

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

GABRIEL GUSTINELLI ARANTES DE CARVALHO

**Efeito da fluência na análise de pastilhas de materiais vegetais por
espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser**

Piracicaba

2011

GABRIEL GUSTINELLI ARANTES DE CARVALHO

**Efeito da fluência na análise de pastilhas de materiais vegetais por
espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser**

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Krug

Piracicaba
2011

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Carvalho, Gabriel Gustinelli Arantes de

Efeito da fluência na análise de pastilhas de materiais vegetais por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser / Gabriel Gustinelli Arantes de Carvalho; orientador Francisco José Krug. - - Piracicaba, 2011.

116 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Análise espectroquímica 2. Espectroscopia óptica 3. Folhas (Plantas)
4. Microanálise I. Título

CDU 543.423

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco José Krug pela orientação, ensinamentos, convivência e amizade ao longo desses dois anos.

Ao Prof. Dr. Dário Santos Jr pela oportunidade inicial, orientação, colaboração e, principalmente, amizade.

À técnica Iolanda Rufini (Tatinha) pela colaboração, amizade e revisão desta dissertação.

Ao Prof. Dr. José Roberto Ferreira pela amizade e iniciação no meio científico.

Aos meus pais e irmãos pelo incentivo, amor e carinho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos.

Aos pesquisadores do Laboratório de Química Analítica “Henrique Bergamin Filho” do CENA-USP Prof. Dr. Boaventura F. dos Reis, Prof. Dr. Elias A. G. Zagatto, Prof. Dr. Fábio R. P. Rocha e Profa. Dra. Maria Fernanda Giné pela convivência e ensinamentos.

Aos funcionários do Laboratório de Química Analítica “Henrique Bergamin Filho” do CENA Fátima Patreze, Otávio Matsumoto, Sheila Perdigão e Valdemir Barros pela atenção e auxílios prestados diariamente.

Ao Programa de Pós-Graduação do CENA e, em especial, aos(às) funcionários(as) da secretaria de Pós-Graduação.

Aos colegas de laboratório Flávio, Kennedy, Lidiane, Lilian, Marcos, Paula, Paulino e Quienly pelas contribuições e amizade.

À prof. Dra. Elisabete Aparecida de Nadai Fernandes pelo apoio e amizade.

À Walterly Moretti Accorsi e ao prof. Lindolpho Capellari Jr pelo fornecimento das amostras de plantas medicinais.

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

RESUMO

CARVALHO, G. G. A. **Efeito da fluência na análise de pastilhas de materiais vegetais por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser**. 2011. 116 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

A espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) constitui um método alternativo para a determinação simultânea de macro e micronutrientes em pastilhas de materiais vegetais. No entanto, pouca informação com relação às condições de fluência e de focalização do laser mais apropriadas para a análise de pastilhas de materiais vegetais são disponíveis na literatura. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da fluência, do diâmetro de focalização do laser e do tamanho das partículas das amostras nas análises de pastilhas de tecidos vegetais por LIBS. O arranjo experimental foi composto por um laser pulsado de Nd:YAG a 1064 nm (pulsos de 5 ns, 360 mJ, 10 Hz) e os sinais de emissão foram coletados por um telescópio acoplado por fibra óptica ao espectrômetro Echelle com detector ICCD. Os parâmetros instrumentais foram ajustados em 20 pulsos acumulados, 2,0 μ s de atraso e 5,0 μ s de integração. Amostras laboratoriais consistiram de pastilhas preparadas com folhas moídas criogenicamente (90 % das partículas < 50 μ m). Maiores intensidades das linhas Ca I 442,554, Mg I 277,983, P I 213,618, Al I 309,271, B I 249,773, Cu I 324,755, Fe II 261,187, Mn II 257,610 e Zn II 206,200 nm foram obtidas com fluências entre 35 e 60 J cm⁻² e diâmetros de focalização entre 600 e 1050 μ m. O uso de fluências e diâmetros de focalização maiores concorreu para melhorar os coeficientes de variação (CV) das medidas. Fixando-se o diâmetro de focalização em 750 μ m, observou-se que, para a maioria dos analitos, o CV das medidas foi reduzido 2 vezes quando a fluência foi alterada de 20 para 50 J cm⁻². Nestas condições, estes resultados foram atribuídos à maior massa removida e, conseqüentemente, à amostragem mais representativa. Os coeficientes angulares das curvas de calibração também aumentaram quando a fluência foi acrescida. No entanto, não foram verificadas diferenças significativas nos coeficientes de correlação das curvas de calibração e nos limites de detecção empregando-se 25 e 50 J cm⁻². Embora as intensidades dos sinais de emissão aumentem com a fluência, a emissão de fundo também aumenta. Por outro lado, o tamanho das partículas das amostras afeta as eficiências de atomização e excitação no plasma induzido por laser. Quando partículas maiores são parcialmente vaporizadas, os sinais de emissão resultantes dos processos de atomização e excitação das espécies constituintes são menores do que os provenientes de partículas menores. Nesta dissertação, melhorias significativas da intensidade dos sinais de emissão e dos CVs das medidas foram observados quando pastilhas preparadas com partículas < 75 μ m foram analisadas. Não foram observadas diferenças significativas nas intensidades dos sinais de emissão e no CV das medidas nas análises de pastilhas preparadas com partículas entre 20 e 75 μ m. Pastilhas preparadas com partículas > 75 μ m apresentaram problemas de coesão e, após ablação, apresentaram crateras não uniformes. A análise destas pastilhas resultou em CV das medidas geralmente > 15 %. Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram que é recomendável utilizar amostras de calibração e amostras-teste com distribuição do tamanho das partículas semelhante para evitar efeitos físicos de matriz, que alteram as interações laser-amostra.

Palavras-chave: Espectrometria de emissão óptica. Plasma induzido por laser. LIBS. Análise direta de plantas. Fluência. Diâmetro de focalização do laser.

ABSTRACT

CARVALHO, G. G. A. **Effect of fluence on laser induced breakdown spectrometry analysis of pellets of plant materials**. 2011. 116 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

Most recently, it was demonstrated that laser induced breakdown spectrometry (LIBS) constitutes an alternative for the simultaneous determination of macro- and micronutrients in pellets of plant materials. However, there is no information regarding the most appropriate fluence and laser focusing for analysis of pellets of plant materials. The aim of this work was to evaluate the effect of laser focusing and fluence on LIBS analysis of plants. The effect of particle size on LIBS analysis of pellets of plant materials as well as sample preparation approaches were also discussed. The experimental setup was designed by using a Q-switch Nd:YAG laser (5 ns, 360 mJ, 10 Hz, $\lambda = 1064$ nm) and the emission signals were collected by lenses into an optical fiber coupled to an echelle spectrometer equipped with a high-resolution ICCD. Instrumental parameters consisted of 20 accumulated laser pulses, 2.0 μs delay time and 5.0 μs integration time gate. Pellets prepared from cryogenically ground plant leaves (90 % particles < 50 μm ; median = 10 μm) were used as laboratory samples and 6 laser spot diameters (from 180 to 1050 μm) at different laser fluences were evaluated. Results indicate that elements emission intensities increased with both laser fluence and spot diameter. Higher intensities for Ca I 442.554, Mg I 277.983, P I 213.618, Al I 309.271, B I 249.773, Cu I 324.755, Fe II 261.187, Mn II 257.610, and Zn II 206.200 nm emission lines were observed with fluences in the 35 - 60 J cm^{-2} range and spot diameters between 600 and 1050 μm . Higher spot diameters improved mass removal and minimized repeatability drawbacks. It was observed that the coefficients of variation (CV) of site-to-site measurements decreased by using higher laser focusing diameters. By fixing the laser spot diameter at 750 μm , the CV of measurements improved at least 2-fold for all analytes when 50 J cm^{-2} was applied in comparison to 20 J cm^{-2} . These results can be attributed to a larger mass removal obtained at higher laser fluences and better laser sampling representativeness. Sensitivity did also increase with laser fluence but no significant differences were observed in the detection limits using 25 and 50 J cm^{-2} . Although emission intensities increased with laser fluence the background emission and noise increased as well. On the other hand, particle size distribution of powdered samples affects the atomization and excitation efficiencies by laser induced plasmas. When larger particles are incompletely vaporized the resulting emission signals were lower than those obtained from smaller particles. In this work, significant improvements on emission intensities and CV of measurements were observed when pellets made with particles < 75 μm were analyzed. No significant differences were observed (emission intensities and CV of measurements) in the analysis of pellets prepared with particles in the 20-75 μm range. Pellets prepared with particles > 75 μm presented cohesion drawbacks and resulted non uniform craters after laser ablation. The CV of measurements for most analytes in these materials was > 15 %. Therefore, similar particle size distribution between calibration and test samples is recommended to avoid physical matrix effects on laser-sample interaction.

Keywords: Laser induced breakdown spectrometry. LIBS. Direct analysis of plant materials. Fluence. Laser focusing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 -	Número de trabalhos sobre espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por lasers entre 1981 e 2010	25
Figura 2.2 -	Esquema do sistema LIBS	27
Figura 3.1 -	Vista superior do arranjo experimental do sistema LIBS	33
Figura 3.2 -	Vista frontal do sistema óptico (lente de focalização do laser e telescópio) e suporte da amostra	33
Figura 4.1 -	Conjunto de moagem utilizado no moinho Spex 6750 Freezer mill. Santos Jr. ⁸¹	38
Figura 4.2 -	Diagrama esquemático do moinho de bolas planetário. Adaptado de: Mio et al. ⁸³	39
Figura 4.3 -	Esquema ilustrativo do sistema óptico de focalização do laser utilizando uma lente plano-convexa com distância focal de 200 mm	44
Figura 4.4 -	Fragmento do espectro mostrando a linha iônica de emissão do Fe a 275,573 nm	47
Figura 5.1 -	Distribuição do tamanho das partículas de amostra de folhas de boldo-do-Chile após moagem criogênica por 10 min (5 ciclos de 2 min)	50
Figura 5.2 -	Efeito da fluência na intensidade de emissão de Ca I 442,544 nm e Mg I 277,983 nm para diâmetros de focalização entre 180 e 1050 μm . Pastilha de boldo, 20 pulsos, 10Hz. Frações de massa: $11,7 \pm 0,1 \text{ g kg}^{-1}$ Ca e $2,1 \pm 0,1 \text{ g kg}^{-1}$ Mg. As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 30 crateras, 20 pulsos/cratera)	51
Figura 5.3 -	Efeito da fluência na intensidade de emissão de P I 213,618 nm e Al I 309,271 nm para diâmetros de focalização entre 180 e 1050 μm . Pastilha de boldo, 20 pulsos, 10Hz. Frações de massa: $1,4 \pm 0,1 \text{ g kg}^{-1}$ P e $664 \pm 19 \text{ mg kg}^{-1}$ Al. As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 30 crateras, 20 pulsos/cratera)	52
Figura 5.4 -	Efeito da fluência na intensidade de emissão de B I 249,773 nm e Cu I 324,755 nm para diâmetros de focalização entre 180 e 1050 μm . Pastilha de boldo, 20 pulsos, 10Hz. Frações de massa: $16,1 \pm 0,60 \text{ mg kg}^{-1}$ B e $5,26 \pm 0,14 \text{ mg kg}^{-1}$ Cu. As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 30 crateras, 20 pulsos/cratera)	53
Figura 5.5 -	Efeito da fluência na intensidade de emissão de Fe II 261,187 nm e Mn II 257,610 nm para diâmetros de focalização entre 180 e 1050 μm . Pastilha de boldo, 20 pulsos, 10Hz. Frações de massa: $599 \pm 20 \text{ mg kg}^{-1}$ Fe e $81,8 \pm 1,3 \text{ mg kg}^{-1}$ Mn. As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 30 crateras, 20 pulsos/cratera)	54
Figura 5.6 -	Efeito da fluência na intensidade de emissão de Zn II 206,200 nm para diâmetros de focalização entre 180 e 1050 μm . Pastilha de boldo, 20 pulsos, 10Hz. Frações de massa: $13,7 \pm 0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ Zn. As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 30 crateras, 20 pulsos/cratera)	55
Figura 5.7 -	Perfilometria de uma cratera produzida por ablação com laser em pastilha de boldo-do-Chile com 20 pulsos de 228 mJ e diâmetro de focalização de 750 μm	56

Figura 5.8 -	Massa ablada em função da área de focalização do laser: 0,10; 0,32; 0,64; 1,13 e 1,76 mm ² correspondente aos diâmetros de 180, 320, 450, 600 e 750 μm, respectivamente. Dados obtidos após 20 pulsos do laser, 10 Hz, a 60 J cm ⁻² . As barras de incerteza correspondem a ±1 desvio-padrão (n = 3 crateras)	58
Figura 5.9 -	Massa ablada em função da fluência do laser (J cm ⁻²). Dados obtidos com diâmetro de focalização de 750 μm e 20 pulsos de laser (10Hz). As barras de incerteza correspondem a ±1 desvio-padrão (n = 3 crateras)	58
Figura 5.10 -	Variação dos sinais de intensidade de emissão de Ca I 442,544 nm em 30 pontos de amostragem (20 pulsos por cratera) na superfície de uma pastilha de boldo-do-Chile: (a) 20 J cm ⁻² e (b) 50 J cm ⁻² . A linha contínua corresponde à média das medidas e as linhas pontilhadas a ± 1 desvio-padrão (n=30 crateras). Fração de massa: 11,7 ± 0,1 g kg ⁻¹ Ca	60
Figura 5.11 -	Variação dos sinais de intensidade de emissão de Mg I 277,669 nm em 30 pontos de amostragem (20 pulsos por cratera) na superfície de uma pastilha de boldo-do-Chile: (a) 20 J cm ⁻² e (b) 50 J cm ⁻² . A linha contínua corresponde à média das medidas e as linhas pontilhadas a ± 1 desvio-padrão (n=30 crateras). Fração de massa: 2,1 ± 0,1 g kg ⁻¹ Mg	61
Figura 5.12 -	Variação dos sinais de intensidade de emissão de P I 213,618 nm em 30 pontos de amostragem (20 pulsos por cratera) na superfície de uma pastilha de boldo-do-Chile: (a) 20 J cm ⁻² e (b) 50 J cm ⁻² . A linha contínua corresponde à média das medidas e as linhas pontilhadas a ± 1 desvio-padrão (n=30 crateras). Fração de massa: 1,4 ± 0,1 g kg ⁻¹ P.	62
Figura 5.13 -	Variação dos sinais de intensidade de emissão de Al I 309,271 nm em 30 pontos de amostragem (20 pulsos por cratera) na superfície de uma pastilha de boldo-do-Chile: (a) 20 J cm ⁻² e (b) 50 J cm ⁻² . A linha contínua corresponde à média das medidas e as linhas pontilhadas a ± 1 desvio-padrão (n=30 crateras). Fração de massa: 664 ± 19 mg kg ⁻¹ Al	63
Figura 5.14 -	Variação dos sinais de intensidade de emissão de B I 249,773 nm em 30 pontos de amostragem (20 pulsos por cratera) na superfície de uma pastilha de boldo-do-Chile: (a) 20 J cm ⁻² e (b) 50 J cm ⁻² . A linha contínua corresponde à média das medidas e as linhas pontilhadas a ± 1 desvio-padrão (n=30 crateras). As setas indicam resultados anômalos (com 95 % de confiança). Fração de massa: 16,1 ± 0,60 mg kg ⁻¹ B	64
Figura 5.15 -	Variação dos sinais de intensidade de emissão de Cu I 324,755 nm em 30 pontos de amostragem (20 pulsos por cratera) na superfície de uma pastilha de boldo-do-Chile: (a) 20 J cm ⁻² e (b) 50 J cm ⁻² . A linha contínua corresponde à média das medidas e as linhas pontilhadas a ± 1 desvio-padrão (n=30 crateras). Fração de massa: 5,26 ± 0,14 mg kg ⁻¹ Cu	65
Figura 5.16 -	Variação dos sinais de intensidade de emissão de Fe II 261,187 nm em 30 pontos de amostragem (20 pulsos por cratera) na superfície de uma pastilha de boldo-do-Chile: (a) 20 J cm ⁻² e (b) 50 J cm ⁻² . A linha contínua corresponde à média das medidas e as linhas pontilhadas a ± 1 desvio-padrão (n=30 crateras). Fração de massa: 599 ± 20 mg kg ⁻¹ Fe	66

Figura 5.17 -	Variação dos sinais de intensidade de emissão de Mn II 257,610 nm em 30 pontos de amostragem (20 pulsos por cratera) na superfície de uma pastilha de boldo-do-Chile: (a) 20 J cm ⁻² e (b) 50 J cm ⁻² . A linha contínua corresponde à média das medidas e as linhas pontilhadas a ± 1 desvio-padrão (n=30 crateras). Fração de massa: 81,8 ± 1,3 mg kg ⁻¹ Mn	67
Figura 5.18 -	Variação dos sinais de intensidade de emissão de Zn II 206,200 nm em 30 pontos de amostragem (20 pulsos por cratera) na superfície de uma pastilha de boldo-do-Chile: (a) 20 J cm ⁻² e (b) 50 J cm ⁻² . A linha contínua corresponde à média das medidas e as linhas pontilhadas a ± 1 desvio-padrão (n=30 crateras). Fração de massa: 13,7 ± 0,1 mg kg ⁻¹ Zn	68
Figura 5.19 -	Intensidades de emissão de Ca I 442,554 nm e Mg I 277,983 nm nas pastilhas preparadas com diferentes frações de tamanho nas partículas aplicando-se 50 J cm ⁻² . As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 30 crateras, 20 pulsos/cratera)	75
Figura 5.20 -	Intensidades de emissão de P I 213,618 nm e B I 249,773 nm nas pastilhas preparadas com diferentes frações de tamanho das partículas aplicando-se 50 J cm ⁻² . As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 30 crateras, 20 pulsos/cratera)	76
Figura 5.21 -	Intensidades de emissão de Mn II 257,610 nm nas pastilhas preparadas com diferentes frações de tamanho das partículas aplicando-se 50 J cm ⁻² . As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 30 crateras, 20 pulsos/cratera)	77
Figura 5.22 -	Coefficientes de variação (CV) referentes às medidas dos sinais de emissão de Ca I 442,544 nm e Mg I 277,983 nm em pastilhas de boldo preparadas com diferentes frações de tamanho das partículas. Dados para 50 J cm ⁻² , n=30 crateras, 20 pulsos por cratera	78
Figura 5.23 -	Coefficientes de variação (CV) referentes às medidas dos sinais de emissão de P I 216,618 nm e Al I 309,271 nm em pastilhas de boldo preparadas com diferentes frações de tamanho das partículas. Dados para 50 J cm ⁻² , n=30 crateras, 20 pulsos por cratera	79
Figura 5.24 -	Coefficientes de variação (CV) referentes às medidas dos sinais de emissão de B I 249,773 nm e Cu I 324,755 nm em pastilhas de Boldo-do-Chile preparadas com diferentes frações de tamanho das partículas. Dados para 50 J cm ⁻² , n=30 crateras, 20 pulsos por cratera	80
Figura 5.25 -	Coefficientes de variação (CV) referentes às medidas dos sinais de emissão de Fe II 261,187 nm e Mn II 257,619 nm em pastilhas de boldo preparadas com diferentes frações de tamanho das partículas. Dados para 50 J cm ⁻² , n=30 crateras, 20 pulsos por cratera	81
Figura 5.26 -	Coefficientes de variação (CV) referentes às medidas dos sinais de emissão de Zn II 206,200 nm em pastilhas de boldo preparadas com diferentes frações de tamanho das partículas. Dados para 50 J cm ⁻² , n=30 crateras, 20 pulsos por cratera	82
Figura 5.27 -	Microscopia eletrônica de varredura das crateras formadas nas pastilhas de boldo preparadas com partículas (a) < 20 μm e (b) entre 20-53 μm com 20 pulsos (10Hz) de laser com 25 J cm ⁻² . Magnificação: 200x	83

Figura 5.28 -	Microscopia eletrônica de varredura das crateras formadas nas pastilhas de boldo preparadas com partículas (a) entre 23-75 μm e (b) entre 75-106 μm com 20 pulsos (10Hz) de laser com 25 J cm^{-2} . Magnificação: 200x	84
Figura 5.29 -	Microscopia eletrônica de varredura das crateras formadas nas pastilhas de boldo preparadas com partículas entre 106 e 150 μm com 20 pulsos (10Hz) de laser com 25 J cm^{-2} . Magnificação: 200x	85
Figura 5.30 -	Distribuição do tamanho das partículas de amostra de folhas de boldo-do-Chile após moagem criogênica por 30 min (5 min pré-congelamento, 15 ciclos de moagem de 2 min com 1 min de recongelamento entre ciclos)	86
Figura 5.31 -	Distribuição do tamanho das partículas de amostras de folhas de boldo-do-Chile após moagem com bolas por 30 min	87
Figura 5.32 -	Distribuição do tamanho das partículas de amostras de folhas de boldo-do-Chile após moagem com bolas por 60 e 120 min	88
Figura 5.33 -	Intensidades de emissão de Ca I 442,554 nm e Mg I 277,983 nm das pastilhas preparadas com com folhas de boldo em diferentes tempos de moagem com bolas usando 50 J cm^{-2} . As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão ($n = 30$ crateras, 20 pulsos/cratera).....	89
Figura 5.34 -	Intensidades de emissão de P I 213,618 nm e Al I 309,271 nm das pastilhas preparadas com com folhas de boldo em diferentes tempos de moagem com bolas usando 50 J cm^{-2} . As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão ($n = 30$ crateras, 20 pulsos/cratera).....	90
Figura 5.35 -	Intensidades de emissão de B I 249,773 nm e Cu I 324,755 nm das pastilhas preparadas com com folhas de boldo em diferentes tempos de moagem com bolas usando 50 J cm^{-2} . As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão ($n = 30$ crateras, 20 pulsos/cratera).....	91
Figura 5.36 -	Intensidades de emissão de Fe II 261,187 nm e Mn II 257,610 nm das pastilhas preparadas com com folhas de boldo em diferentes tempos de moagem com bolas usando 50 J cm^{-2} . As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão ($n = 30$ crateras, 20 pulsos/cratera).....	92
Figura 5.37 -	Intensidades de emissão de Zn II 206,200 nm das pastilhas preparadas com com folhas de boldo em diferentes tempos de moagem com bolas usando 50 J cm^{-2} . As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão ($n = 30$ crateras, 20 pulsos/cratera)	93
Figura 5.38 -	Microscopia eletrônica de varredura de crateras formadas em pastilhas de boldo preparadas após moagem com bolas durante (a) 120 e (b) 60 min. Ablação com 20 pulsos (10Hz) de 25 J cm^{-2} . Magnificação: 200x.	95
Figura 5.39 -	Microscopia eletrônica de varredura de crateras formadas em pastilhas de boldo preparadas após moagem com bolas durante (a) 30 e (b) 20 min. Ablação com 20 pulsos (10Hz) de 25 J cm^{-2} . Magnificação: 200x.	96
Figura 5.40 -	Microscopia eletrônica de varredura de cratera formada em pastilha de boldo preparada após moagem com bolas durante 10 min. Ablação com 20 pulsos (10Hz) de 25 J cm^{-2} . Magnificação: 200x	97

Figura 5.41 -	Curvas de calibração para Mg I 277,669 nm e P I 213,618 nm construídas com CRMs aplicando-se 20 pulsos de 25 e 50 J cm ⁻² . As barras de erro horizontais correspondem às incertezas dos valores certificados (95 % de confiança). As barras de erro verticais correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 30 crateras)	99
Figura 5.42 -	Curvas de calibração para B I 249,773 nm e Fe II 261,187 nm construídas com CRMs aplicando-se 20 pulsos de 25 e 50 J cm ⁻² . As barras de erro horizontais correspondem às incertezas dos valores certificados (95 % de confiança). As barras de erro verticais correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 30 crateras)	100
Figura 5.43 -	Curvas de calibração para Mn II 294,920 nm e Zn II 206,200 nm construídas com CRMs aplicando-se 20 pulsos de 25 e 50 J cm ⁻² . As barras de erro horizontais correspondem às incertezas dos valores certificados (95 % de confiança). As barras de erro verticais correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 30 crateras)	101
Figura 5.44 -	Fragmentos do espectro de emissão de pastilha de boldo com os sinais líquidos de emissão de Zn II 206,200 nm e Cu I 324,755 nm aplicando-se 20 pulsos de 25 e 50 J cm ⁻² . (a) NIST 1515 (12,5 ± 0,3 mg kg ⁻¹ Zn); (b) NIST 1575a (2,8 ± 0,2 mg kg ⁻¹ Cu)	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 -	Variação da concentração de macro e micronutrientes (em matéria seca) frequentemente observada em tecidos foliares de plantas de interesse agrônomo ⁹⁻¹¹	19
Tabela 3.1 -	Materiais de referência certificados (CRM) de origem vegetal	36
Tabela 4.1 -	Programa de aquecimento para decomposição de amostras de tecido vegetal assistida por radiação micro-ondas*	41
Tabela 4.2 -	Frações de massa de Mg e P (% m/m) e B, Fe, Mn e Zn (mg kg ⁻¹) nos materiais de referência certificados selecionados para construção das curvas de calibração	45
Tabela 4.3 -	Parâmetros operacionais do ICP OES Optima 3000 DV	46
Tabela 5.1 -	Variação de energia do laser de Nd:YAG utilizado no presente trabalho (n = 20 medidas de 20 pulsos cada uma)	69
Tabela 5.2 -	Comparação entre os valores obtidos por ICP OES após digestão ácida e os valores de referência certificados. Incertezas dos resultados obtidos por ICP OES representadas por 2 desvios-padrão.	73
Tabela 5.3 -	Concentração média determinada nas diferentes frações de tamanho das partículas de amostras de boldo-do-Chile. As incertezas estão representadas por ± 1 desvio-padrão (n = 3). Os valores entre parênteses referem-se aos valores calculados de <i>t</i> . O valor crítico de <i>t</i> para 2 graus de liberdade e 95 % de probabilidade é 4,303.....	74
Tabela 5.4 -	Coeficientes de variação (% , n = 30 crateras, 20 pulsos por cratera) das medidas de Ca, Mg, P, Al, B, Cu, Fe, Mn e Zn com 50 J cm ⁻² em pastilhas de boldo preparadas após moagem com bolas por 10, 20, 30, 60 e 120 min	94
Tabela 5.5 -	Limite de detecção (LOD; σ = 3,3s) para macro (Ca, Mg e P) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn) em diferentes comprimentos de onda obtidos usando 25 e 50 J cm ⁻²	103

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

CRM	Material de referência certificado
CV	Coefficiente de variação
<i>e.g.</i>	Por exemplo
ETV-ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente empregando atomização eletrotérmica
ETV-ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente empregando atomização eletrotérmica
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama
fs	Femtosegundos
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente
<i>i.e.</i>	Isto é
LA-ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente empregando ablação com laser
LA-ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente empregando ablação com laser
LIBS	Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser
LOD	Limite de detecção
LTSD	Distância entre a lente de focalização e a amostra
ns	Nanosegundos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Objetivos	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	Macro e micronutrientes em plantas	18
2.2	Métodos para análise de tecidos vegetais	19
2.3	Análise direta de sólidos	22
2.4	Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser	24
2.5	LIBS para a análise de tecidos foliares	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	Instrumentação	32
3.2	Reagentes e soluções	35
3.3	Amostras e materiais de referência certificados	35
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	37
4.1	Preparo das amostras	37
4.1.1	Moagem criogênica	37
4.1.2	Moagem com moinho de bolas planetário	38
4.1.3	Peneiramento das amostras	39
4.1.4	Preparo das pastilhas para LIBS	40
4.1.5	Decomposição assistida por radiação micro-ondas	40
4.2	Determinação do tamanho das partículas	41
4.3	Determinação dos elementos por LIBS	41
4.3.1	Avaliação dos efeitos da fluência e do diâmetro de focalização do laser	42
4.3.2	Construção das curvas de calibração	44
4.4	Determinação dos elementos por ICP OES	46
4.5	Descontaminação dos materiais	46
4.6	Tratamento dos dados	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	Efeito da fluência e do diâmetro de focalização do laser nos sinais de emissão.	49
5.2	Efeito da fluência e do diâmetro de focalização do laser na precisão das medidas	57
5.3	Efeito do tamanho das partículas nos sinais de emissão	70

5.3.1	Análise de pastilhas após fracionamento das partículas	71
5.3.2	Análise das pastilhas após moagem criogênica	85
5.3.3	Análise das pastilhas após moagem com bolas	87
5.4	Efeito da fluência nas curvas de calibração	97
6	CONCLUSÃO	106
	REFERÊNCIAS	107

1 INTRODUÇÃO

A evolução de técnicas instrumentais, como a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS), a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) e a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS), possibilitou a determinação rápida e/ou simultânea de elementos em baixas concentrações (*e.g.* $\mu\text{g L}^{-1}$ ou em alguns casos pg L^{-1}). Estes avanços contribuíram para a caracterização e o controle de qualidade de diversos materiais, bem como aplicações nas áreas de toxicologia, agricultura, meio ambiente, farmacêutica, medicina, entre outras. Entretanto, essas técnicas geralmente envolvem a introdução do analito na forma de solução e as estratégias para as etapas de preparo da amostra dependem da natureza da matriz, do elemento químico a ser determinado e sua concentração, da precisão e da exatidão desejadas.

