2004) e batata (*Solanum tuberosum*) (CARNEIRO et al., 2003). Ao ser absorvido o silício deposita-se no tecido da planta conferindo maior

rigidez, menor acamamento, proteção contra pragas e fungos, redução da evapotranspiração e maior capacidade fotossintética. O efeito direto de fontes silicatadas no solo incluem o seu papel como corretivo da acidez, aumentando o pH do solo, diminuindo os teores e a saturação por alumínio e aumentando a saturação por bases. Promove ainda uma redução dos estresses abióticos, incluindo estresses químicos como a salinidade, toxicidade por metais e desequilíbrio de nutrientes.

A importância do silício para as culturas levou ao desenvolvimento de metodologias que possibilitaram sua quantificação em solos, plantas e fertilizantes. Nos solos, o silício total é facilmente determinado por espectroscopia de fluorescência Raios-X (XRF). Esta é uma análise não destrutiva que requer a preparação de amostras compactadas a partir do material finamente moído. Outras técnicas usadas para análise do silício total requerem uma pré-solubilização do silício através de vários métodos de digestão com ácido fluorídrico ou hidróxidos (PEREIRA et al., 2010). O maior interesse, no entanto está em determinar o silício solúvel no solo, ou seja, aquele que efetivamente é absorvido pela planta. Há uma diversidade de métodos já testados em todo o mundo utilizando diferentes soluções extratoras como água (NONAKA; TAKAHASHI, 1988 e 1990; KORNDORFER et al., 1999a); fosfato de sódio (KATO; SUMIDA, 2000); acetato de amônio (PEREIRA et al., 2007); acetato de amônio com ácido acético (PEREIRA et al., 2009); cloreto de cálcio (GIBSON, 1994; KORNDORFER et al., 1999a) e ácido acético (SNYDER, 2001; PEREIRA et al., 2007; CAMARGO et al., 2005; KORNDORFER et al., 1999a).

A quantidade de silício solúvel varia muito em função da solução extratora. Em geral os melhores extratores são ácidos, mas pode ser aumentada mediante o acréscimo de agentes quelatizantes (PEREIRA et al., 2010). Imaizumi e Yoshida (1958) observaram que o silício no solo foi mais solúvel em ácido do que em soluções neutras e que a extração de silício dos solos, por vários reagentes testados, ocorreu na seguinte ordem: oxalato > citrato > tartarato > acetato > cloreto. Disso concluíram que a dissolução do silício no solo aumenta em consequência da quelatação dos óxidos de ferro e alumínio, que funcionam como fixadores de silicatos no solo. A água não é muito recomendada devido a maior dispersão causada pela baixa força iônica da solução (LINDSAY, 1979).

Os níveis críticos de silício no solo, em relação a algumas espécies de plantas, estão sendo atualmente estabelecidos no Brasil, usando-se como extratores de silício do solo o ácido acético e o cloreto de cálcio (KORNDÖRFER et al., 2001 e 2004). O ácido

acético superestima o teor de silício nos solos, principalmente nos corrigidos com calcário e naqueles que receberam a aplicação de fontes ricas em aluminosilicatos como as escórias de alto-forno (PEREIRA et al., 2004). Em função disso, a extração com cloreto de cálcio ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) tem sido o método comumente adotado nos laboratórios credenciados no Brasil para a determinação do silício solúvel.

O extrator cloreto de cálcio é um sal que tem a capacidade de extrair o silício disponível que se encontra principalmente na solução do solo, podendo extrair algumas formas pouco polimerizadas. Este extrator, ao contrário do que acontece com o ácido acético, não sofre a interferência do calcário recentemente aplicado (KORNDORFER et al., 2004). Após a extração o material passa pelos processos de agitação, decantação e filtragem até ser submetido à adição de reagentes (ácidos tartárico, ascórbico e sulfúrico), sendo determinado por colorimetria.

Como na maioria das análises de constituintes de solos, a determinação de silício é também uma técnica relativamente demorada (mínimo de 12 horas para decantação) e que utiliza reagentes químicos potencialmente prejudiciais para o homem (ácido sulfúrico) e para o ambiente (descarte de reagentes). A utilização de uma nova metodologia, como a análise por infravermelho próximo pode trazer grandes avanços na análise do silício uma vez que não há a utilização de extratores e o tempo gasto para a leitura é inferior a 2 minutos.

A espectroscopia de infravermelho próximo é uma técnica particularmente sensível à detecção de moléculas orgânicas, notadamente na identificação de carbono orgânico. O silício é o elemento que mais se assemelha ao carbono, possuindo quatro elétrons de valência e podendo se combinar de várias formas com outros elementos ou compostos, doando ou compartilhando elétrons em muitas formas diferentes de ligações químicas, com grande capacidade de polimerizar-se formando cadeias. O átomo de carbono também é capaz de ligar-se a, no máximo, quatro átomos diferentes (incluindo outros átomos de carbono), em quatro direções diferentes, e ele é tão pequeno que os centros dos átomos de carbono vizinhos estão bastante próximos entre si, o que possibilita a formação de fortes ligações. É por isso que se formam longas cadeias e anéis de átomos de carbono estáveis (ASIMOV, 1982).

Outra hipótese que justificaria a análise de silício no infravermelho é a própria relação do silício com constituintes espectralmente ativos no infravermelho próximo como sua relação com o teor de argila, podendo ser caracterizado de maneira indireta pelo NIR (DALMOLIN et al., 2005).

2.2 Matéria orgânica no solo

A matéria orgânica no solo é formada por resíduos de plantas e de animais em diferentes graus de decomposição e desempenha funções relacionadas à qualidade do solo, como: a geração de cargas elétricas no solo (CTC), porosidade, retenção de água, aeração e atividade microbiana, contribuindo com a fertilidade e consequentemente com a produtividade das culturas (MALAVOLTA, 1989). O teor de matéria orgânica ou de carbono orgânico é um dos índices utilizados para distinguir solos minerais de solos orgânicos e determinar a dose de nitrogênio para as culturas agrícolas (PEREIRA et al., 2006).

A matéria orgânica do solo é definida em sentido amplo por Magdoff (1992), como organismos vivos, resíduos de plantas e animais pouco ou bem decompostos, que variam consideravelmente em estabilidade, susceptibilidade ou estágio de alteração. Segundo Oades (1996) é definida exclusivamente como resíduos de plantas e animais decompostos. Porém, a maioria dos métodos analíticos de determinação da matéria orgânica não distingue entre resíduos de plantas e animais decompostos ou não decompostos, que passem através da peneira de 2 mm (DOORAN; JONES, 1996).

O teor de matéria orgânica apresenta uma grande amplitude de variação entre os diferentes tipos de solos, oscilando desde menos de 1% em solos de deserto até altas percentagens em solos orgânicos (OLIVEIRA et al., 1992). Apresenta maiores concentrações nas camadas superficiais (< 1,0 m) e diminui com o aumento da profundidade (LEITE et al., 2004).

A quantificação da matéria orgânica do solo normalmente é feita a partir da determinação, em laboratório, do conteúdo de carbono orgânico do solo (C). A fórmula comumente empregada é: matéria orgânica (g kg^{-1}) = $1,724 \times \text{C}$, baseando-se na premissa que a matéria orgânica possui 58% de carbono orgânico (fator de Van Bemmelen = 1,724) (SILVA, 1999).

Os procedimentos de análise de carbono total geralmente recuperam todas as formas de carbono orgânico. Envolvem a conversão de todas as formas para CO_2 por meio de combustão seca ou úmida. Subsequentemente quantifica-se o CO_2 extraído, empregando-se técnicas gravimétricas, titulométricas, volumétricas, espectrométricas ou cromatográficas (SILVA et al., 1999). Os métodos propostos para a determinação da matéria orgânica do solo, estimada através do carbono orgânico do solo, podem ser por oxidação da matéria orgânica via seca (YOUNG; LINDBECK, 1964), por via úmida,

onde se destacam os métodos preconizados de Schollenberger (1927, 1945) e de Walkley-Black (1934) e, por cromatografia (DEAN JÚNIOR, 1974), gravimetria por incineração em mufla (BALL, 1964; BEN-DOR; BANIN, 1984; JACKSON, 1982), e termogravimetria (WENDLANDT, 1986; BELTRAN et al., 1988). O padrão mundial de determinação é o método do Analisador Elementar (SWIFT, 1996), onde amostras sólidas são avaliadas sem a utilização de extratores.

O procedimento mais adotado para a determinação do teor de matéria orgânica do solo é o método proposto por Walkley-Black (WALINGA et al., 1992; PAGE et al., 1996; BOLAN et al., 1996). Neste método, o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), causador de contaminação ambiental por cromo, é reduzido pelos compostos de carbono orgânico do solo e o excedente não reduzido é determinado por titulação de oxiredução com ferro (Fe^{2+}) ou por colorimetria. O método Walkley-Black por determinação colorimétrica (WB-Col) adaptou-se facilmente aos requerimentos de análises em série nos laboratórios, tornando-se, portanto, o método mais utilizado.

A avaliação de um número grande de amostras pelo método WB-Col podem apresentar problemas como a geração de efluentes contaminantes (cromo), maior tempo para execução da análise e maiores custos. Diante desse fato tem-se buscado alternativas ao método tradicional WB-Col. Para tanto, a utilização da espectroscopia de infravermelho próximo torna-se uma opção muito interessante para estimar o teor de matéria orgânica no solo, onde a necessidade de uso de reagentes é descartada, reduzindo custos e eliminando a possibilidade de contaminação por cromo, além do tempo extremamente reduzido na execução da análise (em torno de 1 minuto).

Ben-Dor e Banin (1995b) constataram que a matéria orgânica é espectroscopicamente ativa em toda a região do infravermelho próximo o que permite a sua detecção nessa banda do espectro. A espectroscopia NIR fornece informações sobre as proporções relativas de C-H, N-H e O-H que são os componentes primários das moléculas orgânicas (MURRAY, 1993). Meyer (1999) e Meyer et al. (2005) obtiveram boas calibrações pelo NIR para análise da matéria orgânica no solo.

2.3 Argila no solo

A proporção de argila, silte e areia do solo constituem a sua textura ou granulometria. Dessas frações a argila é a que possui maior superfície específica e é de natureza coloidal com alta retenção de cátions. As frações granulométricas (areia, silte e

argila) possuem dimensões variadas: argila ($< 0,002$ mm), silte (0,002 a 0,05 mm), areia (0,05 a 2 mm) (RESENDE et al., 1997). A fração argila é constituída de uma gama variada de minerais (minerais de argila) que apresentam cargas elétricas negativas responsáveis pela capacidade de troca de cátions (CTC) além de possuir uma estreita relação com a retenção de água do solo (RESENDE et al., 1997). A determinação da capacidade de troca de cátions da fração argila é um dos requerimentos para recomendação de doses de fertilizantes e corretivos.

A classificação e o manejo do solo dependem diretamente da determinação do teor de argila. Solos de textura arenosa (solos leves) possuem teores de areia superiores a 70% e o de argila inferior a 15%; são permeáveis, de baixa capacidade de retenção de água e de baixo teor de matéria orgânica. Solos de textura média (solos médios) são solos que apresentam certo equilíbrio entre os teores de areia, silte e argila. Normalmente, apresentam boa drenagem, boa capacidade de retenção de água e índice médio de erodibilidade. Solos com teores de argila superiores a 35% são denominados solos de textura argilosa (solos pesados), possuem baixa permeabilidade e alta capacidade de retenção de água. Esses solos apresentam maior força de coesão entre as partículas, o que além de dificultar a penetração, facilita a aderência do solo aos implementos, dificultando os trabalhos de mecanização (EMBRAPA, 2003).

A análise textural pode ser efetuada basicamente por dois métodos: o Método da Pipeta (EMBRAPA, 1997) que é especialmente indicado para a determinação da argila, podendo determinar também a fração silte. É um método de sedimentação, utilizando pipeta para retirar uma alíquota à profundidade e em tempo determinados. É mais preciso, porém é o mais demorado. E o método do Densímetro, conhecido também como método do hidrômetro, foi proposto em 1926 por Bouyoucos. Baseia-se no princípio de que a matéria em suspensão (silte e argila) confere determinada densidade ao líquido. Com a ajuda de um densímetro, Bouyoucos relacionou as densidades com o tempo de leitura e com a temperatura, calculando com esses dados a porcentagem das partículas. O método é mais rápido, porém menos preciso. Sendo assim, o método da pipeta é hoje o método mais utilizado nos laboratórios para a determinação do teor de argila.

Bandas de absorção na região do NIR (1150 e 1300; 2030 e 2035 nm) foram identificadas por Coleman et al. (1991) como sendo uma das regiões de detecção do teor de argila. Segundo Dalmolin et al. (2005) a argila é um componente espectralmente caracterizado na região do infravermelho próximo. Cozzolino e Morón (2003)

obtiveram boas correlações na calibração para predição de argila em solos, utilizando espectroscopia NIR. O uso do NIR, portanto pode vir a ser uma alternativa ao método tradicional da pipeta, reduzindo o número de etapas e por consequência, a mão de obra e o tempo gastos para análise do teor de argila no solo.

2.4 Nitrogênio Foliar

A análise foliar é fundamental para a avaliação do estado nutricional das culturas considerada como complementar a análise do solo. Quando usada em conjunto com os resultados de análise do solo e o histórico de uso da área, permite acompanhar o equilíbrio nutricional das culturas. Um dos elementos mais importantes, essencial para adubação das plantas, e muito requisitado em análises foliares é o nitrogênio. A adubação nitrogenada influencia não só a produtividade, mas também a qualidade dos produtos agrícolas (FERREIRA et al., 2001). O nitrogênio é importante no metabolismo das plantas, participando como constituinte de moléculas, de proteínas, coenzimas, ácidos nucleicos, citocromos, clorofila, entre outros (MALAVOLTA et al., 1997). É o nutriente exigido em maior quantidade pelas plantas que, na sua deficiência apresentam-se amareladas e com crescimento reduzido (RAIJ, 1991).

O teor de nitrogênio nas folhas é muito influenciado pela adubação nitrogenada. Segundo Killorn e Zourarakis (1992), a concentração foliar de nitrogênio reflete sua disponibilidade no solo, sendo que a sua análise pode ser útil na detecção de deficiência de nitrogênio, bem como na recomendação de adubação.

Para análise do teor de nitrogênio em tecido vegetal, o método mais utilizado é o método Kjeldahl (BATAGLIA et al., 1983). Também é utilizado na determinação o método do Analisador Elementar. Este último baseia-se na metodologia de Dumas proposta no trabalho de Keeney e Bremner (1967) onde ocorre a combustão de uma amostra de massa conhecida em uma câmara de alta temperatura (aproximadamente 900 °C) na presença de oxigênio. Os gases resultantes desta combustão são carregados por hélio de alta pureza (um gás inerte) até a zona de detecção. A técnica embora mais rápida que o método Kjeldahl apresenta como desvantagem o fato de se utilizar uma quantidade de amostra muito pequena podendo ser pouco representativa para a análise.

O método Kjeldhal é muito utilizado em rotinas laboratoriais por ser uma técnica confiável, com rotinas bem estabelecidas e ao longo do tempo permaneceu praticamente a mesma com poucas modificações (VOGEL, 1992). Esta técnica possibilita, além da

determinação do nitrogênio em plantas para a avaliação do estado nutricional, a determinação indireta de proteínas em várias amostras biológicas (YASUHARA; NOKIHARA, 2001; NOGUEIRA; SOUZA, 2005). O método consiste na decomposição da matéria orgânica através da digestão da amostra a altas temperaturas com ácido sulfúrico concentrado, em presença de catalisadores a quente que aceleram a oxidação da matéria orgânica. O nitrogênio presente na solução ácida resultante é determinado por destilação por arraste de vapor, seguida de titulação com ácido diluído (NOGUEIRA; SOUZA, 2005). Este método é internacionalmente utilizado como padrão na análise de nitrogênio total por apresentar alta precisão e reprodutibilidade, porém faz uso de reagentes perigosos (ácido sulfúrico concentrado e catalisadores a quente) sendo ainda uma técnica demorada e laboriosa.

Embora haja trabalho mostrando a adequação da metodologia Kjeldahl visando redução na quantidade de reagentes (GALVANI; GAERTNER, 2006), esse ajuste diminui, mas não elimina o uso dos produtos químicos, a grande demanda de mão de obra e o tempo gasto da extração a determinação do elemento. A análise pelo infravermelho próximo surge como alternativa aos métodos tradicionais de análise de nitrogênio, possibilitando a quantificação diretamente na amostra sem a necessidade do uso de reagentes e sendo menos trabalhoso por eliminar todas as etapas de extração.

O nitrogênio é um componente comum em moléculas orgânicas. No tecido vegetal é encontrado na forma orgânica integrando aminoácidos e proteínas (MALAVOLTA et al., 1997) permitindo, portanto, a sua detecção na região do infravermelho próximo (MEYER, 1983), cuja detecção para compostos orgânicos já é amplamente reconhecida.

2.5 Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR)

Espectroscopia de uma maneira geral, consiste no estudo da radiação eletromagnética emitida ou absorvida por um corpo que pode ser luz visível, infravermelho, ultravioleta, raios-X, elétrons, etc. O processo de medida analítica que, basicamente, emprega as propriedades dos átomos e moléculas de absorverem e/ou emitir energia eletromagnética em uma das regiões do espectro eletromagnético é denominado espectrofotometria (CIENFUEGOS; VAITSMAIN, 2000).

