

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA**

KARLA KARINE BELTRAME

**AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS WALKLEY & BLACK E CHN
COMO MÉTODOS DE REFERÊNCIA PARA CALIBRAÇÃO
MULTIVARIADA NA DETERMINAÇÃO DE CARBONO
ORGÂNICO EM SOLOS BRASILEIROS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**CAMPO MOURÃO
2014**

KARLA KARINE BELTRAME

**AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS WALKLEY & BLACK E CHN
COMO MÉTODOS DE REFERÊNCIA PARA CALIBRAÇÃO
MULTIVARIADA NA DETERMINAÇÃO DE CARBONO
ORGÂNICO EM SOLOS BRASILEIROS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2 (TCC2), do Curso de Licenciatura em Química do Departamento Acadêmico de Química – DAQUI – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito para obtenção do título de Licenciado em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Valderrama

**CAMPO MOURÃO
2014**



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
Câmpus Campo Mourão

Diretoria de Graduação e Educação Profissional

Departamento Acadêmico de Química - DAQUI

Curso de Licenciatura em Química



TERMO DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS WALKLEY & BLACK E CHN COMO MÉTODOS DE REFERÊNCIA PARA CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA NA DETERMINAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO EM SOLOS BRASILEIROS

por

KARLA KARINE BELTRAME

Este trabalho foi apresentado em 20 de fevereiro de 2015 como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciado em Química. O Candidato foi argüido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação a Banca Examinadora considerou o trabalho- (APROVADO OU REPROVADO).

Prof^a. Dr^a. Marcilene Ferrari
Barriquello Consolin
(UTFPR)

Prof^o. Dr^o. Paulo Henrique Março
(UTFPR)

Prof^a. Dr^a. Patricia Valderrama
(UTFPR)
Orientadora

Dedico este trabalho aos meus amados pais MARLENE BRUNETTA BELTRAME e ANTONIO CARLOS BELTRAME, pelo amor, carinho, compreensão, apoio e incentivo. À minha querida irmã KATIA KELLEN BELTRAME por todo amor, carinho e apoio.

Dedico ainda, à todas as pessoas importantes e que fizeram e fazem parte da minha vida, que me ajudaram e incentivaram.

AGRADECIMENTOS

- À Deus por ter me permitido alcançar mais essa vitória.
- Aos meus queridos e amados pais Antonio Carlos Beltrame e Marlene Brunetta Beltrame por todo esforço para comigo, carinho, apoio, incentivo, compreensão, força, confiança e amor. À minha querida irmã Katia Kellen Beltrame por todo amor, incentivo e compreensão.
- À querida professora Dra. Patricia Valderrama por toda ajuda, incentivo, apoio, orientação, convivência e amizade, além da oportunidade de realização deste trabalho.
- Ao pesquisador Andre Marcelo Souza pelo auxílio, colaboração, parceria e ajuda com as análises de solos.
- À Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela valiosa oportunidade concedida.
- À Embrapa Solos - Rio de Janeiro por ter cedido as amostras de solos, além da oportunidade concedida de colaboração.
- Às minhas queridas amigas da faculdade Géssica, Larissa, Andressa, Hellen e Letícia, além das amigas que não são da faculdade, agradeço pela amizade, carinho, apoio e parceria.
- Ao professor Adriano Lopes Romero pela oportunidade de trabalhar dois anos como sua aluna de Iniciação Científica.
- A todos os professores que passaram por minha vida, lembro-me de forma especial de cada um, sem seus ensinamentos jamais conseguiria algum êxito.
- Enfim, meu agradecimento a todos familiares, amigos, professores e demais que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho e desta etapa tão importante de minha vida. Muito Obrigada! Que Deus derrame bênçãos sobre a vida de cada um.

RESUMO

BELTRAME, K. Karla. **Avaliação dos métodos Walkley & Black e CHN como métodos de referência para calibração multivariada na determinação de carbono orgânico em solos brasileiros**. 2015. 48f. Trabalho de conclusão de curso – Licenciatura em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Campo Mourão, 2015.

Os métodos Walkley & Black modificado (Método Embrapa) e CHN foram avaliados como métodos de referência na determinação do carbono orgânico em solos brasileiros empregando a espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIRS) como uma alternativa. O objetivo principal do trabalho foi avaliar qual dos métodos de referência poderia fornecer um modelo de calibração multivariada com maior capacidade preditiva. Os modelos foram centrados na média e construídos a partir do método de mínimos quadrados parciais (PLS) com dez variáveis latentes. A exatidão do modelo cujo método de referência foi o Walkley & Black modificado foi inferior à exatidão do modelo empregando como método de referência o CHN. As demais figuras de mérito, como sensibilidade, sensibilidade analítica, limites de detecção e quantificação, ajuste e linearidade foram bastante similares. Um teste t-pareado foi aplicado aos resultados das figuras de mérito para ambos os modelos construídos e, com 95% de confiança, não existem diferenças significativas entre os dois métodos empregados como referência para o NIRS.

Palavras-chave: Carbono orgânico, Walkley & Black, CHN, NIRS, calibração multivariada.

ABSTRACT

Beltrame, K. Karla. **Evaluation of Walkley & Black and CHN methods as reference methods for multivariate calibration in the determination of organic carbon in Brazilian soils.** 2015. 48f. completion of course work - Degree in Chemistry, Federal Technological University of Paraná (UTFPR). Campo Mourao, 2015.

The modified Walkley & Black method (Embrapa method) and CHN were evaluated as reference methods to determine organic carbon in Brazilian soils using near infrared spectroscopy (NIRS) as an alternative. The main objective of this study was to evaluate which of the reference methods could provide a calibration model with higher predictive ability. The models were mean centered and built from partial least squares (PLS) with ten latent variables. The modified Walkley & Black presented a lower accuracy when compared to CHN as reference method for near infrared spectroscopy. Other figures of merit such as sensitivity, analytical sensitivity, detection and quantification limits, adjust and linearity presented results very similar. A paired t-test was applied to the results of figures of merit obtained from both models and with 95% confidence did not show significant differences between the two methods used as reference for NIRS.

Keywords: organic carbon, Walkley & Black, CHN, NIRS, multivariate calibration.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Equipamento de espectroscopia na região do infravermelho próximo. a) Equipamento NIRS empregado na aquisição dos espectros das amostras de solo; b) saída do feixe de radiação infravermelha do acessório de reflectância difusa (NIRA); c) placas de vidro de 90mm de diâmetro empregadas como amostradores; e) amostras no acessório de reflectância difusa.....25
- Figura 2.** Etapas principais do método da oxidação com dicromato de potássio empregado como referência nas análises de carbono orgânico no solo: a) pesagem das amostras de solo; b) digestão das amostras com solução de dicromato de potássio; c) digestão a quente; d) adição do indicador difenilamina; e) titulação do excesso de dicromato com solução de sulfato ferroso amoniacal.....26
- Figura 3.** Analisador elementar.....27
- Figura 4.** Decomposição em variáveis latentes para a matriz **X** e o vetor **y**.....28
- Figura 5.** A) Espectros NIRS para as amostras de solo. B) correção da linha de base. C) Região empregada no desenvolvimento do modelo de calibração.....36
- Figura 6.** Ajuste do modelo PLS para determinação de Carbono Orgânico. (A) Método de referência Walkley & Black modificado. (B) Método de referência CHN.....38
- Figura 7.** Resíduos. (A) Método de referência Walkley & Black. (B) Método de referência CHN.....40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros de qualidade dos modelos de calibração multivariada.....	38
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CO** – Carbono Orgânico
- CHN** – Análise elementar
- CT** – Carbono Total
- CTC** – Capacidade de troca catiônica
- Embrapa** – Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária
- EURACHEM/CITAC** –
- GPR** – Ground Penetration Radar
- INMETRO** – Instituto nacional de metrologia, normalização e qualidade industrial
- ISO** – International standard organization
- LD** – Limite de detecção
- LIBS** – Laser Induced Breakdown Spectroscopy
- LQ** – Limite de quantificação
- MIR** – Infravermelho médio
- NIRS** – Espectroscopia de infravermelho próximo
- NIRA** – Acessório de reflectância difusa
- ONU** – Organização das Nações Unidas
- PCs** – Componentes principais
- PIB** – Produto Interno Bruto
- PLS** – Mínimos Quadrados Parciais
- RMSEC** – Raiz quadrada do erro médio quadrático da calibração
- RMSEP** – Raiz quadrada do erro médio quadrático da previsão
- USP** – United States Pharmacopeia
- VIS** – Espectroscopia no Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 METODOLOGIAS PARA A DETERMINAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO EM SOLOS.....	17
2.1.1 Método de Walkley & Black.....	17
2.1.2. Método Mebius	18
2.1.3. Método colorimétrico	19
2.1.4. Método gravimétrico ou perda de massa por ignição	19
2.1.5. Análise elementar (CHN) ou método de Dumas	20
2.1.6. Métodos espectroscópicos	21
2.2. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRS).....	22
2.3. CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 DETERMINAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO PELO MÉTODO WALKLEY & BLACK MODIFICADO	25
4.2 DETERMINAÇÃO DO CARBONO ORGÂNICO PELO MÉTODO CHN.....	27
4.3 PLS	28
4.4.1 Exatidão	32
4.3.2. Sensibilidade	33
4.3.3. Sensibilidade Analítica	33
4.3.4. Ajuste	34
4.3.6. Limites de Detecção e Quantificação	34
6 CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

A agricultura é um dos principais setores que alavancam a economia do Brasil, conferindo uma participação do agronegócio superior a 22% no Produto Interno Bruto (PIB) do país. O Brasil se apresenta como um dos principais produtores de grãos do mundo, esperando uma produção recorde para a temporada 2013/14, com uma colheita de 186,86 milhões de toneladas. Esse resultado indica um incremento de 9,81 milhões de toneladas em relação ao período anterior com destaque para as culturas de soja, algodão, trigo e feijão (CONAB, 2014). Com a nova demanda mundial por alimentos, ligado com o crescimento populacional, atingindo 7,2 bilhões de habitantes em 2014 e previsão de 9,6 bilhões para 2050 (ONU, 2013), a otimização dos sistemas de produção agrícola deve ser tratado de forma imprescindível e extraordinária.