Os métodos mais modernos para a decomposição de materiais biológicos baseiam-se na decomposição das amostras com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados,¹ evitando-se a decomposição incompleta da matriz orgânica, perdas por volatilização e erros devidos à contaminação. Para evitar erros sistemáticos, recomenda-se que os procedimentos sejam executados em ambientes limpos (mínimo ISO Classe 7), o uso de ácidos purificados por destilação abaixo do ponto de ebulição e de frascos de decomposição de alta pureza.¹ Não obstante, cabe lembrar a necessidade de instrumentação de custo relativamente alto e infra-estrutura para manipulação de ácidos (capelas de exaustão e sistemas de tratamento de gases).

Após três décadas de intensas pesquisas e avanços na espectrometria atômica existe um consenso que o tratamento da amostra previamente à determinação dos analitos consiste na etapa de maior custo e de maior fonte de erros.^{1, 2} Assim, o desenvolvimento de métodos de análise rápida é uma necessidade cada vez mais presente. Nos últimos anos, duas linhas de pesquisas foram intensificadas: uma delas consiste na busca por métodos de preparo de amostras cada vez mais rápidos (*e.g.* 40 amostras / 20 min) e eficientes,¹ e, a outra, por métodos de análise direta sem nenhum ou com mínimo pré-tratamento da amostra.²

A análise direta de sólidos *in situ* é, em princípio, a ideal para os analistas, pois a determinação dos elementos pode ser feita diretamente no local de amostragem, e a seqüência analítica ficará restrita a poucas etapas, tornando-se mais simples. Entretanto, ainda são poucos os equipamentos com desempenho apropriado que podem ser levados ao campo para a

determinação de elementos químicos em quaisquer tipos de amostras.¹ A análise direta de amostras por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) vem se mostrando como uma alternativa viável aos métodos bem consolidados de espectrometria atômica, e ocupa um lugar de destaque nos principais periódicos especializados, com um número crescente de publicações. LIBS vem se estabelecendo no cenário científico e os resultados apresentados na literatura destacam grandes avanços e potencialidades para analisar amostras de interesse ambiental, biológico e industrial de forma rápida, com o mínimo ou nenhum preparo de amostra, possibilitando determinação simultânea, multielementar e *in situ*.³

Nos últimos 5 anos a técnica LIBS vem sendo avaliada pelo Grupo de Espectrometria Atômica do CENA-USP para análise de tecidos vegetais visando à determinação de P, K, Ca, Mg, B, Cu, Fe, Mn e Zn.⁴⁻⁸ Os resultados mais recentes indicam que LIBS apresenta características analíticas apropriadas para a análise direta de pastilhas de tecidos vegetais.⁵

1.1 Objetivos

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da fluência, do diâmetro de focalização do laser e do tamanho das partículas das amostras nas análises de pastilhas de tecidos vegetais por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Macro e micronutrientes em plantas

Apesar de mais de 60 elementos químicos já terem sido encontrados nas plantas, somente pouco mais de uma dezena é realmente essencial. Pode-se dizer que um elemento é essencial para a planta quando o vegetal não consegue completar seu ciclo de vida na ausência desse elemento.⁹

Os elementos químicos considerados essenciais são classificados como macronutrientes (C, O, H, N, P, K, Ca, Mg e S) e como micronutrientes (Fe, Mn, B, Zn, Cu, Mo, Cl e Ni). Deve-se ressaltar que o critério de classificação entre micro e macronutrientes não tem correlação com uma maior ou menor essencialidade. De maneira geral, os macronutrientes são requeridos em maiores quantidades, pois possui um papel estrutural, i.e., fazem parte de moléculas essenciais para o vegetal. Os micronutrientes estão mais relacionados com atividades bioquímicas, como a ativação de enzimas, por exemplo, sendo esse um papel regulatório.⁹

Os elementos essenciais possuem um papel decisivo na nutrição dos animais e das plantas e afetam o rendimento de lavouras e da produção animal quando presentes em concentrações não apropriadas. Assim, a determinação de macro e micronutrientes em material foliar, o órgão que melhor reflete o estado nutricional da planta, é fundamental para avaliar o estado nutricional das culturas de interesse econômico.⁷⁻⁹ De maneira geral, a Tabela 2.1 mostra a variação das concentrações de macro e micronutrientes em folhas de algumas culturas importantes em estado nutricional adequado.⁷⁻⁹

Tabela 2.1 – Variação da concentração de macro e micronutrientes (em matéria seca) frequentemente observada em tecidos foliares de plantas de interesse agrônomo⁹⁻¹¹

Nutriente	Concentração
	g kg⁻¹
N	0,1 – 20
P	0,8 – 10
K	6 – 60
Ca	2 – 60
Mg	1 – 10
S	0,1 – 10
Cl	0,1 – 40
	mg kg⁻¹
B	10 – 200
Cu	3 – 50
Fe	50 – 900
Mn	20 – 2000
Zn	5 – 200
Mo	0,2 – 2

2.2 Métodos para análise de tecidos vegetais

Em geral, a determinação de macro e micronutrientes em tecidos vegetais envolve pré-tratamentos das amostras como lavagem, secagem e moagem. As próximas etapas da sequência analítica incluem a decomposição ácida de uma dada porção amostrada (*e.g.* 250 – 1000 mg) em sistemas abertos ou fechados, e a determinação dos elementos por técnicas espectroanalíticas como, por exemplo, FAAS e ICP OES.^{1, 7, 8, 12}

Em geral, a decomposição de tecidos vegetais por via úmida implica em aquecimento da amostra na presença de um ácido mineral oxidante concentrado (*e.g.* HNO₃, HClO₄) e/ou misturas com H₂O₂ em sistemas abertos ou fechados. A decomposição por via úmida é particularmente útil para a determinação de elementos em vários tipos de amostra, pois muitos analitos são convertidos em cátions inorgânicos simples não voláteis, que permanecem no meio ácido. Este método também pode ser usado para a determinação de N, P e S, entre os

não-metals. Entretanto, alguns elementos podem ser perdidos, completa ou parcialmente, por volatilização. Incluem-se, neste caso, os halogênios, além de Sb, As, B, Hg e Se, dependendo do procedimento utilizado.^{1, 13}

A decomposição pela via úmida em frascos abertos é um dos métodos mais antigos e mais usados para a decomposição de materiais orgânicos. A digestão nitro-perclórica é a mais utilizada para o preparo de amostras vegetais. Neste método, uma porção de 500 mg da amostra é inicialmente oxidada na presença de 5 mL de HNO₃ 65% m/m a 160 °C, até cessar a evolução de fumos marrons de NO₂. Posteriormente, a reação de decomposição é finalizada na presença de 1,3 mL de solução 70% m/m HClO₄, a 210 °C, até que fumos brancos de HClO₄.H₂O comecem a evoluir. A digestão se completa neste estágio com a obtenção de uma solução incolor ou ligeiramente amarela.¹⁴ Neste digerido podem ser determinados P, K, Ca, Mg, S, Fe, Cu, Mn, Zn, B, Al e Na.¹⁵

No entanto, este método apresenta algumas limitações. Algumas amostras necessitam de altas temperaturas para que as ligações possam ser rompidas e o material apropriadamente oxidado. Como o aquecimento é feito sob pressão atmosférica, temperaturas maiores que o ponto de ebulição dos ácidos utilizados (*e.g.* 120 °C azeótropo HNO₃/H₂O) não podem ser alcançadas. Neste sentido, volumes maiores de ácidos podem ser necessários para que a decomposição ocorra com rendimento apropriado. Consequentemente, elevados brancos analíticos podem ser eventualmente observados. Além disso, o HClO₄, quando utilizado isoladamente, torna-se muito perigoso devido ao risco iminente de explosão provocada pela formação de percloratos instáveis.¹⁵

Por outro lado, a digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados constitui o método moderno mais recomendado para decomposição de amostras orgânicas.¹⁶ Quando um material não transparente às micro-ondas absorve este tipo de radiação, sofre um aumento considerável na sua temperatura devido, principalmente, à interação da radiação eletromagnética com os íons dissolvidos e com o solvente, provocando os fenômenos de migração iônica e rotação de dipolos, respectivamente. O aquecimento por radiação micro-ondas, ao contrário dos sistemas baseados no aquecimento condutivo (*e.g.* chapas aquecedoras, chamas), envolve absorção direta de energia pelo material que está sendo aquecido.^{16, 17}

Em geral, as vantagens preconizadas para decomposições assistidas por radiação micro-ondas em frascos de decomposição fechados quando comparados com os sistemas abertos são:^{16, 17}

- a. maior eficiência na decomposição em altas temperaturas;
- b. risco reduzido de perdas de analitos por volatilização;
- c. risco reduzido de contaminações devidas ao ambiente de trabalho;
- d. menor consumo de reagentes de alta pureza (possibilidade de realizar decomposições com ácidos diluídos).

Entre as desvantagens inerentes aos sistemas fechados encontra-se a limitação para digerir massas de amostra maiores que 500 mg, por exemplo, porque a pressão interna que se desenvolve dentro do frasco depende da pressão de vapor do ácido empregado e da pressão resultante causada pelos produtos gasosos gerados nas reações de decomposição.¹⁶ Esta característica pode dificultar a determinação de elementos presentes em baixas concentrações (*e.g.* $< 5 \text{ mg kg}^{-1}$), principalmente empregando FAAS.

Vale a pena destacar o emprego de métodos modernos de preparo de amostras utilizando equipamentos com câmara de reação pressurizada e aquecimento assistido por radiação micro-ondas, que permitem a decomposição de até 77 amostras simultaneamente com ácidos diluídos, sob alta pressão (*e.g.* 200 bar) e alta temperatura (*e.g.* 260 °C), em frascos de vidro, quartzo ou TFM[®]. Além disso, a principal vantagem desses sistemas é a possibilidade de digerir amostras com massas elevadas (*e.g.* 25 a 30 g). Neste caso, até 6 amostras podem ser processadas simultaneamente.¹⁸

As fontes de erro frequentemente encontradas em procedimentos analíticos envolvendo decomposição ácida, juntamente com os erros sistemáticos, podem ser devidas às substâncias orgânicas não decompostas interferindo na etapa de determinação, ou à incompleta recuperação de elementos-traço em etapas de pré-concentração e/ou separação.¹⁹ As vantagens, limitações e aplicações dos métodos de preparo de amostras pela via úmida em sistemas abertos e fechados foram descritas na literatura.^{1, 20}

A técnica mais recomendada para a análise de rotina dos digeridos é ICP OES devido à possibilidade de determinação simultânea e multielementar para a maioria dos elementos de interesse agrônômico e nutricional. A princípio, determinações de P, K, Ca, Mg, S, Fe, Cu, Mn, Zn e B, com excelente qualidade metrológica, podem ser realizadas em aproximadamente 30 s por digerido utilizando ICP OES com visão axial ou radial.^{21, 22} Alternativamente, a determinação de K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn e Zn nos digeridos ácidos pode ser feita por FAAS ar-C₂H₂⁷ e a determinação de P e B usando injeção em fluxo e espectrofotometria.^{23, 24} Estes métodos têm sido utilizados em análise de rotina de plantas nos últimos 30 anos.

No entanto, a análise direta de material vegetal ainda é um desafio, e constitui um vasto campo de pesquisa. No passado, pesquisas desenvolvidas no CENA objetivaram a análise direta de material vegetal empregando espectrometria de emissão óptica com arco e faísca. Neste caso, as amostras moídas eram misturadas com grafite e prensadas para produzir pastilhas condutoras. Este método não foi facilmente implementado devido à falta de materiais de referência certificados (CRMs) para a calibração e às dificuldades encontradas para homogeneização apropriada das amostras.⁷

2.3 Análise direta de sólidos

A determinação de elementos químicos a partir da análise direta de sólidos é uma alternativa que, nos últimos anos, vem se mostrando bastante viável.^{25, 26} No caso de materiais biológicos, a análise pode ser efetuada diretamente nas amostras *in natura*,²⁷ no material cominuído na forma de pó,^{28, 29} prensado na forma de pastilha,^{7, 30} ou na forma de suspensões.³¹

Algumas técnicas já vêm sendo utilizadas e/ou propostas para a análise direta de amostras sólidas, incluindo materiais vegetais, como ICP-MS empregando ablação com laser (LA-ICP-MS)^{32, 33} ou vaporização eletrotérmica (ETV-ICP-MS),²⁶ ICP OES empregando ablação com laser (LA-ICP OES)³⁴ ou vaporização eletrotérmica (ETV-ICP OES),^{26, 35} LIBS,^{7, 8, 36} GFAAS,^{2, 37} e espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF).³⁸

Entre as vantagens sobre os procedimentos analíticos convencionais que utilizam digestão ácida, destacam-se:^{2, 25, 26}

- a. diminuição do número de etapas do pré-tratamento da amostra antes da determinação dos analitos;
- b. os riscos de contaminação ficam relacionados às etapas de moagem e/ou prensagem, quando necessárias;
- c. eliminação ou redução da geração de resíduos, o que permite classificar os métodos como quimicamente sustentáveis;
- d. possibilidade de analisar porções amostradas menores que 50 µg, permitindo estudos de micro-homogeneidade.

Apesar das vantagens associadas à análise de sólidos, existem algumas dificuldades que ainda precisam ser vencidas. A possibilidade de analisar pequenas massas de amostras, principal característica dos métodos microanalíticos (que analisam massas menores que 10 mg, por exemplo), pode comprometer a precisão e exatidão das medidas. Quanto menor a massa da porção amostrada, maior a possibilidade de se observar um aumento no coeficiente de variação (CV) dos resultados.^{2, 39} Estes métodos são mais susceptíveis às dificuldades associadas à representatividade da porção amostrada em comparação aos métodos que analisam amostras líquidas após a digestão de massas da amostra da ordem de 100 a 250 mg. Em geral, as digestões de massas maiores que 100 mg produzem soluções representativas das amostras, cujas alíquotas retiradas para as determinações são idealmente idênticas.

Considerando-se a homogeneidade dos materiais, pode-se dizer que a maioria dos sólidos, com raras exceções como algumas ligas metálicas e vidros, é uma mistura heterogênea. Materiais biológicos, geológicos e ambientais são, caracteristicamente, não homogêneos. A heterogeneidade encontrada em pequenas massas de amostras é, geralmente, consequência da presença de partículas maiores chamadas *nuggets*, as quais podem conter altas concentrações de elementos químicos.^{25, 28, 40-43}

Uma maneira de minimizar as dificuldades encontradas na análise de pequenas massas é reduzir o tamanho das partículas do material.^{25, 28, 29, 44, 45} O tamanho das partículas e a sua distribuição afetam a homogeneidade e, principalmente, a representatividade das porções a serem amostradas. Em geral, uma estreita distribuição, com partículas idealmente menores que 10 μm , confere um grau de homogeneidade apropriada aos materiais.^{43, 46} Nesse sentido, a determinação da distribuição do tamanho das partículas é fundamental para o desenvolvimento de métodos microanalíticos e, principalmente, para avaliar as incertezas associadas às porções amostradas.^{44, 47} Cabe destacar que tecidos foliares podem ser apropriadamente cominuídos com moinho criogênico^{7, 8} ou moinho de bolas planetário.^{48, 49}

A homogeneidade da distribuição dos elementos químicos que compõem um material pode ser determinada pela medida da concentração dos elementos em uma pequena massa de amostra.^{2, 28} A reprodutibilidade das medidas realizadas em porções individuais reflete diretamente a distribuição dos analitos na matriz.^{25, 28, 50}

Outras dificuldades envolvem os processos de calibração, garantia e controle de qualidade dos métodos microanalíticos, pois a maioria das propriedades dos CRMs é certificada para massas que variam entre 100 e 500 mg.⁴²

2.4 Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser

O interesse pela utilização de lasers em química analítica data do início da década de 1960, após a construção do primeiro laser de rubi. Em 1962, o laser de rubi foi usado para gerar vapores na superfície de materiais metálicos e não metálicos. Os vapores foram excitados por uma fonte de energia auxiliar para formar um microplasma com objetivo de detectar seu espectro de emissão. Esse experimento é considerado como o nascimento de uma das primeiras técnicas analíticas a utilizar o laser como fonte de energia, a qual é denominada *Laser Induced Breakdown Spectroscopy* – LIBS. Em 1964, LIBS tornou-se uma técnica espectroanalítica para a análise direta de amostras pois a ablação e a excitação atômica foram realizadas usando plasma induzido por laser. Nesse experimento, foram construídas curvas de calibração baseadas nas emissões de linhas atômicas e/ou iônicas de Cr e Ni, detectadas diretamente no plasma induzido na superfície de amostras de aço.^{51, 52} A evolução da instrumentação com lasers e do desenvolvimento instrumental em LIBS foi detalhada por Radziemski.⁵³

Embora os lasers tenham sido mais difundidos para fins analíticos durante a década de 1980, os avanços da indústria eletrônica nos últimos 15 anos foram decisivos para que a instrumentação assistida por lasers se tornasse um grande atrativo para as técnicas espectroanalíticas. O desenvolvimento de lasers pulsados com maior energia por pulso (*e.g.* > 50 mJ) e mais rápidos (*e.g.* < 10 ns), assim como de detectores de estado sólido ICCD (*intensified charge-coupled device*), que possibilitam melhor resolução temporal nas medidas espectroscópicas e melhor discriminação entre o espectro de emissão dos analitos e o espectro de fundo devido à emissão do *continuum* do plasma, contribuíram significativamente para o desenvolvimento da técnica.^{51, 53-55} O mercado global de equipamentos analíticos assistidos por lasers movimentava cerca de três bilhões de dólares anuais, o que evidencia a importância estratégica de pesquisas na área de desenvolvimento e aplicações analíticas de lasers.^{51, 52}

A análise direta de amostras por LIBS vem se mostrando como uma alternativa viável aos métodos bem consolidados de espectrometria atômica, e ocupa um lugar de destaque nos principais periódicos especializados, com um número crescente de publicações. Em consulta realizada na página do Institute for Scientific Information (<http://www.isiknowledge.com>), com o termo *laser induced breakdown spectroscopy*, é possível observar o crescimento significativo do número de trabalhos sobre LIBS nos últimos 10 anos (Figura 2.1).

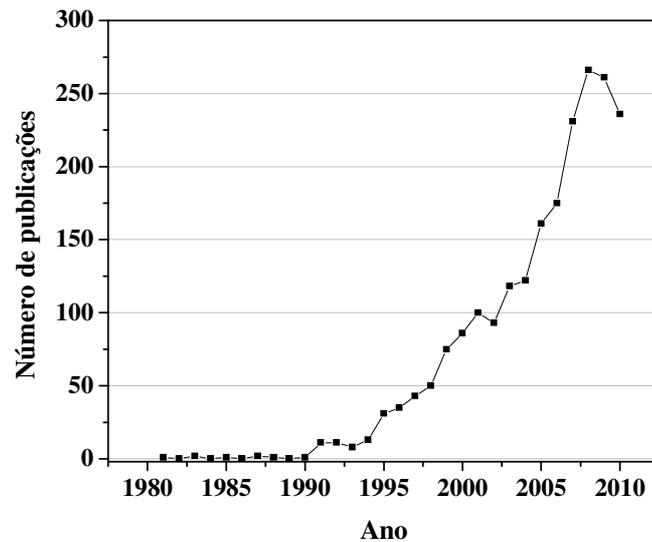


Figura 2.1 - Número de trabalhos sobre espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por lasers entre 1981 e 2010

LIBS é uma técnica espectroanalítica que emprega a microamostragem por ablação com laser e subsequente excitação dos átomos, íons e fragmentos moleculares presentes no microplasma induzido durante a ablação. Em geral, LIBS utiliza um laser pulsado de 1 a 10 ns, com taxa de repetição entre 1 e 10 Hz e energia por pulso entre 10 e 200 mJ. O laser é focalizado por uma lente convergente, resultando em irradiâncias da ordem de GW cm^{-2} para pulsos com duração de ns, provocando a formação de um plasma de alta temperatura (*e.g.* 8000 a 20000 K) que vaporiza uma certa quantidade de material. Parte da luz emitida pelo plasma é capturada por um sistema óptico e transferida para um espectrômetro que dispersa as radiações emitidas pelas espécies atômicas e iônicas excitadas no plasma. Um detector registra os sinais de emissão e os equipamentos eletrônicos digitalizam e computam os resultados. O espectro emitido é usado para determinar os elementos constituintes da amostra.^{52, 54-56} Alternativamente, podem ser utilizados lasers com duração de ps a fs, mas a maioria dos trabalhos presentes na literatura empregam lasers com pulsos de ns. Somente para fins de comparação, os lasers de fs resultam em irradiâncias da ordem de TW cm^{-2} .

A inicialização, formação e decaimento do plasma são processos complexos. A absorção da radiação incidente do laser ocorre por mecanismos de *bremstrahlung* inverso e envolve colisões entre fótons, elétrons e átomos ou moléculas.^{54, 57} A excitação eletrônica para níveis específicos de energia depende de fatores como o equilíbrio termodinâmico e interações com outros átomos e moléculas, geralmente influenciados pelas características da

matriz. Após o término do pulso do laser (tipicamente em 10 ns), o plasma decai em um intervalo compreendido por alguns microssegundos, dependendo da energia depositada e pressão da atmosfera de ablação.⁵⁴

O espectro de emissão altera-se em função da evolução temporal do plasma. Nos primeiros instantes, o espectro é caracterizado pela emissão de radiação do *continuum* e de espécies iônicas excitadas. O *continuum* é a “luz branca” emitida pelo plasma, proveniente, principalmente, de reações de recombinação dos elétrons livres com os íons e de fenômenos *bremsstrahlung*. Ao longo do decaimento do plasma, o espectro começa a ser caracterizado por radiação emitida por átomos neutros e, eventualmente, por moléculas simples, formadas pela recombinação de espécies atômicas. Na prática, durante o decaimento, observa-se uma diminuição da intensidade de emissão de radiação de fundo devida ao *continuum*.⁵⁴

Os principais fatores que afetam as determinações feitas por LIBS são as propriedades intrínsecas do laser (*e.g.* comprimento de onda, duração do pulso, número de pulsos, taxa de repetição, configuração do conjunto óptico de focalização e respectiva fluência), as propriedades da amostra (*e.g.* distribuição do tamanho das partículas, densidade e porosidade das pastilhas de material vegetal moído), a atmosfera de ablação (*e.g.* tipo de gás e pressão) e as condições das medidas de emissão óptica (*e.g.* coleta da radiação emitida pelo plasma, seleção de linhas atômicas e iônicas, tempo de atraso e tempo de integração das medidas). Esses fatores devem ser estudados e cuidadosamente selecionados para cada aplicação analítica.⁵⁸⁻⁶¹ Além disso, é necessário considerar as hipóteses de que a ablação é estequiométrica e que o plasma é opticamente transparente.⁶¹

Os processos físicos envolvidos na interação entre o laser e a amostra, na expansão dinâmica do plasma e em outros fenômenos envolvidos na ablação com laser, são dependentes da matriz e, principalmente, da fluência do laser.^{58, 62, 63} Neste sentido, para cada aplicação, selecionam-se a energia por pulso e o diâmetro de focalização do laser que resultem na fluência que proporcionará as melhores características analíticas como, por exemplo, a melhor razão sinal-ruído (SNR) e os menores CVs. A escolha da fluência deve considerar o tipo de material a ser ablado, os níveis de energia de excitação das linhas de emissão dos analitos e o arranjo óptico do sistema LIBS.⁵⁹

Um esquema do sistema LIBS que tem sido utilizado no CENA^{5, 7, 8, 36, 64, 65} é mostrado na Figura 2.2. Este sistema é constituído por um laser de Nd:YAG, uma lente plano-convexa para focalização do pulso do laser na superfície da amostra, um suporte para fixar a amostra em uma câmara de ablação, um telescópico para coleta da radiação emitida, e um espectrômetro com montagem Echelle. Quando a lente convergente focaliza o pulso de laser

na superfície da amostra, as moléculas componentes do material são dissociadas tanto em átomos, devido à ruptura das ligações moleculares, quanto em íons e elétrons, devido à ruptura das ligações eletrônicas. Essa ruptura (*breakdown*) é promovida pelo gradiente de campo elétrico intenso do laser que acompanha a focalização.^{54-56, 66}

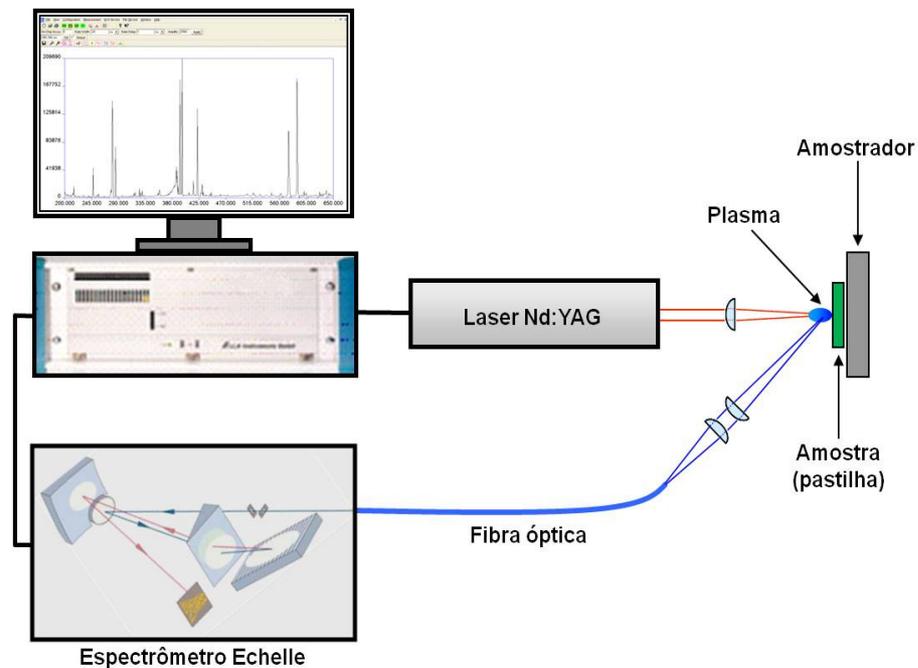


Figura 2.2 - Esquema do sistema LIBS

LIBS é uma técnica bastante versátil e apresenta as seguintes características:

- a. permite análises rápidas (0,5 min) e *in situ*;
- b. análise multielementar;
- c. massas amostradas entre 1 e 250 μg ;
- d. pode dispensar totalmente o preparo da amostra;
- e. permite análise de gases, líquidos e sólidos;
- f. possibilita a análise de materiais de difícil dissolução.