Quando uma amostra é irradiada, a luz é absorvida seletivamente e dá origem a um espectro. Em virtude da constituição química, cada material apresentará diferentes

respostas a absorção da luz. Os espectros são obtidos com o uso de instrumentos denominados espectrofotômetros que apresentam características diferentes com relação aos seus componentes e em função da faixa de comprimento de onda de operação (visível, infravermelho) e pela forma de obtenção da medida espectrofotométrica (transmitância ou reflectância) (SALIBA, 1999).

Os espectros de absorção/emissão dos átomos são constituídos normalmente por linhas, já os das moléculas por bandas (série de linhas de absorção muito próximas) (SALIBA, 1999). A energia associada às bandas de uma molécula qualquer é a soma das energias eletrônicas, vibracionais e rotacionais. As energias eletrônicas são observadas nas regiões ultravioleta e visível, as rotacionais na região de micro-ondas e as vibracionais na região do infravermelho (SKOOG et al., 2002; SCHRADER, 1995).

A região do espectro correspondente ao infravermelho está situada depois da região do visível e abrange a radiação com números de onda no intervalo de aproximadamente 12.800 a 10 cm^{-1} ou comprimento de onda de 780 a 100.000 nm. Por ser uma faixa muito extensa é convenientemente dividida em infravermelho próximo – NIR (*Near-Infrared*), infravermelho médio - MIR (*Middle-Infrared*) e infravermelho distante – FIR (*Far-Infrared*) (Tabela 1) (SKOOG et al., 2002).

TABELA 1. Regiões espectrais do Infravermelho

Região	Números de ondas ($\bar{\nu}$) cm^{-1}	Região em comprimento de onda (λ), nm
Próximo (NIR)	12.800 a 4.000	780 a 2.500
Médio (MIR)	4.000 a 200	2.500 a 5.000
Distante (FIR)	200 a 10	5.000 a 100.000

Fonte: Skoog et al. (2002) Princípios de análise instrumental.

Não existe um limite específico definindo onde termina uma região e começa outra, é comum encontrar na literatura diferentes valores para cada faixa, como a do NIR: 750 a 2.500 nm (PASQUINI, 2003), entretanto, a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) define a região NIR sendo de 780 a 2.500 nm (DAVIS, 1998).

2.5.1 Princípios da espectroscopia NIR

A base física de absorção de luz no infravermelho próximo é relacionada à natureza das ligações moleculares que, por sua vez, são definidas pelos vínculos entre átomos dentro das moléculas. O princípio mecânico da absorção no infravermelho baseia-se na iluminação de uma amostra com luz de comprimento de onda específico e conhecido da região do infravermelho próximo. A absorção de luz, de acordo com a frequência específica de vibração das moléculas presentes, é medida por diferenças entre a quantidade de luz emitida pelo infravermelho e a quantidade de luz refletida pela amostra, relação através da qual se pode prever a sua composição química (VAN KEMPEN; JACKSON, 1996).

As ligações moleculares não são conexões estáticas, mas vibram o tempo todo, provocando estiramento e compressão das moléculas, resultando em um movimento de onda dos átomos, com frequência específica dependente dos elementos envolvidos (VAN KEMPEN; JACKSON, 1996). A espectroscopia no infravermelho próximo apresenta sobreposições (*overtones*) e bandas de combinações vibracionais moleculares (duas ou mais vibrações que ocorrem simultaneamente) sendo que as transições ocorridas não seguem as regras de seleção da mecânica quântica. As ligações químicas que apresentam os maiores desvios são as que envolvem o átomo mais leve (H), sendo por isso, a espectroscopia NIR particularmente sensível às ligações C-H, N-H, O-H e S-H (OSBORNE et al., 1993).

Para absorver radiação infravermelha, uma molécula orgânica precisa sofrer uma variação no momento de dipolo (diferença de polaridade entre os átomos de uma molécula) como consequência do movimento vibracional ou rotacional (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2006). Quando a energia radiante corresponde à diferença entre dois níveis energéticos vibracionais a absorção ocorre. Assim, destacam-se as moléculas diatômicas heteronucleares, as moléculas poliatômicas com vibrações assimétricas e grupos funcionais ligados a polímeros, o que engloba a maioria dos compostos orgânicos, e muitos dos inorgânicos como a água.

As ligações covalentes das substâncias orgânicas absorvem essa energia, usando-se essa absorção para estimar o número e tipo de ligações moleculares nas amostras. Nenhuma absorção ocorre durante a vibração de uma molécula homonuclear, como O₂, N₂, ou Cl₂, conseqüentemente, essas substâncias não podem absorver no infravermelho (SKOOG et al., 2002; COATES, 1999).

O espectro de uma determinada amostra de solo obtida com radiação infravermelha é o resultado da absorção de energia (luz) por moléculas orgânicas,

particularmente aquelas que possuem grande número de ligações do tipo C-H, N-H e O-H (AMORIM, 1996). As ligações envolvidas possuem comprimentos de onda característicos, como mostrado na tabela 2.

TABELA 2. Comprimentos de onda, para absorção de grupos funcionais na região do infravermelho próximo em solos (CREASER; DAVIES, 1988).

Grupo Funcional	Comprimento de onda (nm)
C-H alifático	1212, 1414, 1725, 1760 e 2308
C-H aromático	1077, 1111 e 1615 a 1665
O-H água	1440 e 1940
O-H fenóis	1500 a 1800 e 2000 a 2200
N-H aminas	1534, 1000 e 2100
N-H amidas	1980, 2050 e 2180

De modo geral, os principais constituintes dos solos que influenciam seu comportamento espectral são a matéria orgânica, argilo-minerais, óxidos de ferro, além da distribuição granulométrica e umidade. A quantidade de radiação refletida (radiância) comparada com a quantidade incidente (irradiância) sobre a amostra fornece a medida de reflectância captada por sensores. Como os solos apresentam diferentes constituintes, os mesmos podem ser quantificados pela análise de sua resposta espectral (DALMOLIN et al., 2005). Além dessas absorções características para amostras de solos, alguns minerais em solos apresentam distintas absorções nesta região, como grupos OH^- , SO_4^{2-} e CO_3^{2-} . Outros constituintes que são espectralmente caracterizados de maneira indireta na região do infravermelho próximo são ferro, alumínio, magnésio e sílica, isto porque estes parâmetros estão fortemente relacionados com o teor de argila e com a área de superfície específica (BEN-DOR; BANIN, 1995 a e b; DALMOLIN et al., 2005).

A absorção de radiação no infravermelho por substâncias de origem vegetal (OSBORNE, 1986 apud MELLO, 1998) pode ser atribuída, fundamentalmente à pequena massa do hidrogênio. Átomos de hidrogênio ligados covalentemente a átomos mais pesados e eletronegativos (C, O, N) formam dipolos oscilantes que absorvem energia em regiões de alta frequência, isto é, na região do infravermelho próximo. A maioria das bandas de sobretons é encontrada entre 400 e 2200 nm. Toda matéria de origem vegetal é composta basicamente, de proteínas, amido, açúcares, lipídios, celulose, entre outros. Uma vez que todos esses constituintes possuem grupos

funcionais (-OH, -NH) em que os átomos de H encontram-se ligados a átomos mais pesados (C, N, O) todos são candidatos a apresentar absorção no infravermelho próximo.

2.5.2 Aplicações da espectroscopia NIR

A espectroscopia no infravermelho próximo é uma das técnicas mais promissoras no campo das análises não destrutivas (WETZEL, 1983). Sua utilização possibilita determinações diretas (sem pré-tratamento) na amostra, obtendo-se resultados rapidamente, em intervalos de tempo da ordem de segundos (PANONTIN, 2007).

Inúmeras vantagens obtidas com utilização da técnica NIR, fazem com que sua aplicação seja bastante explorada. Segundo Amorim (1996) a principal vantagem está na análise múltipla dos constituintes, no tempo máximo de um minuto, menor necessidade de mão de obra, rapidez e, portanto, menor custo, além de não ser poluente por não utilizar produtos químicos ou reagentes (AMORIM, 1996). É raro ver um método analítico baseado em NIR, exigindo mais do que um pré-tratamento físico da amostra antes de aquisição de dados espectrais (PASQUINI, 2003). Antti (1999) citado por Andrade (2009) descreve também como vantagem o fato de a obtenção dos espectros depender pouco da habilidade do operador.

A região do infravermelho (especificamente, o infravermelho próximo) vem sendo cada vez mais utilizada como uma ferramenta analítica em determinações qualitativas e quantitativas de diferentes materiais. Para as regiões do infravermelho, em geral, é possível realizar medidas de amostras em todos os estados e formas como, gases, líquidos, sólidos, sistemas binários e terciários como as amostras semissólidas, pastas, géis e outras (SKOOG et al., 2002; SCHRADER, 1995; BURNS; CIURCZAK, 2001). Aplicações da técnica NIR têm sido realizadas nas indústrias de petróleo, têxtil, carvão, cosméticos, polímeros, química, tintas, farmacêuticas, sendo aplicada, inclusive na restauração de imagens decorativas de pinturas históricas (DRENNEN et al., 1991). Tem sido frequentemente aplicada como um método analítico que fornece resultados eficientes na determinação de moléculas orgânicas (proteínas e lipídeos) e parâmetros qualitativos de produtos da agricultura e de alimentos (MEYER, 1999). A tabela 3 mostra inúmeros setores onde a tecnologia NIR obteve êxito em determinações qualitativas e quantitativas (PASQUINI, 2003).

TABELA 3. Setores onde a técnica NIR foi aplicada em outros países (O) e no Brasil (B).

	O	B
1. Agricultura/Alimentos		
1.1 Produtos da agricultura	Williams; Norris, 2001 Cozzolino et al., 2002 Garcia Alvares et al., 2000	Nishyama et al., 1991 Nishyama et al., 1992 Leite, Stuth, 1994 Fardim et al., 2002
1.2 Produtos da indústria alimentícia	Williams; Norris, 2001 TWolmeyer et al., 1995 Wilson, 1996	Barthus; Poppi, 2001
1.3 Agricultura de Precisão – Solos	Confolonieri et al., 2001 Stemberg et al., 2002	Fidêncio et al., 2002 Mello et al., 1999
1. Polímeros		
2.1 Processamentos de Polímeros	Scott, 1995 Pasikatan et al., 2001 Fisher; Eichhorn, 1998	Santos et al., 1998 Vieira et al., 2002
2.2 Características de qualidade de polímeros	Shymoyama et al., 1999 Miller, 1993	Vieira et al., 2001 DeAraújo; Kawano 2002
Indústria de combustíveis petróleos		
3.1 Controle de qualidade de combustíveis	Hofmann; Zanier-Skid Lowski, 1999 Kelly et al., 1989	Pasquini et al., 2000 Guchard et al., 1998
3.2 Processo de produção de combustíveis	Buttner, 1997 Valleur, 1999	
3.3 Caracterização do Petróleo	Hidajat; Chong, 2000 Blanco et al., 2001	-----
3. Ambientais	Geladi et al., 1999 Malley, 2002	-----
4. Têxteis	Cleve et al., 2000 Church; O'Neill, 1998	-----
5. Biomédico/Clínico	Wang et al., 2002 Daneshvar et al., 1999	Duarte et al., 2002 Da Costa et al., 2001
6. Fármacos e Cosméticos	Sparen et al., 2002 Trafford et al., 1999	Scafi; Pasquini, 2001
7. NIR – imagens	Tran, 2000 Martinsen et al., 1999	Tran; Politi, 2002 Politi; Tran, 2002

Traduzida de: PASQUINI, 2003.

As indústrias farmacêuticas e petroquímicas são áreas onde a espectroscopia NIR encontrou grande aplicabilidade, porém é a área agrícola que tem recebido maior destaque na utilização desta técnica. Foi a primeira área a fazer intenso uso de espectroscopia NIR sendo responsável direta pelo lançamento e o desenvolvimento da tecnologia no mercado. O uso mais recente neste setor foi no apoio à agricultura de precisão (PASQUINI, 2003).

A região NIR tem sido usada na análise de frutos, avaliando principalmente os teores de açúcares, ácidos, sólidos solúveis, proteínas, dentre outros (ROBERTS et al., 1991; YOUNG et al., 1997; BELON et al., 1993; THROOP et al., 1995). Grãos e sementes também tem sido muito analisados, como sementes de algodão (PARRISH et al., 1990), de canola (DAUN et al., 1994) e de girassol (SATO et al., 1995), avaliando parâmetros como óleo, proteína, clorofila, etc. Propriedades químicas, biológicas e bioquímicas de amostras de plantas também tem sido frequentemente avaliadas pelo NIR (WILLIAMS; NORRIS, 1990; BATTEN et al., 1993). Meyer (1998) avaliou os teores de sólidos solúveis (brix) e medida do desvio da luz polarizada (pol) em amostras de cana-de-açúcar. Amorim (1996) demonstrou que o uso do NIR é possível não apenas para análise de pol e brix mas também em outros parâmetros como porcentagem de açúcares redutores, porcentagem de levedo, de glicerol e de álcool e da fibra da cana-de-açúcar. Carboidratos em plantas de trigo e arroz foram avaliados por Batten et al. (1993). Phelan et al. (1996) analisaram os teores de nutrientes em plantas de milho e os teores de nitrogênio, açúcares redutores e umidade em batata foram analisados por Mehrubeoglu e Cotte (1997) e por YEH et al. (1994).

Estudos foram realizados para avaliações de propriedades de solo utilizando a técnica NIR como nos trabalhos de Ben-Dor e Banin (1995 a e b) onde foram analisadas 16 propriedades de solo, como matéria orgânica, argila, alumínio, fósforo, ferro, entre outros, obtendo boas correlações entre os métodos tradicionais de análises e o método NIR. O conteúdo de matéria orgânica, CTC, saturação por base e pH também foram avaliados por Stenberg et al., 1995.

2.6 Métodos de análise multivariada

A análise de dados é uma parte essencial em todo experimento, sendo univariada, quando somente uma variável é medida sistematicamente para várias amostras. O modelo estatístico dos métodos multivariados considera a correlação entre

muitas variáveis analisadas simultaneamente, permitindo a extração de uma quantidade muito maior de informação comparada à análise univariada (SENA et al., 2000).

A análise multivariada tem como princípio a utilização das inúmeras variáveis $x_1, x_2, \dots, x_n$ (como valores de absorbância a vários comprimentos de onda) para quantificar alguma outra variável de interesse y (como concentração, por exemplo) (SENA et al., 2000). Um problema real que se tem ao trabalhar com dados da espectroscopia NIR é o processamento e a interpretação das informações. Como os espectros contém um grande conjunto de dados, que seriam difíceis de serem analisados (centenas de pontos), é preciso uma ferramenta para se aplicar e retirar as informações necessárias para a análise quantitativa (FERRARINI, 2004). A área especificamente destinada à análise desses dados químicos de natureza multivariada é chamada Quimiometria (FERREIRA et al., 1999).

Os métodos quimiométricos permitem determinações diretas em situações onde a determinação de um analito é impedida devido à presença de interferentes, ao invés da separação física da espécie (cromatografia, extração, etc.), o uso desse tipo de tratamento dos dados permite a modelagem dos interferentes junto ao analito de interesse. A ideia central é substituir a separação física das espécies pela separação quimiométrica de seus sinais. Esta estratégia apresenta potenciais vantagens para o desenvolvimento de métodos analíticos mais rápidos, de menor custo e que envolvam menor manipulação da amostra (SENA, 2004).

2.6.1 Quimiometria

Define-se quimiometria como a aplicação de métodos matemáticos, estatísticos, e de lógica formal para o tratamento de dados químicos, de forma a extrair uma maior quantidade de informações e melhores resultados analíticos (MASSART et al., 1998). A classificação das amostras, de acordo com suas propriedades, bem como a quantificação de variáveis e até mesmo a previsão de resultados, tornaram a quimiometria indispensável em muitas áreas químicas, notadamente nas análises por infravermelho próximo (WILLIAMS; NORRIS, 1990).

Esta ciência enfoca o estudo de medidas analíticas baseando-se na ideia da observação indireta, relacionando essas medidas à composição química de uma substância e deduzindo o valor de uma propriedade de interesse através de alguma relação matemática. Os métodos matemáticos utilizados em quimiometria incluem: a

Regressão Linear Múltipla (MLR - *Multiple Linear Regression*), a Regressão em componentes principais (PCR – *Principal Components Regression*) e a Regressão por quadrados mínimos parciais (PLS - *Partial Least Squares*). Devido à sofisticação das técnicas analíticas, novos métodos quimiométricos são desenvolvidos até os dias de hoje, com o objetivo de resolver problemas de análise de dados multivariados (BORGES NETO, 2005), como por exemplo, a utilização de métodos de inteligência artificial (redes neurais artificiais) (DESPAGNE; MASSART, 1998) que tem sido testada inclusive na análise de propriedades de solos (FIDÊNCIO, 2001) e de plantas (MELLO, 1998).

A principal linha de pesquisa da quimiometria tem sido a construção de modelos de regressão a partir de dados de primeira ordem, ou seja, dados que podem ser representados através de um vetor para cada amostra, sendo a construção desses modelos denominada calibração multivariada. Neste tipo de calibração a resposta instrumental é representada na forma de matriz, enquanto a propriedade de interesse, determinada por uma metodologia padrão, é representada por um vetor (VALDERRAMA, 2005).