Nesse sentido, um dos componentes mais importantes do desenvolvimento da agricultura, principalmente no que diz respeito ao aumento da produtividade agrícola, sem esquecer os outros fatores de produção, foi a pesquisa em fertilidade do solo e as inovações científicas e tecnológicas que permitiram o uso eficiente de corretivos e de fertilizantes na agricultura brasileira (LOPES & GUILHERME 2007). A análise de solo adequada, por sua vez, é de grande importância para a determinação de suas características, bem como para a avaliação de componentes físicos e químicos através de inúmeros processos responsáveis pela fertilidade e/ou se há a necessidade de correções, para que assim o objetivo de aumentar a capacidade produtiva do solo seja alcançado.

Dentre as variadas características de um solo, a matéria orgânica é um dos principais constituintes responsáveis pelo potencial produtivo do solo, uma vez que desempenha funções importantes como agregação do solo, geração de cargas elétricas negativas e disponibilização de nutrientes. Além disso, a matéria orgânica torna-se um compartimento chave do ciclo global do carbono do solo, pois é nela em que se encontra a principal reserva deste elemento.

Na constituição da matéria orgânica, o carbono apresenta predominância (cerca de 58%), e portanto, a determinação do carbono orgânico total tem sido utilizada para estimar quantitativamente a fração orgânica do solo (NELSON & SOMMERS, 1996). Para a quantificação do carbono são utilizados métodos para a determinação do mesmo na forma total (CT) no solo ou na sua forma orgânica (CO).

Para a determinação do carbono orgânico em solos podem ser utilizados vários métodos. Porém, em nosso estudo daremos destaque a somente dois deles, o método de análise elementar (CHN) e o Walkley-Black modificado (JACKSON, 1982), também conhecido como método Embrapa (EMBRAPA, 1997). O método CHN, classificado como oxidação por via seca, é utilizado para quantificar não somente carbono, mas também nitrogênio, hidrogênio, enxofre e oxigênio. Este método é baseado na oxidação das amostras em alta temperatura (aproximadamente 1000°C). Por sua vez, o método de Walkley-Black modificado, inserido no Manual de Métodos de Análise de Solo (EMBRAPA 1997), é o que vem sendo mais utilizado pela maioria dos laboratórios do Brasil. É baseado na oxidação do carbono orgânico do solo, só que neste caso, pelo Cr^{6+} na presença de H_2SO_4 concentrado, no qual o excesso de Cr^{6+} é titulado com Fe^{2+} . Ambos os métodos de determinação de Carbono Orgânico apresentam algumas limitações em suas execuções.

O método de análise elementar (CHN) possui problemas em relação à verificação na determinação do carbono, pois o equipamento não consegue fazer a distinção do carbono orgânico e inorgânico. Como esse tipo de análise determina o carbono total do solo, pode ocorrer a superestimação do conteúdo de CO dos solos que receberam calcário recentemente ou daqueles solos mais alcalinos (SCHUMACHER, 2002), além de que, o custo de cada análise e a manutenção dos equipamentos são elevados (SEGNINI et al., 2008). Por sua vez, o maior obstáculo do método de Walkley & Black modificado é a utilização de reagentes tóxicos, pois é baseado na redução do dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) por compostos de CO e posterior determinação do cromo não reduzido por titulação de oxirredução com Fe^{2+} . Nesse processo são gerados resíduos químicos acarretando problemas sérios ao meio ambiente, além do tempo elevado envolvido na determinação do CO por esse método.

Devido às problemáticas na análise de carbono já citadas (custos, demora na aquisição de dados, geração de resíduos químicos e uma consequente preocupação com os descartes) torna-se pertinente o estudo e desenvolvimento de novas tecnologias a fim de auxiliar ou até mesmo substituir a análise convencional de laboratório.

Nesse sentido, recentes técnicas como a espectroscopia por infravermelho têm sido consideradas como alternativas para complementar ou substituir os métodos analíticos convencionais (COHEN et al., 2005; FERNANDES et al., 2010). Os métodos espectroscópicos têm sido utilizados em diversos países e apresentam vantagens como precisão e rapidez na geração dos dados e determinações analíticas (CHATTERJEE et al., 2009). Estes métodos correspondem com a necessidade atual de desenvolvimento de artifícios que sejam de baixo custo, eficientes, rápidos e que não prejudiquem o meio ambiente, atendendo assim, aos princípios da “química verde” (PRADO, 2003). Nesse sentido, propõe-se através deste trabalho, aliar a técnica de espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) com o método da calibração multivariada para realizar determinações de CO em solos.

A espectroscopia no infravermelho próximo garante qualidade e especificidade necessária para cada análise. Dentre suas vantagens, comparando-a com as metodologias tradicionais, está a análise múltipla dos constituintes, tempo rápido de análise (cerca de um minuto por amostra), menor necessidade de mão-de-obra, possuindo, desta forma, menor custo variável, além de não utilizar reagentes ou produtos químicos, e, portanto, não sendo poluente ao meio ambiente. O NIRS atua na região do infravermelho próximo situada entre 700 e 2500 nm, onde a maioria dos materiais orgânicos possuem propriedades de absorção da radiação (SANTOS, 2007). Porém, como esta técnica oferece uma variedade imensa de dados, é necessário que estes dados sejam tratados de forma que possam ser analisados corretamente de modo a se extrair um maior número de informações possíveis e, nesse sentido, a quimiometria torna-se imprescindível.

A quimiometria é uma área da pesquisa em química que utiliza métodos estatísticos e matemáticos, a fim de que sejam extraídos o maior número de informações através dos resultados obtidos instrumentalmente (SENA et al.,

1999). Até meados dos anos 60, as análises químicas eram, na sua grande maioria, de forma dispendiosa e lenta, e geravam pouca quantidade de dados. A partir dos anos 60 e 70 houve um advento progressivo de variadas técnicas instrumentais de análise química, bem como do desenvolvimento computadorizado através da implantação de microcomputadores e microprocessadores nos laboratórios. Com isso, se tornaram necessárias metodologias de tratamento de dados que fossem do ponto de vista matemático, mais complexas, e com desígnio de trazer uma elevada compreensão e utilização dos resultados obtidos.

Desde o surgimento da quimiometria até os dias de hoje, muitos métodos foram desenvolvidos, com a finalidade de interpretar e processar dados que até então eram impossíveis de serem analisados.

A determinação do Carbono Orgânico foi realizada em cooperação com a Embrapa Solos, localizada no Rio de Janeiro – RJ, que tem atuado a mais de uma década em estudos da matéria orgânica em diferentes ecossistemas, contando com uma infraestrutura laboratorial e equipamentos adequados para a atuação do tema.

Desta forma, avaliou-se os métodos Walkley & Black modificado (método Embrapa) e CHN como métodos de referência para calibração multivariada na determinação de carbono orgânico em solos, proporcionando, através deste trabalho a implementação da espectroscopia, como o NIRS, objetivando a obtenção de resultados confiáveis de Carbono Orgânico em solos. Estes estudos poderão contribuir também para a redução do consumo de reagentes, bem como uma diminuição no tempo de análise.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo avaliar o método Walkley & Black modificado (método Embrapa) e CHN como método de referência para calibração multivariada na determinação de carbono orgânico em solos brasileiros.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar carbono orgânico em solos brasileiros pelo método de Walkley & Black modificado. (REGIÕES ESPECÍFICAS??)
- Determinar carbono orgânico em solos brasileiros pelo método CHN.
- Construir modelos de calibração multivariada utilizando como referência o método de Walkley & Black modificado e a espectroscopia NIR.
- Construir modelos de calibração multivariada utilizando como referência o método de CHN e a espectroscopia NIR.
- Avaliar qual método de referência promove melhores resultados de predição em modelo de calibração multivariada a partir de espectros NIR.
- Validar o modelo de calibração multivariada que fornecer melhores resultados de predição através do cálculo de figuras de mérito.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Existe uma busca constante para se encontrar a melhor metodologia a ser empregada na determinação de carbono orgânico. Esta deve ser simples,

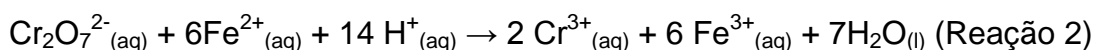
rápida além de utilizar uma quantidade reduzida ou abolir o uso de reagentes, diminuindo assim os danos ambientais causados por estes.

2.1 METODOLOGIAS PARA A DETERMINAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO EM SOLOS

Atualmente existem muitos métodos para a determinação de carbono orgânico em solos, como por exemplo Método Walkley & Black, Método Mebius, Método colorimétrico, Método gravimétrico ou perda de massa por ignição e Análise elementar (CHN) ou método Dumas. Estes métodos estão brevemente descritos a seguir.