As aplicações da técnica LIBS foram recentemente revisadas por Cremers e Chinni³ e Evans et al.⁶⁷ De maneira geral, LIBS tem sido explorada para a análise de ligas metálicas,⁶⁶

materiais geológicos,⁶⁸ materiais de interesse agrônomo,^{5, 69} obras de arte,⁷⁰ explosivos,⁷¹ amostras ambientais,^{65, 72} materiais farmacêuticos³⁶ e tecidos animais.^{30, 73}

2.5 LIBS para a análise de tecidos foliares

A primeira tentativa de analisar material de origem vegetal por LIBS foi realizada por Sun et al.⁷⁴ Neste trabalho, os autores fixaram as amostras de folhas moídas em uma fita adesiva dupla face, afixada em lâmina de vidro, e pulsos de 100 mJ (Nd:YAG a 1064 nm, aproximadamente 25 J cm⁻²) foram aplicados na superfície para formar o plasma. A concentração de macronutrientes (Ca, Mg e P), micronutrientes (Cu, Fe, Mn e Zn) e Al foram determinadas usando CRMs de origem vegetal e misturas destes materiais, em diferentes proporções, para calibração. A melhor SNR foi observada quando os tempos de atraso e integração foram fixados em 1 e 10 µs, respectivamente, e o CV das medidas variou entre 8 e 15 %. Neste trabalho, o CRM NIST 1575 foi utilizado para validar os resultados obtidos por LIBS e, apesar de o trabalho relatar a determinação de 8 elementos em materiais vegetais, os autores forneceram informações apenas para Al, Cu, Fe e P e não justificaram os outros resultados. Além disso, resultados de Mn e Zn obtidos por LIBS em musgo foram comparados os com os determinados por ICP OES após digestão com 1,0 mol L⁻¹ HNO₃.⁷⁴ De maneira geral, este artigo mostra a viabilidade da técnica LIBS para a determinação de macro e micronutrientes em materiais vegetais e aponta as dificuldades para se realizar análises quantitativas.

Assion et al.⁷⁵ avaliaram a performance de lasers com pulso de ns e fs para a determinação de Ca em solução aquosa para subsequente aplicação para a análise de células do tronco de girassol (*Helianthus annuus* L.). Os autores observaram redução significativa da emissão do *continuum* quando fs-LIBS foi utilizado. O sistema fs-LIBS proporcionou ablação mais precisa (i.e. melhor reprodutibilidade do volume das crateras) e possibilitou o monitoramento de Ca ao longo das células, sendo o laser mais apropriado para realizar análises com resolução de 150 nm. A determinação de Fe na nervura central e regiões de folhas frescas também foi realizada utilizando fs-LIBS,⁷⁶ proporcionando informação espacial com relação à distribuição deste elemento ao longo da folha.

Kaiser et al.⁷⁷ avaliaram a bioacumulação espacial de Cd e Pb em folhas e raízes utilizando fs-LIBS e técnicas radioanalíticas baseadas em microscopia com raio-X. A

dificuldade encontrada pelos autores foi para a calibração, uma vez que as informações com respeito à distribuição espacial dos elementos ao longo da estrutura dos tecidos é perdida quando a calibração é feita com material vegetal prensado, por exemplo. Desta forma, apenas a análise qualitativa destes elementos foi realizada. Em outra contribuição, Galiová et al.²⁷ mapearam a distribuição espacial de Pb em tecidos foliares utilizando ns-LIBS (Nd:YAG, 532 nm, 10 mJ/pulso).

Trevizan et al.⁷ determinaram macronutrientes (P, K, Ca, Mg) em material foliar por LIBS. Pastilhas foram preparadas com folhas moídas criogenicamente e analisadas aplicando-se 8 pulsos (5 ns, 1064 nm) consecutivos de 200 mJ (23 J cm^{-2}). CRMs foram utilizados para construção das curvas de calibração e os resultados obtidos por LIBS comparados com os determinados por ICP OES após digestão ácida das amostras. Os resultados discrepantes foram atribuídos, principalmente, à pequena massa da porção amostrada (estimada em 360 μg) que pode dificultar a amostragem de materiais cujos elementos constituintes podem estar distribuídos de maneira não homogênea na matriz. Com exceção do K, os limites de detecção (LOD) foram apropriados para diagnose foliar.⁷ Posteriormente, a determinação de micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn) em materiais vegetais por LIBS também foi avaliada por Trevizan et al.⁸ O preparo de amostra, as condições instrumentais e o método de calibração foram os mesmos utilizados anteriormente.⁷ Os resultados obtidos por LIBS foram comparados com os determinados por ICP OES após digestão ácida das amostras. Alguns resultados não concordantes também foram observados e, inicialmente, associados aos efeitos de matriz provocados, principalmente, por diferenças entre a composição da matriz e à distribuição do tamanho das partículas entre as amostras de validação e calibração. Os autores enfatizaram que, dentre os aspectos destacados no trabalho anterior,⁷ estas diferenças entre as matrizes podem provocar diferentes interações entre o laser e a amostra resultando em variações da massa de material vaporizado pelo plasma. Além disso, as incertezas dos valores certificados (*e.g.* entre 2 e 4 %) dos CRMs empregados para a calibração e a amostragem de massa menor que a mínima recomendada pelos fabricantes dos CRMs (*e.g.* 150 mg) são fatores que contribuíram para a obtenção de alguns resultados discordantes. Os LODs obtidos foram apropriados para a determinação de micronutrientes em material foliar.⁸

Pouzar et al.⁷⁸ também avaliaram a determinação de P, K, Ca, Mg em tecidos foliares, mas com sistema LIBS de duplo-pulso. Os autores analisaram pastilhas preparadas com folhas moídas criogenicamente, aplicando-se 2 pulsos (12 ns, 1064 nm) co-lineares consecutivos com 7 μs de intervalo entre os pulsos. Deve-se ressaltar que, para cada analito, os autores utilizaram pulsos com energia diferente, variando de 65 a 78 mJ/pulso (*i.e.* entre 207 e

248 J cm⁻²). Amostras previamente analisadas por FAAS e ICP OES foram empregadas para construção das curvas de calibração e CRMs foram utilizados para validar os métodos. Resultados concordantes com os valores certificados foram obtidos apenas para K e P, mas os autores utilizaram condições experimentais diferentes para cada analito. Nesta contribuição, verificou-se a preocupação dos autores com o controle da distribuição do tamanho das partículas das amostras, ressaltando a importância deste parâmetro para a obtenção de resultados apropriados.⁷⁸

Em outra contribuição, publicada pelo grupo de pesquisa do CENA-USP, estratégias quimiométricas baseadas em redes neurais artificiais e algoritmos genéticos foram empregadas para a otimização de alguns parâmetros operacionais para a determinação simultânea de Ca, Mg, P, B, Cu, Fe, Mn, Zn, Al e Si em material foliar por LIBS.⁶ Utilizou-se um sistema LIBS comercial (Aryelle, Technique Berlin LTB, Alemanha) equipado com laser de Nd:YAG (532 nm, 12 ns, 140 mJ) e espectrômetro Echelle com detector ICCD. A otimização foi feita com pastilhas do CRM NIST 1570a (folhas de espinafre). Os melhores resultados foram obtidos com 1,1 µs de atraso, 9,0 µs de integração, 70 mJ/pulso (35 J cm⁻²) e 30 pulsos acumulados.⁶

Kaiser et al.³² avaliaram a distribuição espacial de Pb, Mg e Cu em folhas de *Helianthus annuus* L. por LIBS e LA-ICP-MS com resolução de 200 µm. Os autores concluíram que estes dois métodos podem ser utilizados para a análise espacial da distribuição multielementar, de maneira rápida, em superfícies foliares de aproximadamente 1 cm². Ohta et al.⁷⁹ avaliaram o efeito de partículas coloidais metálicas de Ag ou Au (20 – 80 nm) depositadas sobre a superfície de folhas de *Citrus unshiu* e *Rhododendron obtusum* nas determinações de Ca, Fe, Na, K e Mo por LIBS (1,1 mJ/pulso, 100 Hz, 20 ns, 1064 nm). Os autores observaram aumento de sensibilidade quando as partículas metálicas foram adicionadas, sendo que este efeito foi mais evidenciado na presença de Ag, que proporcionou linhas de emissão mais intensas e estreitas.⁷⁹

Recentemente, estratégias quimiométricas de calibração foram avaliadas pelo grupo de pesquisa do CENA-USP para a determinação de macro e micronutrientes em pastilhas de folhas moídas criogenicamente. Braga et al.⁴ avaliaram o desempenho de métodos de calibração univariada e multivariada utilizando regressão pelos mínimos quadrados parciais (PLSR). Pastilhas, contendo celulose como agente aglutinante, foram analisadas por LIBS empregando o procedimento descrito por Nunes et al.⁶ O desenvolvimento de modelos de PLSR específicos para cada elemento e a seleção de regiões de comprimento de onda contendo somente a linha de emissão de interesse resultaram nas melhores condições

analíticas para a determinação de micronutrientes. Os dois métodos de calibração apresentaram resultados semelhantes (i.e. precisão e exatidão equivalentes), mas a PLSR mostrou-se mais robusta (i.e. menor ocorrência de *outliers*). No entanto, os autores observaram que o método era bastante dependente da matriz, e sugeriram que o emprego de amostras de calibração semelhantes às amostras-teste deveria ser avaliado.⁴ Este estudo foi feito por Nunes et al.⁵ que otimizaram e validaram um método para a determinação de macro e micronutrientes em folhas de cana-de-açúcar por LIBS. Os autores utilizaram PLS por intervalos (iPLS) para selecionar as melhores regiões espectrais para a determinação dos elementos e PLSR para o desenvolvimento de estratégias de calibração e predição. Empregaram-se 26 amostras para calibração e 15 para validação. As pastilhas foram analisadas com emprego de laser de Nd:YAG a 1064 nm (5 ns, 10 Hz), aplicando-se 25 pulsos de 110 mJ (25 J cm⁻²). Os métodos com calibração univariada e multivariada apresentaram resultados semelhantes, exceto para o Fe, quando a estratégia multivariada proporcionou os melhores resultados. Os autores concluíram que LIBS é um método alternativo bastante viável para a determinação de macro e micronutrientes em material foliar, especialmente quando amostras de calibração e validação apresentam características físicas e químicas semelhantes.⁵

Recentemente, um método foi proposto por Pereira et al.⁸⁰ para classificação de folhas de laranjeiras, infectadas ou não por *citrus greening*, baseado nos espectros de emissão gerados por LIBS (Nd:YAG@1064 nm, 50 mJ) e no emprego de ferramentas quimiométricas. Os autores analisaram as folhas em 10 pontos diferentes aplicando-se 1 pulso com 50 mJ.

Cabe observar, que nem todos os trabalhos revisados apresentaram informações sobre a fluência e/ou irradiância utilizadas, ou informações que permitissem os respectivos cálculos, como o diâmetro de focalização do laser, por exemplo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação

Os resultados apresentados nesta dissertação foram obtidos no sistema LIBS desenvolvido no próprio laboratório. Utilizou-se um laser Q-Switched Nd:YAG (Brilliant, Quantel, França) operando no comprimento de onda fundamental (1064 nm) e produzindo pulsos de laser com 6 mm de diâmetro (fator de qualidade $M^2 < 2$), energia máxima de 365 ± 3 mJ, 5 ns de duração (*full width at half maximum* - FWHM) e taxa de repetição de 10 Hz. Os pulsos de laser foram focalizados na superfície da pastilha com uma lente convergente plano-convexa de sílica fundida (2,54 cm de diâmetro e distância focal de 20,0 cm (Edmund Optics, EUA).

A emissão do plasma foi focalizada por um sistema óptico composto por lentes plano-convexas convergentes de sílica fundida com distância focal de 50 e 80 mm (LLA Instruments GmbH, Alemanha) acoplado, com o auxílio de uma fibra óptica, na fenda de entrada de um espectrômetro com montagem óptica Echelle.

Utilizou-se um espectrômetro ESA 3000 (LLA Instruments GmbH, Alemanha) equipado com óptica Echelle (distância focal de 25 cm e abertura numérica de 1:10) e detecção por um ICCD (*intensified charge coupled device*) Kodak KAF 1001 de 1024 x 1024 pixels. Este sistema proporciona uma imagem plana de 24.5×24.5 mm². O espectrômetro possibilita a aquisição de sinais de emissão na região entre 200 e 780 nm, com resolução ($\lambda/\Delta\lambda$) entre 10000 e 20000. A dispersão linear por pixel varia de 5 pm a 200 nm e 19 pm a 780 nm.

Os sinais de imagem foram digitalizados em sistema de 16 bits e processados por computador. A corrente de fundo do detector foi automaticamente subtraída. A energia dos pulsos do laser foi monitorada com um detector de energia equipado com sensor piroelétrico (FieldMax II-P Coherent, USA). A calibração dos comprimentos de onda foi feita com as linhas Hg I 253,652 nm e Zn I 213,855 nm emitidas por lâmpadas de descarga sem eletrodo (EDL II System, Perkin Elmer, Alemanha). O esquema experimental e as fotos do sistema LIBS proposto são mostrados nas Figuras 2.2, 3.1 e 3.2.

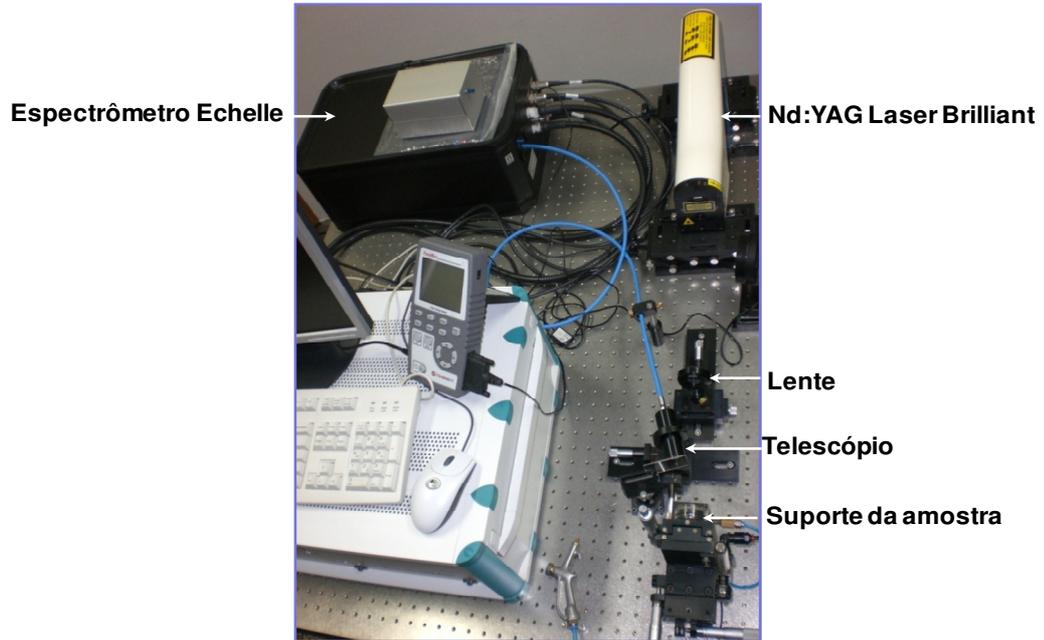


Figura 3.1 - Vista superior do arranjo experimental do sistema LIBS

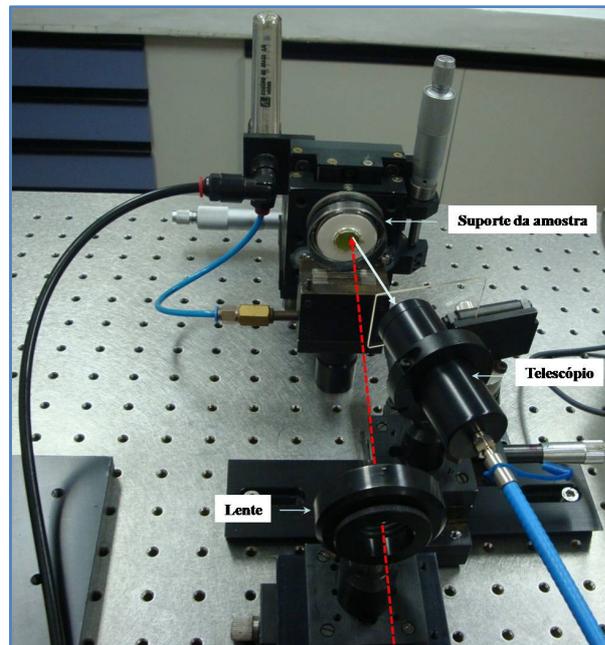


Figura 3.2 - Vista frontal do sistema óptico (lente de focalização do laser e telescópio) e suporte da amostra

As determinações de macro e micronutrientes foram feitas em espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente, modelo Optima 3000 DV (Perkin Elmer, Alemanha), com visão radial e nebulizador de fluxo cruzado.

A secagem das amostras foi feita em estufa de circulação forçada (Fanem, São Paulo, Brasil) entre 60 e 65 °C. A moagem das amostras foi feita em moinho de facas com peneira com abertura de 600 μm (Marconi, Piracicaba, Brasil). Uma segunda etapa de moagem foi feita empregando-se moinho criogênico Spex 6800 Freezer Mill (Spex, USA) ou moinho de bolas planetário PM 400 (Retsch, Alemanha).

O peneiramento das amostras foi feito através de peneiras de aço inoxidável (Bertel, Caieiras, Brasil) com aberturas de 212, 150, 106, 75, 53 e 20 μm (ASTM 70, 100, 140, 200, 270 e 635, respectivamente) com auxílio de um agitador de peneiras vibratório (Bertel, Caieiras, Brasil).

Para a pesagem das amostras utilizou-se uma balança Mettler modelo AE 100 (Greifensee, Suíça), com precisão de décimo de miligrama.

As pastilhas das amostras foram preparadas em prensa hidráulica (Spex model 3624B X-Press, EUA) com capacidade máxima de 35 ton. O material moído foi pressionado no interior de uma matriz de aço inoxidável com diâmetro interno de 150 mm.

As decomposições das amostras foram feitas em forno de micro-ondas modelo ETHOS 1600 (Milestone, Itália) equipado com rotor modelo HPR com capacidade para 10 frascos de reação de PTFE modificado (TFM[®]), os quais suportam temperatura de 300 °C e pressão de até 100 bar.

As determinações do tamanho das partículas foram feitas em analisador de partículas por difração de laser (LS 13 320 Tornado Dry Powder System (Beckman Coulter, EUA) no Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (IPT-SP).

As micrografias das crateras produzidas por ablação com laser foram feitas por microscopia eletrônica de varredura (Stereoscan 440, LEO) no Departamento de Engenharia de Minas e Petróleo da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. As amostras foram recobertas com platina durante 80s no equipamento MED 020 (Bal-tec). As microscopias das crateras foram feitas em um microscópio eletrônico de varredura LEO, modelo Stereoscan 440, utilizando detector de elétrons secundários.

As perfilometrias das crateras produzidas por ablação com laser foram feitas em perfilômetro modelo SV C525 TALYSURF Series 2 (Taylor Hobson Precision, UK) no Laboratório de Materiais Fotônicos do Instituto de Química da UNESP, Araraquara, SP.

3.2 Reagentes e soluções

Água purificada em sistema Milli-Q[®] (Millipore, Bedford, MA, EUA) com resistividade de 18,2 MΩ cm foi utilizada nos procedimentos. O sistema Milli-Q[®] foi alimentado com água proveniente de sistema com osmose reversa (Marconi, Piracicaba, Brasil). Álcool absoluto (Merck, Brasil) foi utilizado para secagem das peças metálicas. Ácido nítrico (HNO₃) de grau analítico foi purificado em destilador de quartzo, empregando-se sistema de destilação abaixo do ponto de ebulição (Kürner, Alemanha), operando a 200 W com rendimento de 20 mL h⁻¹. O ácido destilado foi coletado em frasco de quartzo e armazenado em frasco de polipropileno Nalgene[®]. Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30 % m/m de grau analítico (Merck, Brasil) foi utilizado nos procedimentos de digestão.

As soluções-padrão de Al, B, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P e Zn foram preparadas em meio ácido a partir de diluições apropriadas das soluções estoque contendo 1000 mg L⁻¹ do analito, considerando-se a acidez final das soluções após o procedimento de digestão.

Perclorato de magnésio anidro (Mg(ClO₄)₂, Vetek, Brasil) foi utilizado para manter as amostras com baixo teor de umidade no interior de um dessecador.

3.3 Amostras e materiais de referência certificados

Os experimentos para avaliar os efeitos da fluência, do diâmetro de focalização do laser e do tamanho das partículas nos sinais de emissão foram feitos com amostras de folhas de boldo-do-Chile (*Peumus boldus* Molina) adquiridas no Laboratório Fármaco-botânico Prof. Walter Radamés Accorsi. As folhas de boldo foram escolhidas objetivando o emprego de LIBS para análise de plantas medicinais.

Utilizaram-se materiais de referência certificados (CRMs) de origem vegetal produzidos pelo NIST (National Institute of Standards and Technology, USA), IAEA (International Atomic Energy Agency, Áustria) e NIES (National Institute for Environmental Studies, Japão) para a construção das curvas de calibração. Os códigos dos CRMs e as respectivas matrizes estão listados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Materiais de referência certificados (CRM) de origem vegetal

Código	Matriz
SRM NIST 1515	Folhas de maçã
SRM NIST 1547	Folhas de pêsego
SRM NIST 1570a	Folhas de espinafre
SRM NIST 1573a	Folhas de tomate
SRM NIST 1575a	Acículas de pinheiro
IAEA 359	Folhas de repolho
NIES 3	Alga verde

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Preparo das amostras

De modo geral, para realizar a determinação de macro e micronutrientes em materiais vegetais por LIBS, as amostras de folhas devem ser previamente moídas, visando ao controle da homogeneização e da distribuição do tamanho das partículas,⁵ e, posteriormente, à utilização deste material moído para a confecção das pastilhas (i.e. amostras-teste). O preparo adequado das pastilhas minimiza variações significativas na densidade, porosidade e rugosidade das mesmas.^{7, 8, 36, 49}

4.1.1 Moagem criogênica

A moagem criogênica feita em nitrogênio líquido (i.e. -195.8 °C) provoca um aumento da dureza do material e a inserção de microfalhas na estrutura dos tecidos. Este processo fragiliza o material facilitando a cominuição das partículas. O conjunto para moagem criogênica é constituído de um tubo de policarbonato, uma barra magnética e duas tampas de aço inoxidável. A barra magnética é colocada no interior do tubo contendo a amostra, o qual é vedado nas extremidades com as tampas de aço. Após um período de pré-congelamento da amostra no interior do tubo, imerso em um banho de nitrogênio líquido, um campo magnético alternado é aplicado, fazendo com que a barra magnética se choque com as tampas fixadas nas extremidades do tubo em alta velocidade promovendo a moagem (Figura 4.1). Para tanto, selecionou-se a opção de 10 impactos por segundo conforme proposto por Santos Jr et al.^{31, 81, 82} No equipamento utilizado, é possível fazer, simultaneamente, a moagem de até quatro amostras em frascos com capacidade de até 2 g ou a moagem de apenas uma amostra em frasco com capacidade de até 100 g.

Neste trabalho, 2 g da amostra foram moídos em moinho criogênico, fixando-se a etapa de pré-congelamento de, no mínimo, 5 min e os intervalos de recongelamento durante 1 min, conforme recomendado por Santos Jr et al.^{31, 81, 82} Avaliaram-se 4 tempos de moagem:

5 min (2 ciclos de 2,5 min), 10 min (5 ciclos de 2 min), 20 min (10 ciclos de 2 min) e 30 min (15 ciclos de 2 min).

Como o aumento da área de superfície do material moído aumenta a capacidade de absorção de água do ambiente, todas as amostras moídas foram imediatamente armazenadas em dessecador contendo perclorato de magnésio anidro.

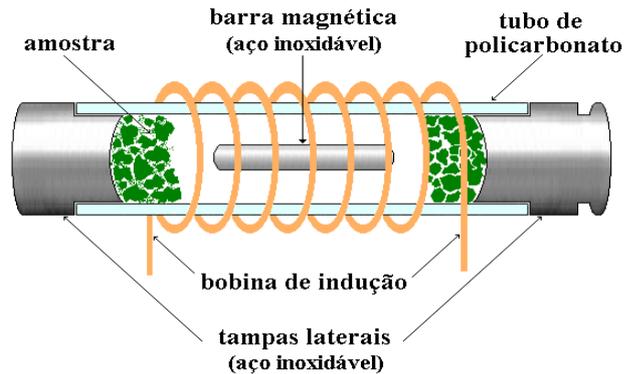


Figura 4.1 – Conjunto de moagem utilizado no moinho Spex 6750 Freezer mill. Fonte: Santos Jr.⁸¹

4.1.2 Moagem com moinho de bolas planetário

O moinho de bolas planetário permite a moagem de materiais fibrosos e de alta dureza e resulta em partículas geralmente entre 0,1 e 100 μm .^{48, 49} O conjunto de moagem com moinho de bolas planetário, utilizado no presente trabalho, constituiu-se de bolas de ágata em frasco cilíndrico de ágata, revestido externamente com aço inoxidável. As bolas são colocadas no interior do frasco de moagem contendo a amostra, o qual é vedado com uma tampa de ágata revestida externamente com aço inoxidável. No equipamento utilizado, 4 frascos de moagem são dispostos em um disco rotacional, de tal maneira que eles possam girar em torno de seus próprios eixos e em torno do eixo do disco que os suporta, apresentando um modelo planetário (Figura 4.2). Isso resulta em constante alteração da combinação das forças centrífugas atuando nas bolas, fazendo com que elas se movimentem ao longo da parede interna do frasco, mudem de posição, e se choquem na parede oposta com impacto. A combinação da fricção e impacto resulta em alto grau de cominuição e homogeneização.^{48, 83}

Segundo Arroyo et al.,⁴⁹ a moagem de amostras de solos com moinho de bolas planetário, empregando frascos e bolas de carbeto de tungstênio, resultou em partículas menores que 10 μm com 40 min de moagem.