2.6.2 Calibração Multivariada

Com grande frequência, o objetivo de uma análise química é determinar a concentração de um determinado analito em amostras, isto é, um composto químico de interesse presente nas mesmas. Os instrumentos de laboratório não produzem diretamente as concentrações como resposta. Por exemplo, um espectrofotômetro registra absorbâncias que naturalmente dependem das concentrações dos analitos. Calibração é o procedimento para encontrar um algoritmo matemático que produza propriedades de interesse a partir dos resultados registrados pelo instrumento (FERREIRA et al., 1999). O resultado de uma calibração pode ser representado pelo diagrama abaixo (Figura 1):

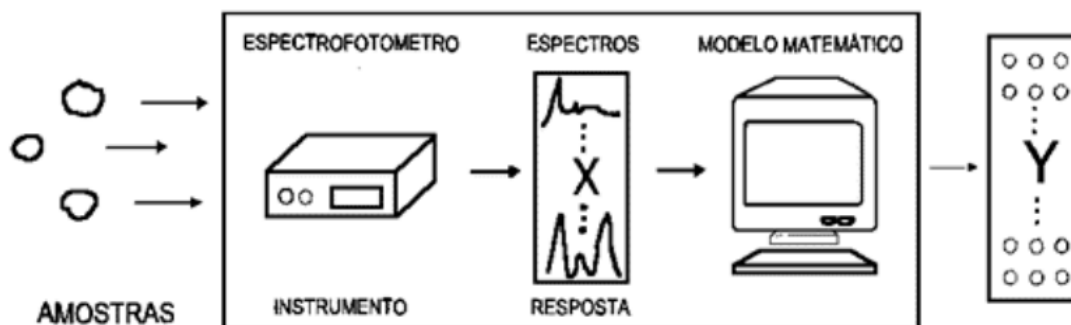


FIGURA 1. Diagrama representativo de uma calibração (FERREIRA et al., 1999).

A calibração multivariada estabelece uma relação entre dois blocos de dados de informação química disponível, o das medidas instrumentais (espectros) e o da propriedade calibrada (concentração) (VALDERRAMA, 2005).

O desenvolvimento de modelos com calibração multivariada consiste em duas etapas: o desenvolvimento (ou calibração) e a validação (FERREIRA et al., 1999). Na etapa de calibração, as relações entre sinais analíticos são decompostos em uma matriz (matriz **X**) e concentrações dos analitos (matriz **Y**) são deduzidas a partir de padrões representativos para o conjunto de amostras a serem analisadas. A figura 2 ilustra como uma matriz de dados **X** de dimensão $n \times m$, ou seja, n objetos (espectros) e m variáveis (número de onda) podem ser construídos a partir de um vetor de resposta instrumental (concentração) (BORGES NETO, 2005).

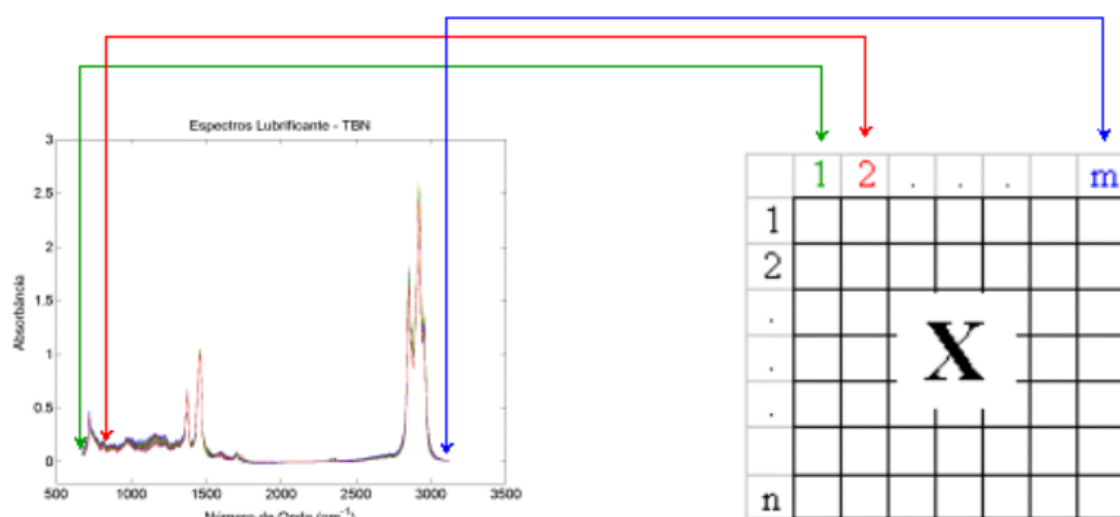


FIGURA 2. Representação da construção da matriz **X** para calibração multivariada (BORGES NETO, 2005).

Para atingir o objetivo principal da calibração multivariada, que é representar a enorme quantidade de informações contidas nos espectros em outro sistema com menos variáveis é necessário o uso do método exploratório de dados denominado análise de componentes principais (PCA – *Principal Component Analysis*) onde se baseiam os métodos de calibração multivariada (MLR, PCR e MLR).

A PCA é utilizada para resolver problemas de matrizes e, para descrevê-la matematicamente supõe-se que n amostras tiveram seus espectros no infravermelho adquirido em m comprimentos de onda. Essas informações podem ser arranjadas na forma de uma matriz de absorbância X de dimensões $n \times m$. A PCA é um método de decomposição de uma matriz X de posto A em um somatório de A matrizes de posto 1, onde posto é o número que expressa a dimensão de uma matriz. As novas matrizes de posto 1 podem ser escritas como produtos dos vetores (h) chamados “escores” (t_h) e “pesos” ($p^T h$), calculados par a par, como na equação 01.

$$X = t_1 p^T_1 + t_2 p^T_2 + \dots + t_h p^T_h \quad (01)$$

A figura 3 apresenta a matriz X decomposta em produtos de matrizes “escores” e “pesos”.

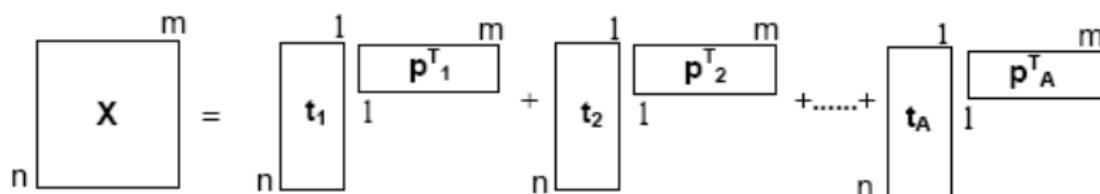


FIGURA 3. Representação da matriz de dados X decomposta em produtos de matrizes de posto igual a um.

Essas novas variáveis são denominadas de fatores, componentes principais (PCs) ou simplesmente variáveis latentes (VL). O número máximo de componentes principais obtidos (PCs) é igual ao número de vetores de dados utilizados (posto da matriz X de dados independentes), sendo que nem todas as PCs possuem informações úteis. Normalmente, as últimas PCs modelam ruído inerente aos dados, sendo assim, a eliminação dessas PCs frequentemente aumenta a relação sinal/ruído (BEEBE et al., 1998; MASSART et al., 1998). Os ruídos são informações estranhas que afetam a

detecção como diferenças de temperatura, pressão e umidade (ruídos químicos) e componentes eletrônicos dos instrumentos como fonte (ruídos instrumentais).

À medida que se aumenta o número de variáveis latentes, corre-se o risco de transferir para o modelo ruído proveniente do conjunto de calibração, o que poderia levar a um aumento na variância de predição. Por outro lado, um modelo com poucos fatores, poderia deixar de incluir informações relevantes, o que poderia levar a erros de previsão. Portanto, é necessário determinar o número ideal de variáveis latentes, que resulte na melhor previsão possível (BEEBE et al., 1998).

Os métodos matemáticos MLR, PCR e PLS permitem determinar um número pequeno de variáveis latentes ou fatores que possibilitem a previsão de $\mathbf{Y}$, ou seja, de valores analíticos, o mais eficientemente possível, usando os valores contidos em $\mathbf{X}$. O método mais simples de calibração multivariada é a MLR. A MLR é o melhor método para sistemas bem comportados (resposta linear, sem interferentes, sem interações entre analitos, com baixo ruído e nenhuma colinearidade). A limitação da MLR está no fato de ela usar toda a informação contida na matriz $\mathbf{X}$, não importando se é relevante ou não (SENA et al., 2000). O PCR surge como alternativa no intuito de contornar os problemas apresentados pela MLR, ou seja, eliminando a colinearidade, resolvendo problemas de inversão de matriz e também reduzindo a quantidade de ruído inserida no modelo matemático final. No PCR a regressão, ao invés de ser feita nas variáveis originais, é feita nos “scores” (coordenadas dos espectros das novas variáveis latentes) obtidos em uma PCA. O PLS, no entanto, é considerado o método de regressão mais utilizado na calibração multivariada, difere do PCR por usar a informação de y no cálculo das chamadas variáveis latentes, ele utiliza fatores que capturam a maior variância dos dados e, ao mesmo tempo sejam os que permitam uma correlação máxima entre as variáveis originais e as previstas. Este método, assim como a PCR, não requer um conhecimento exato de todos os componentes presentes nas amostras podendo realizar a previsão de amostras mesmo na presença de interferentes, desde que estes também estejam presentes por ocasião da construção do modelo (BORGES NETO, 2005).

Antes de agrupar os dados em matrizes há a possibilidade de se realizar um tipo de manipulação dos dados para obtenção de um modelo de calibração melhor. Algumas destas operações são conhecidas como pré-processamento espectral e são usualmente aplicadas tanto nas variáveis independentes (matriz $\mathbf{X}$) quanto nas variáveis dependentes (matriz $\mathbf{Y}$) (THOMAS, 1994). Trata-se de um método corretivo de

interferências causadoras de variação na aquisição dos espectros de modo a extrair-se a informação útil dos dados. Existem vários tipos de pré-processamentos que produzem diferentes transformações nos dados como, por exemplo, a normalização, ponderação, suavização, correção de linha de base, correção multiplicativa de sinal (MSC) e variação normal padrão (SNV) (BEEBE et al., 1998). A normalização e a ponderação são técnicas de pré-processamentos muito semelhantes que consistem na divisão ou multiplicação de cada variável de um vetor de amostra por uma constante, removendo assim variações sistemáticas relativas às amostras (BEEBE et al., 1998). Já a suavização é um método utilizado para reduzir matematicamente ruídos aleatórios de alta frequência a fim de aumentar a relação sinal/ruído. Para esse procedimento existem diferentes filtros digitais, tais como: média móvel, Savitzky-Golay (BEEBE et al., 1998), transformada de Fourier (CERQUEIRA et al., 2000) e transformada Wavelet (GALVÃO et al., 2001).

Ainda na etapa de calibração dos modelos, algumas amostras anômalas também denominadas de “*outliers*”, são eliminadas. Naes e Isaksson (1994) definem *outliers* como sendo observações diferentes do resto do conjunto de dados. Pode ser irrelevante, fortemente errôneos ou anormais em alguma forma, comparado a maioria dos dados. A eliminação deles pode melhorar, de forma significativa, os modelos na etapa de calibração.

Após a calibração é feita a validação do modelo que consiste na otimização da relação que descreve as espécies de interesse e na avaliação da habilidade preditiva do modelo construído (FERREIRA et al., 1999). A validação do modelo pode ser realizada de duas maneiras: validação externa e interna (ou cruzada). Quando os objetos do conjunto de validação forem preparados junto com os padrões utilizados na calibração, mas não fazem parte do cálculo do modelo, o processo é conhecido como validação externa. Na validação interna, todos os padrões preparados são empregados no cálculo do modelo e são utilizados também como amostras para o teste do modelo construído. As amostras são separadas, um modelo é construído com as amostras restantes e a previsão é feita em relação às amostras separadas inicialmente. O procedimento é realizado para cada amostra ou subconjunto de amostras, até que todo o conjunto de dados iniciais seja explorado. A validação cruzada é recomendada quando se trabalha com um pequeno número de amostras. Quando se tem um número elevado de amostras, é recomendado o método de validação externa (ANDRADE, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A primeira fase do trabalho consistiu na construção de um banco de dados com valores conhecidos de silício solúvel, matéria orgânica e teor de argila em amostras de solos e de nitrogênio em folhas de milho e soja. Foi realizada a calibração do aparelho a partir de medida em triplicatas das amostras no equipamento, para que, a partir da varredura que o aparelho faz em cada amostra, fosse gerada uma curva espectral a qual corresponde a uma concentração conhecida para cada uma das análises realizadas, ficando, juntamente com a curva, armazenada no programa computacional do equipamento. Após essa fase, foi feita a validação dos modelos (com amostras selecionadas aleatoriamente pelo próprio programa) onde se verificou o potencial dos modelos para a previsão de novas amostras.

Na fase final, denominada de previsão, outro grupo de amostras, não pertencentes ao banco de dados foi avaliado mediante a comparação dos resultados obtidos pelos métodos realizados nos laboratórios e os resultados previstos pelo NIR a partir dos novos modelos desenvolvidos.

3.1 Obtenção das amostras

Foram inicialmente obtidas diversas amostras de solos e folhas, fornecidas pelo Laboratório de Análise de solos e plantas da UFU (LABAS), pelo Laboratório de Manejo e Conservação dos solos da UFU (LAMAS), pelo Laboratório de Fertilizantes da UFU (LAFER), pelo UBERSOLO Tecnologia Agrícola e pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC). O experimento abrangeu solos com diferentes classes, profundidades, características físicas e químicas.

Duas populações de amostras foram separadas, sendo divididas em uma população de amostras destinadas a calibração e validação do aparelho, que consistiu no banco de dados para construção de modelos de regressão, e outro grupo para a previsão/estimativa de valores após a construção dos modelos de calibração.

Para a construção dos modelos de calibração dos solos, foram utilizadas 170 amostras com valores de silício disponível no solo conforme determinação sugerida por Korndorfer et al. (2004), destas, 150 com resultados de matéria orgânica determinados por análise colorimétrica (RAIJ et al., 2001) e 164 com teor de argila pelo método da Pipeta (EMBRAPA, 1997).

Na etapa de previsão foram utilizadas 86 amostras para análise do silício disponível, 50 para análise de matéria orgânica e 58 para determinação do teor de argila. Amostras de solos, utilizadas no controle de qualidade do IAC (Ensaio de Proficiência), também foram avaliadas pelos modelos, sendo 15 para análise de silício, 15 para matéria orgânica e 12 para o teor de argila.

Nas análises foliares 51 amostras de folhas de soja e 58 amostras de folhas de milho, com resultados de nitrogênio foliar medido pelo método semimicro Kjeldahl descrito por Tedesco et al. (1995) foram utilizadas para a construção do banco de dados. Na etapa de previsão foram utilizadas 20 amostras de folhas de soja e 82 amostras de milho não pertencentes ao banco de dados.

3.2 Equipamento NIR

Os espectros NIR de reflectância das amostras foram adquiridos em um espectrofotômetro da marca FEMTO, modelo NIR 900PLS (Figura 4).



FIGURA 4. Espectrofotômetro NIR 900PLS

O intervalo espectral usado encontra-se no comprimento de onda compreendido entre 1100 a 2500 nm, com incremento de 2 nm entre as varreduras. O programa FemWin900[®] foi utilizado para processamento das informações registradas no equipamento. O aparelho é do tipo Monocromador com rede de difração contínua. O modo de operação do aparelho foi em Reflexão e a leitura fornecida em Log 1/R (inverso da transmitância).

O espectrofotômetro é constituído por uma fonte de luz, um sistema óptico, um detector e um suporte para a amostra. A energia radiante, a partir de fonte controlada, é direcionada para a amostra e um detector mede a intensidade do feixe emergente.

A luz é originada por uma lâmpada alógena (nº1, Figura 5), passa por uma lente direcionadora (nº2, Figura 5) e é periodicamente interrompida por um cortador rotativo (nº3, Figura 5). A luz passa por uma roda de filtros de interferência de alta precisão (nº4, Figura 5) que selecionam os raios infravermelhos próximo de comprimento de onda específico; posteriormente passam por uma lente e por uma abertura (nº5 e 6, Figura 5) até chegarem aos espelhos inclinados (nº7/A e 7/B, Figura 5) que refletem os raios em direção à amostra. Parte da luz penetrada é absorvida pela amostra e parte é refletida. A esfera de parede blindada a ouro contém um detector de chumbo que mede a porção refletida da luz incidente. A informação espectral resultante é característica da amostra, e permite determinação de propriedades relevantes do produto ou material.

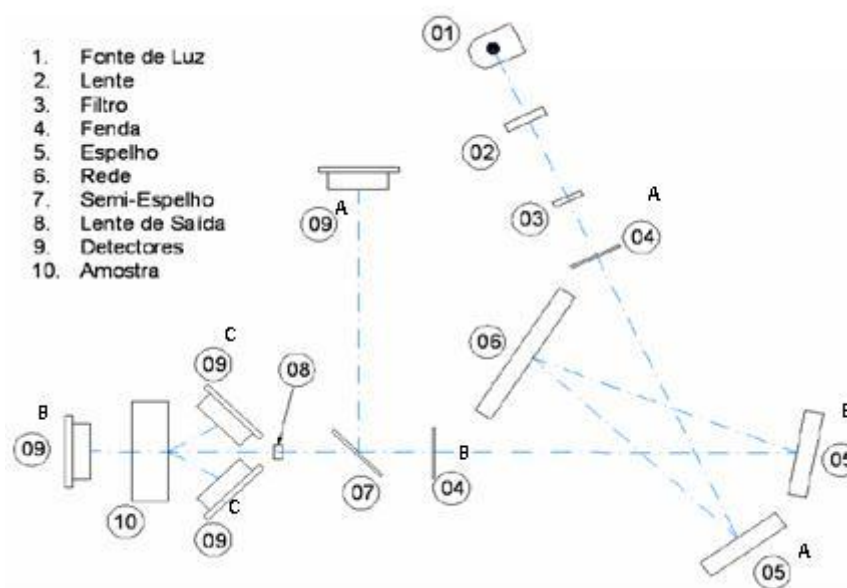


FIGURA 5. Princípio de funcionamento do equipamento NIR

Os dados espectrofotométricos das amostras de solo e plantas, juntamente com os resultados das análises convencionais, foram armazenados no computador enquanto que o sistema operacional (programa FemWin900®) fez a leitura de todos os dados derivando equações.