2.1.1 Método de Walkley & Black

Este método para determinação de carbono orgânico apresenta boa exatidão, simples execução e não necessita da utilização de equipamentos sofisticados. Baseia-se na oxidação de carbono orgânico do solo através de íons dicromato em meio fortemente ácido, e a determinação da quantidade de íons Cr^{3+} reduzido é feita por titulação do dicromato em excesso com íons Fe^{2+} , conforme as reações abaixo:



Na primeira equação, o dicromato reduzido equivale ao carbono orgânico presente na amostra do solo. Na segunda equação, o excesso de dicromato é titulado com íons Fe^{2+} (solução padronizada de sulfato ferroso amoniacal - Sal

de Mohr). Desta forma, a determinação de carbono orgânico total é feita pela diferença entre a quantidade de Fe^{2+} gasta na titulação, quando o Cr^{6+} foi adicionado, e aquela gasta na titulação do dicromato que restou após a oxidação do carbono da amostra - assumindo que todo o carbono da matéria orgânica está no estado de oxidação zero.

Este método tem como um dos grandes problemas as análises feitas com dicromato, devido às preocupações ambientais sobre a geração de resíduos tóxicos. Além de que, mesmo sendo muito utilizado em laboratórios no Brasil, esta metodologia apresenta muitas críticas (Rheinheimer et al., 2008, Conceição et al., 1999, Silva et al., 1999), não promove a oxidação completa de carbono orgânico, não alcançando as formas elementares de carbono, em amostra de solo, acarretando passíveis erros na determinação desta particularidade. Estima-se que a recuperação de CO usando esse procedimento varia entre 60 e 86%, com média de 76% (SCHUMACHER, 2002).

2.1.2. Método Mebius

Esta metodologia é semelhante à metodologia de Walkley & Black. Porém, neste o carbono orgânico é oxidado de forma maximizada pela adição de calor (reação ocorre sob refluxo), ou seja, através do aquecimento externo durante todo o processo de oxidação, uma maior quantidade de material orgânico é detectada. Desta forma, a eficiência da reação é aumentada, não necessitando da utilização de fatores de correção, freqüentemente utilizados no método citado anteriormente.

2.1.3. Método colorimétrico

A determinação de carbono orgânico pode ser feita também através deste método em que o processo acontece do mesmo modo que na oxidação por dicromato, só que aqui, a determinação final não é feita através de titulação, mas sim por espectrofotometria. Essa medição é feita por meio da intensidade da cor verde, característica quando há produção de íons Cr^{3+} em solução. Neste caso, a quantificação do teor de carbono orgânico na amostra de solo acontece através de curvas calibração univariadas, que podem ser construídas com distintas concentrações de sacarose ou baseadas em curvas feitas com teores de carbono determinados pelo método Walkley & Black, ou também por diferentes concentrações de dicromato (ETCHEVERS & ETCHEVERS, 1981; OLIVEIRA & PERMONIAN, 2002). Duda et al. (2005), comparando métodos titulométricos (como o Walkley & Black e o Mebius) e colorimétricos na determinação do carbono, concluíram que o colorimétrico apresenta maior precisão e confiabilidade dentre os métodos, além de que este método utiliza menores quantidade de reagentes.

2.1.4. Método gravimétrico ou perda de massa por ignição

Esta metodologia tem base no princípio da perda de carbono por aquecimento e incineração. Foi muito empregada no passado, e foi abandonada por apresentar maior tempo gasto nas análises e, também pela dificuldade de automação nos laboratórios (MIYAZAWA et al., 2000). Este método tem como principal aspecto positivo a não utilização de reagentes e a consequente não geração de resíduos tóxicos. Alguns estudos relatam a tentativa de teste de variadas temperaturas para incineração da matéria orgânica em solos, possuindo resultados distintos entre si, com temperatura de 250° a 600°C (SILVA et al, 1999; CONCEIÇÃO et al., 1999; DIAS & LIMA,

2004), explicando assim, a necessidade de novos estudos para adaptar essa metodologia aos solos tropicais. A perda de massa da decomposição dos grupos funcionais carboxílicos e fenóis, hidrocarbonetos, ácidos húmicos e fúvicos está em torno de 150° e 280°, podendo influenciar em relação à composição característica de alguns tipos de solos.

2.1.5. Análise elementar (CHN) ou método de Dumas

Neste método geralmente são quantificados os elementos carbono, hidrogênio, nitrogênio, enxofre e oxigênio. Ele é baseado na oxidação das amostras em temperatura próximas de 1000° C. As amostras são moídas finamente e depositadas em cápsulas de estanho, que não contém carbono. Após ocorrer toda a combustão através da emissão de uma mistura de gases (N₂, CO₂, SO₂e H₂O) separados posteriormente por uma coluna cromatográfica serão detectados por meio de um sensor de termocondutividade, que gerará um sinal elétrico proporcional à quantidade de gás, que, por fim posteriormente são convertidos em teores percentuais dos elementos, ou seja, a concentração de cada substância é medida. Estes equipamentos permitem a análise simultânea de diferentes elementos presentes tanto em amostras orgânicas quanto inorgânicas, estando nas formas líquidas, gasosas ou sólidas.

Nelson & Sommers (1996) avaliam esse método como bom pela precisão e exatidão dos resultados, além de ser o único que tem a competência de quantificar outros elementos como nitrogênio, hidrogênio e enxofre de forma simultânea com o carbono (CHATTERJEE et al., 2009). Mesmo apresentando alto custo inicial na aquisição do equipamento, este método possibilita que um maior número de amostra seja analisado em menor tempo, comparado a outros métodos analíticos (GATTO et al., 2009).

Um problema encontrado nesta metodologia é o fato deste equipamento não fazer a distinção do carbono orgânico do inorgânico, pois como esse tipo de análise determina o carbono total do solo, pode ocorrer a superestimação

do conteúdo de CO dos solos que receberam calcário recentemente ou daqueles solos mais alcalinos (SCHUMACHER, 2002). Outros fatores limitantes, como a trituração das amostras, são encontradas neste método, pois assim o torna além de mais vagaroso com um custo além, bem como a utilização de pequena quantidade de amostra (em geral, de 10 a 1000 mg), que podem levar a problemas de representatividade do solo (CHATTERJEE et al., 2009).

Considerando todas as limitações de técnicas analíticas laboratoriais até aqui analisadas, percebe-se a grande necessidade de obtenção de uma metodologia que seja de fácil execução, rápida e cada vez mais precisa na determinação de carbono orgânico nas amostras de solo. Sendo assim, métodos espectroscópicos se tornam cada vez mais objeto de estudo de pesquisadores afim de que estes solucionem estas problemáticas até aqui encontradas.

2.1.6. Métodos espectroscópicos

Os métodos espectroscópicos têm sido ponderados como alternativas para servir de complemento ou até substituição de métodos laboratoriais convencionais, com o intuito da obtenção de forma rápida e econômica de dados para o monitoramento ambiental (COHEN et al., 2005; FERNANDES et al., 2010).

Algumas metodologias foram testadas, tais como o Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) (CREMER et al., 2001; HAPKE, 2010); a pirólise acoplada à espectroscopia de massa (HOOVER et al., 2002); a espectroscopia no visível (VIS) (VISCARRA ROSSEL et al., 2006), infravermelho próximo (NIRS), infravermelho médio (MIR) e espectroscopia Raman; e ainda o Ground Penetration Radar (GPR). Dentre elas, o NIRS vem encontrando aplicações voltadas à agricultura desde a década de setenta nos Estados Unidos, sendo atribuído ao professor Karl Norris, quando era responsável por um grupo de pesquisas do Departamento de Agricultura dos

Estados Unidos, os primeiros trabalhos que proporcionaram interesse pelo estudo da espectroscopia NIRS como ferramenta de análise industrial (VALDERRAMA, 2005).

2.2. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRS)

A espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS) possui vasta aplicabilidade, quando se trata de análise de carbono orgânico em amostras de solo. Isto se dá ao fato da atuação na região do infravermelho próximo (entre 700 e 2500 nm), pois é nesta região que a maior parte dos materiais orgânicos possuem propriedades de absorção da respectiva radiação. Basicamente, o que acontece nesta técnica é a incidência de um feixe luminoso de radiação na região do infravermelho próximo sobre a amostra, e, com isto ligações covalentes, sobretons e bandas de combinação das ligações entre os componentes das substâncias orgânicas absorvem essa energia. Desta forma, calcula-se o quanto de luz foi emitida pelo infravermelho próximo e o quanto de luz foi refletida pela amostra, afim de que sejam estimados os números e os tipos de ligações moleculares presentes na mesma. (FERNANDES et al., 2010).

Esta técnica possui amplas aplicações como ferramenta analítica em determinações quantitativas e qualitativas de diversos materiais, sendo muito utilizada em indústrias de petróleo, têxtil, carvão, cosméticos, polímeros, química, tintas e farmacêuticas. Deve-se salientar que a eficácia da espectroscopia de infravermelho próximo é dependente de métodos analíticos tradicionais, visto que é necessária a sua calibração a partir dos resultados desses.

O NIRS foi empregado desde o início da década de 1960, para determinar umidade em sementes (HART et al., 1962). Para as avaliações de propriedades de solo, alguns estudos foram realizados utilizando esta técnica, como nos trabalhos de Bem-Dor e Banin (1995), onde foram analisadas 16 propriedades do solo, como ferro, fósforo, argila, matéria orgânica, entre

outros, obtendo satisfatórias correlações entre os métodos tradicionais de análises e o método NIR. Stenberg et al., 1995 também avaliaram algumas propriedades do solo como saturação por base, matéria orgânica, capacidade de troca catiônica (CTC) e pH.