Nesta dissertação, 10 g de tecido vegetal, previamente moído em moinho de facas (partículas < 600 μm), e 50 bolas de ágata com 10 mm de diâmetro foram introduzidos no interior de um frasco de ágata de 250 mL, e o sistema submetido a 400 rpm. O sentido de rotação dos frascos foi alternado, permanecendo 5 min no sentido horário e 5 min no sentido anti-horário. Investigaram-se tempos de moagem de 10 a 120 min.

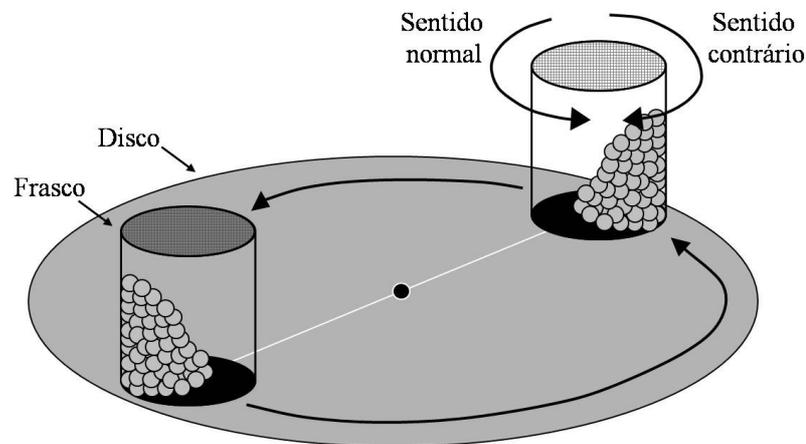


Figura 4.2 – Diagrama esquemático do moinho de bolas planetário. Adaptado de Mio et al.⁸³

4.1.3 Peneiramento das amostras

Folhas de boldo foram moídas em moinho de facas equipado com peneira com abertura de 600 μm e com moagem criogênica utilizando-se 5 e 15 ciclos de moagem de 2 min, conforme descrito no item 4.1.1. Após a moagem, o material foi peneirado utilizando peneiras de aço inoxidável com aberturas de 212, 150, 106, 75, 53 e 20 μm (ASTM 70, 100, 140, 200, 270 e 635, respectivamente) com o auxílio de um agitador de peneiras vibratório. O procedimento moagem/peneiramento foi repetido até a obtenção de alíquotas de cada fração suficientes para a realização dos experimentos. Todas as frações selecionadas foram

acondicionadas em frascos de polietileno de 125 mL com tampa e armazenadas em dessecador.

Conforme observado por Marques et al.,⁸⁴ o peneiramento de amostras de líquen provocou mudanças nas concentrações de alguns elementos químicos nas frações de menor tamanho das partículas. Neste sentido, para verificar possíveis mudanças nas concentrações dos elementos de interesse nas diferentes classes de tamanho das partículas, as frações foram decompostas em meio ácido, conforme o procedimento descrito no item 4.1.5, e a concentração de macro e micronutrientes foi determinada por ICP OES (item 4.1.6).

4.1.4 Preparo das pastilhas para LIBS

As pastilhas foram preparadas transferindo-se 500 mg do material moído para uma matriz de aço inoxidável, aplicando-se $8,0 \text{ ton cm}^{-2}$ durante 5 min, conforme recomendado.⁷ As pastilhas apresentaram 15 mm de diâmetro e aproximadamente 2 mm de espessura.

4.1.5 Decomposição assistida por radiação micro-ondas

As decomposições das amostras de tecido vegetal e CRMs foram feitas em triplicata por via úmida em forno micro-ondas, transferindo-se 250 mg do material seco e moído para os frascos de digestão (TFM[®]) e adicionando-se 6,0 mL de 20 % v/v HNO₃ e 1,0 mL de 30 % m/m H₂O₂ em cada frasco.¹² Os frascos de TFM foram acondicionados individualmente em cilindros de proteção de PEEK (*polyether ether ketone*), fechados e fixados em rotor apropriado para 10 amostras. O rotor foi devidamente instalado na cavidade do forno de micro-ondas e um programa para digestão das amostras foi utilizado (Tabela 4.1). Após o resfriamento, a solução da amostra digerida foi transferida para tubos tipo Falcon de polietileno de 25,0 mL e o volume completado com água.

4.2 Determinação do tamanho das partículas

A distribuição do tamanho das partículas foi determinada por difração com laser, de acordo com o guia ISO 13320-1:1999.⁴⁴ As amostras foram introduzidas na cela de medição, onde o pó seco foi disperso através do feixe do laser. O ângulo de difração da luz espalhada pelas partículas é inversamente proporcional ao diâmetro da partícula. As medidas foram feitas no Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (IPT-SP).

Tabela 4.1 – Programa de aquecimento para decomposição de amostras de tecido vegetal assistida por radiação micro-ondas*

Etapa	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Potência (W)
1	5	160	1000
2	2	160	0
3	5	230	1000
4	15	230	1000
5	30	25	0

* Como medida de segurança, a máxima temperatura externa dos cilindros de proteção foi programada para 90 °C.

4.3 Determinação dos elementos por LIBS

As pastilhas de 15 mm de diâmetro foram posicionadas em um amostrador afixado em um controlador manual com translação em 2 eixos, movendo-se ortogonalmente em relação ao feixe do laser, conforme recomendado.^{5, 7, 8, 36, 65} A ablação foi feita em atmosfera de argônio com fluxo laminar de 0,5 L min⁻¹, tangencialmente à superfície da pastilha fixada em um porta-amostra, evitando a presença de ar atmosférico no ambiente de reação. Os espectros de emissão foram coletados em 30 pontos diferentes, 1,5 mm equidistantes, sobre a superfície da pastilha incidindo-se 20 pulsos de laser. O sistema óptico de coleta da radiação emitida pelo plasma foi posicionado a 25° em relação ao eixo do laser.

Os tempos de atraso e de integração foram fixados em 2,0 e 5,0 μs, respectivamente, conforme recomendado por Trevizan et al. na determinação de macro⁷ e micronutrientes⁸ em

pastilhas de materiais vegetais. As determinações foram feitas com 20 pulsos acumulados em taxa de repetição de 10 Hz.

4.3.1 Avaliação dos efeitos da fluência e do diâmetro de focalização do laser

Uma das maneiras de minimizar as dificuldades encontradas nas análises de amostras heterogêneas é o uso de diâmetros de focalização maiores, da ordem de 0,5 a 1,5 mm.^{36, 49, 59, 65} Esta estratégia resulta em maior remoção de massa e, conseqüentemente, pode tornar os processos de microamostragem assistidos por ablação com laser mais representativos. Neste trabalho, o efeito do diâmetro de focalização do laser sobre os resultados obtidos por LIBS foi avaliado mantendo-se a fluência do laser constante e variando-se a distância lente-amostra (LTSD).

De acordo com Sirven et al.,⁵⁹ para cada problema analítico existe uma condição de fluência e focalização do laser ótima que resulta em uma melhor razão sinal/ruído e melhor repetibilidade das medidas. A fluência é a quantidade de energia por unidade de área irradiada pelo laser,⁵⁴ expressa em $J\ cm^{-2}$. Desta forma, o ajuste da fluência é feito selecionando-se o diâmetro de focalização do laser sobre a superfície da amostra e a energia por pulso. Assim, os efeitos da fluência do laser nos sinais analíticos obtidos por LIBS também foram avaliados. Posicionando-se a lente de focalização em uma distância menor que a distância focal é possível obter diâmetros de focalização maiores do que o obtido no ponto focal da lente (Figura 4.3), o qual é definido pelo raio mínimo (w_2) da cintura do feixe (*beam waist*) calculado pela Equação 1:⁸⁵

$$w_2 = \frac{f}{\sqrt{\left(\frac{\pi w_1^2}{M^2 \lambda}\right)^2 + (f - d_1)^2}} \quad (\text{Equação 1})$$

onde:

f = distância focal da lente = 20 cm

w_1 = raio do pulso do laser = 0,3 cm

M^2 = fator de qualidade do laser = 2

λ = comprimento de onda do laser = $1064\ 10^{-7}$ cm

d_1 = distância entre a saída do laser e a lente focalizadora = 50 cm

Conhecendo-se o raio da cintura do feixe, pode-se calcular a distância focal corrigida (d_2), onde a cintura do feixe estará localizada após a focalização pela lente convergente (Equação 2):⁸⁵

$$d_2 = f + (d_1 - f) \left(\frac{w_2}{w_1} \right)^2 \quad (\text{Equação 2})$$

Desta maneira, conhecendo-se w_2 e d_2 , o raio de focalização do laser em função de LTSD pode ser calculado pela Equação 3:⁸⁵

$$w(z) = 45 \cdot 10^{-4} \left[\left[1 + \left(\frac{(z-d_2)2 \times 1064 \cdot 10^{-7}}{\pi (45 \cdot 10^{-4})} \right)^2 \right] \right]^{0,5} \quad (\text{Equação 3})$$

onde:

w = raio de focalização (cm)

z = distância lente-amostra (cm)

d_2 = distância focal corrigida (20,0068 cm)

Neste trabalho foram avaliados 6 diâmetros de focalização (de 180 a 1050 μm) com diferentes fluências. Inicialmente, os tempos de atraso e de integração foram ajustados em 2,0 e 5,0 μs , respectivamente. O telescópio para coleta da radiação emitida pelo plasma foi ajustado para uma determinada condição e fixado para todas as fluências e diâmetros de focalização do laser.

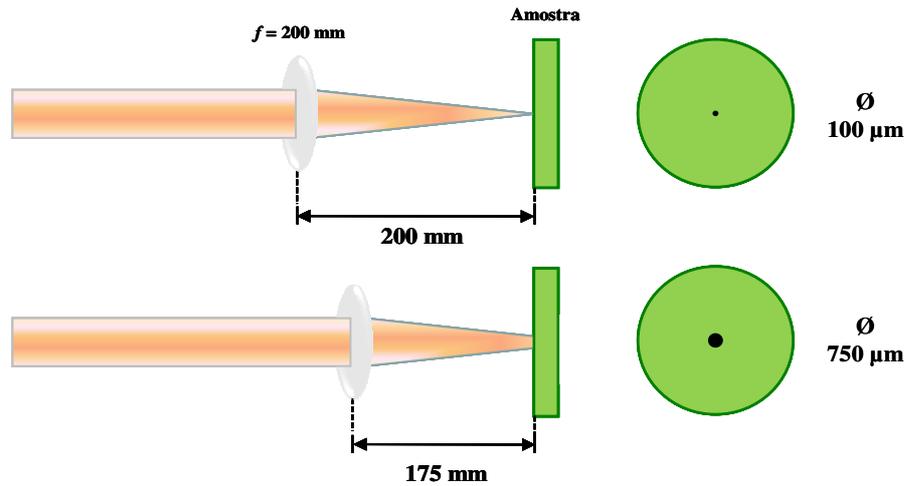


Figura 4.3 - Esquema ilustrativo do sistema óptico de focalização do laser utilizando uma lente plano-convexa com distância focal de 200 mm

4.3.2 Construção das curvas de calibração

As curvas de calibração foram construídas com CRMs de origem vegetal (Tabela 3.1), de maneira semelhante à descrita em trabalhos anteriores.^{7, 8, 65, 66, 86, 87}

Os CRMs foram homogeneizados em moinho criogênico por 10 min (5 ciclos de moagem de 2 min) e, posteriormente, armazenados em dessecador contendo perclorato de magnésio anidro. As pastilhas dos CRMs, preparadas após prensagem com $8,0 \text{ ton cm}^{-2}$, foram analisadas por LIBS aplicando-se 20 pulsos com 25 e 50 J cm^{-2} . Os experimentos foram realizados com diâmetro de focalização de $750 \mu\text{m}$, ajustando-se a LTSD em 175 mm. Os tempos de atraso e de integração foram fixados em 2,0 e $5,0 \mu\text{s}$, respectivamente.

Os CRMs e as frações de massa certificadas dos analitos para a construção das curvas de calibração de macro (Ca, Mg e P) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn) estão mostrados na Tabela 4.2. Cabe informar que as frações de massa de Mg, Fe, Mn e Zn são valores de referência no CRM IAEA 359.

Tabela 4.2 – Frações de massa de Mg e P (% m/m) e B, Fe, Mn e Zn (mg kg⁻¹) nos materiais de referência certificados selecionados para construção das curvas de calibração

	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 3	Padrão 4	Padrão 5	Padrão 6	Padrão 7
Mg	NIST 1575a	IAEA 359	NIST 1515	NIES 3	NIST 1547		
	0,106 ± 0,017	0,216 ± 0,021	0,271 ± 0,008	0,33 ± 0,02	0,432 ± 0,008		
P	NIST 1575a	NIST 1547	NIST 1515	NIST 1573a	NIST 1570a	-	
	0,107 ± 0,008	0,137 ± 0,007	0,159 ± 0,011	0,216 ± 0,004	0,518 ± 0,011		
B	NIST 1575a	NIST 1515	NIST 1547	NIST 1573a	NIST 1570a	-	-
	9,6 ± 0,2	27 ± 2	29 ± 2	33 ± 0,7	37,6 ± 1,0		
Fe	NIST 1575a	NIST 1515	IAEA 359	NIST 1547	NIST 1573a	-	
	46 ± 2	83 ± 5	148 ± 21	218 ± 14	368 ± 7		
Mn	IAEA 359	NIST 1515	NIES 3	NIST 1570a	NIST 1547	NIST 1573a	NIST 1575a
	31,9 ± 2,8	54 ± 3	69 ± 5	75,9 ± 1,9	98 ± 3	246 ± 8	488 ± 12
Zn	NIST 1515	NIST 1547	NIES 3	NIST 1573a	NIST 1575a	IAEA 359	NIST 1570a
	12,5 ± 0,3	17,9 ± 0,4	20,5 ± 1	30,9 ± 0,7	38 ± 2	38,6 ± 3,8	82 ± 3

4.4 Determinações dos elementos por ICP OES

As determinações de macro e micronutrientes nas amostras digeridas foram feitas com ICP OES com visão radial e nebulizador de fluxo cruzado em condições robustas de análise, conforme recomendado por Silva et al.⁸⁸ e Trevisan et al.⁸⁹ A Tabela 4.3 apresenta os parâmetros operacionais utilizados no ICP OES Optima 3000 DV.

Tabela 4.3 – Parâmetros operacionais do ICP OES Optima 3000 DV

Parâmetros operacionais	Valores	
Potência da radiofrequência (kW)	1,4	
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15,0	
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	0,5	
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,7	
Vazão da amostra (mL min ⁻¹)	1,0	
Altura de observação (mm)	15	
Diâmetro interno do canal central da tocha (mm)	2,0	
Tempo de integração (s)	1 - 5	
Número de replicatas	3	
Linhas de emissão (nm)	Ca II 317,933	Mg I 285,212
	P I 214,914	Al I 237,312
	B I 208,957	Cu I 327,396
	Fe II 259,939	Mn II 294,920
	Zn I 213,856	

4.5 Descontaminação dos materiais

O material plástico e a vidraria foram limpos com lavagem em água corrente, lavagem com água purificada por osmose reversa e imersão em banho 50 % v/v HNO₃ por 24 h. Posteriormente, esses materiais foram enxaguados com água de alta pureza. Os materiais foram secos em capela de fluxo laminar horizontal (Pachane, Piracicaba, Brasil).

Os materiais metálicos como as peças do moinho criogênico, a matriz da prensa hidráulica e as peneiras de aço inoxidável foram lavados com água proveniente de osmose reversa, sonicadas em solução 10 % v/v Extran MA02 neutro (Merck, Brasil), lavadas com água de alta pureza e, posteriormente, enxaguadas com álcool absoluto.

4.6 Tratamento dos dados

Para a correção dos sinais de emissão de fundo (background), os sinais médios de emissão obtidos em regiões espectrais independentes localizadas nas vizinhanças das linhas de emissão dos analitos (BG1 e BG2, Figura 4.4) foram subtraídos da intensidade máxima de cada linha de emissão (IE), conforme recomendado^{5, 36} e ilustrado para a linha de Fe II 275,573 nm .

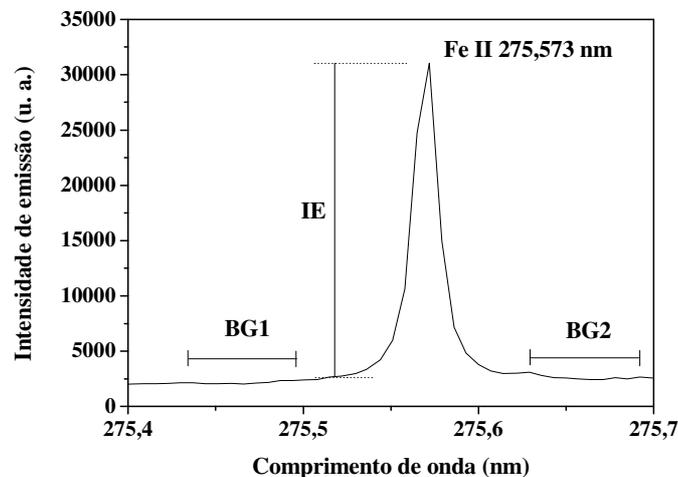


Figura 4.4 – Fragmento do espectro mostrando a linha iônica de emissão do Fe a 275,573 nm

Nesta dissertação, os dados basearam-se em medidas de área integrada dos picos das linhas de emissão. Os dados apresentados referem-se à média de 30 espectros obtidos, independentemente, pela ablação de 30 pontos diferentes na superfície das pastilhas incidindo-se 20 pulsos consecutivos por ponto. Neste sentido, os coeficientes de variação apresentados são relativos a 30 observações. Deve-se ressaltar que resultados anômalos

(*outliers*) foram identificados pelo teste de Grubbs, ao nível de 95 % de confiança,⁹⁰ e descartados.

Os valores de limite de detecção (*LOD*) foram estimados utilizando a Equação 4:⁹¹

$$LOD = \frac{s_{ruído} * k}{\alpha} \quad (\text{Equação 4})$$

onde:

$s_{ruído}$ = desvio-padrão da intensidade de emissão do ruído. Este valor foi calculado com base na intensidade de emissão de regiões espectrais independentes, localizadas nas vizinhanças das linhas de emissão (BG1 e BG2, Figura 4.4) do CRM com a menor concentração do analito, conforme recomendado.⁷

$k = 3,3$

α = coeficiente angular da função de calibração

As concentrações dos elementos nas diferentes frações de tamanho das partículas das amostras de boldo-do-Chile foram comparadas aplicando-se o teste t de *Student*, ao nível de 95 % de confiança. Do mesmo modo, a comparação dos resultados obtidos nas análises dos CRMs por ICP OES com os valores certificados foi feita com o teste t de *Student*, ao nível de 95 % de confiança.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito da fluência e do diâmetro de focalização do laser nos sinais de emissão

Os efeitos da fluência e do diâmetro de focalização do laser nos sinais de emissão obtidos por LIBS foram avaliados analisando-se pastilhas de folhas de boldo-do-Chile. Como foi comentado anteriormente, para o preparo das pastilhas é recomendável a cominuição apropriada do material, se possível em um tempo relativamente curto, para homogeneizar o material antes da prensagem. No caso das folhas de boldo, que haviam sido previamente moídas em moinho de faca, a moagem criogênica deste material durante 10 min proporcionou uma distribuição do tamanho das partículas adequada (Figura 5.1) para os testes preliminares, com 90 % das partículas menores que 52 μm e mediana de 10 μm . A análise da porosidade da pastilha indicou que 80 % dos poros apresentaram diâmetros variando de 0,22 a 1,75 μm (diâmetro médio de 0,79 μm). Nestas condições, a densidade da pastilha foi de 1,30 g cm^{-3} . Observou-se que as pastilhas apresentaram coesão e resistência mecânica apropriadas para serem analisadas por ablação com laser, mesmo na ausência de agentes aglutinantes, ou seja, o processo de ablação não provocou rachaduras e danos visíveis nas regiões vizinhas das crateras.

Em LIBS, a distância lente-amostra (LTSD) pode modificar o diâmetro de focalização do laser (*spot size*) e, conseqüentemente, a fluência, promovendo alterações na massa removida, no volume do plasma e, conseqüentemente, na intensidade das linhas de emissão.^{59, 92, 93} Geralmente, as análises por LIBS são realizadas incidindo-se os pulsos de laser sobre a superfície da amostra posicionada no ponto focal da lente convergente, ou próximo, i.e. no parâmetro confocal. Quando se trabalha muito próximo do foco, a configuração óptica pode propiciar pequenos diâmetros de focalização, da ordem de 20 a 100 μm , sobre a superfície da amostra. No entanto, essa estratégia pode resultar em ablação de pequenas massas (*e.g.* < 20 μg) e, conseqüentemente, pode comprometer a repetibilidade das medidas quando amostras pouco homogêneas são analisadas.³⁶ As Figuras 5.2 a 5.6 mostram as intensidades das linhas de emissão selecionadas para determinação de Al, B, Cu, Fe, Mg, Mn, P e Zn em função da fluência, para diâmetros de focalização de 180 a 1050 μm .

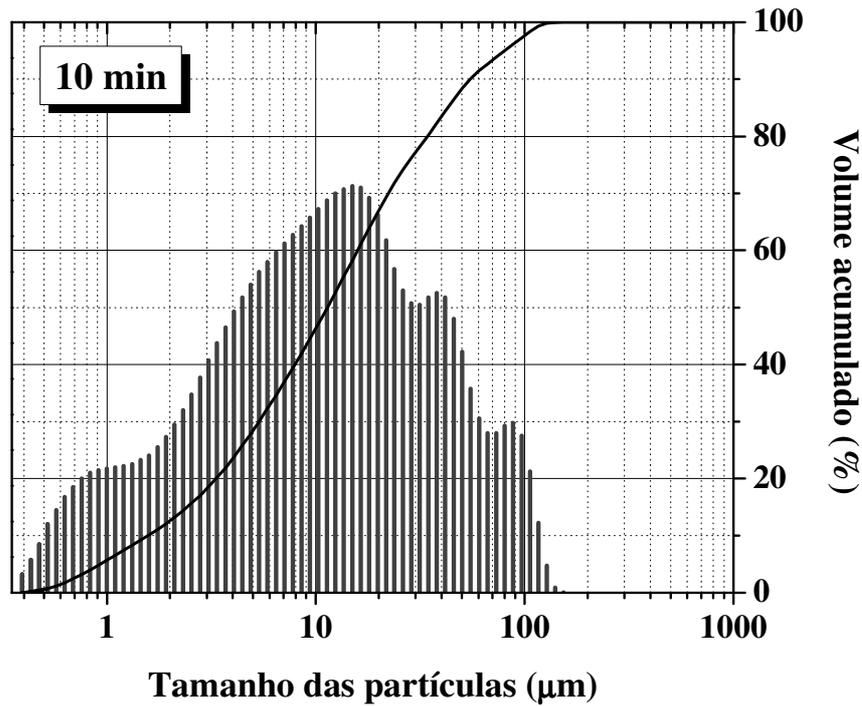


Figura 5.1 - Distribuição do tamanho das partículas de amostra de folhas de boldo-do-Chile após moagem criogênica por 10 min (5 ciclos de 2 min)

Os resultados mostram que as intensidades das linhas de emissão aumentam com o aumento da fluência e com o diâmetro de focalização do laser. Na maioria dos casos, máxima intensidade de emissão foi observada quando fluências entre 35 e 60 J cm⁻² e diâmetros de focalização entre 600 e 1050 µm foram utilizados (Figuras 5.2 a 5.6). O aumento das intensidades de emissão é devido ao aumento da eficiência de ablação e do número de átomos vaporizados no interior do plasma. De acordo com Aguilera et al.,⁹⁴ o volume dos plasmas induzidos por laser depende linearmente da fluência do laser.