3.3 Procedimentos analíticos

3.3.1 Análise de solos

O método utilizado como referência neste trabalho para análise do silício disponível no solo foi o proposto por Korndorfer et al. (2004), para a matéria orgânica foi utilizado o método colorimétrico (WB-Col) (RAIJ et al., 2001) pelo princípio de extração proposto por Walkley-Black (1934) e para o teor de argila foi utilizado o método da pipeta (EMBRAPA, 1997).

Antes de iniciar o procedimento analítico as amostras de solo foram secas a temperatura ambiente (TFSA - terra fina seca ao ar), homogeneizadas e peneiradas (abertura peneira - malha de 2 mm) e então submetidas às análises referidas, utilizadas nos laboratórios que forneceram as amostras. Em seguida foram acondicionadas em saquinhos plásticos até que fosse obtida a leitura de seus espectros pelo aparelho NIR.

A extração do silício no solo foi feita utilizando a solução extratora de cloreto de cálcio (CaCl_2 0,01 mol L^{-1}). De cada amostra pesou-se 10 gramas de solo e adicionou 100 mL da solução extratora em copo plástico de 150 mL. O copo foi tampado e agitado horizontalmente por uma hora em agitador horizontal a 250 rpm. Após essa agitação, o extrato permaneceu em repouso por 15 minutos, em seguida foi filtrado utilizando papel de filtro número 42 (papel filtro quanty JP42 - faixa azul). O extrato filtrado foi mantido em repouso por uma noite (>12 h). A determinação do silício no extrato foi feita misturando-se 10 mL do extrato (filtrado/decantado) com 1 mL da solução sulfo-molibdica 75g L^{-1} (7,5 g de molibdato de amônio + 10 mL de ácido sulfúrico 500 g L^{-1} - em 100 mL de água). Após 10 minutos foram acrescentados 2 mL da solução ácido tartárico a 200 g L^{-1} , utilizado para complexar o fósforo da solução. Cinco minutos depois, adicionou-se 10 mL da solução de ácido ascórbico 3 g L^{-1} . Após 1 hora foi feita a leitura em espectrofotômetro UV-vísivel no comprimento de onda de 660 nm.

Para a análise de matéria orgânica foi adotado o método Walkley-Black com determinação colorimétrica (WB-Col) (RAIJ et al., 2001) onde 1cm³ da TFSA foi transferida para copo de polietileno de 150 mL. Adicionou-se 10 mL de solução digestora sulfocrômica dicromato ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4N + H_2SO_4) 10 mol L^{-1} , agitando por 10 minutos em agitador horizontal a 170 rpm. A mistura foi deixada em repouso por 1 hora e, após esse período acrescentou-se 50 mL de água destilada. A mistura

decantou durante uma noite (16 h) sendo feita, na manhã seguinte a leitura em espectrofotômetro a 650 nm.

A obtenção dos teores de argila seguiu o método da Pipeta onde 10 g de TFSA de cada amostra foram pesadas e transferidas para copo plástico com 10 esferas. Adicionou-se 40 mL de solução de hidróxido de sódio 0,05 mol L⁻¹ e agitou-se por uma hora a 220 rpm deixando-se em repouso por 12 h. Na manhã seguinte coletou-se o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta. Logo após a coleta do sobrenadante foi acrescentado 50 mL de hidróxido de sódio 0,2 mol L⁻¹, deixando-se em repouso por uma noite. As amostras foram transferidas para um copo metálico com o auxílio de um jato de água, completando-se o volume para 300 mL. Colocou-se o copo no agitador elétrico “*stirrer*”, procedendo-se à agitação durante 15 minutos a 12000 rpm. Após a agitação, o conteúdo de cada copo foi passado em peneiras de 0,210 mm (ABNT N° 270) e 0,053 mm (ABNT N° 70), para a separação das frações areia grossa e areia fina, levando-as em estufa a 105 °C por 24 h para secagem. A solução que passou pelo conjunto de peneiras, foi colocada em uma proveta de 1000 mL, completando-se o volume com água destilada. A suspensão foi agitada por 1 minuto com um bastão e repouso de 4 minutos para ocorrer a sedimentação das partículas. Em seguida coletou-se uma alíquota de 25 mL na profundidade de 10 cm, e após levou-se o material em estufa a 105 °C por 24 horas para a determinação do silte + argila. A fração argila, também foi obtida por sedimentação, coletando-se 25 mL da suspensão a uma profundidade de 5 cm 4 horas após a agitação, sendo levada para estufa a 105 °C por 24 horas para secagem. A fração silte foi obtida por diferença entre a massa da fração silte + argila e a massa da fração argila.

Com a massa da argila, silte + argila, areia fina e grossa foram calculadas a concentração da fração argila na TSFA (Expressão 01):

$$TA = (A + D) - D \times 4000 \quad (01)$$

Onde: TA = teor de argila em g kg⁻¹

A = massa da argila em g

D = massa do dispersante em g

Na análise no equipamento NIR utilizou-se aproximadamente 25 cm³ de terra em uma cubeta (Figura 6) a qual foi inserida no aparelho para se fazer a leitura espectral

e consequente obtenção de resultados de silício, argila e matéria orgânica das amostras. Cada uma das amostras de solos foram medidas em triplicatas.



FIGURA 6. Foto da cubeta contendo amostra de solo.

3.3.2 Análises Foliares

As folhas de milho e soja foram lavadas com uma solução de água e detergente (1% v/v) e enxaguadas várias vezes com água destilada e uma vez com água deionizada. Em seguida, foram colocadas em sacos de papel (para identificação), secas em estufa a 65 °C (até atingir peso constante), moídas em moinho tipo Willey com abertura de 2 mm e peneiradas (177 μ m; 80 Mesh).

A análise do nitrogênio total (N-Total) foi realizada através da solubilização sulfúrica (Bataglia et al.,1983) seguida do método semimicro Kjeldahl descrito por Tedesco et al. (1995). Para a extração foram pesadas 0,2 g da amostra moída e seca em tubos para digestão de 50 mL. Adicionou-se 15 mL de mistura ácida de sulfatos (ácido sulfúrico concentrado; sulfato de sódio: 90 g L⁻¹ e sulfato de sódio hepta-hidratado 9 g L⁻¹), procedeu-se a digestão por 1 hora em bloco digestor, aumentando a temperatura gradativamente até cerca de 335 °C até a completa digestão da matéria orgânica, caracterizada por um líquido incolor ou levemente esverdeado. Na determinação do N-Total transferiu-se todo o extrato digerido para o destilador semimicro Kjeldahl; conectou-se um erlernmeyer de 50 mL, contendo 10 mL da solução de ácido bórico 20 g L⁻¹ com a mistura de indicadores, na extremidade de refrigeração do destilador; adicionou-se gradativamente 10 mL de hidróxido de sódio 13 mol L⁻¹ ao digerido. Em seguida procedeu-se a destilação até atingir um volume de 30 mL. O frasco foi retirado e a titulação foi feita com solução de ácido sulfúrico 0,014 mol L⁻¹, até mudança da cor para rosa.

Após a análise convencional as amostras foram devidamente acondicionadas em saquinhos plásticos e identificadas até serem submetidas à análise no espectrofotômetro NIR.

Para a análise no espectrofotômetro, foram colocados aproximadamente 25 cm³ do material vegetal de cada uma das amostras em uma cubeta (Figura 7) a qual foi inserida no aparelho para se obter a leitura espectral. Cada uma das amostras de folha foram medidas em triplicatas, obtendo 3 medidas do mesmo material para construção do modelo de calibração.



FIGURA 7. Foto da cubeta contendo material vegetal.

3.4 Análise de dados

Após a definição do banco de dados, foram desenvolvidos vários modelos de regressão para construção das curvas de calibração. Esses modelos foram baseados em métodos de calibração multivariada, permitindo que as informações espectrais e as concentrações fossem utilizadas ao mesmo tempo na fase de calibração.

O modelo matemático utilizado foi o de quadrados mínimos parciais: PLS (*Partial Least Squares*). A validação dos modelos foi cruzada e os sinais analíticos expressos em Log 1/R.

3.4.1 Cálculo dos erros

A eficiência dos modelos de calibração multivariada foi avaliada pelo cálculo dos valores de erro quadrático médio (RMSE – *root mean square error*) e o erro relativo (ER). Esses valores expressam a exatidão do modelo, ou seja, a proximidade entre o valor calculado pelo modelo (y_{previsto}) e o valor verdadeiro ou obtido por outro

método de análise (y real) (GELADI; KOWALSKI, 1986). Os parâmetros de erros empregados foram:

Erro quadrático médio (RMSE) (Expressão 02):

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - k - 1}} \quad (02)$$

onde n representa o número de amostras do conjunto de calibração, Y_i é o valor de referência (REAL) e $\hat{y}_i$ é o valor previsto pelo modelo para a i ésima amostra e k é igual ao número de variáveis latentes. Como estes erros podem ser medidos tanto para o conjunto de calibração quanto para a previsão, adicionou-se ao final da sigla destes erros a letra C, indicando serem estes relativos à calibração C (RMSEC), ou P, quando forem relativos à previsão de outras amostras (RMSEP).

Erro relativo percentual (ER (%)) entre o método de referência e o método desenvolvido (NIR-PLS) (Expressão 03):

$$ER(\%) = \frac{(y_i - \hat{y}_i)}{y_i} \times 100 \quad (03)$$

3.4.2 Linearidade dos modelos e Teste de hipóteses

Os resultados foram também avaliados por uma análise de regressão simples, onde foram comparados os valores reais (medidos pelos métodos de referência) com os valores preditos (estimados pelo NIR). Foi calculado o *Coeficiente de Correlação de Amostra* (r), dado por (Expressão 04):

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2][\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2]}}$$

(04)

onde, $(x_1, y_1), \dots, (x_n, y_n)$ são os n pares de observações.

Além da correlação foi aplicado um teste “t” de Student para hipóteses de diferença de duas médias. O nível de probabilidade utilizado foi de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento de modelos em espectroscopia NIR para análise de solos

Os espectros NIR (na faixa de 1100 a 2500 nm) de 20 amostras de solos de duas principais classes (Latossolo Vermelho Distrófico típico e Neossolo Quartzarênico Órtico típico) utilizadas para construção dos modelos estão sobrepostos na figura 8:

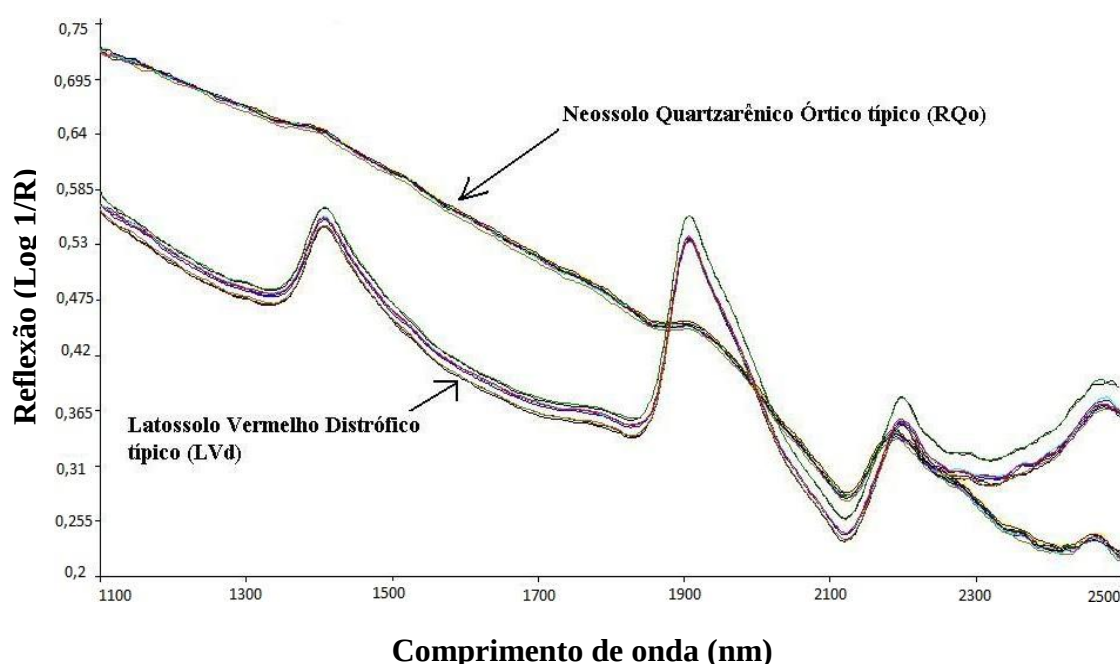


FIGURA 8. Conjunto dos espectros de reflectância (Log 1/R) na região do NIR, de duas principais classes de solos utilizadas para a construção dos modelos.

Como cada solo apresenta uma diferente constituição, a respectiva curva espectral terá diferentes bandas de absorção (DALMOLIN et al., 2005). Como pode ser visto na figura 8 os espectros para ambas as classes de solos estão sobrepostos não permitindo a visão de um analista relacioná-los às suas respectivas concentrações, portanto, torna-se necessário a utilização de algum recurso matemático (função) para relacionar o sinal analítico medido (espectro) com sua respectiva concentração. Tal relação é possível utilizando métodos quimiométricos de calibração multivariada como o PLS.

4.1.1 Calibração e validação de modelos para análises de silício solúvel, matéria orgânica e argila em solos

As 170 amostras de solo utilizadas para a construção do modelo de calibração, apresentavam teores de silício solúvel em CaCl_2 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) variando entre 0,1 e 17 mg dm^{-3} , 150 apresentando teor de matéria orgânica na faixa de 0,7 a 4,3 dag kg^{-1} e 164 com teores de argila entre 15,5 a 89,6%. Como as amostras foram medidas em triplicatas, foram obtidos 510 espectros para análise de silício, 450 para análise de matéria orgânica e 492 para o teor de argila. Desses, 38 espectros para análise do silício foram descartados, por apresentarem discrepância do restante do conjunto (leituras anômalas) restando 472 espectros para a calibração, que agora variavam de 0,1 a 12,1 mg dm^{-3} de silício solúvel no solo. Para a matéria orgânica 18 amostras discrepantes foram descartadas restando 432 espectros com mesma faixa de variação (0,7 a 4,3 dag kg^{-1}) e, na análise de argila descartaram-se 18 espectros anômalos restando 474 espectros variando de 15,5 a 73,8%. Neste conjunto, o programa selecionou 300 leituras de cada analito para a construção dos modelos de calibração. Na etapa de validação, 172 espectros foram utilizados para validar o modelo para análise de silício, 132 para matéria orgânica e 174 para argila (Tabela 4).

TABELA 4. Banco de dados com respectivos espectros obtidos, número de amostras selecionadas e intervalos de variação nas etapas de calibração e validação de modelos para análise de silício solúvel, matéria orgânica e argila nos solos.

Análise	nº de amostras e intervalo do banco de dados	nº de espectros obtidos	nº de amostras selecionadas e intervalo de variação: Calibração/Validação
Silício solúvel*	170 amostras (0,1 – 17,7 mg dm^{-3})	510	300/172 (0,1 – 12,1 mg dm^{-3})
Matéria Orgânica**	150 amostras (0,7 – 4,3 dag kg^{-1})	450	300/132 (0,7 – 4,3 dag kg^{-1})
Argila***	164 amostras (15,5 – 89,6 %)	492	300/174 (15,5 – 73,8 %)

* Método Colorimétrico: Extrator: CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$

** Método Colorimétrico: Extrator: Solução sulfocrômica dicromato

*** Método da Pipeta

Na etapa inicial muitas amostras anômalas foram removidas no intuito de melhorar a correlação dos dados, o que explica a redução na faixa de amostras utilizadas

na calibração e validação (Tabela 4). Se por um lado perde-se com a restrição das faixas de teores na calibração, espera-se por outro lado uma maior precisão entre o real e o previsto pelo NIR dos valores avaliados dentro da faixa calibrada.

Uma etapa inicial, que é de suma importância na construção de um modelo de calibração, é a escolha do número de variáveis latentes a serem incluídas. Várias variáveis latentes foram testadas e os melhores resultados para cada análise foram obtidos com o número de fatores (variáveis latentes) indicado na tabela 5. Os valores de correlação e variâncias obtidos nas etapas de calibração e validação dos modelos também estão apresentados nesta tabela:

TABELA 5. Número de variáveis latentes utilizadas e valores de correlação (r) e variâncias (s^2) obtidos nas etapas de calibração e validação de modelos PLS para análise de solos.

Análises	Variáveis Latentes	CALIBRAÇÃO		VALIDAÇÃO	
Silício	6	r=0,71	$s^2=1,56$	r=0,72	$s^2=1,69$
Matéria Orgânica	8	r=0,84	$s^2=0,40$	r=0,80	$s^2=0,43$
Argila	8	r=0,85	$s^2=8,01$	r=0,85	$s^2=8,05$

Os melhores modelos para esses conjuntos de espectros foram obtidos com a utilização de seis variáveis latentes para a análise de silício e 8 variáveis latentes para análise de matéria orgânica e de argila (Tabela 5), onde os valores de correlação na calibração e validação foram os maiores, a partir dos quais não se tinha um aumento de variância significativa. Quanto mais variáveis latentes são utilizadas no modelo, melhor é a correlação, porém pode aumentar a quantidade de informações irrelevantes causadas, por exemplo, por diferenças de temperatura, pressão ou umidade (ruídos químicos) no momento da análise, o que pode levar a uma superestimativa dos resultados e uma previsão ruim para outras amostras. Portanto, deve-se escolher o número de variáveis latentes que corresponda ao valor mínimo para a diferença de erros, pois a partir desse valor não se tem mais uma variância significativa, ou seja, a maior parte da informação estatística útil foi capturada.