Devido ao número e a complexidade de dados obtidos, para a extração de informações relevantes através do NIRS é indispensável o uso de quimiometria, e para esta quantificação utiliza-se a calibração multivariada.

2.3. CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Em uma análise química o principal objetivo é a determinação da concentração do analito de interesse na amostra analisada. Nesse sentido, calibração é a relação entre medidas instrumentais e valores da propriedade de interesse, feita através de uma série de operações matemáticas, transformando-os em resultados passíveis de interpretação (VALDERRAMA et al., 2009).

A calibração multivariada tem como principal objetivo utilizar muitas variáveis, respostas instrumentais (um vetor de dados), para quantificar alguma propriedade de interesse. O resultado da propriedade de interesse, utilizado na etapa de calibração é obtido através de uma metodologia padrão.

Esse tipo de calibração permite que a análise possa ser efetuada mesmo na presença de interferentes, uma vez que estes estejam presentes na construção do modelo de calibração (vantagem de primeira ordem) (VALDERRAMA et al., 2009). Sendo assim, a calibração multivariada pode ser usada quando os métodos univariados não são aplicáveis para tal situação.

Dentre os modelos de regressão mais empregados em química analítica com o intuito de construir modelos de calibração multivariada o mais utilizado é a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) (VALDERRAMA, 2005), descrito com maiores detalhes na seção 4 (MATERIAIS E MÉTODOS).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de solos foram secas em estufa a 40° C durante 48 horas, destorradas com um martelo de borracha e passadas em peneira de 2 mm de diâmetro, obtendo-se a fração conhecida como terra fina seca ao ar (Santos et al., 2013). Dessa forma não há necessidade de determinar a umidade das amostras. A etapa de secagem tem a função de padronizar o teor de água nas amostras.

Foram selecionadas 161 amostras de solo obtidas de horizontes em perfis completos, ou seja, todos os horizontes do solo foram utilizados, descritos e amostrados para fins de estudos de mapeamento digital de solos no Parque Estadual da Mata Seca (PEMS) no estado de Minas Gerais. A profundidade foi variável, podendo chegar a 1,5 metros. Os teores de carbono das amostras variaram de 0,5 a 23,9 g kg⁻¹, com média de 4,9 g kg⁻¹ e mediana de 2,8 g kg⁻¹.

A amostragem do solo, a parte experimental para a determinação do carbono orgânico pelos métodos Embrapa e CHN, bem como a aquisição dos espectros NIRS foram realizadas por técnicos especializados da Embrapa na unidade Embrapa Solos – Rio de Janeiro. A Embrapa Solos é uma instituição de referência internacional em solos tropicais, sendo responsável por coordenar, em todo o território nacional, medidas que prognosticam e promovam a prevenção do solo e das águas contra riscos ambientais, tendo como princípio base a visão de que o solo é um patrimônio, priorizando assim, seu uso sustentável, afim de que, fornecendo subsídios para a tomada de decisões, contribua para o avanço técnico-científico na área de Ciência do Solo.

Um total de 161 espectros foram adquiridos em um espectrofotômetro NIR PerkinElmer, equipado com acessório de reflectância difusa (NIRA). O espectrofotômetro e a esfera de integração são equipados com detectores de DTGS/AsInGa, respectivamente. Os espectros foram registrados na região de 4000 a 10000 cm⁻¹, 64 varreduras, no modo de porcentagem de reflectância. A Figura 1 ilustra o equipamento de espectroscopia para região do infravermelho

próximo e as principais etapas do processo de aquisição dos espectros das amostras de solo.

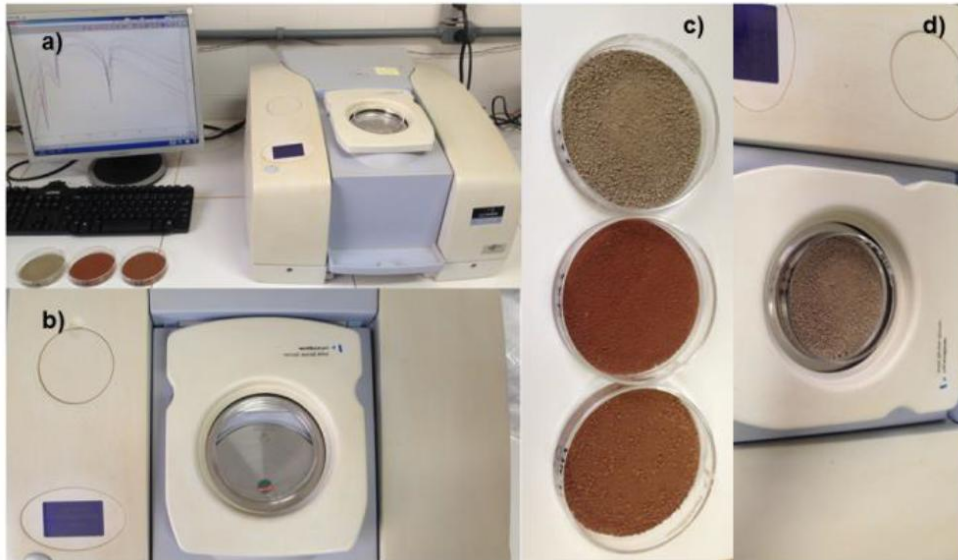


Figura 1 - a) Equipamento NIRS (Spectrum 100N, PerkinElmer) empregado na aquisição dos espectros das amostras de solo; b) saída do feixe de radiação infravermelha do acessório de reflectância difusa (NIRA); c) placas de vidro de 90mm de diâmetro empregadas como amostradores; e) amostras no acessório de reflectância difusa. Fonte: Souza, 2014.

A parte computacional envolvida no tratamento dos dados foi realizada através do uso do *software Matlab* e das ferramentas do *PLS-toolbox*, doadas pela Embrapa Solos, RJ.

4.1 DETERMINAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO PELO MÉTODO WALKLEY & BLACK MODIFICADO

A metodologia modificada, também é conhecida como método Embrapa, é um método de via úmida utilizado para quantificação de carbono orgânico no solo.

Nesse método foram coletadas cerca de 20g de solo, que em seguida foi triturado e passado em uma peneira de 80 mesh. Deste preparado, 0,5g foi transferido para um erlenmeyer de 250mL, no qual foram adicionados 10mL de solução de dicromato de potássio 0,4N. Para comparação, coletou-se 10mL de solução de dicromato de potássio 0,4N em outro erlenmeyer, que foi a “prova branca”. Esta consiste em realizar a quantificação de uma solução que contém tudo menos o analito de interesse, seguindo exatamente o mesmo procedimento utilizado para analisar uma amostra, com o desígnio de determinar o valor acrescido no resultado da análise. Após esse procedimento colocou-se um tubo de ensaio de 25mm de diâmetro e 250mm de altura cheio de água até a boca do erlenmeyer contendo o solo e a solução de $K_2Cr_2O_7$. Esse conjunto formou um sistema semelhante a um condensador. Depois de montado o sistema foi aquecido por uma placa elétrica até a ebulição branda do conteúdo do recipiente por cinco minutos. Após o resfriamento da amostra contida no erlenmeyer acrescentou-se 80mL de água destilada, 2mL de ácido ortofosfórico e 3 gotas do indicador difenilamina.

A seguir foi realizada uma titulação com os erlenmeyers contendo a “prova branca” e a amostra de solo, utilizando como titulante uma solução de sulfato ferroso amoniacal 0,1N até que a coloração mudasse de azul para verde. Anotaram-se os volumes gastos na titulação. A Figura 2 apresenta os passos empregados na determinação do carbono orgânico a partir do método Embrapa.



Figura 2 - Etapas principais do método da oxidação com dicromato de potássio empregado como referência nas análises de carbono orgânico no solo: a) pesagem das amostras de solo; b) digestão das amostras com solução de dicromato de potássio; c) digestão a quente; d) adição do indicador difenilamina; e) titulação do excesso de dicromato com solução de sulfato ferroso amoniacal.

Fonte: Souza, 2014.

Para o cálculo da quantidade de carbono orgânico usa-se a equação 1:

$$C \text{ (g/ kg)} = (40 - \text{volume gasto na titulação do solo}) \times f \times 0,6 \quad (1)$$

Em que C representa a concentração de carbono orgânico; 40 e 0,6 são constantes e f é igual a 40 / volume sulfato ferroso gasto na prova em branco.

4.2 DETERMINAÇÃO DO CARBONO ORGÂNICO PELO MÉTODO CHN

A determinação de Carbono Orgânico em solos foi realizada utilizando a metodologia CHN, descrita por Nelson & Somers (1996).

Para as análises elementares de carbono orgânico foram pesadas aproximadamente 25 mg de amostra de solo pulverizada, e analisadas em um analisador elementar Perkin Elmer 2400, como ilustrado na figura 3, nas seguintes condições: temperatura de combustão: 925°C, temperatura de redução: 640°C, pureza mínima dos gases: He (99,995%), O₂ (99,995%) e N₂ (99,0%) e pressão dos manômetros de aproximadamente 1,5 bar, 1bar, e 4 bar, respectivamente.



Figura 3 - Analisador elementar.

Fonte: Perkin Elmer, 2015.