Na presente dissertação, observou-se que o aumento da fluência resultou em maior absorção de energia, produzindo um aumento no volume do plasma e na emissão (i.e. quando o plasma ainda está opticamente transparente), mesmo para diâmetros de focalização menores. O aumento no volume do plasma foi constatado por inspeção visual. Além disso, a atomização e excitação das espécies vaporizadas e, conseqüentemente, a intensidade das linhas de emissão dos elementos presentes no espectro são dependentes da temperatura do plasma que aumenta quando fluências maiores são usadas. Assim, a fluência pode trazer benefícios significativos para a sensibilidade analítica.⁶¹

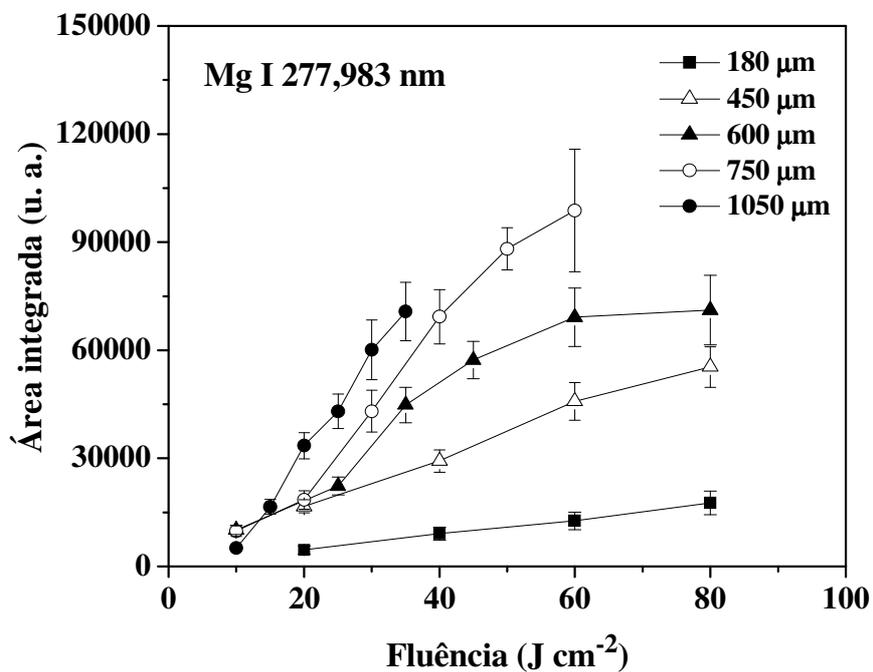
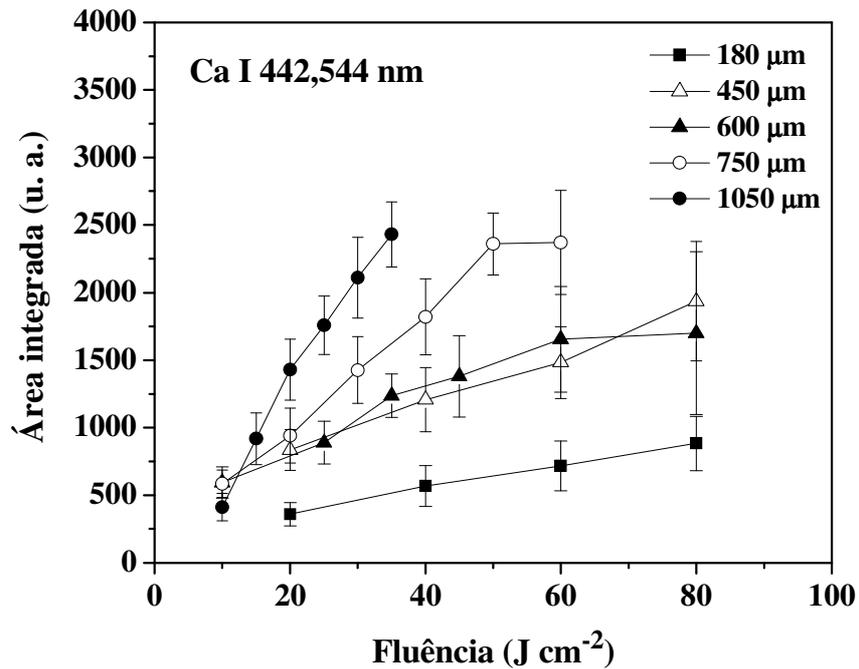


Figura 5.2 - Efeito da fluência na intensidade de emissão de Ca I 442,544 nm e Mg I 277,983 nm para diâmetros de focalização entre 180 e 1050 μm . Pastilha de boldo, 20 pulsos, 10Hz. Frações de massa: $11,7 \pm 0,1 \text{ g kg}^{-1}$ Ca e $2,1 \pm 0,1 \text{ g kg}^{-1}$ Mg. As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão ($n = 30$ crateras, 20 pulsos/cratera)

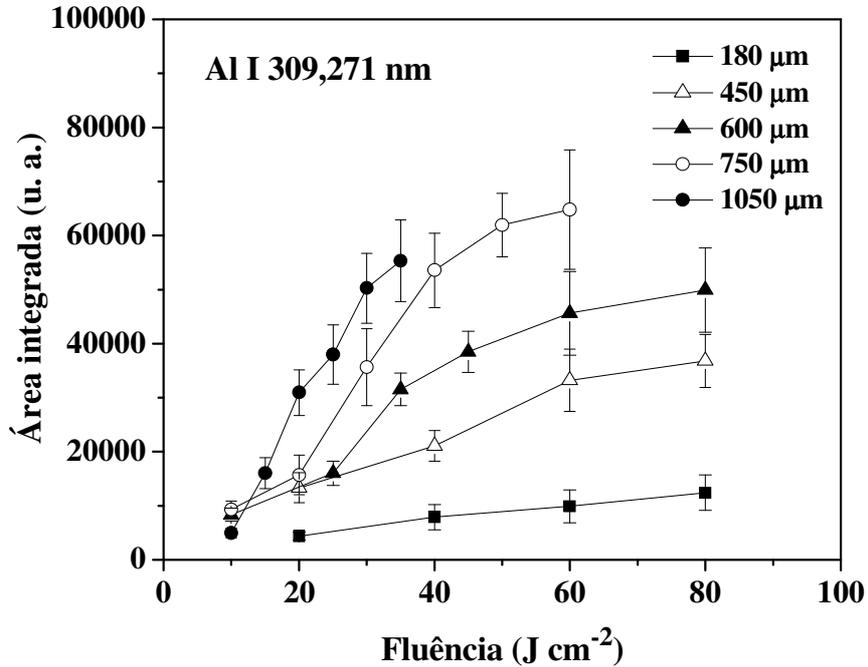
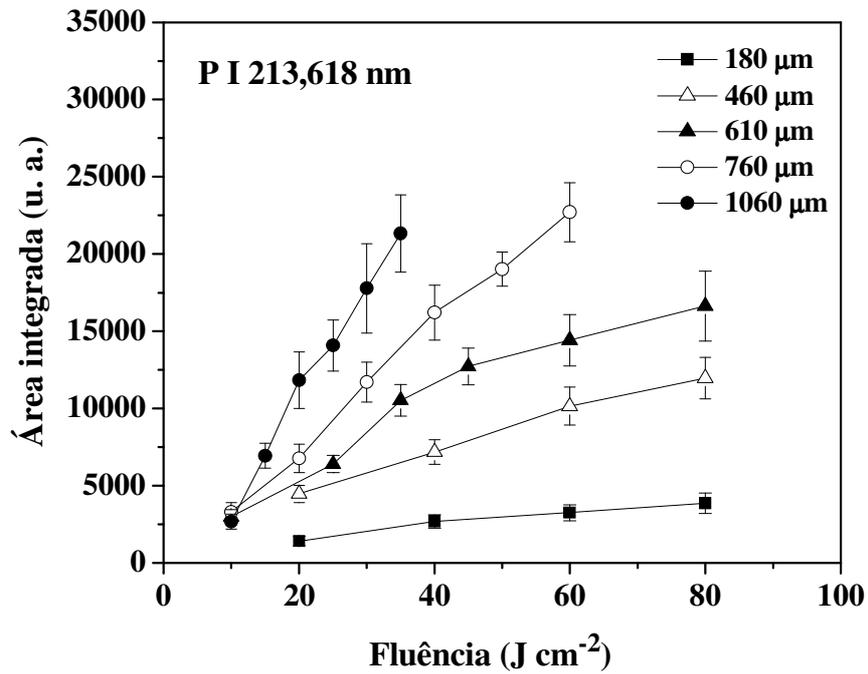


Figura 5.3 - Efeito da fluência na intensidade de emissão de P I 213,618 nm e Al I 309,271 nm para diâmetros de focalização entre 180 e 1050 μm . Pastilha de boldo, 20 pulsos, 10Hz. Frações de massa: $1,4 \pm 0,1\ g\ kg^{-1}$ P e $664 \pm 19\ mg\ kg^{-1}$ Al. As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão ($n = 30$ crateras, 20 pulsos/cratera)

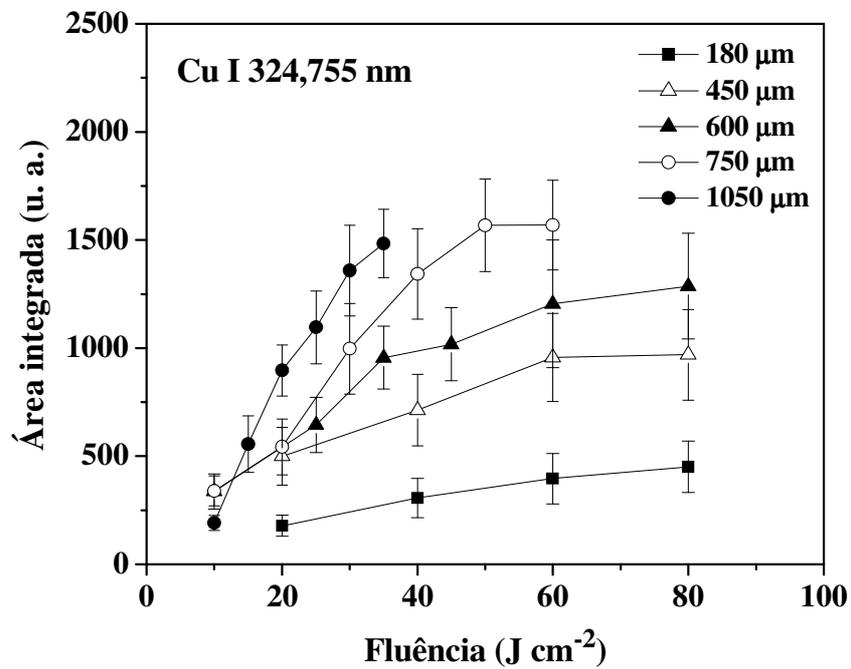
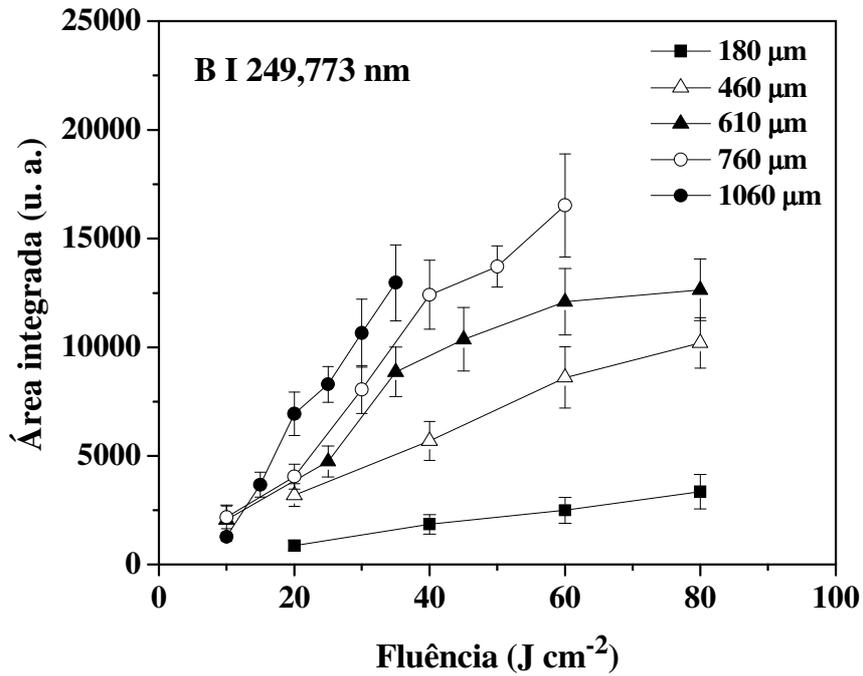


Figura 5.4 - Efeito da fluência na intensidade de emissão de B I 249,773 nm e Cu I 324,755 nm para diâmetros de focalização entre 180 e 1050 μm . Pastilha de boldo, 20 pulsos, 10Hz. Frações de massa: $16,1 \pm 0,60 \text{ mg kg}^{-1}$ B e $5,26 \pm 0,14 \text{ mg kg}^{-1}$ Cu. As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão ($n = 30$ crateras, 20 pulsos/cratera)

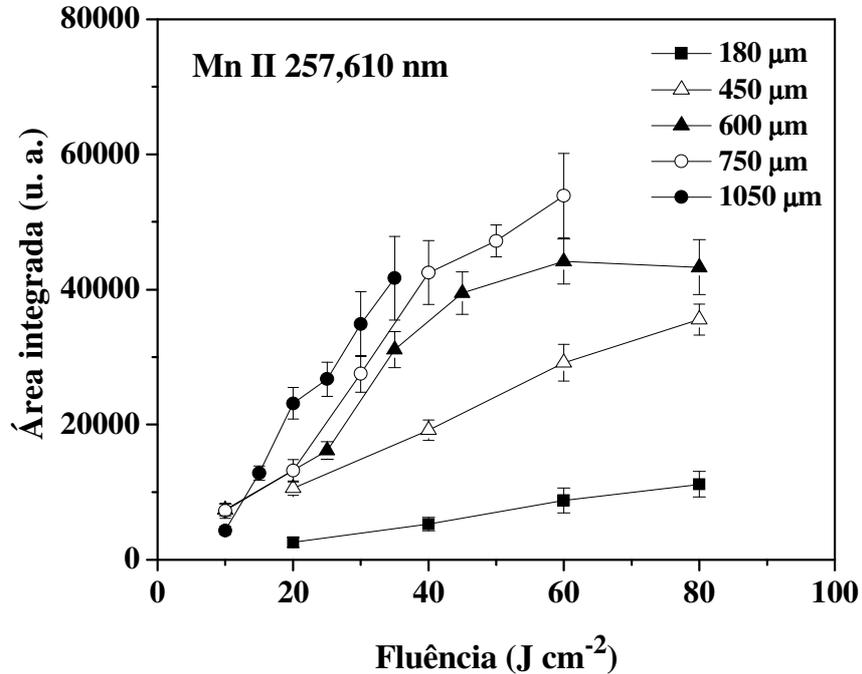
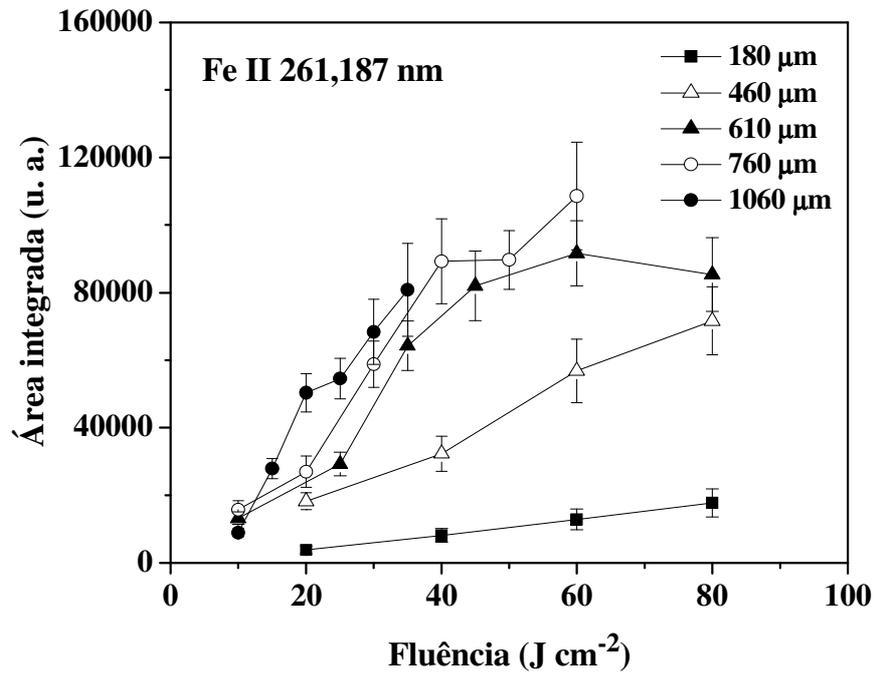


Figura 5.5 - Efeito da fluência na intensidade de emissão de Fe II 261,187 nm e Mn II 257,610 nm para diâmetros de focalização entre 180 e 1050 μm. Pastilha de boldo, 20 pulsos, 10Hz. Frações de massa: $599 \pm 20 \text{ mg kg}^{-1}$ Fe e $81,8 \pm 1,3 \text{ mg kg}^{-1}$ Mn. As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão ($n = 30$ crateras, 20 pulsos/cratera)

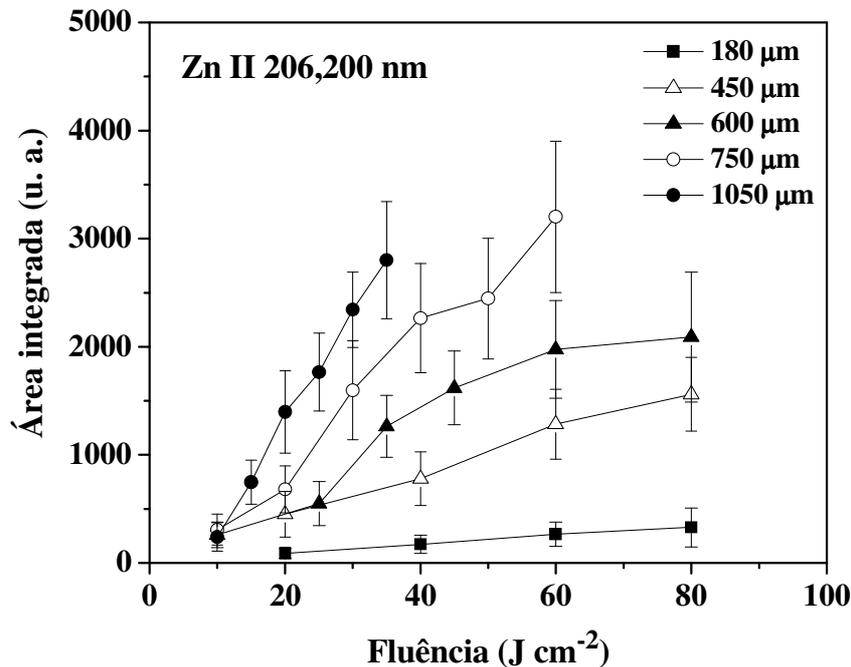


Figura 5.6 - Efeito da fluência na intensidade de emissão de Zn II 206,200 nm para diâmetros de focalização entre 180 e 1050 μm. Pastilha de boldo, 20 pulsos, 10Hz. Frações de massa: $13,7 \pm 0,1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Zn}$. As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão ($n = 30$ crateras, 20 pulsos/cratera)

De um modo geral, observa-se pelo exame da intensidade dos sinais de emissão uma melhor eficiência de transferência de energia do laser quando diâmetros de focalização entre 750 e 1050 μm foram empregados. Para fluências de até 20 J cm^{-2} existe uma vantagem significativa com diâmetros de focalização maiores, o que indica que existe uma relação entre a fluência, massa atomizada e volume de observação do plasma. Cabe destacar que este experimento foi possível, uma vez que com o laser Brilliant utilizado a energia pode ser variada entre 5 e 310 mJ/pulso. Para lasers de menor energia, abaixo de 50 mJ/pulso, por exemplo, o maior diâmetro de focalização possível para se obter fluência mínima de 20 J cm^{-2} é de, aproximadamente, 450 μm.

As Figuras 5.2 a 5.6 mostram que, em alguns casos, para fluências maiores que 40 J cm^{-2} houve uma mudança na proporcionalidade entre a fluência aplicada e as intensidades dos sinais de emissão. Parte da redução da linearidade pode ser devida ao efeito de blindagem, ao alargamento das linhas por efeito Stark e aos processos de auto-absorção.^{55, 95, 96} A blindagem do plasma (*shielding effect*) é provocada pela elevada densidade eletrônica

(i.e. $10^{21} \text{ e}^- \text{ cm}^{-3}$).⁵⁴ Além disso, a alta densidade de átomos e íons no plasma pode resultar em um plasma opticamente opaco.^{55, 97} Esses fenômenos resultam em absorção e/ou espalhamento parcial da radiação do pulso do laser impedindo-o de atingir com total energia a superfície da amostra. Isso reduz a taxa de ablação e, conseqüentemente, as intensidades de emissão.^{55, 94} O efeito de blindagem foi aparentemente mais pronunciado para fluências maiores que 60 J cm^{-2} . Em alguns casos (Figuras 5.2 a 5.6) observa-se um moderado incremento dos sinais de emissão após 60 J cm^{-2} , o que pode ser devido ao aumento da temperatura do plasma.^{54, 55} De acordo com Meissner et al.,⁹⁸ a temperatura do plasma induzido por laser sobre superfícies metálicas aumenta linearmente com a fluência.

A remoção de massa pela ablação com laser foi estimada considerando-se a densidade da pastilha e o volume da cratera. Este volume pode ser determinado a partir de dados obtidos por perfilometria. A Figura 5.7 mostra uma imagem obtida em uma cratera formada na superfície de uma pastilha de boldo. O volume da cratera formada, após 20 pulsos consecutivos do laser (228 mJ/pulso) com taxa de repetição de 10 Hz e diâmetro de focalização de $750 \mu\text{m}$ (i.e. 50 J cm^{-2}), foi estimado em $0,18 \text{ mm}^3$.

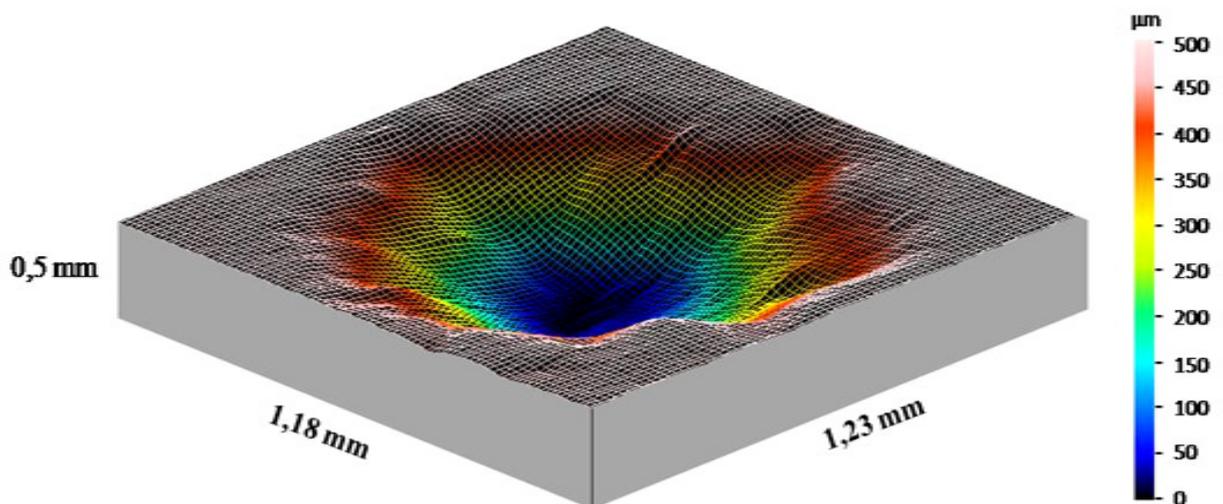


Figura 5.7 – Perfilometria de uma cratera produzida por ablação com laser em pastilha de boldo-do-Chile com 20 pulsos de 228 mJ e diâmetro de focalização de $750 \mu\text{m}$

A Figura 5.8 mostra a variação da massa de material ablado na pastilha de boldo em função da área de focalização do laser, mantendo-se a fluência constante (60 J cm^{-2}). Como esperado, observou-se que o aumento do diâmetro de focalização promove uma remoção de massa que é proporcional à área de focalização correspondente. Essa estratégia pode minimizar as dificuldades encontradas nas análises de amostras pouco homogêneas por LIBS, e uma redução significativa do CV das medidas foi observada em outros trabalhos utilizando essa estratégia.^{7, 8, 36, 49, 65}

A Figura 5.9 mostra a relação entre a massa removida e a fluência do laser, mantendo-se constante o diâmetro de focalização em $750 \mu\text{m}$. Como esperado, observou-se que quanto maior a fluência do laser maior a massa removida da cratera.

5.2 Efeito da fluência e do diâmetro de focalização do laser na precisão das medidas

Precisão é um termo amplo que inclui repetibilidade e reprodutibilidade. Neste trabalho, a repetibilidade foi relacionada à variabilidade encontrada entre os diferentes pontos de ablação ao longo da superfície da pastilha (i.e. site-to-site). Assim, as incertezas relacionadas às flutuações do laser, eventualmente observadas em determinações pulso a pulso (shot-to-shot),⁹⁹ puderam ser minimizadas pois as medidas de emissão foram feitas acumulando-se os espectros de 20 pulsos consecutivos do laser. Em todos os experimentos os coeficientes de variação da energia do laser foram sempre menores que 3 % .

Neste sentido, foram avaliados os efeitos do diâmetro de focalização do laser (i.e. spot size) na repetibilidade das medidas ($n = 30$ sites). Observaram-se reduções significativas dos coeficientes de variação (site-to-site CV) das medidas, para todos os analitos, quando diâmetros maiores foram utilizados. Esta melhoria foi associada, principalmente, à maior representatividade da microamostragem durante a ablação, uma vez que massas maiores foram removidas utilizando-se maiores diâmetros de focalização do laser (Figura 5.8). Mantendo-se a fluência constante em 60 J cm^{-2} , observou-se maior sensibilidade e maior razão sinal-ruído (SNR) com diâmetros de 600 e $750 \mu\text{m}$ de focalização. Apesar de os resultados terem sido equivalentes nessas duas condições, selecionou-se $750 \mu\text{m}$ por proporcionar maiores SNR e menores CV para as determinações de Cu, elemento presente em menor concentração na amostra.

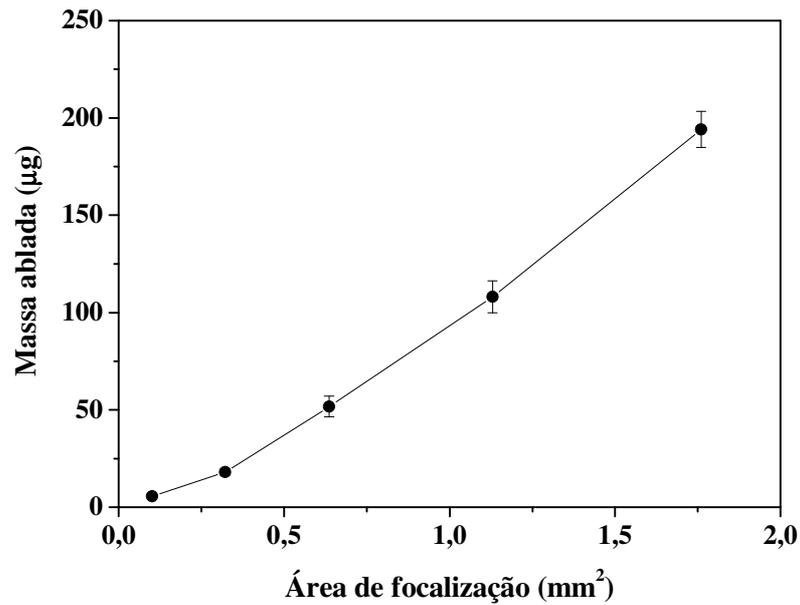


Figura 5.8 - Massa ablada em função da área de focalização do laser: 0,10; 0,32; 0,64; 1,13 e 1,76 mm² correspondentes aos diâmetros de 180, 320, 450, 600 e 750 µm, respectivamente. Dados obtidos após 20 pulsos do laser, 10 Hz, a 60 J cm⁻². As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 3 crateras)

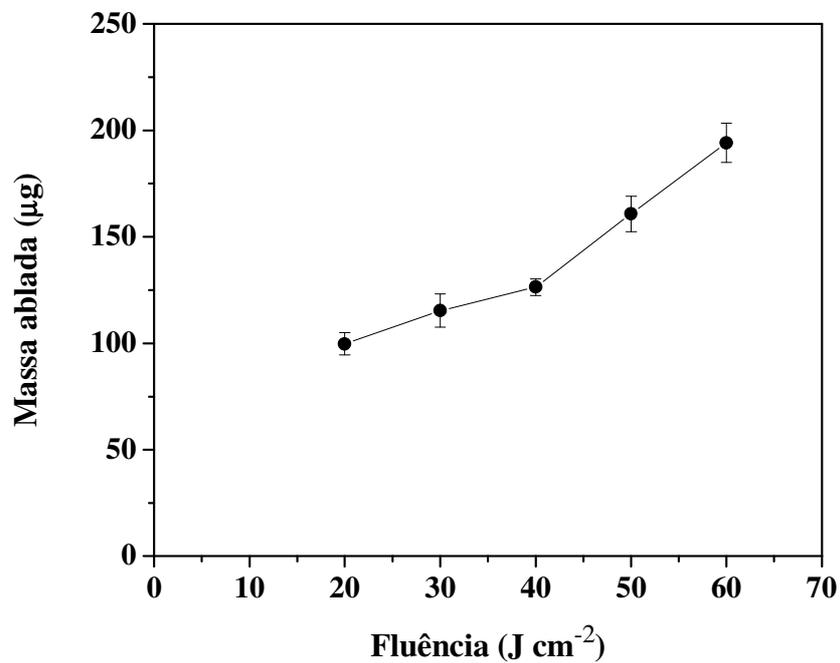


Figura 5.9 – Massa ablada em função da fluência do laser (J cm⁻²). Dados obtidos com diâmetro de focalização de 750 µm e 20 pulsos de laser (10Hz). As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 3 crateras)

Mantendo-se constante o diâmetro de focalização do laser em 750 μm , observou-se que, de maneira geral, o CV das medidas melhorou 2 vezes quando se aumentou a fluência de 20 para 50 J cm^{-2} (Figuras 5.10 a 5.18). Esses resultados podem ser atribuídos ao aumento da massa removida (i.e. da porção analisada) em fluências maiores (Figura 5.9). Considerando-se a densidade da pastilha e os dados obtidos por perfilometria, a massa removida foi de 100 ± 5 e $161 \pm 8 \mu\text{g}$ ($n = 3$ crateras), aplicando-se 20 pulsos com 20 e 50 J cm^{-2} , respectivamente. Neste sentido, pode-se inferir que o aumento da fluência pode melhorar a representatividade dos processos de amostragem assistidos por ablação com laser. Estes resultados estão de acordo com a previsão de que, quanto maior a massa da porção amostrada menor é o CV das medidas.^{100, 101} Embora o uso de 60 J cm^{-2} tenha promovido uma ablação de massa maior que 50 J cm^{-2} (Figura 5.9), não foram observadas melhorias na precisão das medidas. Para 60 J cm^{-2} os CVs foram predominantemente maiores que 20 % e podem ser atribuídos a um maior efeito de blindagem do plasma como sugerido por Aguilera et al.⁹⁴

A presença de resultados anômalos (*outliers*) nas Figuras 5.10 a 5.18 foi avaliada com o teste de Grubbs ao nível de 95 % de confiança.⁹⁰ Considerando-se os 30 pontos amostrados, nenhum resultado anômalo foi identificado nas determinações de Mg, P, Al, Cu, Fe, Mn e Zn. Apenas 2 resultados anômalos foram identificados nas determinações de B (Figura 5.14). O CV das determinações de B foi corrigido de 23,3 para 6,8 % quando estes dados foram descartados. Segundo Mermet et al.,⁹⁹ a presença de resultados anômalos em LIBS pode estar relacionado, em alguns casos, às diferenças na interação entre o laser e a amostra como por exemplo a presença de poeira ou defeito físico na superfície da amostra, o que é altamente improvável no presente caso. Cabe observar, que este fato não foi observado quando outras pastilhas de boldo e de CRMs foram analisadas, o que confirma a previsão do teste de Grubbs.