A figura 9 apresenta os gráficos de modelos de calibração para a análise de silício solúvel (Si), matéria orgânica (M.O.) e argila nos solos com a utilização das variáveis escolhidas.

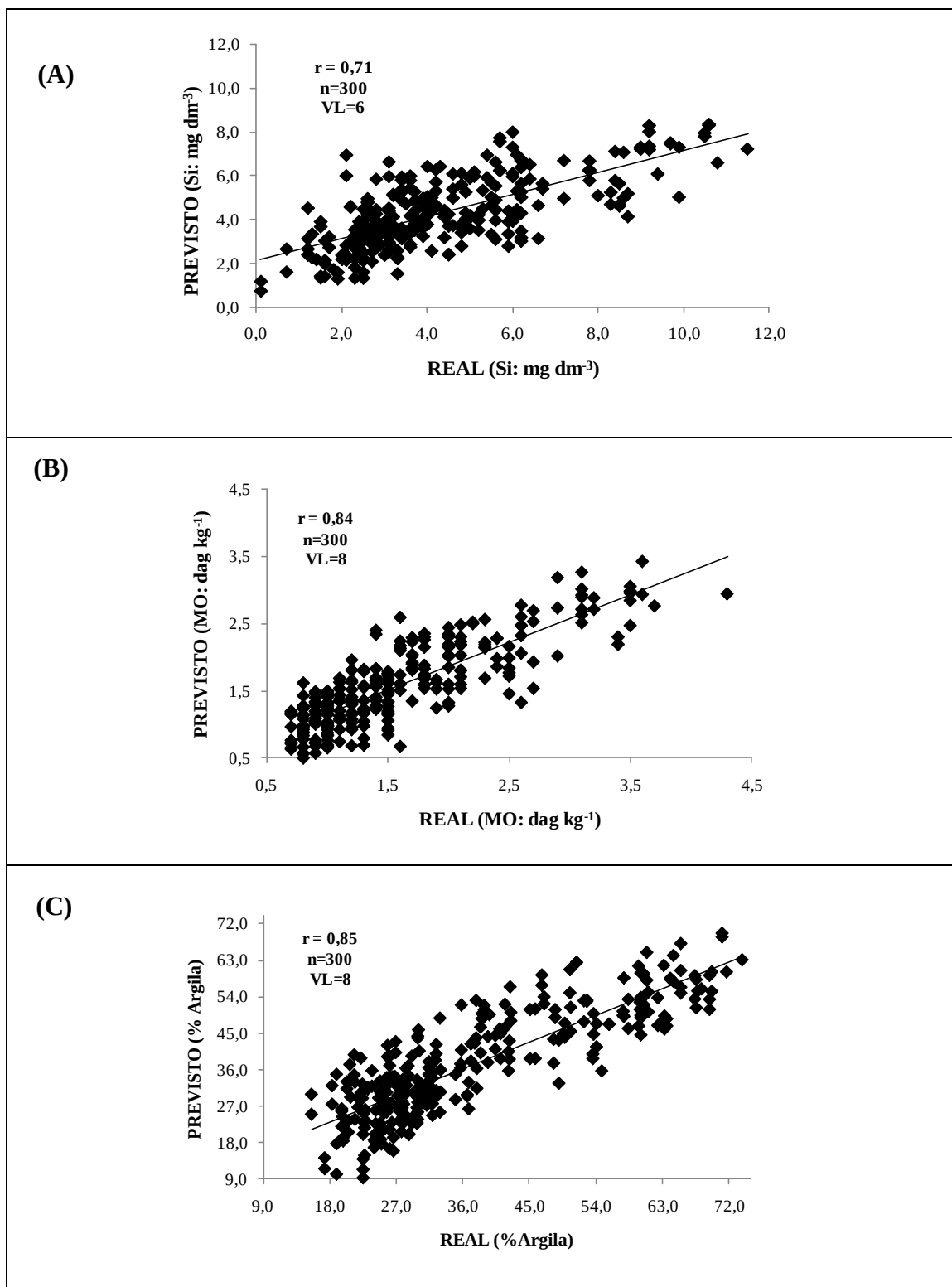


FIGURA 9. Gráfico de Calibração. Valores de silício medidos pelo método colorimétrico com extração por CaCl_2 (A), matéria orgânica por WB-Col (B) e teor de argila pelo método da Pipeta (C) (REAL) versus valores previstos pelo NIR (PREVISTO) utilizando método PLS com 6 (A) e 8 (B) e (C) variáveis latentes.

A correlação obtida para a calibração do silício solúvel no solo ($r=0,71$) foi menor do que a obtida para a calibração de matéria orgânica ($r=0,84$) e de argila ($r=0,85$) (Figura 9(A)). A melhor linearidade destes deve-se possivelmente ao fato de a matéria orgânica e a argila serem diretamente detectadas na região do infravermelho próximo (BEN-DOR E BANIN, 1995b; DALMOLIN, et al., 2005) enquanto que moléculas inorgânicas, como o silício, são identificadas de forma indireta por estarem ligadas a compostos orgânicos. Mesmo não apresentando alta correlação para calibração do silício, correlação de 0,71 é um valor expressivo, uma vez que os padrões utilizados para a construção dos modelos não são os chamados “padrões de bancada”, ou seja, aqueles simulados e pré-quantificados, mas sim amostras reais, sujeitas às inúmeras interferências relacionadas aos outros constituintes presentes nas amostras. Além disso, a maior parte do silício encontra-se ligada a óxidos de ferro e a polímeros de diferentes tamanhos.

O coeficiente de correlação de 0,84 na calibração do modelo para determinação do teor de matéria orgânica (Figura 9(B)) foi superior ao encontrado por Santos et al. (2010) que construindo modelos em espectroscopia NIR e utilizando vários tipos de solos na mesma calibração, encontraram um coeficiente de correlação igual a 0,70 para a mesma característica analisada. He e Song (2006) trabalhando com calibração multivariada obtiveram correlação maior de 0,96 nas etapas de calibração e validação de modelos PLS para análise de matéria orgânica em solo argiloso. Fidêncio (2001) avaliou o uso do infravermelho próximo para determinação de matéria orgânica em diferentes tipos de solos; com a utilização do método PLS para duas classes de solos (Latosolo Vermelho Amarelo e Podzólico Vermelho Amarelo) a correlação entre o NIR e o método de referência (Bloco Digestor) foi de 0,95 - o método do bloco digestor apresentava correlação de 0,999 com o método Walkley-Black (FIDÊNCIO, 2001). Neste mesmo trabalho, o autor encontrou correlação menor ($r=0,88$) ao desenvolver modelos PLS com solos de quatro classes diferentes (Latosolo Vermelho Amarelo e Podzólico Vermelho Amarelo, Latossolo Roxo e Latossolo Vermelho escuro), porém ao fazer uso de redes neurais artificiais em substituição ao método PLS, as correlações foram maiores que 0,9, mesmo utilizando maior número de classes para calibração.

Alguns pré-processamentos de dados espectrais (como a correção de espalhamento multiplicativo, por exemplo) que não foram adotados neste trabalho, foi aplicado nos trabalhos de Fidêncio (2001) o que também pode ter contribuído para melhores correlações nas calibrações dos modelos.

O teor de carbono orgânico do solo também foi avaliado por vários autores (FERNANDES et al., 2010; GUIOTOKU et al., 2006; COUTÊAUX et al., 2003; MEYER, 1999 e MEYER et al., 2005) que encontraram correlações maiores que 0,9 na calibração de modelos baseados em espectroscopia NIR.

Coeficiente de correlação de 0,85 foi obtido na calibração do modelo desenvolvido para análise do teor de argila no solo (Figura 9(C)). Esse valor está bem próximo ao encontrado por Guiotoku et al. (2006), que obtiveram correlação de 0,85 e de 0,89 na calibração e validação de modelos respectivamente. Santos et al. (2010) encontrou correlação menor de 0,77 para a mesma característica analisada. Meyer (1999) obteve correlações de 0,94 e de 0,91 na calibração e validação de modelos NIR, respectivamente, para análise de argila em vários tipos de solos. No trabalho de Cozzolino e Morón (2003) também foram obtidas altas correlações (maiores que 0,9) entre o método NIR e o método de referência adotado para análise do teor de argila.

Após a definição dos melhores modelos de calibração para cada analito, foram realizadas previsões com outro grupo de amostras, diferentes daqueles inicialmente utilizadas na calibração, para avaliar a capacidade de previsão. A figura 10 apresenta os gráficos com as previsões de silício solúvel, matéria orgânica e teor de argila em solos.

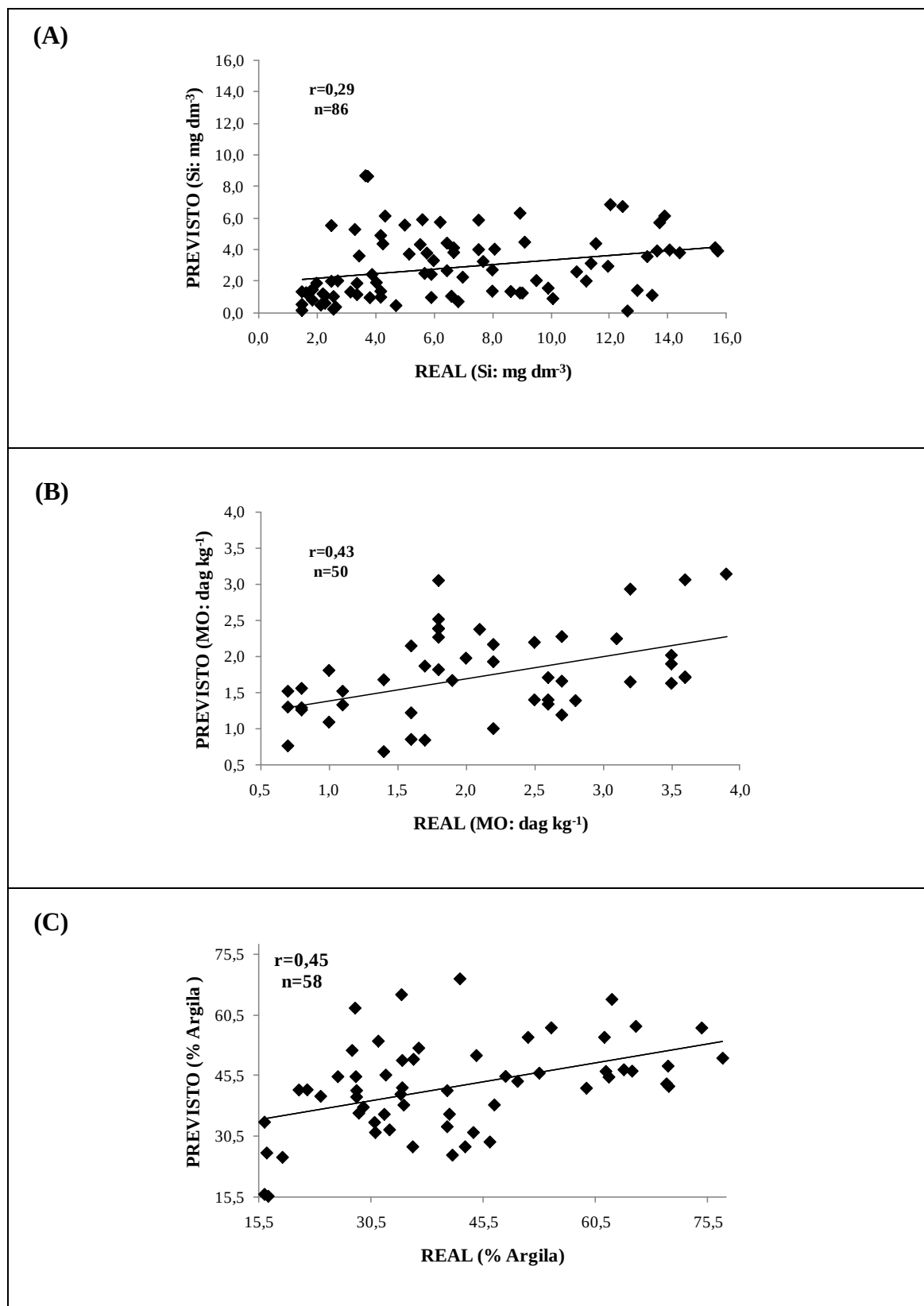


FIGURA 10. Gráfico de Previsão. Valores de silício medido pelo método colorimétrico com extração por CaCl_2 (A), matéria orgânica por WB-Col (B) e teor de argila pelo método da Pipeta (C) (REAL) versus valores previstos pelos modelos NIR (PREVISTO).

A correlação obtida na etapa de previsão foi baixa para os três modelos avaliados (Figura 10). O coeficiente de correlação para análise de silício pelo método NIR (Figura 10(A)) foi o menor ($r=0,29$).

A previsão dos modelos PLS para o teor de matéria orgânica e de argila em amostras de solos também apresentaram correlações baixas ($r= 0,43$ e $r= 0,45$). Há uma dispersão de pontos muito alta o que confirma a baixa linearidade dos modelos. Para um mesmo valor de matéria orgânica ou argila, medido pelo método de referência adotado, a metodologia NIR prevê diferentes valores (Figura 9 (B) e (C)), o que causa um maior espalhamento dos pontos em torno da linha de tendência. O método PLS aplica-se basicamente a sistemas lineares, e, há uma forte tendência de não linearidade nos dados de solos apresentados.

O baixo poder de previsão dos modelos para análise de solos pode ter ocorrido devido à presença de pontos sobrepostos na regressão de calibração (Figura 9). Há a ocorrência de mais de uma informação espectral (devido à heterogeneidade das diferentes amostras) para um mesmo valor de concentração. Amostras distintas (com diferentes características de teor de argila, cor e constituição) apresentavam mesmo valor de matéria orgânica, por exemplo. Assim, o modelo não consegue prever com precisão o valor de uma amostra. Neste sentido, pode-se inferir que, quanto mais específico for o conjunto de amostras utilizadas para a calibração, melhor linearidade poderá ser obtida. A utilização de solos de diferentes classes para a calibração dos modelos pode ser a principal causa da baixa capacidade de previsão dos mesmos e, neste caso, a utilização dos métodos PLS lineares de calibração multivariada não são satisfatórios.

Para comparar a precisão entre o real e o previsto das amostras utilizadas nesta etapa, foi aplicado, além da correlação, um teste “t” a 5% de probabilidade (Tabela 6).

TABELA 6. Teste t-student (5%) e probabilidade obtida para diferenças entre médias, para os métodos de referência *versus* estimados pelo NIR para previsão de (n) amostras de solo.

Análise	Métodos Comparados	“p”	t_{calculado}	t_{tabelado}
Silício	CaCl ₂ x NIR (n=86)	0,006*	7,37	1,98
Matéria Orgânica	WB-Col x NIR (n=50)	0,017*	2,43	1,99
Argila	Pipeta x NIR (n=58)	0,63 ^{ns}	-0,48	1,98

*são significativamente diferentes

^{ns} não significativo a 5% de probabilidade

Um teste “t” significativo (Tabela 6) confirma que os valores obtidos na previsão de silício e de matéria orgânica em solos, além de não lineares são diferentes entre si. Ou seja, para esses conjuntos de amostras, o método de análise de silício com extração por CaCl₂ (0,01 mol L⁻¹) e o método colorimétrico para análise de matéria orgânica diferiu do previsto pelo modelo PLS de infravermelho próximo. Embora o teste “t” na análise do teor de argila não tenha sido significativo, a correlação é muito baixa (r= 0,44) o que não permite afirmar que o real (medido pelo método da Pipeta) é igual ao previsto pelo NIR.

O cálculo dos erros quadráticos médios de calibração (RMSEC) e previsão (RMSEP), e o erro relativo percentual (ER) médio dos modelos desenvolvidos para análise de solos estão resumidos na tabela 7.

TABELA 7. Erros de previsão dos modelos de calibração multivariada para análise dos teores de silício solúvel, matéria orgânica e argila em solos.

Análises	RMSEC	RMSEP	ER (%) médio
Silício (mg dm ⁻³)	2,03	5,74	59,2
Matéria orgânica (dag kg ⁻¹)	0,81	1,03	39,3
Argila (%)	11,20	16,55	34,7

Os erros quadráticos médios na calibração dos modelos (RMSEC) foram menores do que os erros de previsão (RMSEP) para as três características analisadas. O maior erro relativo percentual foi encontrados na análise de silício no solo (Tabela 7).

O erro relativo percentual para análise do silício foi muito alto (ER= 59,2%). Em geral, erros maiores que 20% podem ser considerados altos na determinação de silício no solo.

O erro relativo percentual médio de previsão da matéria orgânica foi de 39,3% (Tabela 7), sendo considerado elevado para previsão de matéria orgânica em solos. Para essa característica mesmo porcentagens de erros menores podem ser significativas, uma vez que incrementos mesmo que pequenos na matéria orgânica de um solo representam grande variação de suas propriedades. RMSEC de 0,81 foi mais de 10 vezes do que o obtido por He e Song (2006) que encontraram um RMSEC de 0,058 analisando a previsão no infravermelho próximo para a análise de matéria orgânica.