4.3 PLS

A regressão por mínimos quadrados parciais é considerada o método de regressão mais utilizado para calibração multivariada de primeira ordem. Isto porque nesse tipo de regressão, os espectros (vetores de dados instrumentais – dados de primeira ordem) são organizados no formato de uma matriz que é decomposta no produto de duas matrizes: uma matriz de *scores* (**T**) e uma

matriz de *loadings* (\mathbf{P}^T). Este procedimento também é aplicado ao vetor \mathbf{y} que contém as informações dos valores de referência para o analito a ser determinado. A Figura 4 ilustra o processo de decomposição em *scores* e *loadings* obtidos a partir de \mathbf{X} e \mathbf{y} (GELADI; KOWALSKI, 1986).

$$\begin{array}{c}
 \begin{array}{ccc}
 & p & \\
 \begin{array}{|c|} \hline \mathbf{X} \\ \hline \end{array} & = & \begin{array}{|c|} \hline \mathbf{T} \\ \hline \end{array} \\
 n & & n
 \end{array}
 \quad
 \begin{array}{ccc}
 & p & \\
 \begin{array}{|c|} \hline \mathbf{P}^T \\ \hline \end{array} & + & \begin{array}{|c|} \hline \mathbf{E} \\ \hline \end{array} \\
 d & & n
 \end{array}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{ccc}
 \begin{array}{|c|} \hline \mathbf{Y} \\ \hline \end{array} & = & \begin{array}{|c|} \hline \mathbf{U} \\ \hline \end{array} \\
 n & & n
 \end{array}
 \quad
 \begin{array}{ccc}
 & m & \\
 \begin{array}{|c|} \hline \mathbf{Q}^T \\ \hline \end{array} & + & \begin{array}{|c|} \hline \mathbf{F} \\ \hline \end{array} \\
 d & & n
 \end{array}$$

Figura 4. Decomposição em *scores* e *loadings* para matriz \mathbf{X} e o vetor \mathbf{y} (OTTO, 1999).

Após a etapa de decomposição, uma relação linear é estabelecida entre os *scores* da matriz \mathbf{X} e os *scores* do vetor \mathbf{y} . Desta forma, não há necessidade de conhecimento exato acerca de todos os componentes presentes nas amostras, podendo-se fazer a previsão de amostras mesmo se houver interferentes, porém é imprescindível que estes estejam presentes na etapa de construção do modelo. O modelo PLS é obtido por meio de um processo iterativo, onde otimiza-se ao mesmo tempo, a projeção das amostras sobre os *loadings*, para a determinação dos *scores* da matriz \mathbf{X} aos *scores* da matriz \mathbf{Y} de modo a minimizar os desvios (VALDERRAMA, 2009). Através desta otimização simultânea, há ocorrência de pequenas distorções nas direções dos *loadings*, e estes apresentem pequenas redundâncias de informação, perdendo assim, a ortogonalidade. Porém, a otimização da relação linear entre os *scores*

é feita através destas pequenas redundâncias, e estas distorções da ortogonalidade entre os PCs no PLS fazem com que os mesmos não sejam mais componentes principais (que são ortogonais) e sim variáveis latentes (BRERETON, 2000).

Para o processo de previsão utilizam-se os *scores* da matriz **X** e um vetor que contém os coeficientes de regressão (**b**) para determinar o valor dos *scores* de **y**, de acordo com a equação (2).

$$\mathbf{u}_h = \mathbf{b}_h \mathbf{t}_h \quad (2)$$

O valor do *score* previsto, multiplicado pelos *loadings* de **y** fornecerá o resultado para o analito em questão, nesse caso, carbono orgânico.

4.4 TESTE T-PAREADO

O teste t-pareado é um teste de significância utilizado para comparar dois métodos de análise diferentes e verificar se estes métodos são diferentes. Neste teste são utilizados pares de medidas para minimizar fontes de variabilidade que não são de interesse (MILLER; MILLER 1993).

O primeiro passo consiste em calcular a média dos pares de dados obtidos por cada um dos métodos (d_M), seguido pelo somatório da diferença ao quadrado conforme a equação (4), assim:

$$d_M = \overline{M_1} - \overline{M_2} \quad (3)$$

$$\sum_{i=1}^n d_i^2 \quad (4)$$

O próximo passo consiste no cálculo do desvio padrão das diferenças. Primeiro calcula-se a variância através da equação (5) ou diretamente o desvio padrão a partir da equação (6)

$$s_d^2 = \frac{\sum d_i^2 - n d_M^2}{n-1} \quad (5)$$

Onde n é o número de amostras analisadas.

$$s_d = \sqrt{\frac{\sum d_i^2 - nd_M^2}{n-1}} \quad (6)$$

Por fim, o valor de t é calculado através da equação:

$$t = \frac{\sqrt{n}d_M}{s_d} \quad (7)$$

Se o valor de $t_{\text{calculado}}$ for menor que o valor para t_{tabelado} , dentro da percentagem de confiança desejada, então não é possível detectar diferença entre os dois métodos no nível de significância considerado.

4.5 VALIDAÇÃO

A exigência e o reconhecimento da qualidade nas análises químicas por meio da confiabilidade, rastreabilidade e comparabilidade é cada vez maior, pois resultados inconfiáveis ou distorcidos podem levar a decisões catastróficas ou danos financeiros ponderáveis (RIBANI et al, 2004). Quando um novo procedimento ou método analítico é desenvolvido ou proposto, há a necessidade de averiguação se este apresenta atuação satisfatória ou não para as suas determinadas aplicações. Esse processo de averiguação é conhecido como validação (EURACHEM/CITAC). Deste modo, a validação de um novo procedimento ou método analítico acontece através de pesquisas de cunho sistemático realizadas em laboratório, com o intuito de analisar se estes atendem aos propósitos de órgãos de fiscalização e agências reguladoras nacionais como o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) e a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), ou internacionais como a USP (United States Pharmacopeia) e a ISO (International Standard Organization).

A validação de um novo método analítico ocorre através da determinação de parâmetros conhecidos como figuras de mérito (VALDERRAMA, 2009). Estes parâmetros podem variar dependendo do órgão de fiscalização a que está sujeito, bem como de onde o método será aplicado ou qual o seu propósito. Porém, os principais são exatidão, sensibilidade, sensibilidade analítica, ajuste, linearidade, limites de detecção e quantificação.

O modo como as figuras de mérito devem ser determinadas geralmente é estabelecido por órgãos de fiscalização, e encontra-se descrita em trabalhos científicos, guias de validação e em normas específicas (VALDERRAMA, 2009). No Brasil, a ANVISA (RE nº 899, de 20/05/2003) e o INMETRO (DOQ-CGCRE-008, de março/2003) disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, e, juntamente com artigos científicos (RIBANI et al, 2004 e BARROS et al, 2002), pode-se definir algumas figuras de mérito.

4.4.1 Exatidão

É utilizada, comumente, em calibração multivariada, através do RMSEP (do inglês, Root Mean Squares Error of Prediction) e RMSEC (do inglês, Root Mean Squares Error of Calibration), que significa raiz do erro médio quadrático de previsão e calibração, respectivamente, e tem função de expressar a medida de concordância entre o valor tido como referência e o estimado pelo modelo multivariado, como mostram as equações (8) e (9):

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{l_v} (y_i - \hat{y}_i)^2}{l_v}} \quad (8)$$

$$\text{RMSEC} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{l_v} (y_i - \hat{y}_i)^2}{l_c - A - 1}} \quad (9)$$

em que, y_i é o valor de referência, \hat{y}_i o previsto pelo modelo, l_v o número de amostras do conjunto de validação, l_c o número de amostras do conjunto de calibração, A o número de variáveis latentes utilizadas na construção do modelo.

4.3.2. Sensibilidade

Para modelos como o PLS de calibração multivariada, esta figura de mérito pode ser determinada pela equação abaixo, sendo definida por ser a fração do sinal responsável pelo acréscimo de uma unidade de concentração à propriedade de interesse (CURRIE, 1995; FERRE 2001), de acordo com a equação (10):

$$S\hat{E}N = \frac{1}{\|\mathbf{b}_k\|} \quad (10)$$

onde \mathbf{b}_k é o vetor coeficiente de regressão, estimado pelo método PLS.

4.3.3. Sensibilidade Analítica

Esta figura de mérito é definida por ser a razão entre a sensibilidade e o desvio padrão do sinal de referência (δ_x) (RODRIGUEZ et al, 1993), e pode ser obtida através da equação (11):

$$\gamma = \frac{S\hat{E}N}{\|\delta_x\|} \quad (11)$$

em que $S\hat{E}N$ pode ser obtido através da equação de Sensibilidade e δ_x é o desvio padrão do sinal de referência.

4.3.4. Ajuste

Esta figura de mérito é obtida determinando-se, por mínimos quadrados a reta que melhor se ajusta aos valores tidos como referência e os valores estimados pelo modelo de calibração multivariada, ou seja, consegue-se determinar o ajuste através da correlação entre os valores estimados pelo modelo de calibração multivariada e os valores tidos como de referência para as amostras de calibração (BRAGA & POPPI, 2004).

Este parâmetro não é utilizado com constância em artigos científicos ou normas oficiais, devido à dificuldade em conseguir-se estimar a linearidade porém, em trabalhos que envolvem modelos de calibração multivariada esta figura de mérito é muito utilizada. (VALDERRAMA, 2005)

4.3.5. Linearidade

Uma medida de cunho quantitativo para esta figura de mérito não corresponde ser uma tarefa simples e até possível. Isto se deve principalmente ao uso de PLS, em calibração multivariada, pois as variáveis são decompostas pelos componentes principais. Na forma qualitativa, tem-se que o gráfico dos resíduos (se a distribuição destes for aleatória) pode indicar se os dados apresentam uma conduta de forma linear, para amostras de calibração e validação.