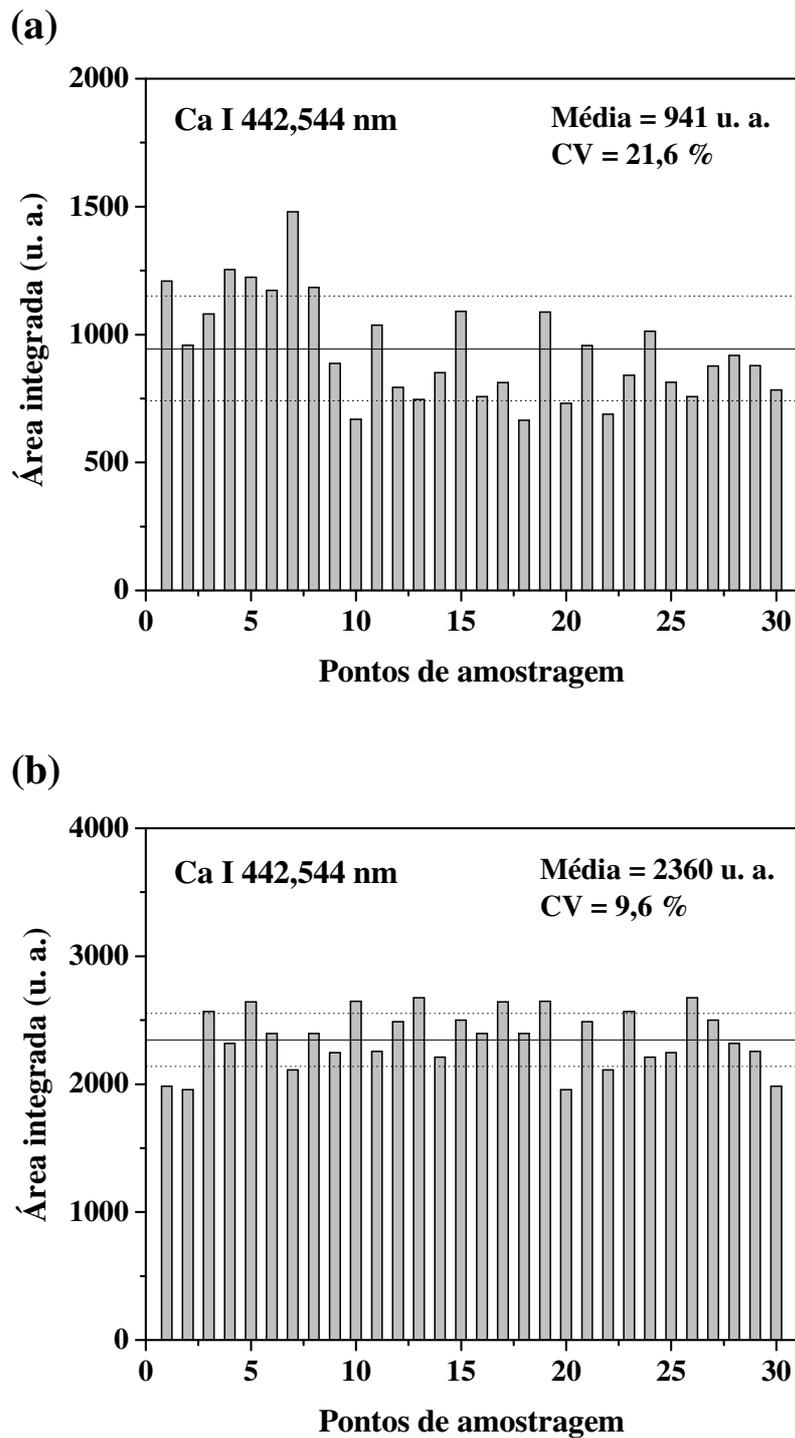


Figura 5.10 – Variação dos sinais de intensidade de emissão de Ca I 442,544 nm em 30 pontos de amostragem (20 pulsos por cratera) na superfície de uma pastilha de boldo-do-Chile: (a) 20 J cm^{-2} e (b) 50 J cm^{-2} . A linha contínua corresponde à média das medidas e as linhas pontilhadas a ± 1 desvio-padrão ($n=30$ crateras). Fração de massa: $11,7 \pm 0,1 \text{ g kg}^{-1}$ Ca

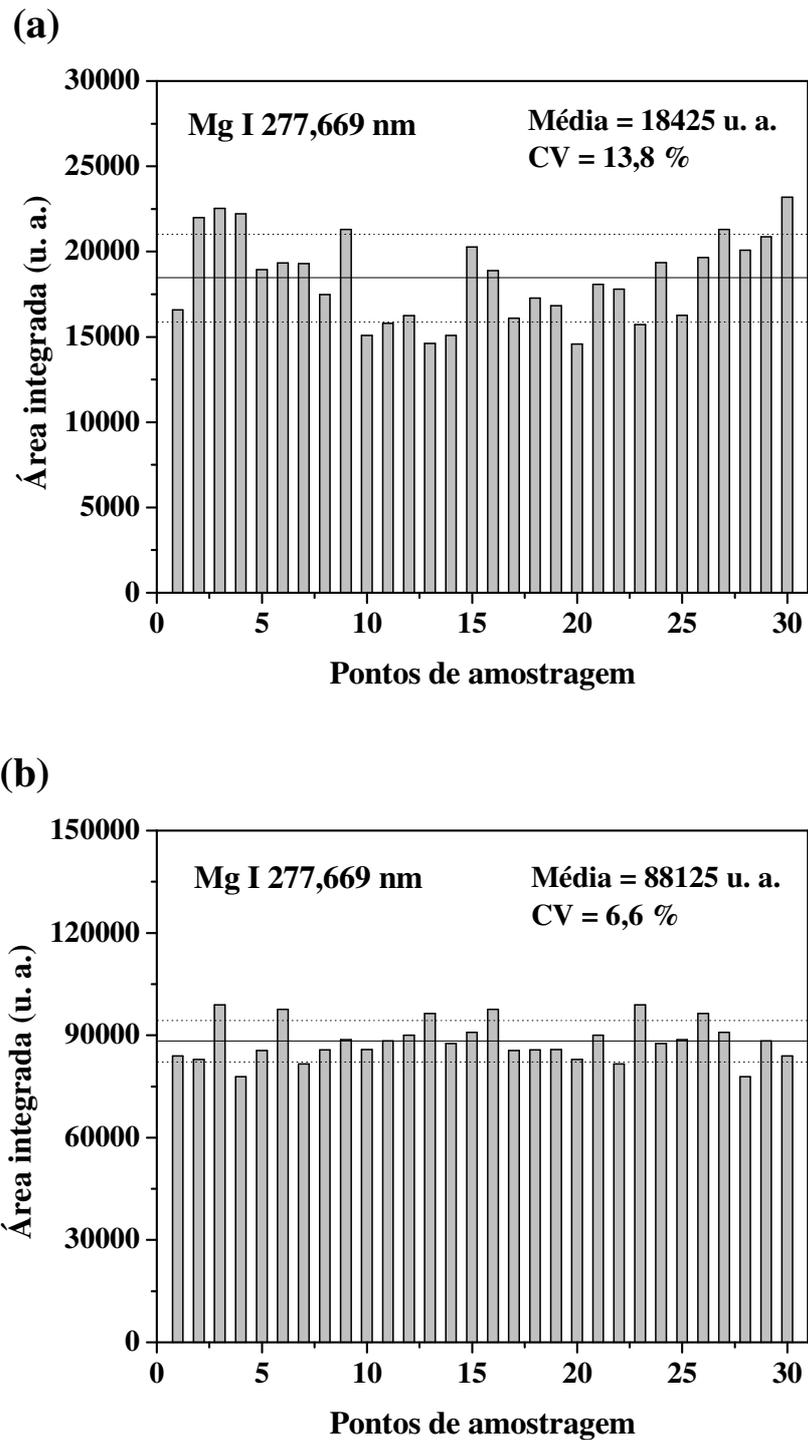


Figura 5.11 – Variação dos sinais de intensidade de emissão de Mg I 277,669 nm em 30 pontos de amostragem (20 pulsos por cratera) na superfície de uma pastilha de boldo-do-Chile: (a) 20 J cm^{-2} e (b) 50 J cm^{-2} . A linha contínua corresponde à média das medidas e as linhas pontilhadas a ± 1 desvio-padrão ($n=30$ crateras). Fração de massa: $2,1 \pm 0,1 \text{ g kg}^{-1} \text{ Mg}$

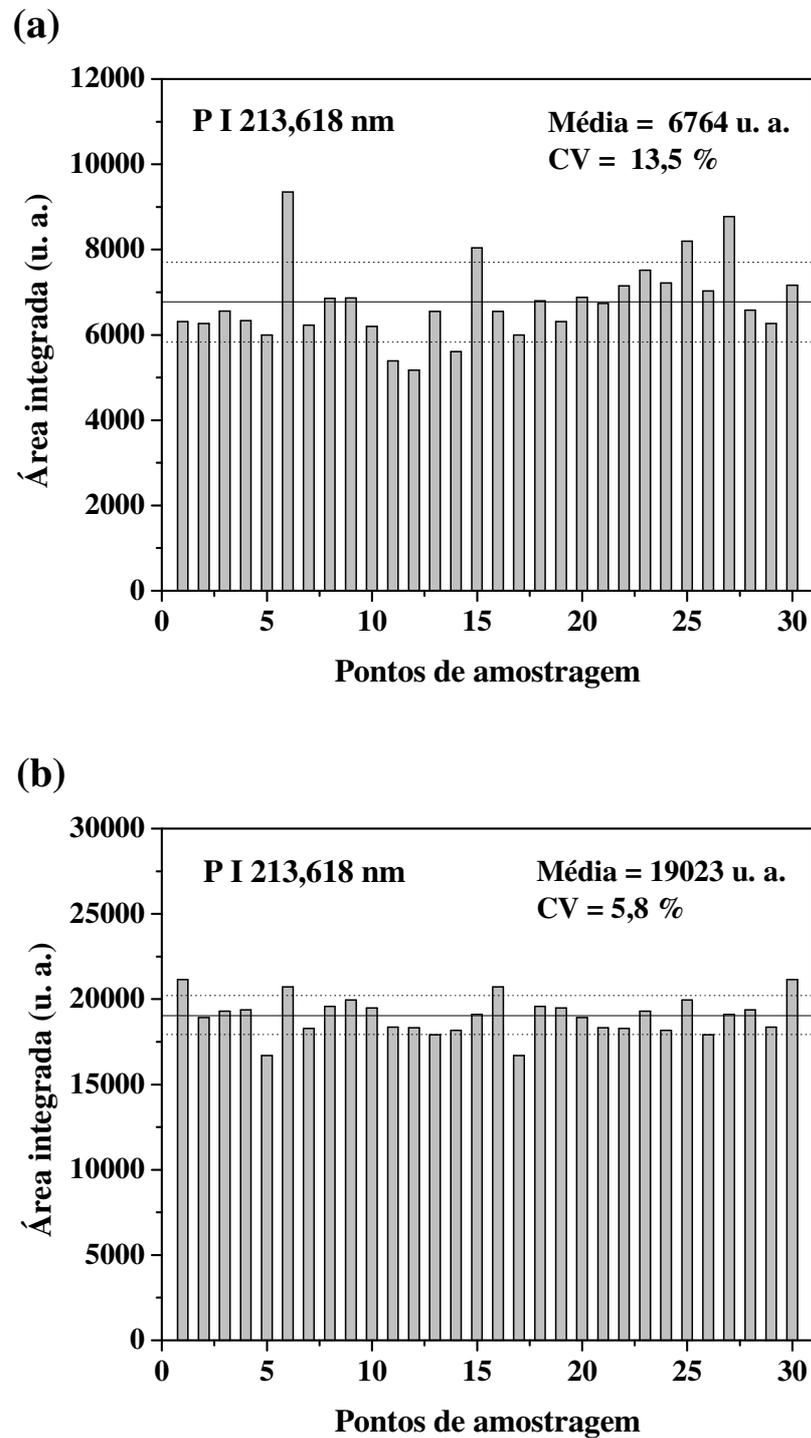


Figura 5.12 – Variação dos sinais de intensidade de emissão de PI 213,618 nm em 30 pontos de amostragem (20 pulsos por cratera) na superfície de uma pastilha de boldo-do-Chile: (a) 20 J cm⁻² e (b) 50 J cm⁻². A linha contínua corresponde à média das medidas e as linhas pontilhadas a ± 1 desvio-padrão (n=30 crateras). Fração de massa: 1,4 \pm 0,1 g kg⁻¹ P

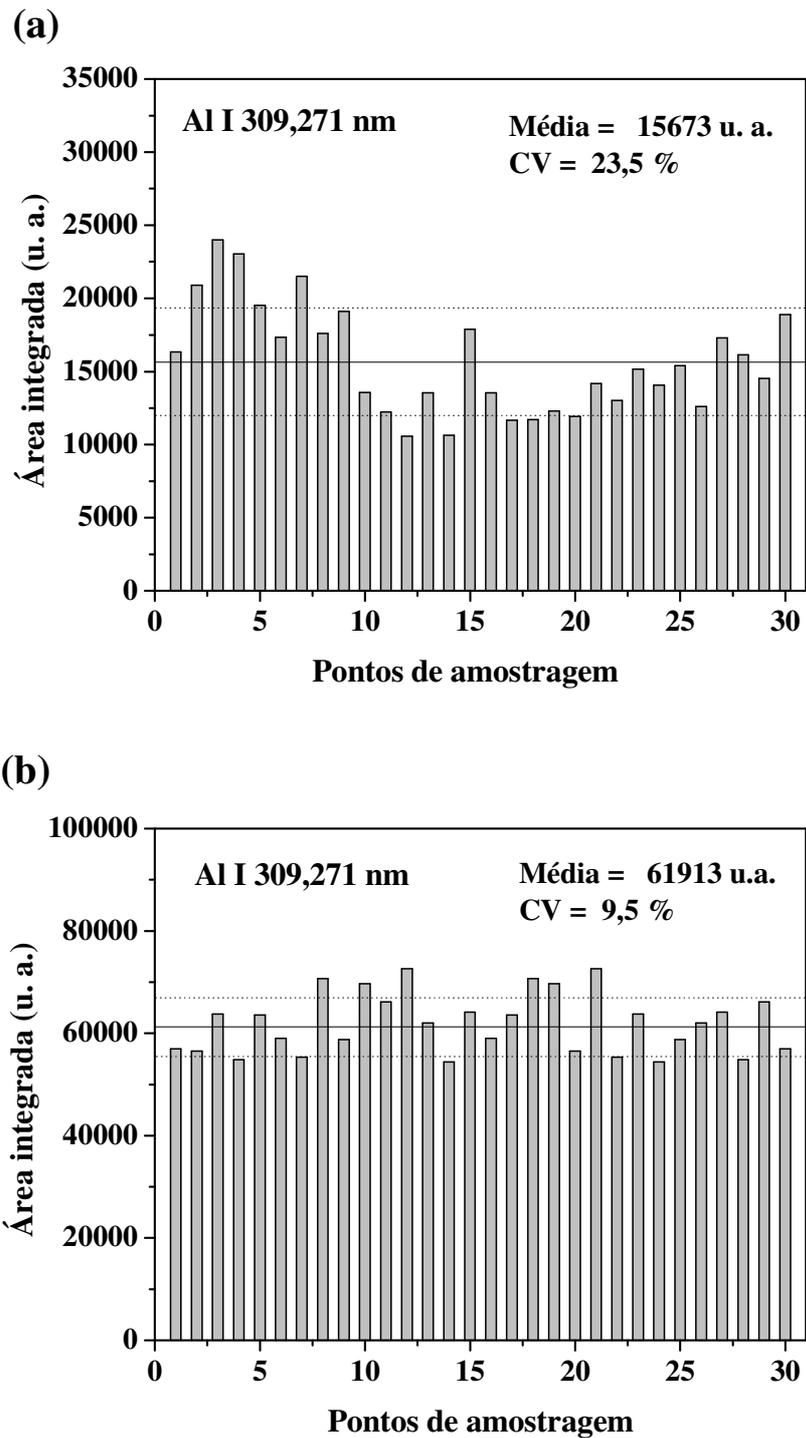


Figura 5.13 – Variação dos sinais de intensidade de emissão de Al I 309,271 nm em 30 pontos de amostragem (20 pulsos por cratera) na superfície de uma pastilha de boldo-do-Chile: (a) 20 J cm^{-2} e (b) 50 J cm^{-2} . A linha contínua corresponde à média das medidas e as linhas pontilhadas a ± 1 desvio-padrão ($n=30$ crateras). Fração de massa: $664 \pm 19 \text{ mg kg}^{-1}$ Al

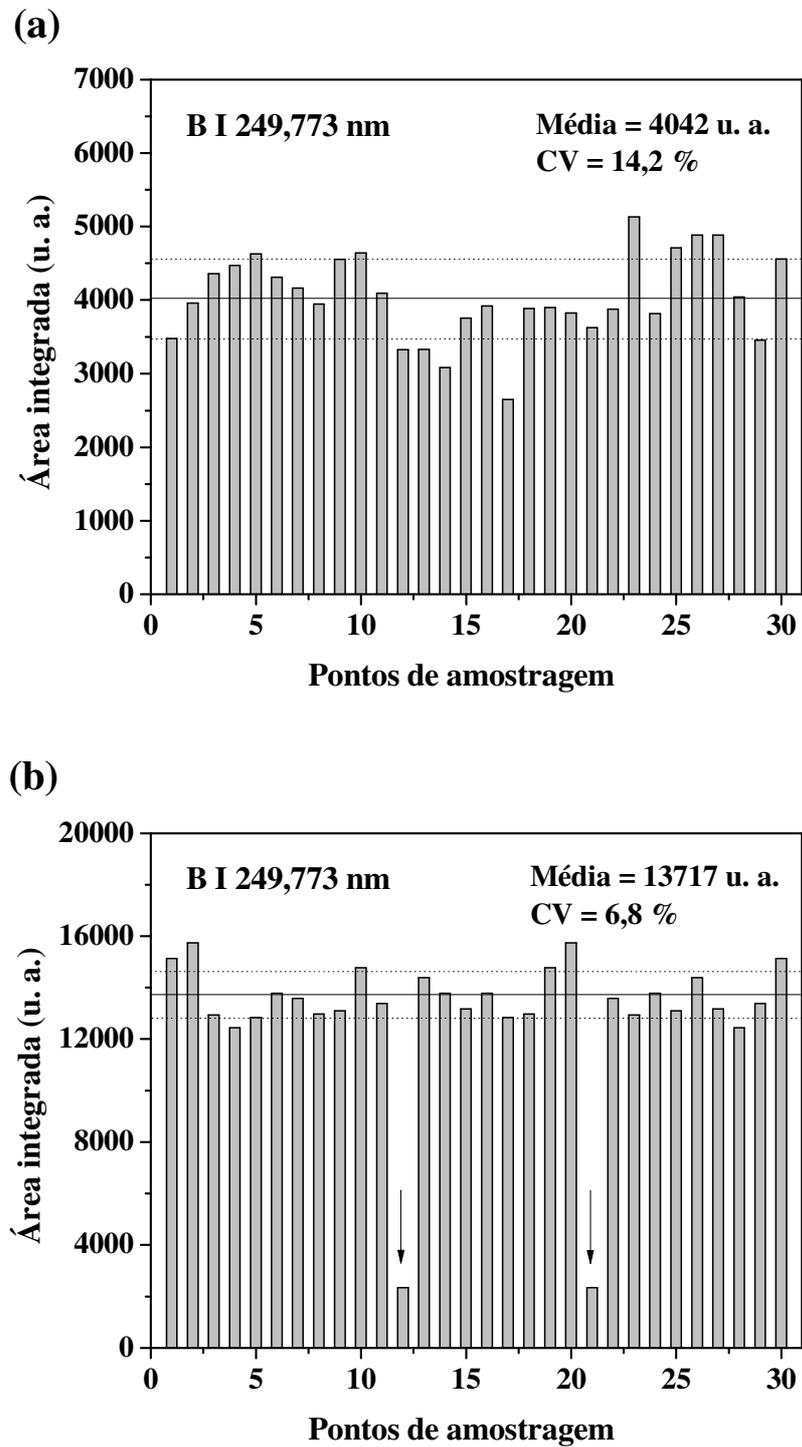


Figura 5.14 – Variação dos sinais de intensidade de emissão de B I 249,773 nm em 30 pontos de amostragem (20 pulsos por cratera) na superfície de uma pastilha de boldo-do-Chile: (a) 20 J cm^{-2} e (b) 50 J cm^{-2} . A linha contínua corresponde à média das medidas e as linhas pontilhadas a ± 1 desvio-padrão ($n=30$ crateras). As setas indicam resultados anômalos (com 95 % de confiança). Fração de massa: $16,1 \pm 0,60 \text{ mg kg}^{-1} \text{ B}$

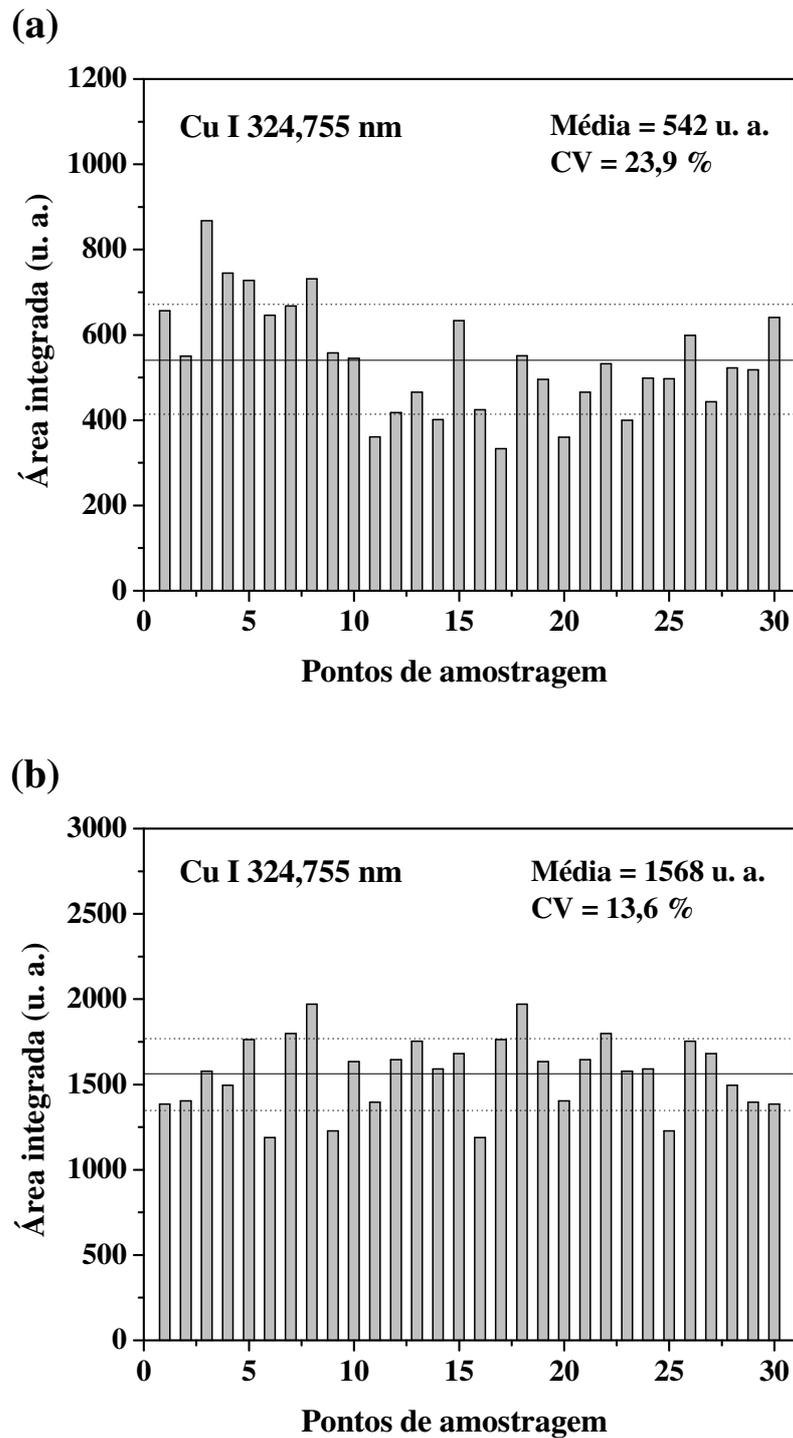


Figura 5.15 – Variação dos sinais de intensidade de emissão de Cu I 324,755 nm em 30 pontos de amostragem (20 pulsos por cratera) na superfície de uma pastilha de boldo-do-Chile: (a) 20 J cm^{-2} e (b) 50 J cm^{-2} . A linha contínua corresponde à média das medidas e as linhas pontilhadas a ± 1 desvio-padrão ($n=30$ crateras). Fração de massa: $5,26 \pm 0,14 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Cu}$