Para a textura do solo, no entanto, uma faixa maior de erro pode ser permitida. Um solo que apresente 30% de argila, não difere tanto de outro que apresente 40%, ou seja, erros mais ou menos iguais a 34% (ER médio = 34,7%) (Tabela 7).

Por tratar-se de erros relativos “médios”, a avaliação dentro de cada intervalo fez-se necessária para identificar possíveis tendências de erros em determinadas faixas de concentração dos analitos ou mesmo observar erros muito discrepantes aos valores médios encontrados. As faixas com os erros relativos percentuais, delimitados pelos intervalos reais (medidos pelos métodos de referência) dos teores de silício solúvel, matéria orgânica e argila, podem ser observadas na tabela 8.

TABELA 8. Intervalos de silício solúvel (Si), matéria orgânica (M.O.) e argila (INTERVALO REAL), número de amostras (*n*) e erros relativos percentuais (ER%) médios previstos pelos modelos.

	INTERVALO REAL	<i>n</i>	ER (%) Médio
Si: mg dm⁻³	1,0 a 4,0	30	57,7
	4,1 a 8,0	27	46,3
	8,1 a 12,0	17	72,6
	12,1 a 16,0	12	73,2
	<i>n</i> total=86		ER médio=59,2
M.O.: dag kg⁻¹	0,5 a 1,5	12	53,8
	1,6 a 2,5	21	31,8
	2,6 a 3,5	13	39,6
	3,6 a 4,5	4	34,7
	<i>n</i> total= 50		ER médio=39,3
Argila: %	15 a 30	16	59,4
	31 a 45	22	28,8
	46 a 60	8	16,9
	>60	12	29,8
	<i>n</i> total=58		ER médio=34,7

Os menores erros relativos percentuais ocorreram na menor faixa de concentração (1,0 até 8,0 mg dm⁻³) de silício solúvel no solo (Tabela 8) enquanto que, para o teor de matéria orgânica e de argila a maior variação de erros foram observadas nas menores faixas de calibração (0,5 a 1,5 dag kg⁻¹ de M.O. e de 15 a 30 % do teor de argila). Há, no entanto, uma distribuição de erros elevada em todos os intervalos de calibração dos analitos.

Os modelos também foram testados para previsão de amostras pertencentes ao controle de qualidade de solos do laboratório do IAC (Campinas). Nas tabelas 9, 10 e 11 abaixo, podem ser observados mais detalhadamente, diferenças entre valores que foram previstos pelo NIR e os valores médios esperados de silício, matéria orgânica e argila respectivamente.

TABELA 9. Diferenças entre o valor esperado de silício solúvel (Si REAL) em amostras de solo utilizadas no controle de qualidade do IAC (Ensaio de Proficiência) e o previsto pelo modelo (Si PREVISTO) NIR/PLS com 6 variáveis latentes, e o erro relativo percentual (ER) para cada amostra.

Amostras	Si-REAL mg dm ⁻³	Si-PREVISTO	ER (%)
1	4,0	3,9	2,5
2	4,5	4,4	2,2
3	5,0	5,0	0,0
4	5,0	5,5	10,0
5	6,0	5,3	11,7
6	6,5	4,7	27,7
7	7,0	7,5	7,1
8	7,0	6,2	11,4
9	8,5	5,7	32,9
10	8,5	5,5	35,3
11	9,0	9,5	5,6
12	9,5	10,5	10,5
13	10,0	8,1	19,0
14	10,0	9,7	3,0
15	26,5	5,5	79,2
Intervalo	4,0 a 26,5	3,9 a 10,5	0 a 79,2

Excetuando-se uma predição (amostra 15), todos os outros valores apresentaram baixas diferenças entre o valor de silício real do solo e o valor previsto pelo modelo. Observa-se que o maior erro está na faixa de alto valor de silício, isto porque o modelo de calibração obtido privilegia amostras com valores menores de silício (curva de

calibração variando de 0,1 até 12,1 mg dm⁻³ de Si (Tabela 4). Esta deficiência pode ser devida não à técnica em si, mas ao erro de amostragem (escolha das amostras) para construção da curva de calibração. Embora o modelo desenvolvido para análise de silício em solos, apresentou previsões ruins para o conjunto de amostras inicialmente avaliadas, quando feito nas amostras certificadas pelo IAC apresentaram resultados melhores, ou seja, têm-se uma boa calibração para os modelos e há problemas na previsão devido, possivelmente, às repetições de concentrações na calibração dos modelos.

Para a análise da matéria orgânica praticamente todas as amostras mostraram erros relativos elevados entre a análise de referência (WB-Col) e o previsto pelo NIR. Dada a tolerância baixa para erros em análise de matéria orgânica, o modelo construído não foi satisfatório (Tabela 10).

TABELA 10. Diferenças entre o valor esperado de matéria orgânica (M.O. REAL) em amostras de solo utilizadas no controle de qualidade do IAC (Ensaio de Proficiência) e o previsto pelo modelo (M.O.PREVISTA) NIR/PLS com 8 variáveis latentes, e o erro relativo percentual (ER) para cada amostra.

Amostras	M.O. REAL dag kg ⁻¹	M.O. PREVISTA	ER (%)
1	0,7	1,2	71,4
2	1,0	0,3	70,0
3	1,3	1,5	15,4
4	2,3	2,0	13,0
5	2,4	1,2	50,0
6	2,5	1,2	52,0
7	2,6	1,0	61,5
8	2,6	1,3	50,0
9	3,4	1,2	64,7
10	3,4	1,7	50,0
11	3,5	1,9	45,7
12	4,1	1,4	65,9
13	4,1	1,8	56,1
14	4,3	2,2	48,8
15	7,1	1,7	76,1
Intervalo	0,7 a 7,1	0,3 a 2,2	13 a 76,1

Percebe-se que a previsão de valores de matéria orgânica inferiores a 2 dag kg⁻¹ (Tabela 10) é predominante, correspondendo também a incidência maior de pontos abaixo desse valor no modelo de calibração (Figura 9(B)).

Na análise do teor de argila das amostras do IAC avaliadas pelos modelos a previsão apresentou erros relativos de 5,1 até 134,4% de argila nos solos (Tabela 11).

TABELA 11. Diferenças entre o valor esperado para o teor de argila (REAL) em amostras de solo utilizadas no controle de qualidade do IAC (Ensaio de Proficiência) e o previsto pelo modelo (PREVISTO) NIR/PLS com 8 variáveis latentes, e o erro relativo percentual (ER) para cada amostra.

Amostras	Teor de Argila REAL	Teor de Argila PREVISTO	ER (%)
	%.....		
1	18,3	42,9	134,4
2	18,6	41,5	123,1
3	19,3	38,4	99,0
4	27,8	32,0	15,1
5	28,0	33,2	18,6
6	29,0	52,6	81,4
7	33,9	47,7	40,7
8	37,0	40,0	8,1
9	37,1	40,8	10,0
10	37,5	39,4	5,1
11	62,6	47,9	23,5
12	63,2	45,9	27,4
Intervalo	18,3 a 63,2	32,0 a 52,6	5,1 a 134,4

Apresentando erros altos de previsão para todas as características analisadas uma solução seria usar amostras simuladas para a calibração, ou retirar um pouco das amostras de concentrações repetidas na calibração dos modelos.

Quando comparados a outros trabalhos utilizando o uso da espectroscopia NIR (SANTOS et al., 2010; GUIOTOKU et al., 2006) obtiveram-se bons resultados de calibração para solos, porém com problemas durante a etapa de previsão de amostras, o que deve ser melhorado com uma nova seleção de amostras; uso de amostras pré quantificadas (simuladas), pré-tratamento dos dados ou ainda recorrer a métodos de calibração não lineares.

4.2 Desenvolvimento de modelos em espectroscopia NIR para análises foliares

Os espectros NIR de reflexão das amostras foliares utilizadas para a construção dos modelos de calibração estão apresentados na figura abaixo:

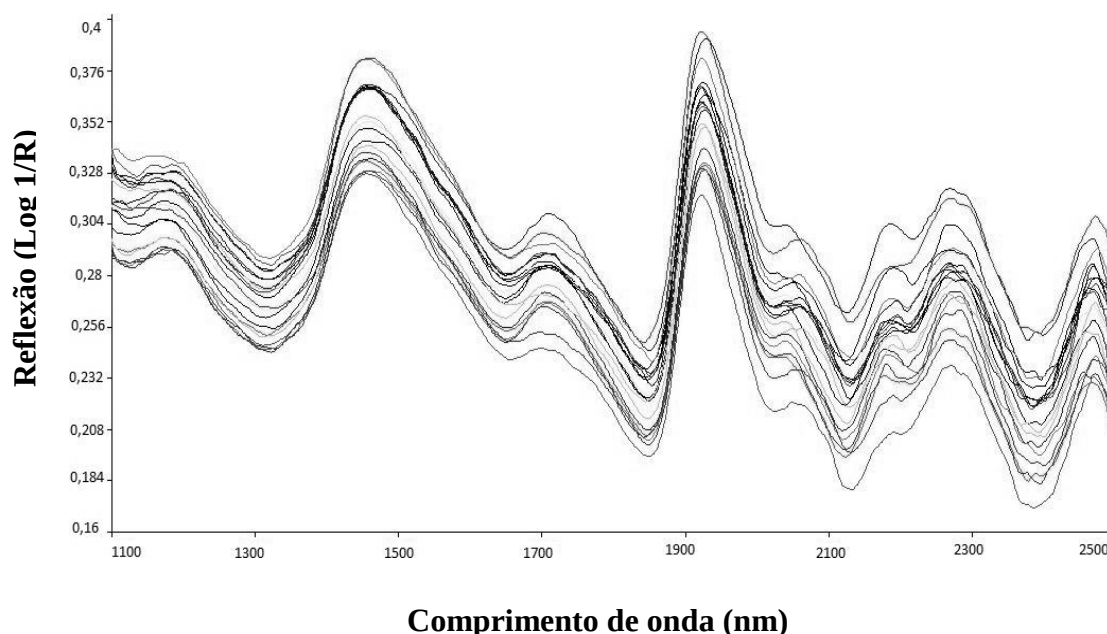


FIGURA 11. Conjunto dos espectros de reflectância (Log 1/R) na região do NIR, de 20 amostras de folhas (10 amostras de milho e 10 de soja) utilizadas para a construção dos modelos.

Os espectros das amostras foliares (Figura 11) assim como os espectros obtidos de amostras de solos (Figura 8), apresentam-se sobrepostos sendo também necessário recorrer aos métodos de calibração multivariada (PLS) para quantificar o nitrogênio no tecido vegetal.

4.2.1 Calibração de modelos para análise de nitrogênio total em folhas de milho e soja

Para construção de modelos para análise de nitrogênio total (N-Total) em folhas, foram utilizadas 58 amostras foliares de milho e 51 de soja. Medidas em triplicatas foram gerados 174 espectros para serem utilizados na calibração e validação de modelos para análise de nitrogênio em milho e, 153 espectros para análise de nitrogênio em folhas de soja (Tabela 12).

TABELA 12. Banco de dados com respectivos espectros obtidos e selecionados pelo aparelho na etapa de calibração e validação de modelos PLS para análise de nitrogênio total (N-Total) em folhas de milho e soja.

Análise	n° de amostras e intervalo do banco de dados	n° de espectros obtidos	n° de espectros selecionados e intervalo de dados nas etapas de Calibração/Validação
N-Total* (Milho)	58 amostras (23,1 – 56,7 g kg ⁻¹)	174	100/50 (23,1 – 37,1 g kg ⁻¹)
N-Total* (Soja)	51 amostras (24,5 – 67,2 g kg ⁻¹)	153	73/50 (36,4 – 62,3 g kg ⁻¹)

*Método Semimicro Kjeldahl (Digestão sulfúrica)

As amostras de milho apresentavam N-Total na folha variando de 23,1 a 56,7 g kg⁻¹. Após a retirada de amostras discrepantes, restaram 150 espectros com variação de 23,1 a 37,1 g kg⁻¹ de nitrogênio total nas folhas (Tabela 12). Nas amostras de soja, a variação do N-Total era de 24,5 a 67,2 g kg⁻¹, sendo reduzido este intervalo para 36,4 a 62,3 g kg⁻¹ após a seleção de amostras para calibração. A melhor correlação e menores variâncias entre o real e o previsto pelo NIR para esse conjunto selecionado foi obtido com a utilização de 8 variáveis latentes no modelo PLS para análise de N-Total em milho e 5 variáveis latentes para o modelo de análise de N-Total em soja (Tabela 13):

TABELA 13. Número de variáveis latentes utilizados e valores de correlação (r) e variâncias (s²) obtidos nas etapas de calibração e validação de modelos PLS para análises foliares.

Análise	Variáveis Latentes	CALIBRAÇÃO		VALIDAÇÃO	
N-Total (Milho)	8	r=0,85	s ² =1,63	r=0,78	s ² =1,98
N-Total (Soja)	5	r=0,88	s ² =3,08	r=0,89	s ² =4,12

O modelamento para análise do N-Total em folhas de milho apresentou correlações de 0,85 na calibração e de 0,78 na etapa de validação. Correlações maiores, de 0,88 na calibração e 0,89 na validação foram obtidas nos modelos para análise de N-Total em soja. Meyer (1983) comparando a análise pelo método Kjeldahl com modelos em espectroscopia NIR na determinação de nitrogênio em folhas de cana-de-açúcar, encontrou um coeficiente de correlação de 0,89 na calibração. Santos et al. (2010)

encontrou um valor próximo ($r=0,87$) para a mesma determinação (N-Total em folhas de cana) pela metodologia NIR.

As variâncias foram de 1,63 e de 1,98, na calibração e validação respectivamente, nos modelos para análise do N-Total em folhas de milho. Na análise da soja a variância encontrada foi maior, sendo de 3,08 na calibração e 4,12 na validação do modelo (Tabela 13). Esses resultados podem ser observados pelo grau de dispersão dos dados na figura 12.

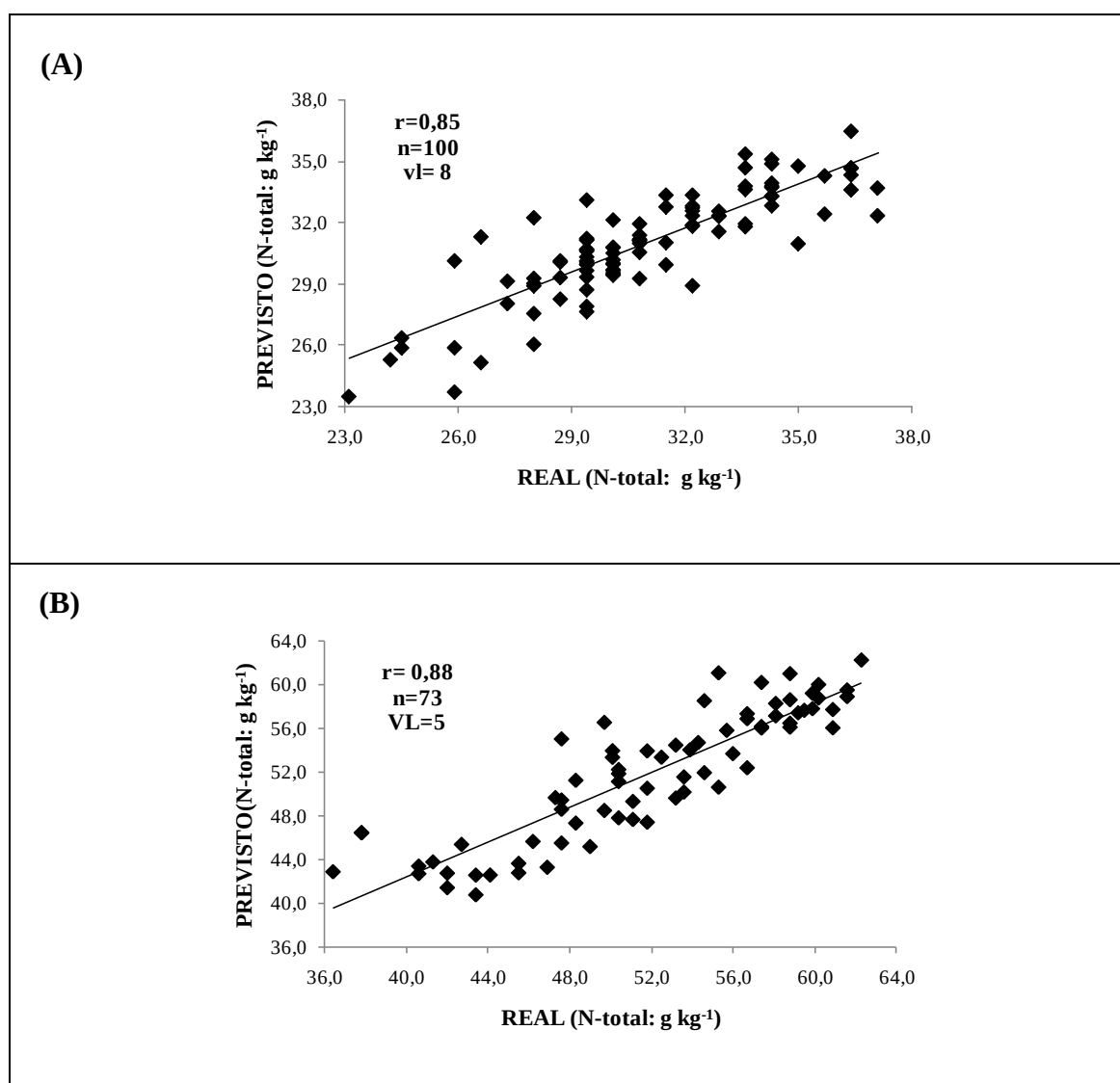


FIGURA 12. Gráficos de Calibração. Teor de nitrogênio (N-Total) em folhas de milho (A) e soja (B) medido pelo método Kjeldahl (REAL) versus teor de N-Total previsto pelo NIR (PREVISTO) utilizando método PLS com 8 (A) e 5 (B) variáveis latentes.