4.3.6. Limites de Detecção e Quantificação

Os parâmetros limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) de uma metodologia analítica consistem na mínima quantidade da espécie de interesse que pode ser detectada e determinada na forma quantitativa,

respectivamente. Se o conjunto de dados apresenta comportamento homoscedástico (erros com previsão sem correlação, seguindo distribuição normal e constante variância ao longo da faixa de trabalho), em calibração multivariada os LD e LQ podem ser determinados através das equações (12) e (13), respectivamente:

$$LD = 3\delta_x \|b_k\| = 3\delta_x \frac{1}{S\hat{E}N} \quad (12)$$

$$LQ = 10\delta_x \|b_k\| = 10\delta_x \frac{1}{S\hat{E}N} \quad (13)$$

sendo que, $S\hat{E}N$ é o valor de sensibilidade, obtido através da equação (9), δ_x é o desvio padrão do sinal de referência e b_k é o vetor para a espécie k , dos coeficientes de regressão do modelo PLS.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A matriz X foi composta pelas absorvâncias para cada amostra, onde cada linha da matriz é representada por uma amostra diferente e as colunas representam as respectivas absorvâncias para a amostra em questão.

A separação das amostras entre os conjuntos de calibração e validação foi realizada pelo algoritmo Kennard-Stone (KENNARD e STONE, 1969). Este algoritmo seleciona as amostras com base em suas distâncias, ou seja, a primeira amostra selecionada é a que apresenta maior distância em relação à amostra média enquanto a segunda amostra a ser selecionada será a que apresentar maior distância em relação à primeira amostra selecionada. A próxima amostra a ser selecionada apresentará maior distância em relação à última amostra selecionada, e assim sucessivamente até atingir o número de amostras desejadas. Esse algoritmo é aplicado para realizar a seleção das amostras que irão compor o conjunto de calibração, uma vez que procede a seleção das amostras de maior variabilidade, ou seja, as amostras mais

“externas” do conjunto total. Assim, cada conjunto de dados foi inicialmente composto por 105 amostras para o conjunto de calibração e 56 amostras para o conjunto de validação, para ambos os métodos avaliados.

A figura 5A ilustra os espectros, na região do infravermelho próximo, de solos brasileiros, enquanto que na figura 5B os referidos espectros são apresentados após uma correção de linha de base. Esta correção se faz necessária para que haja uma correção de desvios lineares e pode ser obtida através da primeira derivada. Neste caso, o algoritmo utilizado foi o de Savitsky-Golay (SAVITSKY e GOLAY, 1964) com janela de 15 pontos e polinômio de segunda ordem (SOUZA, 2014). Após a correção de linha de base observou-se que na região acima de 7500 cm^{-1} não havia mais informações relevantes sobre as amostras e apresentava somente ruído, logo esta região do espectro foi removida, ilustrado na Figura 5C.

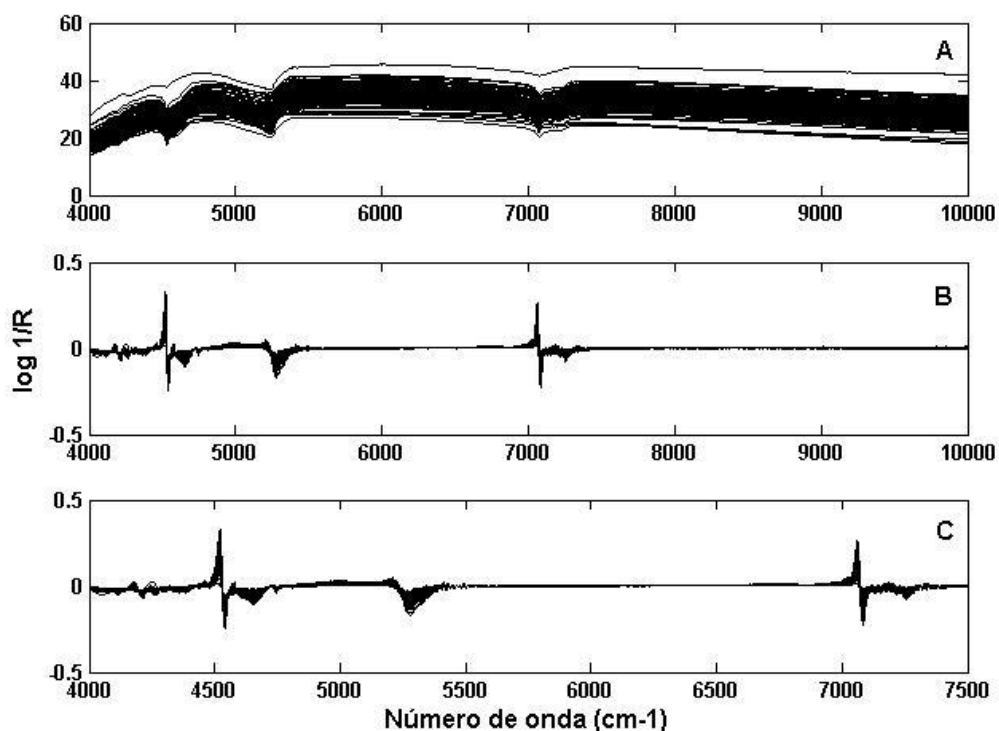


Figura 5 – A) Espectros NIR para as amostras de solo. B) correção da linha de base. C) Região empregada no desenvolvimento do modelo de calibração.

Fonte: autoria própria.

Para a construção dos modelos, os espectros foram centrados na média e o número de variáveis latentes foi determinado através dos resultados da raiz quadrada do erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV) para as amostras de calibração, obtido por validação cruzada do tipo “*contiguous block*” (blocos contínuos) de dez amostras. Neste tipo de validação dez amostras são deixadas de fora no processo de construção do modelo e a seguir essas amostras são previstas. Esse processo se repete até que todas as amostras tenham sido deixadas de fora e previstas (VALDERRAMA *et al*, 2005). Afim de que fosse construído o modelo de calibração para Carbono Orgânico foram necessárias um total de dez variáveis latentes para ambos os métodos empregados como referência na correlação com os espectros NIR.

A otimização dos conjuntos de calibração e validação pela eliminação das amostras anômalas resultou em 93 amostras de calibração e 50 amostras de validação para o método Walkley & Black modificado, e 93 amostras de calibração e 44 amostras de validação para o método CHN. A qualidade dos modelos desenvolvidos foi avaliada através do cálculo das figuras de mérito como exatidão (representada pelos valores de RMSEC e RMSEP), sensibilidade, sensibilidade analítica, limites de detecção e quantificação, apresentados na Tabela 1, além do ajuste e da linearidade apresentados nas Figuras 6 e 7, respectivamente.

Tabela 1 - Parâmetros de qualidade dos modelos de calibração multivariada			
FIGURAS DE MÉRITO		Walkley& Black modificado	CHN
EXATIDÃO ^a	RMSEC ¹	1,9427	1,4901
	RMSEP ²	1,9795	1,0430
SENSIBILIDADE ^b		0,0106	0,0125
SENSIBILIDADE ANALÍTICA ^{-1 a}		0,1326	0,1124
LIMITE DE DETECÇÃO ^a		0,4377	0,3710
LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO ^a		1,3262	1,1244
R		0,8710	0,8829

a = (g/Kg) e b = (g/Kg)⁻¹

⁽¹⁾RMSEC: raiz do erro médio quadrático de calibração.

⁽²⁾RMSEP: raiz do erro médio quadrático de previsão.

Primeiramente observa-se que os valores de todos os parâmetros analisados são muito parecidos comparando os modelos construídos empregando os métodos Walkley & Black modificado e o CHN como métodos de referências para quantificação de Carbono Orgânico em solo a partir da espectroscopia NIR. Os valores de exatidão são representados RMSEC e RMSEP e revelam que os valores estimados pelos modelos multivariados apresentaram concordância com os resultados esperados. Os valores de RMSEP e RMSEC são parâmetros globais que incorporam tanto erros sistemáticos quanto aleatórios. Sendo assim, um melhor indicador de exatidão é a regressão entre os valores de referência e os valores estimados pelo modelo, e os valores da inclinação e do intercepto, apresentados na Figura 6. Além disso, o coeficiente de correlação para esses ajustes são apresentados na Tabela 1.

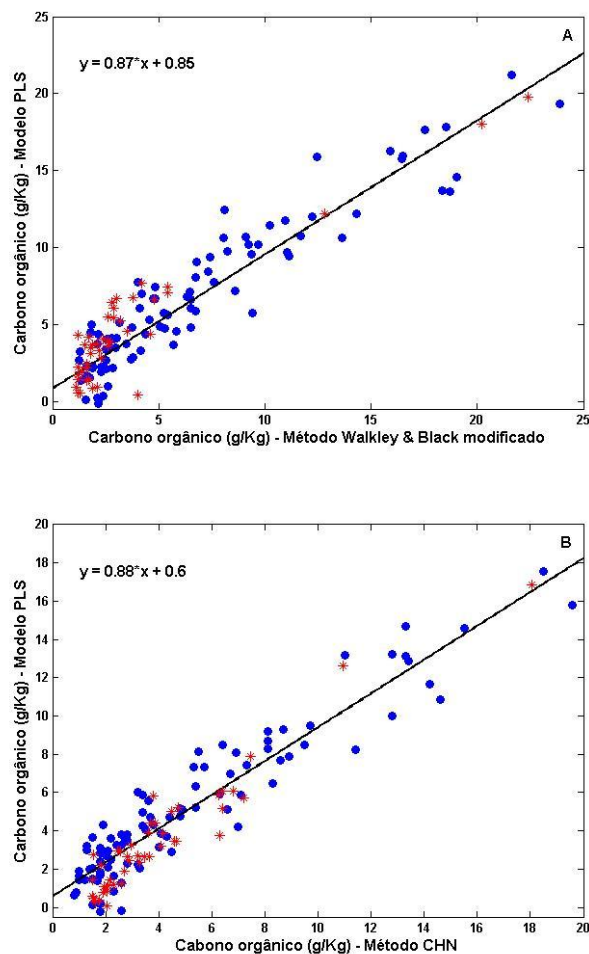


Figura 6 - Ajuste do modelo PLS para determinação de Carbono Orgânico. (A) Método de referência Walkley & Black modificado. (B) Método de referência CHN. Amostras de calibração (•) e validação (*).