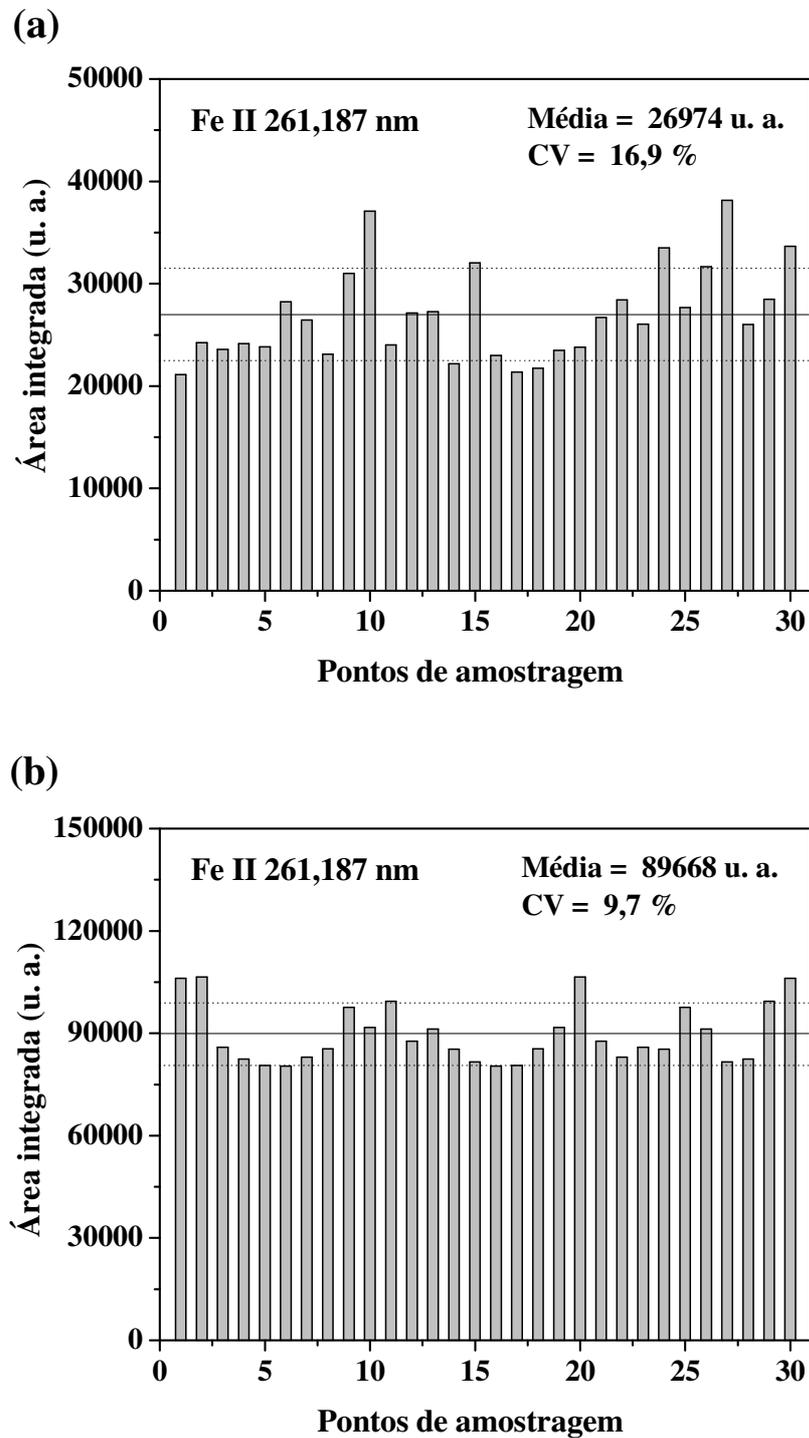


Figura 5.16 – Variação dos sinais de intensidade de emissão de Fe II 261,187 nm em 30 pontos de amostragem (20 pulsos por cratera) na superfície de uma pastilha de boldo-do-Chile: (a) 20 J cm^{-2} e (b) 50 J cm^{-2} . A linha contínua corresponde à média das medidas e as linhas pontilhadas a ± 1 desvio-padrão ($n=30$ crateras). Fração de massa: $599 \pm 20 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Fe}$

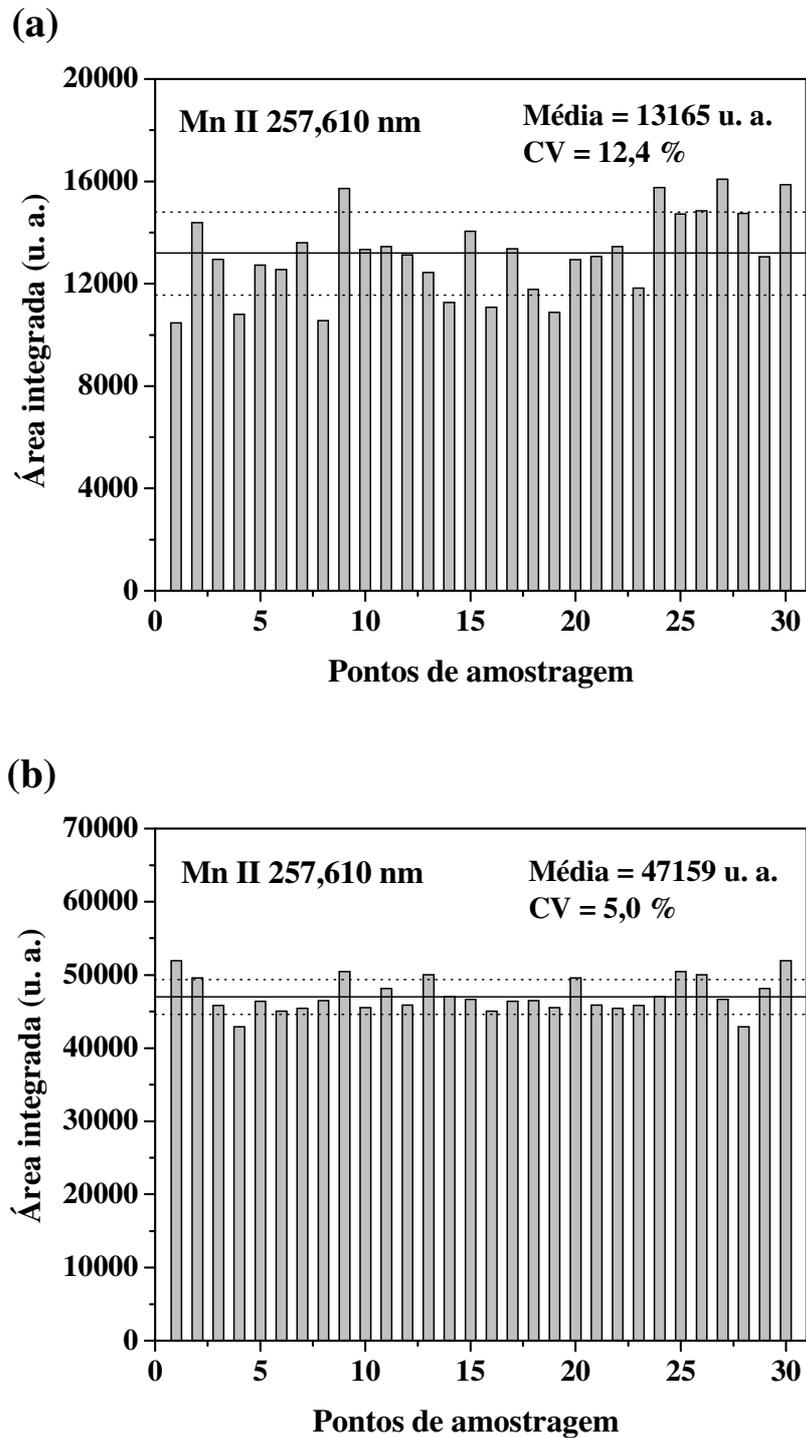


Figura 5.17 – Variação dos sinais de intensidade de emissão de Mn II 257,610 nm em 30 pontos de amostragem (20 pulsos por cratera) na superfície de uma pastilha de boldo-do-Chile: (a) 20 J cm^{-2} e (b) 50 J cm^{-2} . A linha contínua corresponde à média das medidas e as linhas pontilhadas a ± 1 desvio-padrão ($n=30$ crateras). Fração de massa: $81,8 \pm 1,3 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Mn}$

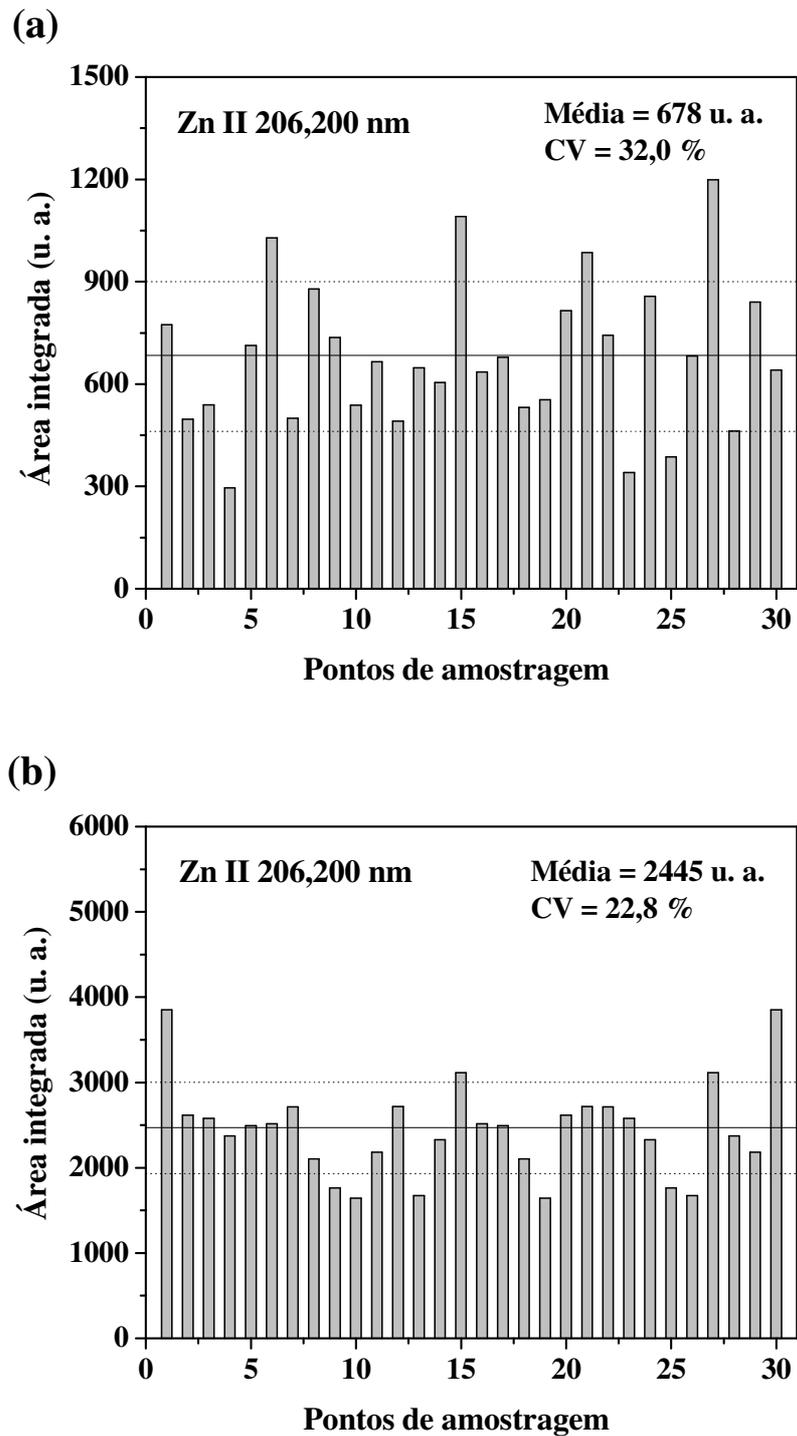


Figura 5.18 – Variação dos sinais de intensidade de emissão de Zn II 206,200 nm em 30 pontos de amostragem (20 pulsos por cratera) na superfície de uma pastilha de boldo-do-Chile: (a) 20 J cm^{-2} e (b) 50 J cm^{-2} . A linha contínua corresponde à média das medidas e as linhas pontilhadas a ± 1 desvio-padrão ($n=30$ crateras). Fração de massa: $13,7 \pm 0,1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Zn}$

De um modo geral, observou-se que a condição experimental com diâmetro de focalização de 750 μm e 50 J cm^{-2} resultou em linhas de emissão mais intensas e proporcionou CVs menores que 10 % para a maioria dos analitos, exceto para Cu e Zn com 13,6 e 22,8 %, respectivamente. No caso do Zn, cabe ressaltar que o CV das medidas feitas nas pastilhas de boldo (Figura 5.18) foi muito maior do que os geralmente observados para as outras amostras e não reflete, em princípio, a qualidade das medidas feitas por LIBS. Neste caso, a maior variância pode ser atribuída exclusivamente à heterogeneidade da distribuição do Zn nesta amostra. De modo geral, os dados já obtidos pelo Grupo de espectrometria atômica do CENA-USP e os resultados obtidos na presente dissertação para os CRMs (CV entre 8,3 e 13,0 %) indicam melhores resultados para este elemento. Nas condições utilizadas, existe a possibilidade de aumentar o número de pulsos (*e.g.* 200 pulsos com a amostra rodando) para melhorar a estatística de contagens e a amostragem. Na presente dissertação isso não foi avaliado mas é objeto de investigação em andamento pelo Grupo.

A Tabela 5.1 mostra as incertezas das energias por pulso do laser de Nd:YAG utilizado neste trabalho com taxa de repetição de 10Hz. Na condição recomendada de 50 J cm^{-2} e 750 μm de focalização, a energia por pulso foi de 228 mJ, e assim pode-se inferir que as incertezas das medidas devidas ao laser foram menores que 1,5%.

Tabela 5.1 – Variação de energia do laser de Nd:YAG utilizado no presente trabalho (n = 20 medidas de 20 pulsos cada uma)

Energia (mJ)	Variação (mJ)	CV (%)
250	238,4 – 251,2	1,1
200	189,5 – 200,4	1,5
150	142,6 – 151,2	2,0
100	95,7 – 102,3	1,7
50	48,2 – 51,7	1,7
25	20 – 21,9	2,6

5.3 Efeito do tamanho das partículas nos sinais de emissão

A principal fonte de incerteza dos métodos microanalíticos, os quais analisam pequenas massas de amostra (*e.g.* de 0,1 a 10 mg), está relacionada ao grau de homogeneidade dos materiais, uma vez que a pequena massa da porção analisada pode não refletir a composição verdadeira da amostra.^{29, 43, 50} Neste aspecto, a representatividade do material analisado não é uma limitação verificada somente para LIBS, mas também para outras técnicas microanalíticas.^{42, 43, 65} A representatividade dos materiais está diretamente relacionada com a distribuição do tamanho das partículas,⁴¹ e de acordo com Zeisler,⁴³ uma distribuição estreita, com partículas preferencialmente menores que 10 μm , pode proporcionar a homogeneidade desejada.

A escolha da técnica de moagem deve levar em consideração a possibilidade de contaminação da amostra, algumas características dos analitos (*e.g.* volatilidade), da técnica de análise e, principalmente, as características da matriz da amostra, como dureza e teores de fibra e gordura. No entanto, para se obter uma boa qualidade metrológica empregando métodos microanalíticos, é recomendável que as amostras apresentem partículas menores que 50 μm ,²⁹ sendo que a moagem criogênica^{31, 82} e a cominuição utilizando moinho de bolas planetário⁴⁹ conseguem atender a esse critério. As propriedades físicas da amostra, como densidade, porosidade e rugosidade superficial, afetam a interação laser-amostra e devem ser avaliadas nos métodos de análise direta de sólidos assistidos por ablação com laser. De acordo com Arroyo et al.,⁴⁹ procedimentos de cominuição capazes de reduzir partículas de solo menores que 1 μm foram fundamentais para a produção de pastilhas resistentes e coesas, o que possibilitou uma microamostragem apropriada em análises por LA-ICP-MS.

O tamanho das partículas é um fator físico que afeta as análises de amostras sólidas por LIBS. Este parâmetro afeta diretamente a eficiência de vaporização/excitação do material ablado. Quando partículas maiores são incompletamente vaporizadas, o sinal resultante será menor do que os obtidos das amostras com partículas menores, as quais serão vaporizadas com maior eficiência. Além disso, esse processo é altamente dependente da fluência do laser e da composição das partículas. Um aumento significativo dos sinais de emissão de LIBS foi observado quando partículas menores de minério de ferro foram analisadas.¹⁰²

De acordo com Cremers e Radziemski,¹⁰³ o coeficiente angular da curva de calibração depende do tamanho das partículas, aumentando à medida que as partículas apresentam menores diâmetros. Neste sentido, efeitos físicos de matriz podem prejudicar a análise de materiais com diferentes tamanhos de partículas.¹⁰³

5.3.1 Análise de pastilhas após fracionamento das partículas

Quando um material é peneirado e separado em frações com diferentes tamanhos de partículas pode haver alteração em sua composição química. Alguns elementos podem se tornar mais ou menos concentrados conforme a granulometria é reduzida.⁸⁴ Neste sentido, as frações com diferentes tamanhos de partículas, obtidas após o peneiramento, foram analisadas por ICP OES, após digestão ácida, para verificar o comportamento das concentrações dos elementos de interesse. Neste trabalho, o método baseado na decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas (item 4.1.5) e determinação elementar por ICP OES (item 4.4) foi adotado como método de referência. ICP OES é uma técnica analítica bem consolidada e amplamente utilizada em análises de rotina para a determinação de macro e micronutrientes em materiais vegetais.^{12, 104} Além disso, uma vez que as análises por ICP OES geralmente são realizadas em soluções de amostras obtidas após a decomposição de massas relativamente grandes (*e.g.* 250 mg), este método é menos vulnerável aos erros e incertezas relacionados à amostragem da porção a ser analisada.

A qualidade dos resultados obtidos por ICP OES foi monitorada analisando-se CRMs de origem vegetal conjuntamente com as amostras teste. A Tabela 5.2 apresenta os valores certificados das frações de massa e as concentrações determinadas no laboratório para os elementos estudados. Com exceção dos valores de Fe no CRM NIST 1515 e de Zn no CRM NIST 1573a, os resultados foram satisfatórios, pois os valores encontrados foram concordantes com os certificados ao nível de 95 % de confiança.

A Tabela 5.3 apresenta as concentrações médias e as incertezas associadas obtidas por ICP OES nas análises das amostras de boldo (< 600 µm) e nas frações peneiradas (212-150 µm, 150-106 µm, 106-75 µm, 75-53 µm, 53-20 µm e < 20 µm). As concentrações determinadas na fração < 600 µm (proveniente do moinho de facas, segunda coluna da Tabela 5.3) representam os valores mais prováveis da composição da amostra, e foram utilizados como valores de referência para fins de comparação com as concentrações obtidas

nas frações peneiradas. Após o fracionamento, maiores concentrações de Al, Cu, Fe e Zn foram encontradas nas frações com partículas menores (Tabela 5.3). Para efeitos de comparação são mostrados apenas os dados referentes à repetibilidade (CV) das determinações dos elementos citados acima. Os resultados indicaram que as concentrações de B, Ca, Mg, Mn e P não apresentaram diferenças significativas nas frações do material peneirado ao nível de 95 % de confiança. Assim, para Ca, Mg, P, B e Mn, foi possível correlacionar os dados de intensidade de emissão e repetibilidade (CV) para as diferentes frações de tamanho de partículas.

Os resultados indicaram que a análise de pastilhas preparadas com partículas menores que 75 μm proporcionaram aumentos das intensidades de emissão de Ca, Mg, P, B e Mn (Figuras 5.19 a 5.21). Em geral, os processos de atomização e excitação dos átomos e íons pelo microplasma induzido por laser são favorecidos quando partículas menores são vaporizadas.¹⁰³ Com exceção de Ca e B, não foram verificadas diferenças significativas nas intensidades de emissão dos analitos presentes nas pastilhas preparadas com partículas < 75 μm (Figuras 5.19 a 5.21).

Tabela 5.2 – Comparação entre os valores obtidos por ICP OES após digestão ácida e os valores de referência certificados. Incertezas dos resultados obtidos por ICP OES representadas por 2 desvios-padrão

Elemento	NIST 1570a		NIST 1515		NIST 1573a		NIST 1547	
	<i>Obtido</i>	<i>Certificado</i>	<i>Obtido</i>	<i>Certificado</i>	<i>Obtido</i>	<i>Certificado</i>	<i>Obtido</i>	<i>Certificado</i>
Ca (%)	1,440 ± 0,089	1,527 ± 0,041	1,522 ± 0,015	1,526 ± 0,015	4,84 ± 0,18	5,05 ± 0,09	1,57 ± 0,05	1,56 ± 0,02
Mg (%)	0,904 ± 0,018	0,89 ^a	0,280 ± 0,010	0,271 ± 0,008	1,144 ± 0,011	nd	0,444 ± 0,015	0,432 ± 0,008
P (%)	0,518 ± 0,019	0,518 ± 0,011	0,155 ± 0,010	0,159 ± 0,011	0,217 ± 0,001	0,216 ± 0,004	0,137 ± 0,001	0,137 ± 0,007
Al (mg/kg)	298 ± 14	310 ± 11	285 ± 4	286 ± 9	576 ± 29	598 ± 12	242 ± 8	249 ± 8
Cu (mg/kg)	12,2 ± 0,6	12,2 ± 0,6	5,54 ± 0,26	5,64 ± 0,24	4,7 ± 0,3	4,7 ± 0,14	3,5 ± 0,12	3,7 ± 0,4
Fe (mg/kg)	257 ± 18	nd	75 ± 2	83 ± 5	355 ± 18	368 ± 7	211 ± 7	218 ± 14
Mn (mg/kg)	74,3 ± 2,5	75,9 ± 1,9	53 ± 1	54 ± 3	247 ± 13	246 ± 8	96 ± 2	98 ± 3
Zn (mg/kg)	76 ± 5	82 ± 3	13,0 ± 0,3	12,5 ± 0,3	28,3 ± 1,5	30,9 ± 0,7	17,3 ± 0,7	17,9 ± 0,4

^a Valor de informação fornecido pelo NIST; nd = não disponível.

Tabela 5.3 – Concentração média determinada nas diferentes frações de tamanho das partículas de amostras de boldo-do-Chile. As incertezas estão representadas por ± 1 desvio-padrão ($n = 3$). Os valores entre parênteses referem-se aos valores calculados de t . O valor crítico de t para 2 graus de liberdade e 95 % de probabilidade é 4,303

Elemento	Frações de tamanho de partículas						
	< 600 μm	212-150 μm	150-106 μm	106-75 μm	75-53 μm	53-20 μm	< 20 μm
Ca (%)	1,17 \pm 0,01	1,10 \pm 0,03 (3,131)	1,12 \pm 0,06 (1,457)	1,21 \pm 0,01 (0,977)	1,20 \pm 0,01 (3,344)	1,20 \pm 0,01 (3,420)	1,20 \pm 0,01 (2,442)
Mg (%)	0,21 \pm 0,01	0,20 \pm 0,01 (1,730)	0,21 \pm 0,01 (0,271)	0,22 \pm 0,01 (2,267)	0,22 \pm 0,01 (1,498)	0,22 \pm 0,01 (1,292)	0,20 \pm 0,01 (3,204)
P (%)	0,14 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01 (3,232)	0,13 \pm 0,01 (3,669)	0,13 \pm 0,01 (1,509)	0,14 \pm 0,01 (0,624)	0,14 \pm 0,01 (0,402)	0,14 \pm 0,01 (2,882)
Al (mg kg ⁻¹)	664 \pm 19	664 \pm 28 (0,009)	642 \pm 22 (1,327)	611 \pm 27 (2,792)	737 \pm 18 (4,787)	742 \pm 11 (6,154)	834 \pm 8 (14,381)
B (mg kg ⁻¹)	16,1 \pm 0,60	17,3 \pm 0,90 (1,922)	17,2 \pm 0,80 (1,905)	16,5 \pm 0,60 (0,816)	17,5 \pm 0,50 (3,105)	17,6 \pm 0,60 (3,062)	17,8 \pm 0,40 (4,083)
Cu (mg kg ⁻¹)	5,26 \pm 0,14	5,72 \pm 0,19 (3,361)	5,30 \pm 0,02 (0,074)	4,80 \pm 0,20 (3,282)	5,49 \pm 0,15 (1,951)	5,93 \pm 0,25 (4,085)	9,89 \pm 0,26 (26,971)
Fe (mg kg ⁻¹)	599 \pm 20	598 \pm 12 (0,116)	596 \pm 18 (0,209)	556 \pm 20 (2,647)	683 \pm 18 (5,485)	661 \pm 7 (5,096)	794 \pm 11 (15,116)
Mn (mg kg ⁻¹)	81,8 \pm 1,3	82,6 \pm 0,4 (1,035)	84,0 \pm 0,4 (2,889)	86,5 \pm 2,1 (3,253)	85,0 \pm 0,5 (4,063)	84,9 \pm 0,3 (0,637)	79,3 \pm 0,5 (3,096)
Zn (mg kg ⁻¹)	13,7 \pm 0,1	12,9 \pm 0,1 (10,984)	13,2 \pm 0,7 (0,381)	15,4 \pm 0,1 (25,200)	14,9 \pm 0,2 (9,748)	65,2 \pm 3,6 (8,130)	101,4 \pm 1,8 (12,832)