Os modelos de calibração construídos (Figura 12) foram testados e os resultados entre o real e o previsto plotados em gráficos conforme ilustrado na figura 13.

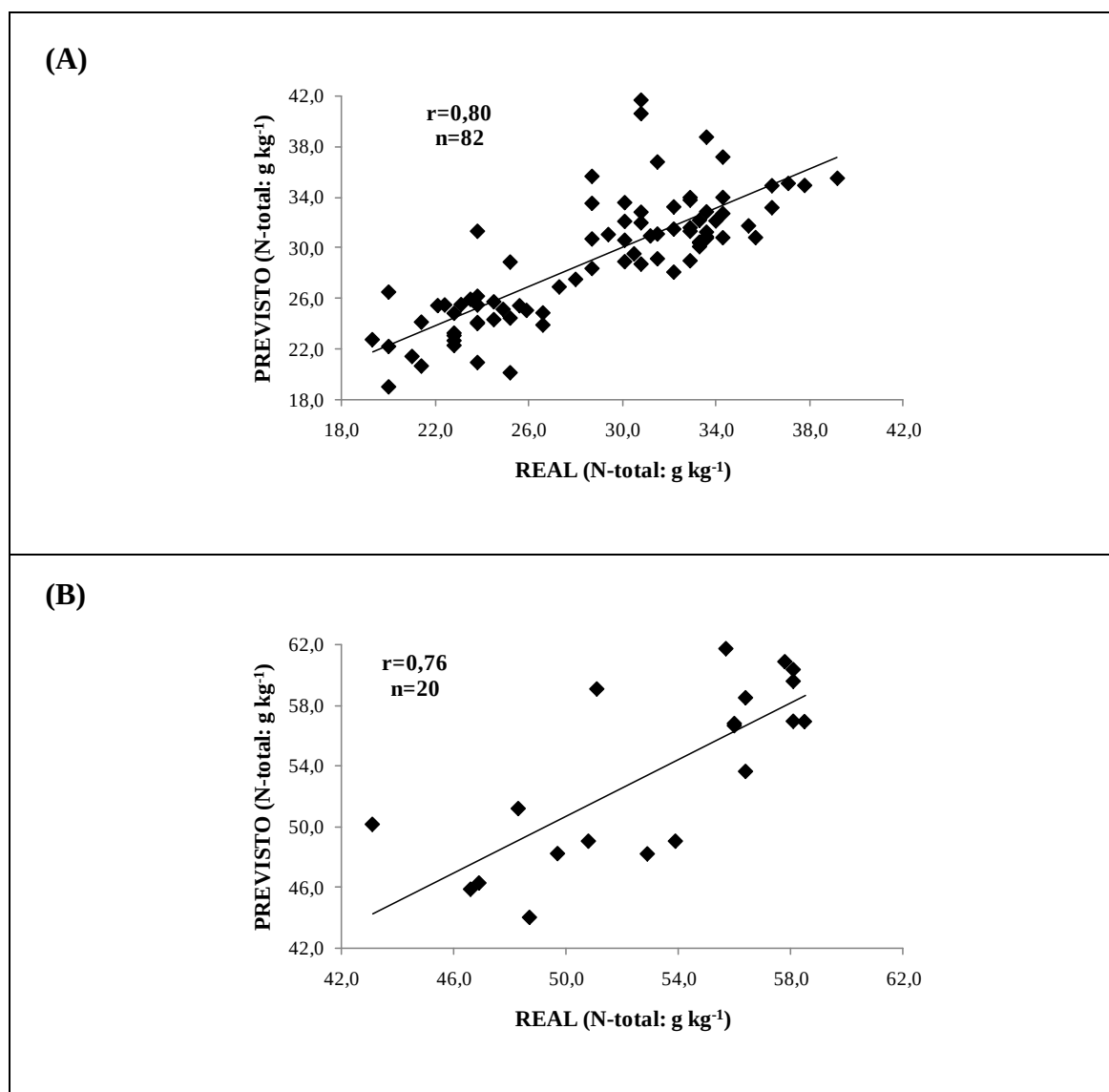


FIGURA 13. Teor de nitrogênio total (N-Total) em folhas de milho (A) e soja (B), medido pelo método Kjeldahl (REAL) versus teor de nitrogênio previsto pelo NIR (PREVISTO)

A previsão de nitrogênio total em folhas de milho (Figura 13(A)) e de soja (Figura 13(B)) apresentou melhor linearidade do que na previsão das análises de solo (Figura 10). O teste “t” indicou que esses valores além de correlacionados são estatisticamente iguais (Tabela 14), comprovando que para esse conjunto de amostras, os valores preditos pelos modelos em espectroscopia NIR não diferiram dos valores

reais medidos pelo método de análise foliar (Semimicro Kjeldahl) usado como referência neste trabalho.

TABELA 14. Teste t-student (5%) e probabilidade (p) obtida para diferenças entre médias, para os métodos de referência e estimados pelo NIR para previsão de (n) amostras foliares de milho e soja.

Análise	Métodos Comparados	“p”	t calculado	t tabelado
N-Total (Milho)	Kjeldahl x NIR (n=82)	0,69 ^{ns}	-0,40	1,97
N-Total (Soja)	Kjeldahl x NIR (n=20)	0,77 ^{ns}	-0,30	2,03

^{ns} não significativo a 5% de probabilidade

A melhor previsão para análises foliares em comparação as análise de solos, pode ser resultado da maior variabilidade encontrada nestes últimos como as diferentes cores e texturas das diversas classes de solos utilizadas para calibração e previsão dos modelos. Diferentemente dos espectros obtidos para análise de solos (Figura 8), os espectros de folhas de milho e soja (Figura 11) apresentam maior similaridade, dada as menores fontes de variações destas, resultando, portanto em melhores resultados de previsão. Outro fator que contribui no melhor resultado de previsão dos modelos para análises foliares deve-se ao fato de as análises de solos apresentarem valores medidos pelos métodos de referência fora dos limites do intervalo em que os modelos foram calibrados, enquanto que na previsão de análises foliares, com exceção de um valor, todos os outros valores previstos estavam dentro do intervalo de calibração construído para os modelos.

Os erros de previsão para esse modelamento (RMSEC, RMSEP e ER%) estão resumidos na tabela 15 abaixo:

TABELA 15. Erros quadráticos médios na calibração (RMSEC) e previsão (RMSEP) e erros relativos percentuais médios (ER%) dos modelos desenvolvidos para análise dos teores de nitrogênio total (N-Total) em folhas de milho e soja.

Análise	RMSEC	RMSEP	ER (%) médio
N-Total (Milho)	4,65	3,33	8,3
N-Total (Soja)	4,53	4,35	5,7

Os erros quadráticos médios (RMSEC e RMSEP) para N-Total em milho e soja foram muito próximos, sendo o mínimo de 3,33 e o máximo de 4,65. O erro relativo percentual médio de previsão para análise de soja (ER médio= 5,7) foi menor que para análise de milho (ER médio=8,3), ambos maiores do que os encontrados por Lima et al. (2008) que desenvolvendo modelos PLS em espectroscopia NIR, para avaliação de nitrogênio em folhas de trigo, obtiveram erros relativos médios inferiores a $\pm 3,00 \%$. Mello (1998) também avaliou o uso da espectroscopia NIR para determinar teor de nitrogênio em folhas de trigo. Segundo este autor, para se obter eficiência da espectroscopia NIR na determinação do teor de nitrogênio em folhas, deve-se, invariavelmente, corrigir os espectros, recorrendo a pré-processamentos espectrais (MSC, Filtros de Fourier e Wavelets) antes da calibração dos modelos, caso contrário, os erros de previsão podem ser elevados. Este mesmo autor avaliou a utilização de redes neurais artificiais para o modelamento dos dados e concluiu que elas forneceram melhores resultados que o modelamento por PLS na análise de nitrogênio em folhas.

Os erros relativos médios para N-Total em milho e soja seguem detalhados por intervalos na tabela 16:

TABELA 16. Erros relativos percentuais médios (ER) e número de amostras (n) para cada intervalo de nitrogênio total (N-Total) avaliado em amostra de milho e soja.

	INTERVALO REAL	n	ER (%) Médio
N total (milho): g kg⁻¹	19 a 25	25	8,8
	25 a 30	14	8,3
	30 a 35	35	7,9
	35 a 40	7	8,4
	<i>n</i> total=82		ER médio=8,3
N total (soja): g kg⁻¹	42 a 47	3	6,4
	47 a 53	6	7,8
	53 a 58	7	5,2
	58 a 63	4	2,8
	<i>n</i> total= 20		ER médio=5,7

A variabilidade dos erros relativos para previsão de nitrogênio em folhas de milho foi praticamente a mesma em todas as faixas de nitrogênio analisadas (Tabela 16). Para a análise do N-Total em soja os menores erros foram encontrados na faixa de maiores valores de nitrogênio (58 a 63 g kg⁻¹). O número de amostras avaliadas na previsão de N-Total em soja foi pequeno, inclusive a quantidade de amostras (4) na

faixa de menor variação (58 a 63 g kg⁻¹) o que pode ter reduzido a representatividade da análise no intervalo avaliado.

Nas metodologias desenvolvidas para a análise de folhas os resultados obtidos foram próximos aos relatados na literatura (MEYER, 1983; LIMA et al., 2008; SANTOS et al., 2010) demonstrando a viabilidade do uso da metodologia NIR para tal finalidade.

Podemos observar uma maior eficiência do uso da metodologia NIR para análises foliares do que para análise de solos, significando uma melhor linearidade nos modelos desenvolvidos para foliares, uma vez que a complexidade na matriz solo é maior. A heterogeneidade encontrada em solos é provavelmente o principal motivo para a enorme dificuldade em desenvolver bons modelos em espectroscopia NIR na determinação de constituintes dos solos. Para estes, a tendência é que os modelos sejam não lineares.

Uma alternativa para melhorar a previsão na análise de solos seria construir modelos os mais específicos possíveis, delimitando, por exemplo, à classe de textura. Outra possibilidade é trabalhar com o pré-processamento de dados ou mesmo recorrer a outros métodos não lineares de calibração multivariada, como por exemplo, a utilização do recurso quimiométrico das redes neurais artificiais (FIDÊNCIO, 2001). Estes recursos também poderiam ser utilizados para as análises foliares para obter melhores correlações na calibração, e menores erros de previsão.

CONCLUSÕES

Há uma maior eficiência da utilização da metodologia NIR, aliada a calibração multivariada por mínimos quadrados parciais (NIR-PLS), para análises foliares do que para análises de solos;

A metodologia NIR-PLS apresentou problemas para a previsão de silício, matéria orgânica e argila em solos utilizando diferentes classes na calibração dos modelos;

Para a análise do N-Total em folhas de milho e soja, a metodologia NIR-PLS foi satisfatória;

No geral, embora necessitando de estudos futuros para o devido aperfeiçoamento nas metodologias desenvolvidas, a metodologia NIR aliada a calibração multivariada apresenta viabilidade para a determinação dos teores de silício solúvel, matéria orgânica e argila em solos, assim como de nitrogênio em folhas de milho e soja. Podendo tornar-se uma alternativa rápida para tais análises químicas.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, H. V. **Manual de métodos analíticos para o controle da produção de álcool e açúcar**. 2. ed. Piracicaba: Esalq-USP, 1996.
- ANDRADE, C. R. **Espectroscopia no Infravermelho Próximo para prever propriedades da madeira e do carvão de plantio clonal de *Eucalyptus* SP**. 2009. 121f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia da Madeira) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2009.
- ASIMOV, I. **Asimov explica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Francisco Alves, 1982. 113 p.
- BALL, D.F. Loss-on-ignition as an estimate of organic matter and organic carbon in non-calcareous soils. **Journal of Soil Science**, London, v. 15, n.1, p.84-92, 1964.
- BATAGLIA, O. C. et al. **Métodos de análise química de plantas**. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas, 1983.
- BATTEN, G. et al. Non-structural carbohydrate: Analysis by near infrared reflectance spectroscopy and its importance as an indicator of plant growth. **Plant and Soil**, Crawley, v. 155-156, p. 243-246, 1993.
- BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: a practical guide**. New York: Wiley, 1998.
- BELLON, V.; VIGNEAU, J.L.; LECLERCQ, M. Feasibility and performances of a new, multiplexed fast and low-cost fiber-optic nir spectrometer for the on-line measurement of sugar in fruits. **Applied Spectroscopy**, Lawrence, v. 47, n.7, p. 1079-1083, 1993.
- BELTRAN, V. et al. Formation of black core during the firing of floor and wall tiles. **Interceram**, Freiburg, v. 37, p.15-21, 1988.
- BEN-DOR, E.; BANIN, A. Determination of organic matter content in arid zone soils using a simple “loss-on-ignition” method. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 20, p.1675-1695, 1984.
- BEN-DOR, E.; BANIN, A. Near infrared analysis as a Rapid Method to Simultaneously Evaluate Several Soil Properties. **Soil Science Society of American Journal**, Madison, v. 59, n. 2, p. 364-372, 1995a.
- BEN-DOR, E.; BANIN, A. Near infrared analysis (NIRA) as a method to simultaneously evaluate spectral featureless constituents in soils. **Soil Science**, Baltimore, v.159, n.4, p. 259-270, 1995b.
- BIRCHALL, J. K. The essentiality of silicon in biology. **Chemical Society Reviews**, Cambridge, v. 24, p. 351-357, 1995.
- BOLAN, N.S.; BASKARAN, S.; THIAGARANJAN, S. An evaluation of the methods

of measurement of dissolved organic carbon in soils, manures, sludges and stream water. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.27, p.13-14: 2723-2737, 1996.

BORGES NETO, W. **Parâmetros de qualidade de lubrificantes e óleo de oliva através de espectroscopia vibracional, calibração multivariada e seleção de variáveis**. 2005. 130 f. Tese (Doutorado em Química) - UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, 2005.

BOUYOUCOS, G. J. Rapid determination of the moisture content of soils. **Soil Science**, Baltimore, v.24, p. 651-652, 1926.

BURNS, D. A.; CIURCZAK, E. W. **Handbook of near-infrared analysis**. New York: Marcel Dekker, 2001.

CAMARGO, M. S. et al. Extratores de silício solúvel em solos: influência do calcário e fósforo. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.21, n.2, p.9-19. May./Aug. ISSN 1516-3725, 2005.

CARNEIRO, L. M. S. et al. Uso de argila silicatada na redução da severidade de *Phytophthora infestans* em batateira. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p.347-348, 2003.

CERQUEIRA, E. O. et al. Utilização de filtro de transformada de Fourier para minimização de ruídos em sinais analíticos. **Química Nova**, São Paulo, v.23, p. 690, 2000.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise Instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2000. 606 p.

COATES, J. A review of current new technology: Used in instrumentation for industrial vibrational spectroscopy. **Spectroscopy**, Duluth, v. 14, n. 10, p. 20-34, 1999.

COLEMAN, T. L. et al. Spectral band selection for quantifying selected properties in highly weathered soils. **Soil Science**, Baltimore, v.151, n.5, p. 355-361, 1991.

COSTA, R. R., MORAES, J. C., COSTA, R. R. Interação silício-imidacloprid no comportamento biológico e alimentar de *Schizaphis Graminum* (Rond.) (Hemíptera-Aphididae) em plantas de trigo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 455-460, 2009.

COÛTEAUX, M. M.; BERG, B.; ROVIRA, P. Near infrared reflectance spectroscopy for determination of organic matter fractions including microbial biomass in coniferous forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, [S.l.], v. 35, p. 1587-1600, 2003.

COZZOLINO, D.; MORÓN, A. The potential of near-infrared reflectance spectroscopy to analyses soil chemical and physical characteristics. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 140, p. 65-71, 2003.

CREASER, C.S.; DAVIES, A.M.C. **Analytical Applications of Spectroscopy**. 1. ed.

London, UK: Royal Society of Chemistry, 1988. 502 p.

DALMOLIN, R. S. D. et. al. GONÇALVES, C. N; KLAMT, E; DICK, D. P. Relações entre os constituintes do solo e seu comportamento espectral. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 481- 489, 2005.

DATNOFF, L.E.; SNYDER, G.H.; KORNDORFER, G. H. **Silicon in Agriculture**. Amsterdam: Elsevier, 2001. 403p.

DAUN, J.K.; CLEAR, K.M.; WILLIAMS, P. Comparison of three whole seed near infrared analyzers for measuring quality components of canola seed. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 71, n. 10, p. 1063-1068, 1994.

DAVIS, T. The History of Near Infrared Spectroscopy Analysis: Past, Present and Future – From Sleeping Technique to the Morning Star of Spectroscopy. **Analisis Magazine**, [S.l.], v. 26, n.4, p.17-18, 1998.

DEAN JÚNIOR, W.E. Determination of carbonate and organic matter in calcareous sediments and sedimentary rocks by loss on ignition: comparison with other methods. **Journal of Sedimentary Petrology**, New York, v.44, p.242-248, 1974.

DEAVILLE, E.R.; FLINN, P.C. Near infrared (NIR) spectroscopy: an alternative approach for the estimation of forage quality and voluntary in take. In: GIVENS, D. I.; OWEN, E; AXFORD, R. F. E.; OMED, H. M. **Forage Evaluation in Ruminant Nutrition**, Wallingford: CABI, 2000. p. 301–320.