A sensibilidade e a sensibilidade analítica apresentaram resultados coerentes para os dois métodos de referência considerando-se a faixa de concentrações utilizada no trabalho. Por ser mais simples e informativa para comparações, a sensibilidade analítica apresenta de forma direta a sensibilidade do método em termos da unidade de concentração que é utilizada, e o inverso deste parâmetro permite estabelecer a menor diferença de concentração entre amostras que pode ser distinguida pelo método. Desta forma, percebe-se que os modelos construídos empregando ambos os métodos de referência possuem valores próximos, podendo fazer distinção de

amostras com diferença de concentração da ordem de 0,1% de Carbono Orgânico em modelos construídos com espectros NIR.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) expressam as menores quantidade da espécie de interesse que podem ser detectadas e determinadas quantitativamente, de forma respectiva. Sendo assim, estes parâmetros dos modelos construídos apresentaram resultados coerentes com as medidas dos outros parâmetros. A faixa de aplicação para o Método Walkley Black é de 1,25 à 23,90 g/Kg de Carbono Orgânico e para o método CHN é de 0,80 à 19,6. Desta maneira, os LD e LQ se adéquam a ambos os métodos.

Na avaliação da linearidade dos modelos construídos observa-se o comportamento dos resíduos, apresentados na Figura 7. Qualitativamente, os resíduos podem indicar se os dados seguem ou não um comportamento linear se a distribuição dos erros for aleatória. Desta forma, em ambos os casos, observa-se que os modelos construídos podem ser considerados lineares, uma vez que seus resíduos apresentaram comportamento aleatório, e a magnitude do erro absoluto foi da mesma ordem, independentemente do método empregado como referência no desenvolvimento do modelo.

Um teste de significância, teste t-pareado, foi aplicado aos resultados da Tabela 1 com o intuito de avaliar diferenças significativas entre os métodos utilizados como referência na calibração multivariada. Nesse teste, o valor para $t_{\text{calculado}}$ foi 1,801, enquanto o valor de t_{tabelado} é de 2,447, para 95% de confiança. Como o valor de $t_{\text{calculado}}$ é menor que o valor de t_{tabelado} , isso indica que não existem diferenças significativas entre os modelos PLS construídos empregando o método Walkley & Black modificado e CHN como métodos de referência na determinação de carbono orgânico, no nível de significância considerado.

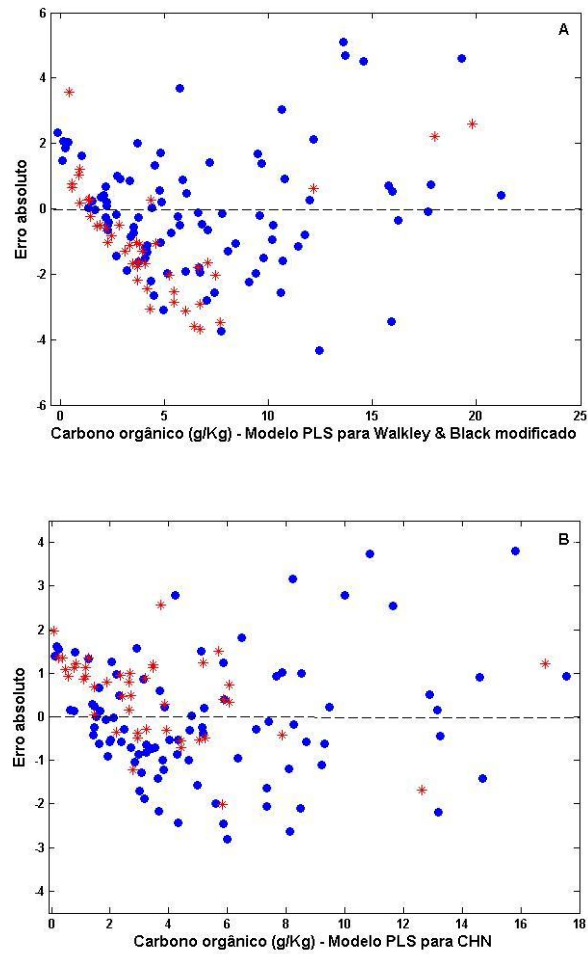


Figura 7–Resíduos. (A) Método de referência Walkley & Black. (B) Método de referência CHN. Amostras de calibração (•) e validação (*).

6 CONCLUSÕES

O desenvolvimento deste trabalho mostrou a possibilidade da utilização de métodos espectroscópicos associados a métodos quimiométricos para a determinação de carbono orgânico em solos.

Os modelos desenvolvidos se mostraram lineares, de acordo com a distribuição aleatória dos resíduos, que apresentaram a mesma ordem de magnitude.

Os modelos construídos por calibração de primeira ordem utilizando o método PLS mostraram resultados satisfatórios para essa determinação. A exatidão do modelo para a determinação de carbono orgânico via método Walkley & Black modificado foi inferior à exatidão do modelo para a mesma determinação via método CHN. Isso pode ser atribuído a um erro maior associado na determinação do carbono orgânico, uma vez que no método de referência CHN determina-se carbono total, não fazendo a distinção do carbono orgânico do inorgânico. Apesar disso, um teste de significância foi aplicado aos resultados das figuras de mérito de ambos os modelos e o resultado mostrou que, no nível de confiança de 95%, os métodos não apresentam diferença significativa.

REFERÊNCIAS

BARROS Neto, Benício.; PIMENTEL, Maria F.; ARAÚJO, Mário C.U.; Recomendações para calibração em química analítica – Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (Calibração univariada). **Química Nova**, 25, n.5, p. 856-865, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v25n5/11419.pdf>>. Acesso em 19 jul. 2014, 11:14.

BEN-DOR, Eyal.; BANIN, Amos. Near-Infrared analysis as a rapid method to simultaneously evaluate several soil properties. **Soil Science Society of America Journal**, v. 59, p. 364-372, 1995.

BOQUÉ, Ricard.; RIUS, Xavier F. Multivariate detection limits estimators. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. v. 32, p. 11-23, fev. 1996.

BRAGA, Jez W.B.; POPPI, Ronei J.; Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 1004-1011, março 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v27n6/22293.pdf>>. Acesso em 19 jul. 2014, 11:35.

BRERETON, Richard G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. **Analyst**. v. 125, n.11, p. 2125-2154, set. 2000.

COHEN, Matt J.; PRENGER, Joseph P.; DeBUSK, William F. Visible-near infrared reflectance spectroscopy for rapid, non-destructive assessment of wetland soil quality. **Journal of Environmental Quality**, v. 34. n. 4. p.1422-1434, set. 2005.

CONAB COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. Acomp. safra bras. grãos, v. 1 – Safra 2013/14, n. 4 - Quarto Levantamento, jan. 2014. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_01_10_15_07_19_boletim_graos_janeiro_2014.pdf>, acesso em 20 abr. 2014, 20:30.

CONCEIÇÃO, Mauro; MANZATTO, Celso V.; ARAÚJO, Wilson S.; MARTIN NETO, Ladislau; SAAB, Sérgio C.; CUNHA, Tony J.F.; FREIXO, Alessandra A. **Estudo comparativo de métodos de determinação do teor de matéria orgânica em solos orgânicos do estado do Rio de Janeiro**. Comunicado Técnico, Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1999. Disponível em: <www.cnps.embrapa.br/solosbr/pdfs/pesqandamento03_1999.pdf> Acesso em: 30 abril 2014, 11:23.

CHATTERJEE, Anjan; LAL. Rattan; WIELOPOLSKI, Lucian; MARTIN, Madhavi Z.; EBINGER, Michael H. Evaluation of different soil carbon determination methods. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 28. p.164-178, 2009.

CREMER, David A.; EBINGER, Michael H.; BRESHEARS, David D.; UNKEFER, Pat J.; KAMMERDIENER, Susan A.; FERRIS, Monty J.; CATLETT, Kathryn M.; BROWN, Joel R. Measuring total soil carbon with laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). **Soil Science Society of America Journal**, v. 30, n.6, p 2202-2206, fev. 2001.

CURRIE, Lloyd. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995), **Analytica Chimica Acta**. v. 391, n. 2, p.105-126, maio, 1999.

DIAS, Jailson C.; LIMA, Waterloo N. Comparação de métodos para a determinação de matéria orgânica em amostras ambientais. **Revista Científica da UFPA**, v. 4, p. 1-16, abr. 2004.

DUDA, Gustavo P.; MONTEIRO, Marcela T.; SALVIANO, Alessandra M.; GUERRA, José G. M. Comparação entre métodos colorimétrico e titulométrico para determinação de carbono microbiano. **Revista Caatinga**, v. 18, p. 52-57, 2005.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solos**. 2 ed. Rio de Janeiro, p. 85, 1997.

ETCHEVERS, Jorge D.; ETCHEVERS, Gloria G. Comparação de métodos de determinação de carbono orgânico no solo. **Agropecuária Técnica**, v. 2, p. 40-49, 1981.

EURACHEM/CITAC– **Work Group**, Guide of quality in analytical chemistry – An aid to accreditation, 2^a Ed, 2002.

FERNANDES, Fernando A.; FERNANDES, Ana H.B.M.; BUENO SOBRINHO, Antônio A.; MONTEIRO, Hektor de C.; SILVA, Antonio C.G. **Uso de espectrometria de refletância no infravermelho próximo (NIRS) na análise de carbono de Neossolos do Pantanal**. Comunicado Técnico, ISSN 1981-7231, dezembro 2010. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/COT86.pdf>> Acesso em: 14 abr.2014, 11:20.

FERRE, Joan; BROWN, Steven D.; RIUS, F. Xavier. Improved calculation of the net analyte signal in inverse multivariate calibration, **Journal of Chemometrics**.v. 15, n. 6, p 537-553, jul 2001.

GATTO, Alcides; BARROS, Nairam F. de; NOVAIS, Roberto F.; SILVA, Ivo R.; MENDONÇA, Eduardo de S.; VILLANI, Ecila M. de A. Comparação de métodos de determinação do carbono orgânico em solos cultivados com eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 735-740, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v33n3/v33n3a26.pdf>>. Acesso em 19 jul. 2014, 13:45.

GELADI, Paul; KOWALSKI, Bruce R. Partial Least Squares regression: A Tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 185, p. 1-17, 1986.

HAPKE, Bruce. Reflectance Methods and Applications. In: **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Second Edition)**. Elsevier, p. 2420-2425, 2010.

HART, Judith R.; NORRIS, Karl H.; GOLUMBIC, Calvin. Determination of the moisture content of seeds by near-infrared spectrophotometry of their methanos extracts. **Cereal Chemistry**, Manhatan, v. 39, p. 94-99, 1962.

HOOVER, Coeli M.; MAGRINI, Kimberley A.; EVANS, Ron J. Soil carbon content and character in an old growth forest in northwestern Pennsylvania: a case study introducing pyrolysis molecular beam mass spectrometry (py-MBMS). **Environmental Pollution**, v. 116, p 269-275, mar. 2002.

JACKSON, Marion L.; **Analisis quimico de suelos**, Barcelona: Omega, v. 631, n. 42, p. 662, 1982.

KENNARD, R.W.; STONE, L.A.; **Technometrics**,v. 11, n. 1, p. 137, 1969.

LOPES, Alfredo S.; GUILHERME, Luiz R.G. 2007. Fertilidade do solo e produtividade agrícola. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**. Viçosa (MG), p. 1-64, 2007. Disponível em: <<http://people.ufpr.br/~nutricaoeplantas/fertisolo.pdf>>. Acesso em: 19 jul. 2014, 14:11.

MILLER, Jane .C.; MILLER, James N.; **Statistics for analytical chemistry**. 3rd edition, England: Ellis Horwood Limited, 1993.

MIYAZAWA, Mario; PAVAN, Marcos A.; OLIVEIRA, Egidio L.; IONASHIRO, Massao; SILVA, Allegra K. Gravimetric Determination of Soil Organic Matter. Brazilian **Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 43, n. 5, p. 475-478, 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/babt/v43n5/a04v43n5.pdf>>. Acesso em 19 jul. 2014.

NELSON, Davi W., SOMMERS, Lee E. **Total carbon, organic carbon, and organic matter**. Part 3. Chemical methods. Madison, Soil Science of America and American Society of Agronomy, p.961-1010, 1996.

OLIVEIRA, Cássio L.F.; PERMONIAN, LilianM. Determinação de material orgânica no solo por espectrometria no visível. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, dez. 2002. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/ImThprcFL53yS CV_2013-4-24-15-29-11.pdf> Acesso em: 02 mai. 2014, 14:30.

ONUBR ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS NO BRASIL. Poluição mundial deve atingir 9,6 bilhões em 2050, diz novo relatório da ONU.

Disponível em: <<http://www.onu.org.br/populacao-mundial-deve-atingir-96-bilhoes-em-2050-diz-novo-relatorio-da-onu/>>. Acesso em: 10 jun. 2014.

OTTO, Michael. **Chemometrics, Weinheim: Wiley**. New York, p. 197, 1999.

PERKIN ELMER. Catálogo de produto. Disponível em: <<http://www.perkinelmer.com/catalog/product/id/n2410650>>. Acesso em: 11 fev. 2015, 23:15.

PRADO, Alexandre. G. S. Química Verde, os desafios da química do novo milênio. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 738-744, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v26n5/17210.pdf>>. Acesso em: 19 jul. 2014, 14:34.

RHEINHEIMER, Danilo S.; CAMPOS, Bem-Hur C.; GIACOMINI, Sandro J.; CONCEIÇÃO, Paulo C.; BORTOLUZZI, Edson C. Comparação de métodos de determinação de carbono orgânico total do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 435-440, ago 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v32n1/41.pdf>>. Acesso em: 19 jul. 2014, 14:40.

RIBANI, Marcelo; BOTTOLI, Carla B.; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel C.S.F.; MELO, Lúcio; Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, jun 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v27n5/a17v27n5.pdf>>. Acesso em: 19 jul 2014, 15:00.

RODRIGUEZ, Luis C.; CAMPANÃ, Ana M. G.; LINARES, Carlos J.; CEBA, Manuel R. Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment. **Analytical Letters**. v.26, n. 6, p. 1243-1258, 1993.

SANTOS, Maria de F. da P. **Desenvolvimento e Validação de Métodos de Espectroscopia no Infravermelho Próximo e Médio para Caracterização de Lamas de ETAR para Uso Agrícola**. 2007. 87f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica), Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2007. Disponível em: <<https://dspace.ist.utl.pt/bitstream/2295/148619/1/TeseFinal.pdf>> Acesso em: 30 abril 2014, 12:39.

SANTOS, Humberto G. dos; JACOMINE, Paulo K.T.; ANJOS, Lúcia H.C. dos; OLIVEIRA, Virlei Á. de; LUBRERAS, José F.; COELHO, Maurício R.; ALMEIDA, Jaime A. de; CUNHA, Tony J.F.; OLIVEIRA, João B. de. 2013. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**, 3^a ed. Embrapa, Brasília - Distrito Federal.

SAVITSKY, Abraham. e GOLAY, Marcel. **Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures**. Analytical Chemistry, 36, 1627, 1964.

SCHUMACHER, Brian A. **Methods for the determination of total organic carbon (TOC) in soils and sediments**. United States - Environmental Protection Agency, Las Vegas, abril 2002. Disponível em: <http://www.epa.gov/esd/cmb/research/papers/bs116.pdf>. Acesso em: 30 abril 2014, 14:46.

SEGNINI, Aline; SANTOS, Larissa M.; SILVA, Wilson T.L da.; MARTIN NETO, Ladislau; BORATO, Carlos E.; de MELO, Wanderley J.; BOLONHEZI, Denizart. Estudo comparativo de métodos para a determinação da concentração de carbono em solos com altos teores de Fe (Latosolos). **Química Nova**. v. 31, n. 1, p. 94-97, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v31n1/a20v31n1.pdf>. Acesso em: 19 jul. 2014, 15:30.

SENA, Marcelo M.; POPPI, Ronei. J.; FRIGHETTO, Rosa T. S.; VALARINI, Pedro J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. **Química Nova**, v. 23, n. 4, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v23n4/2656.pdf>. Acesso em: 19 jul. 2012, 13:45.

SILVA, Alexandre C.; TORRADO, Pablo V; ABREU JUNIOR, José S. Métodos de quantificação da matéria orgânica do solo. **Revista Unifenas Alfenas**, Alfenas, v. 5, p. 21-26, 1999. Disponível em: http://www.unifenas.br/pesquisa/revistas/download/ArtigosRev1_99/pag21-26.pdf. Acesso em: 19 jul. 2014, 13:24.

SOUZA, André M. **Avaliação do potencial da espectroscopia no infravermelho próximo como método de rotina para a determinação de carbono orgânico do solo**. 2014. 158 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

VALDERRAMA, Leonardo; GONÇALVES, Rhayanna P.; MARÇO, Paulo H.; VALDERRAMA, Patricia. Espectroscopia UV-Vis e Método Quimiométrico na Avaliação de Adulterações e Fraudes em Azeite de Oliva Extra Virgem. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**. v. 5, n. 2, p. 32–40, 2014.

VALDERRAMA, Patrícia. **Avaliação de figuras de mérito em calibração multivariada na determinação de parâmetros de controle de qualidade em indústria alcooleira por espectroscopia o infravermelho próximo**. 2005. V232a. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química – Departamento de Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

VALDERRAMA, Patrícia.; BRAGA, Jez W. B.; POPPI, Ronei J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 5, p.1278-1287, mar. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n5/v32n5a34.pdf>. Acesso em: 19 jul. 2014, 15:08.

VALDERRAMA, Patricia. **Calibração multivariada de primeira e segunda ordem e figuras de mérito na quantificação de enantiômeros por espectroscopia**. 2009. V233c. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química – Departamento de Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

VISCARRA ROSSEL, Raphael A.; WALVOORT, Dennis J.J.; MCBRATNEY, Alex B.; JANIK, Leslie J.; SKJEMSTAC, Jan.O. Visible, near infrared, mid infrared or combined diffuse reflectance spectroscopy for simultaneous assessment of various soil properties. **Geoderma**, v. 131, p. 59-75, mar. 2006.