DESPAGNE, F., MASSART, D. L. Neural networks in multivariate calibration. **Analyst**, [S.l.], v.123, n.157, 1998.

DOORAN, J. W.; JONES, A.J. **Methods for Assessing Soil Quality**. Madison: Soil Science Society of America, SSSA Special Publication n. 49. 1996. 410p.

DRENNEN, K.J.; KRAEMER, E.G; LODER, R.A. Advances and Perspectives in Near Infrared Spectrophotometry. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, [S.l.], v. 22, n. 6, p. 443-475, 1991.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solo**, 2. ed, Rio de Janeiro: EMBRAPA, 1997. 212p.

EMBRAPA, **Cultivo de Algodão Irrigado**. 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Algodao/AlgodaoIrrigado/solos.htm>>. Acesso em: 24 jun. 2010, 08:15:26.

EPSTEIN, E; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. 2. ed. Londrina: Planta, 2006. 403p.

FARIA, R. **Efeito da acumulação de silício e a tolerância das plantas de arroz do sequeiro ao déficit hídrico do solo**. 2000. 125f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Solos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

FERNANDES, F. A. et al. **Uso de espectrometria de refletância no infravermelho próximo (NIRS) na análise de carbono de Neossolos do Pantanal**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2010. 3p.

FERRARINI, H. **Determinação de teores nutricionais do milho por espectroscopia no infravermelho e calibração multivariada**. 2004. 107 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2004.

FERREIRA, A. C. B. et al. Características agronômicas e nutricionais do milho adubado com nitrogênio, molibdênio e zinco. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 131-138, 2001.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M. MELGO, M. S. VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: Calibração Multivariada, um Tutorial. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n.5, p. 724-731, 1999.

FIDÊNCIO, P.H. **Análise de Solos por Espectroscopia no Infravermelho Próximo e Aplicação de Métodos Quimiométricos**. 2001. 138f. Tese (Doutorado em Química Analítica). UNICAMP- Universidade Estadual de Campina, Campinas, 2001.

GALVANI, F.; GAERTNER, E. **Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2006. 9p.

GALVÃO, R. K. H. et al. Estudo comparativo sobre filtragem de sinais instrumentais usando transformadas de Fourier e Wavelet. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, p. 874, 2001.

GELADI, P.; KOWALSKI, B. R. Partial Least-Squares Regression: A Tutorial. **Analytica Chimica Acta**, [S.l.], v. 185, p. 1-17, 1986.

GIBSON, J. A. E. Kinetics of silicon and aluminum release from soils during extration with 0,01 M calcium chloride. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 25, p. 3393-3403, 1994.

GUIOTOKU, M. et al. Aplicação da Espectroscopia de Infravermelho Próximo na Análise de Propriedades de Solos Florestais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29. 2006, Águas de Lindóia, SP. **Anais...** Águas de Lindóia: SBQ, 2006. (CD-ROM).

HE, Y., SONG, H. Prediction of Soil Content Using Near-Infrared Spectroscopy, SPIE Newsroom- **International Society for Optical Engineering**, [S.l.], v.2, p. 8-10, 2006.

IMAIZUMI, K.; YOSHIDA, S. Edaphological studies on silicon supplying power of paddy soils. **Bulletin of the National Institute of Agricultural Sciences**, Ibaraki, v.8, p.261-304, 1958.

JACKSON, M.L. **Analisis quimica de suelos**. Barcelona: Omega, 1982. p. 282-309.

KATO, N.; SUMIDA, H. Evaluation of silicon availability in paddy soils by an

extraction using pH 6.2 phosphate buffer solution. **Annual Report of the Tohoku National Agricultural Experiment Station for 1999**, Morioka, p. 73-75, 2000.

KEENEY, D.R.; BREMNER, J.M. Use of the Coleman model 29A analyser for total nitrogen analysis of soils. **Soil Science**, Baltimore, v. 104, p. 358-363. 1967.

KILLORN, R.; ZOURARAKIS, D. Nitrogen fertilizer management effects on corn grain yield and nitrogen uptake. **Journal of Production Agriculture**, Madison, v. 5, n. 1, p. 142-148, 1992.

KORNDORFER, G. H. et al. Avaliação de métodos de extração de silício para solos cultivados com arroz de sequeiro. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 23, n.1, p. 101-106, 1999a.

KORNDORFER, G.H.; DATNOFF, L.E.; CORREA, G.F. Influence of silicon on grain discoloration and upland rice grown on four savanna soils from Brazil. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 22, n. 1, p. 93-102, 1999b.

KORNDORFER, G. H.; PEREIRA, H. S.; NOLLA, A. **Análise de silício no solo, planta e fertilizante**. Uberlândia: UFU, 2004. 50 p.

KORNDORFER, G.H.; SNYDER, G. H.; ULLOA, M.; POWELL, G.; DATNOFF, L.E. Calibration of soil and plant silicon analysis for rice production. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.24, p. 1071-1084, 2001.

LEITE, C. M.; BERNARDES, R. S.; OLIVEIRA, S. A. O. Metodologia Walkley-Black na determinação da matéria orgânica em solos contaminados por chorume. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.8, n.1, p.111-115, 2004.

LIMA, K. M. G. et al. Determinação não destrutiva do nitrogênio total em plantas por espectroscopia de reflectância difusa no infravermelho próximo. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n.3, p.700-703, 2008.

LINDSAY, W.L. **Chemical equilibrium in soil.**, New York: John Wiley & Sons, 1979. 449p

MA, J. F.; TAKAHASHI, E. Effect of silicon on growth and phosphorus uptake of rice. **Plant and Soil**, Crawley, v.126, n.1, p.115-119, 1990.

MAGDOFF, F. **Building soils for better crops: organic matter management**. Lincoln: University of Nebraska Press, 1992. 433p.

MALAVOLTA, E. **ABC da adubação**. 5.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1989. 292p.

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

MASSART, D. L. et al. **Handbook of chemometrics and qualimetrics Part A**.

Amsterdam: Elsevier Science B. V., v.20A, 867 p., 1998.

MEHRUBEOGLU, M.; COTE, G.L. Determination of total reducing sugars in potato amples using near-infrared spectroscopy. **Cereal Foods World**, St Paul, v.42, n.5, p. 409-413, 1997.

MELLO, C. A. de. **Redes Neurais e técnicas de pré-processamento de sinais em Espectroscopia de Reflectância no Infravermelho Próximo**. 1998. 147f. Tese (Doutorado em Química). UNICAMP, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

MEYER, J. H. Rapid determination of nitrogen in cane leaves. **Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association**, [S.l.], v.57, p. 109-112, 1983.

MEYER, J. H. Use of NIR in the South African sugar industry with reference to soil fertility management. **South African Sugar Association Experiment Station**, p. 1-13, KwaZulu-Natal, 1999.

MEYER, J. H.; VAN VUUREN, J. A. J.; VAN ANTWERPEN, R. The potential hole of near infrared reflectance (NIR) monitoring in precision agriculture (PAG). **Proceedings of The South African Sugar Technologists Association**, [S.l.], v.79, p. 202-205, 2005.

MEYER, J.H. Near infra-red spectroscopy (NIRS) research in the South African sugar industry. **International Sugar Journal**, London, v. 100, p. 279-286, 1998.

MURRAY, I. Forage analysis by near infrared spectroscopy. In: DAVIES, A.; BAKER, R. D.; GRANT, S.A.; LAIDLAW, A. S. **Sward measurement handbook**, Reading, UK: British Grassland Society, 1993. p. 285-312.

NAES, T.; ISAKSSON, T. Different strategies for handling non-linearity problems in NIR calibration. **NIR News**, Chichester, v. 5, n.1 p.4-11, 1994.

NOGUEIRA, A. R. de A.; SOUZA, B. G. de. **Manual de laboratório: solo, água, nutrição animal e alimentos**. São Carlos: EMBRAPA, 2005. 334p.

NOLLA, A.; KONRDÖRFER, G. H.; ARRUDA, D. G. Eficiência de silicato de cálcio e calcário no controle de cercospora sojina na cultura da soja. In: SIMPÓSIO SOBRE SILÍCIO NA AGRICULTURA, 3, 2004, Uberlândia-MG. **Resumos...** Uberlândia: Grupo de Pesquisa Silício na Agricultura, 2004 (CD ROM).

NONAKA, K.; TAKAHASHI, K. A method of assessing the need of silicate fertilizers in paddy soils. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF SOIL SCIENCE, 14, Kioto, 1990. **Proceedings...** Kyoto: Japanese Society of Soil Science, 1990. v. 4, p. 513-514.

NONAKA, K.; TAKAHASHI, K. A method of measuring available silicates in paddy soils. **Japan Agriculture Research Quarterly**, Ibaraki, v.22, p. 91-95, 1988.

OADES, J. M. An Introduction to Organic Matter in mineral Soils. In: DIXON, J.B; WEED, S.B **Mineral in Soil Environments**. 2.ed. Madison: Soil Science Society of

America, 1996. p. 89-159.

OLIVEIRA, J. B.; JACOMINE, P. K. T.; CAMARGO, M. N. **Classes gerais de solos do brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 203p.

OSBORNE, B.G.; FEARN, T.; HINDLE, P.H. **Practical near infrared reflectance spectroscopy**: with Applications in Food and Beverages Analysis. Harlow, U.K.: Longman Scientific and Technical, 1993. p. 13-35.

PAGE, A.L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D. R. **Methods of soil Analysis, part. 2**: chemical and microbiological properties. 2. ed., Wisconsin, USA: American Society of Agronomy, 1996.

PANONTIN, F. **Determinação de volume de poro de sílicas para clae utilizando espectroscopia no Infravermelho próximo**. 2007. 93f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2007.

PARRISH, F.W. et al. Determination of phytic acid in cottonseed by near infrared reflectance spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 2, p. 407-409, 1990.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.14, n.2, p.198-219, mar./abr. 2003.

PEREIRA, H. S.; BARBOSA, N. C.; CARNEIRO, M. A.C.; KORNDORFER, G. H. Avaliação de fontes e de extratores de silício no solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 239-247, 2007.

PEREIRA, H. S. et al. Avaliação de extratores de silício disponível em solos de cerrado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 32, 2009, Fortaleza-CE. **Anais...** O solo e produção de bionergia: perspectivas e desafios. Fortaleza: SPH Comunicação visual, 2009. v.1, p.1-4.

PEREIRA, H. S. et al. Silicon sources for the rice plants. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.61, n.5, p.522-528, 2004.

PEREIRA, H.S.; ASSIS, M. H.; KORNDORFER, G. H. Métodos para análise de solos e fertilizantes para silício. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE SILÍCIO NA AGRICULTURA, 5, 2010, Viçosa-MG. **Anais...** Viçosa: Suprema Gráfica, 2010. p. 155-169.

PEREIRA, M. G. et al. Determinação do carbono orgânico em organossolos e solos com horizontes com elevado conteúdo de matéria orgânica. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 2, p. 187-193, 2006.

PHELAN, P.L.; NORRIS, K.H.; MASON, J.F. Soil management history and host preference by *ostria nubilalis*: evidence for plant mineral balance mediating insect-plant interactions. **Population Ecology**, Tokyo, v. 25, n. 6, p. 1329-1336, 1996.

RAIJ, B. V. **Fertilidade do solo e adubação**. São Paulo, Piracicaba: Ceres, 1991. 343p.

RAIJ, B. V.; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H; QUAGGIO, A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2001. p. 213-224.

RESENDE, M. et al. **Pedologia**: base para distinção de ambientes. 2. ed., Viçosa: NEPUT, 1997.

ROBERTS, C.A. et al. Chemical and spectral quantification of mold in contaminated barley. **Cereal Chemistry**, St Paul, v. 68, n. 3, p. 272-275, 1991.

SALIBA, P. R. **Desenvolvimento de Metodologias Analíticas utilizando espectroscopia visível e infravermelho próximo**: classificação de açúcares, determinação de brix e acidez total em suco de laranja. 1999. 78f. Tese (Doutorado em Química) Universidade Estadual de Campinas-SP, 1999.

SANTOS, G. A.; PEREIRA, A.B; KORNDORFER, G. H. Uso do sistema de análises por Infravermelho próximo (NIR) para análises de matéria orgânica e fração argila em solos e teores foliares de silício e nitrogênio em cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n.1, p.100-108, Jan/Fev. 2010.

SATO, T. et al. Nondestructive determination of fatty acid of husked sunflower (*Helianthus annua* L.) seeds by near infrared spectroscopy. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 72, v. 10, p. 1177-1183, 1995.

SAVANT, N.K.; SNIDER G. H.; DATNOFF, L.E. Silicon management and sustainable rice production. **Advances in Agronomy**, New York, v. 58, p. 151-199, 1997.

SCHOLLENBERGER, C.J. A rapid approximate method for determining soil organic matter. **Soil Science**, Baltimore, v.24, p.65-68, 1927.

SCHOLLENBERGER, C.J. Determination of soil organic matter. **Soil Science**, Baltimore, v.59, p.53-56, Jan./June 1945.

SCHRADER, B. **Infrared and Raman Spectroscopy**: methods and applications. Weinheim: VCH, 1995.

SENA, M. M., **Aplicação de métodos quimiométricos de primeira e segunda ordem na determinação direta de fármacos por espectroscopia molecular**. 2004. 122f. Tese (Doutorado em Química), UNICAMP- Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2004.

SENA, M. M.; POPPI, R. J.; FRIGHETTO, R. T. S.; VALARINI, P. J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. **Revista Química Nova**, São Paulo, v.23, p.547-556, 2000.

SILVA, A. C.; TORRADO, P. V.; ABREU JÚNIOR, J. Métodos de quantificação da matéria orgânica do solo. **Revista da Universidade de Alfenas**, Alfenas, v.5, n. 1, p.

21-26, 1999.

SILVA, F. C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília, DF: EMBRAPA, 1999. 370p.

SILVEIRA JÚNIOR. et al. Silicato de cálcio e calcário na produção e qualidade da cana de açúcar: Usina Catanduva. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS DO SOLO: Alicerce dos sistemas de produção, 29, 2003, Ribeirão Preto. **Resumos...** Ribeirão Preto: USP, 2003. p. 66.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de Compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos, 2006.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. São Paulo: Bookman, 2002.

SNYDER, G.H. Methods for silicon analysis in plants, soils and fertilizers. In: DATNOFF, L.E.; SNYDER, G.H.; KORNDÖRFER, G.H. **Silicon in agriculture**. Amsterdam: Elsevier, 2001. p.185-196.

STENBERG, B.; NORDKVIT, E.; SALOMONSSON, L. Use of near infrared reflectance spectra of soils for objective selection of samples. **Soil Science**, Baltimore, v.159, n. 2, p.109-114, 1995.

SWIFT, R. S. Organic Matter Characterization. In: SPARKS, D. L. **Methods of soil analysis**: part 3-chemical methods/ SSSA Book Series 5. Madison: American Society of Agronomy, 1996. P. 1011-1069.

TEDESCO, J. M. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed., Porto Alegre: UFRGS/DS, 1995.

THOMAS, E.V. A Primer on Multivariate Calibration. **Analytical Chemistry**, [S.l.], v. 66, p. 795A-804-A, 1994.

THROOP, J.A.; ANESHANSLEY, D.J.; UPCHURCH, B.L. Na image processing algorithm to find new and old bruises. **Applied Engineering in Agriculture**, St. Joseph, v. 11, n. 5, p. 751-757, 1995.

VALDERRAMA, P. **Avaliação de Figura de Mérito em Calibração Multivariada na Determinação de controle de Qualidade em Indústria Alcooleira por Espectroscopia no Infravermelho Próximo**. 2005. 128f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – UNICAMP, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2005.

VAN KEMPEN, T.; JACKSON, D. NIRS may provide rapid evaluation of amino acids. **Feedstuffs**, Minnetonka, v. 68, p.12-15, 1996.

VOGEL, A. I. **Análise Química Quantitativa**. Tradução de Horácio Macedo. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1992. 712p.

WALINGA, I. et al. Spectrophotometric determination of organic carbon in soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 23, p. 1935 - 1944, 1992.

WALKLEY, A.; BLACK, I. A. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. **Soil Science**, Baltimore, v.37, p.29-38, Jan/Jun, 1934.

WENDLANDT, W.W.M. **Thermal analysis**. New York: J. Wiley, 1986. p. 137-460.

WETZEL, D. L. Near-Infrared Reflectance Analysis Sleeper Among Spectroscopic Techniques. **Analytical Chemistry**, [S.l.], v. 55, p. 1165A-1176A, 1983.

WILLIAMS, P.C.E.; NORRIS, K.H. **Near infrared technology in the agricultural and food industries**. St. Paul, MN, USA: Americam Association of Cereal Chemists, 1990, 330p.

YASUHARA, T.; NOKIHARA, K. High-throughput analysis of total nitrogen content that replaces the classic Kjeldahl method. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 49, p. 4581-4583, 2001.

YEH, R.S. et al. Determination of moisture profile in foods during microwave heating using vis-nir spectroscopy. **Food Science and Technology-Leb.**, [S.l.], v. 27, n.4, p. 358-362, 1994.

YOUNG, J. L.; LINDBECK, M. R. Carbon determination in soils and organic materials with high-frequence induction furnace. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madison, v.28, p.377-381, 1964.

YOUNG, M.W.; MACKERRON, D.K.L.; DAVIES, H.V. Calibration of near infrared reflectance spectroscopy to estimate nitrogen concentrarion in potato tissues. **Potato Research**, Wageningen, v. 40, n. 2, p. 215-220, 1997.