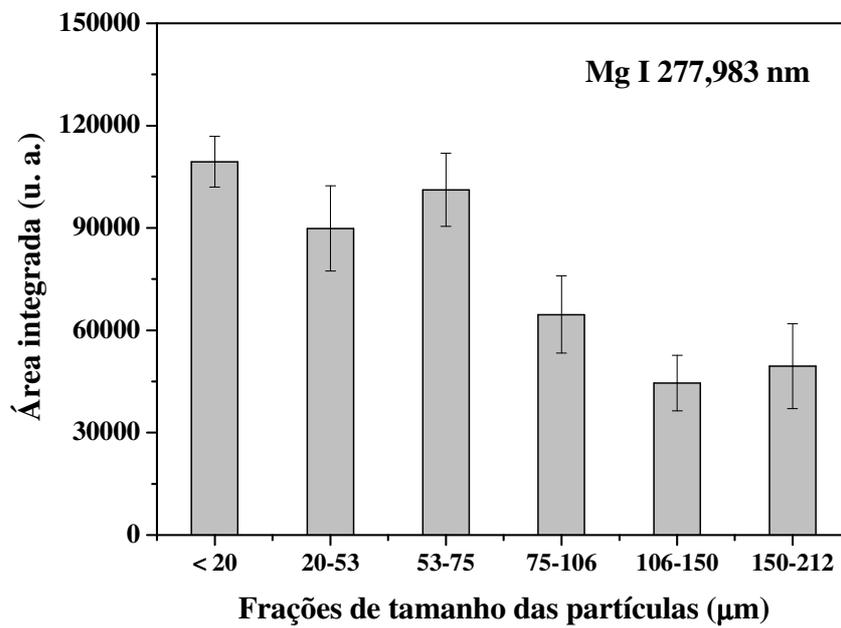
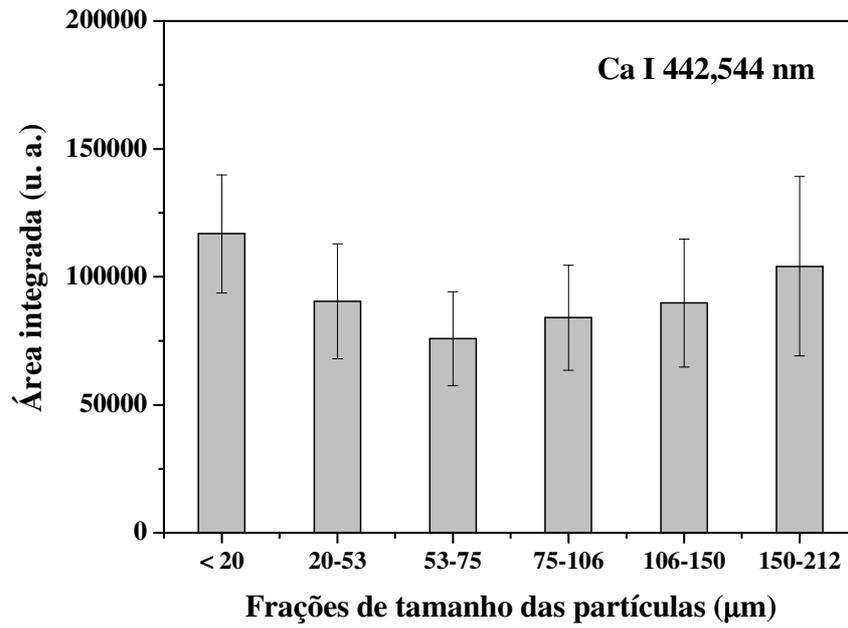


Figura 5.19 - Intensidades de emissão de Ca I 442,554 nm e Mg I 277,983 nm nas pastilhas preparadas com diferentes frações de tamanho das partículas aplicando-se 50 J cm^{-2} . As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão ($n = 30$ crateras, 20 pulsos/cratera)

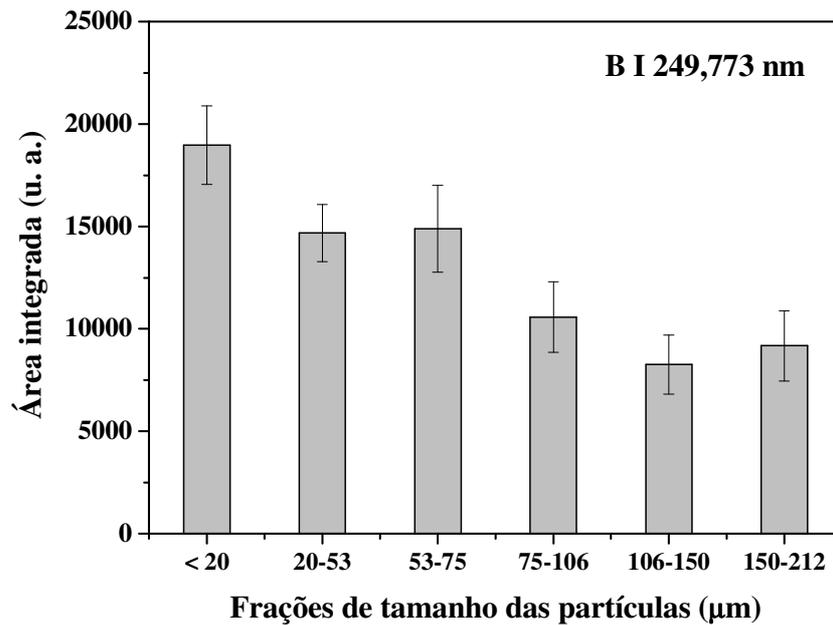
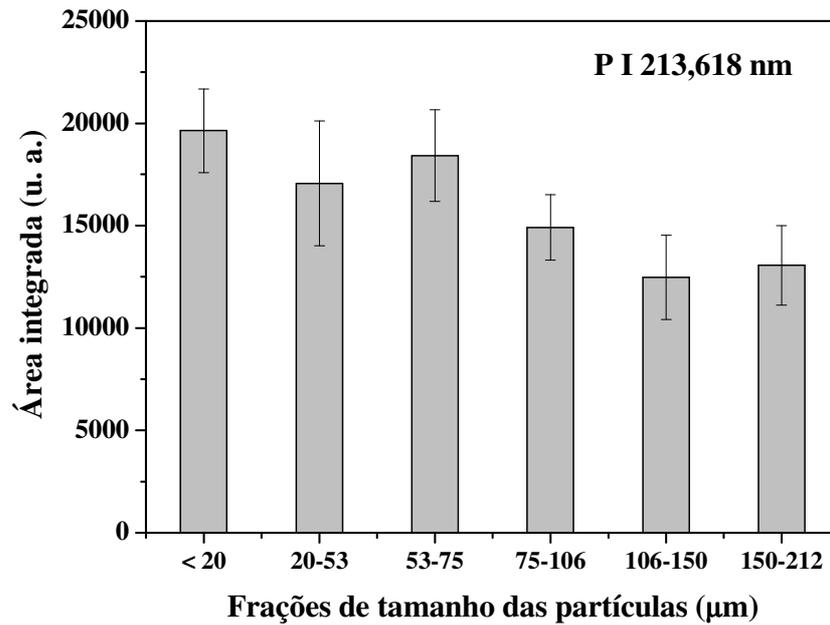


Figura 5.20 - Intensidades de emissão de P I 213,618 nm e B I 249,773 nm nas pastilhas preparadas com diferentes frações de tamanho das partículas aplicando-se 50 J cm^{-2} . As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão ($n = 30$ crateras, 20 pulsos/cratera)

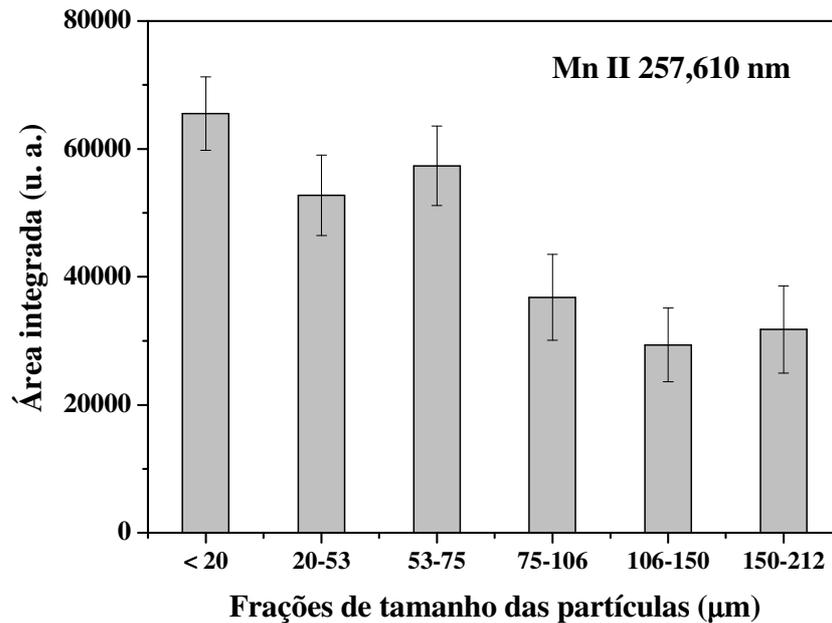


Figura 5.21 - Intensidades de emissão de Mn II 257,610 nm nas pastilhas preparadas com diferentes frações de tamanho das partículas aplicando-se 50 J cm^{-2} . As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão ($n = 30$ crateras, 20 pulsos/cratera)

Os resultados também mostraram uma diminuição do CV das medidas nas pastilhas preparadas com partículas menores (Figura 5.22 e 5.26). Estes resultados eram esperados e são coerentes com a literatura, uma vez que quanto menor o tamanho das partículas mais homogêneo é o material.^{41, 43, 44} De acordo com Zeisler,⁴³ uma distribuição estreita do tamanho das partículas com diâmetros preferencialmente menores que $10 \mu\text{m}$, confere homogeneidade para massas amostradas menores que $1,0 \text{ mg}$. Com exceção do Zn nas pastilhas de boldo, verificou-se que o CV da determinação de todos os analitos foi menor que 15% quando pastilhas preparadas com partículas menores que $75 \mu\text{m}$ foram analisadas. Neste sentido, métodos de moagem capazes de reduzir o tamanho das partículas a diâmetros menores que $75 \mu\text{m}$ podem ser apropriados para o preparo de amostras vegetais para análise por LIBS.

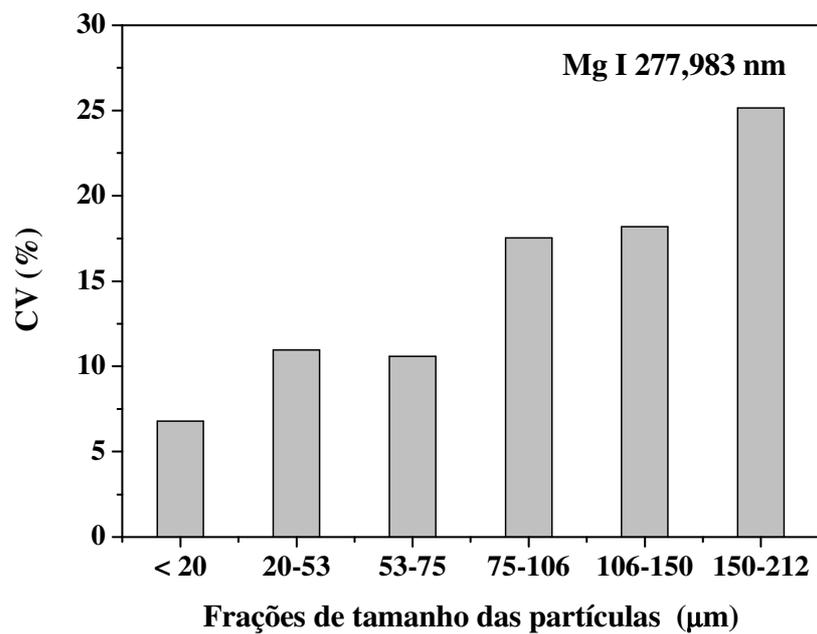
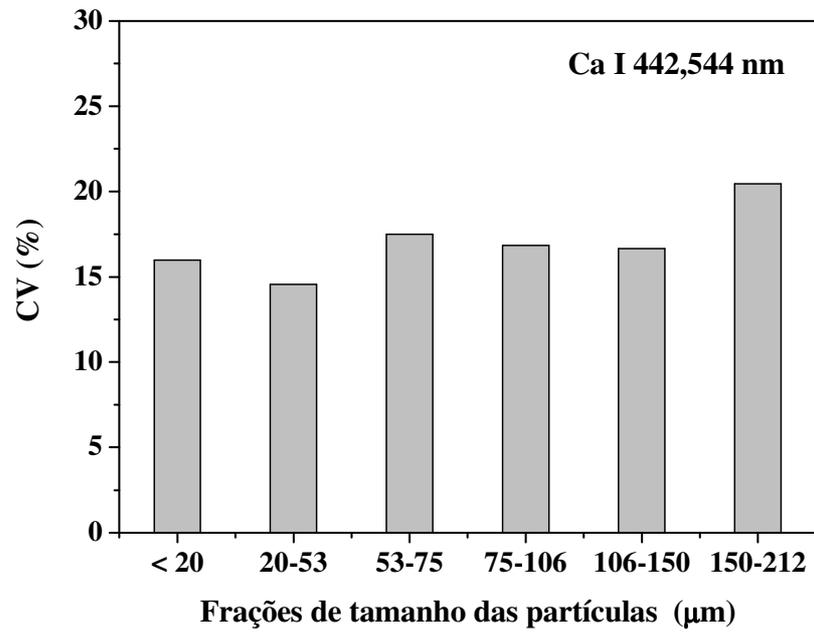


Figura 5.22 - Coeficientes de variação (CV) referentes às medidas dos sinais de emissão de Ca I 442,544 nm e Mg I 277,983 nm em pastilhas de boldo preparadas com diferentes frações de tamanho das partículas. Dados para 50 J cm^{-2} , $n=30$ crateras, 20 pulsos por cratera

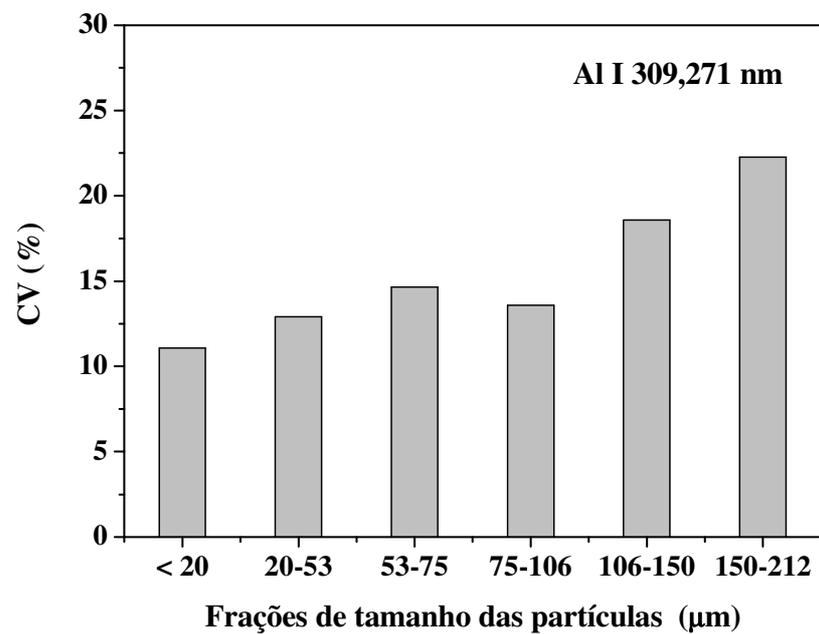
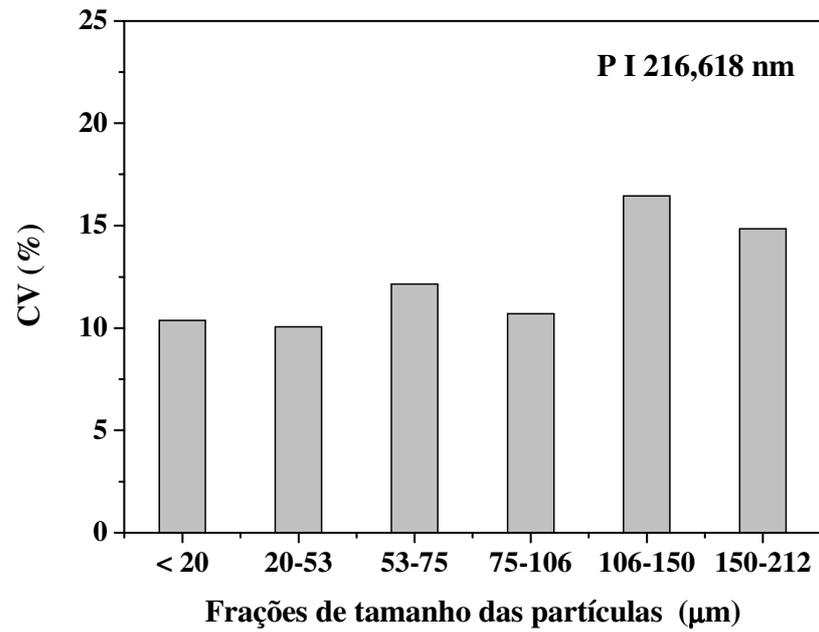


Figura 5.23 - Coeficientes de variação (CV) referentes às medidas dos sinais de emissão de P I 216,618 nm e Al I 309,271 nm em pastilhas de boldo preparadas com diferentes frações de tamanho das partículas. Dados para 50 J cm^{-2} , $n=30$ crateras, 20 pulsos por cratera

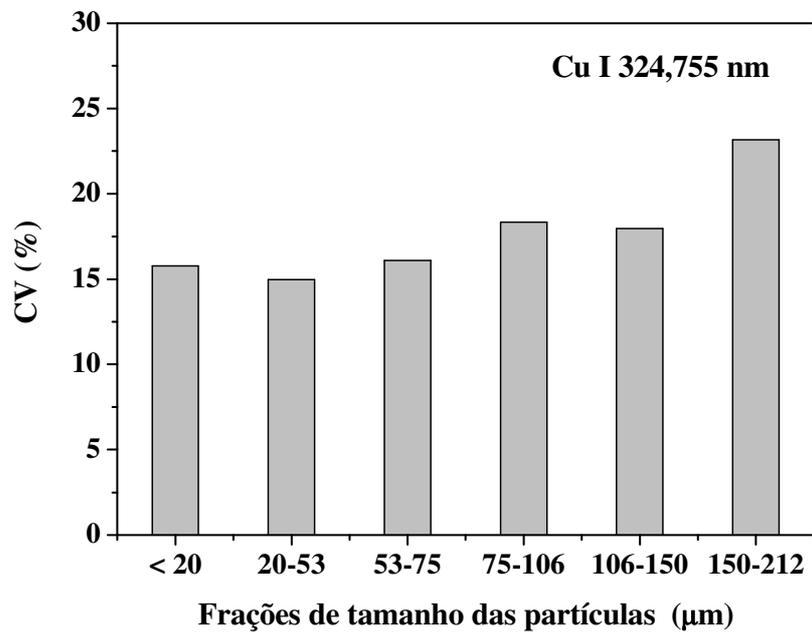
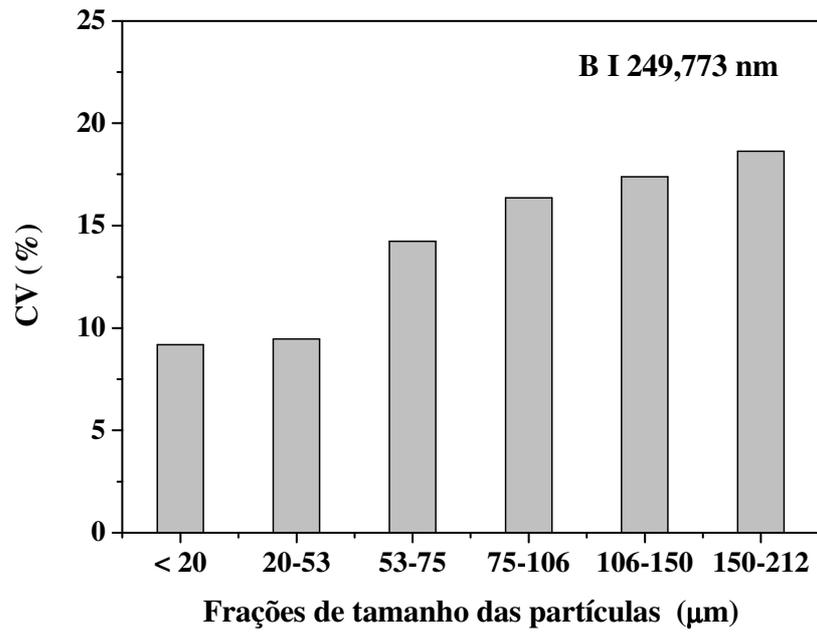


Figura 5.24 - Coeficientes de variação (CV) referentes às medidas dos sinais de emissão de B I 249,773 nm e Cu I 324,755 nm em pastilhas de Boldo-do-Chile preparadas com diferentes frações de tamanho das partículas. Dados para 50 J cm^{-2} , $n=30$ crateras, 20 pulsos por cratera

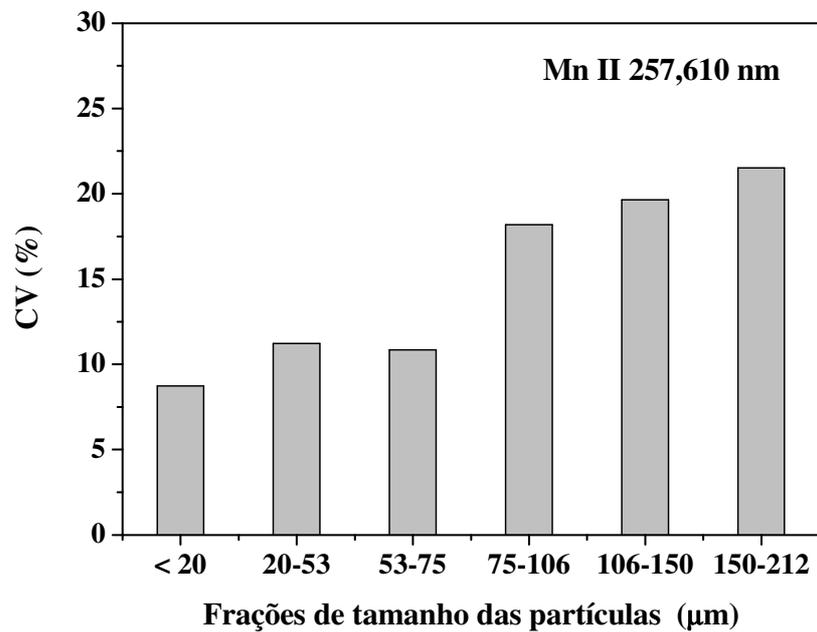
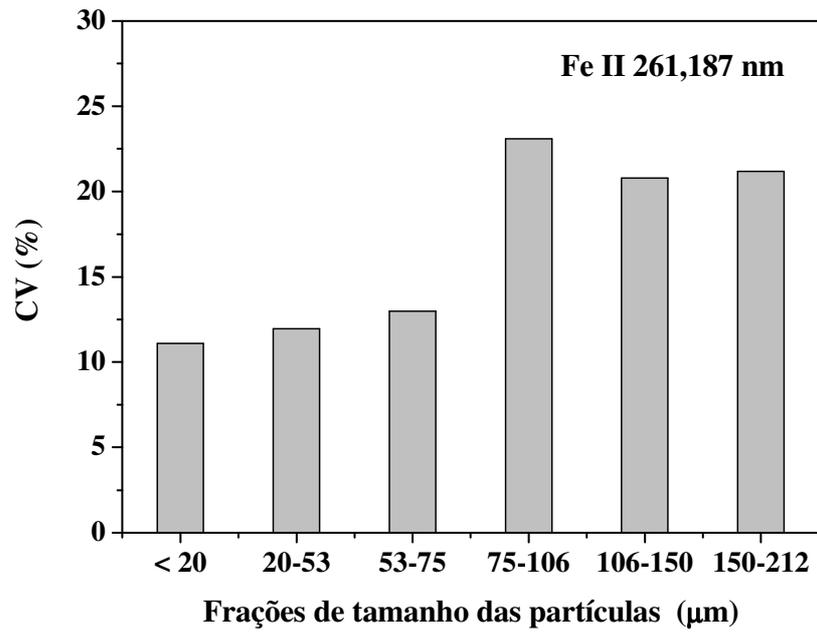


Figura 5.25 - Coeficientes de variação (CV) referentes às medidas dos sinais de emissão de Fe II 261,187 nm e Mn II 257,619 nm em pastilhas de bolço preparadas com diferentes frações de tamanho das partículas. Dados para 50 J cm^{-2} , $n=30$ crateras, 20 pulsos por cratera

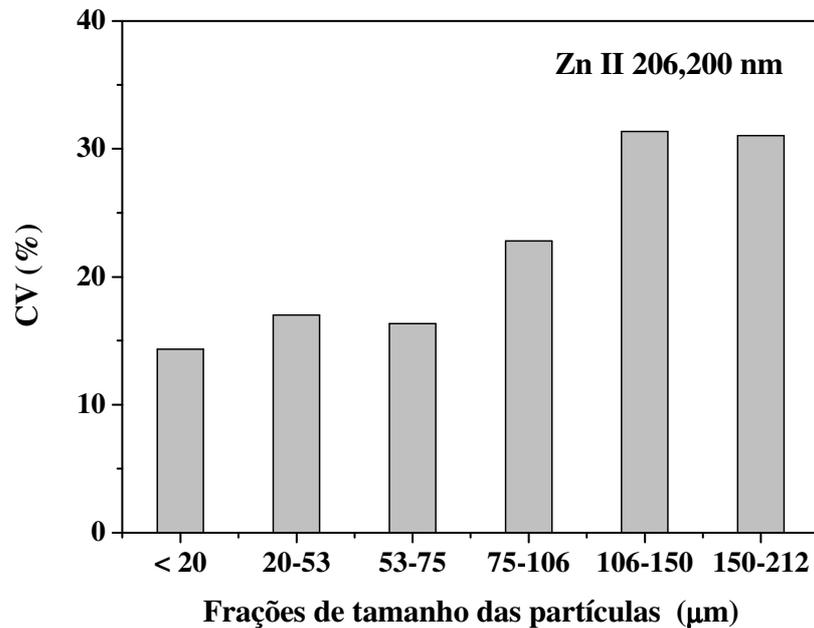


Figura 5.26 - Coeficientes de variação (CV) referentes às medidas dos sinais de emissão de Zn II 206,200 nm em pastilhas de boldo preparadas com diferentes frações de tamanho das partículas. Dados para 50 J cm^{-2} , $n=30$ crateras, 20 pulsos por cratera

De acordo com Arroyo et al.,⁴⁹ no caso de amostras de solos e sedimentos, partículas menores aumentam a coesão das pastilhas, propiciando um aumento da reprodutibilidade das medidas feitas por LA-ICP-MS, mesmo na ausência de agentes aglutinantes. A coesão das partículas agregadas na pastilha apresenta um papel bastante importante na precisão das medidas, pois quanto mais compacta e mecanicamente resistente for a pastilha mais reprodutível será a interação entre o laser e a amostra. Na presente dissertação, verificou-se que as pastilhas produzidas com partículas menores que $75 \mu\text{m}$ apresentaram coesão apropriada para análise por LIBS. As Figuras 5.27 e 5.28-a mostram que, para essas amostras, não houve sinais de rugosidade superficial e de fraturas ao redor das crateras produzidas pela ablação. Nos casos das pastilhas produzidas com partículas entre $75\text{-}106$ e $106\text{-}150 \mu\text{m}$, foi possível verificar superfícies rugosas e a presença de fibras (Figuras 5.28-b e 5.29). Provavelmente, os altos valores de CV das medidas de emissão dos analitos nestas pastilhas (i.e. $> 20 \%$) foram devido a esses fatores.

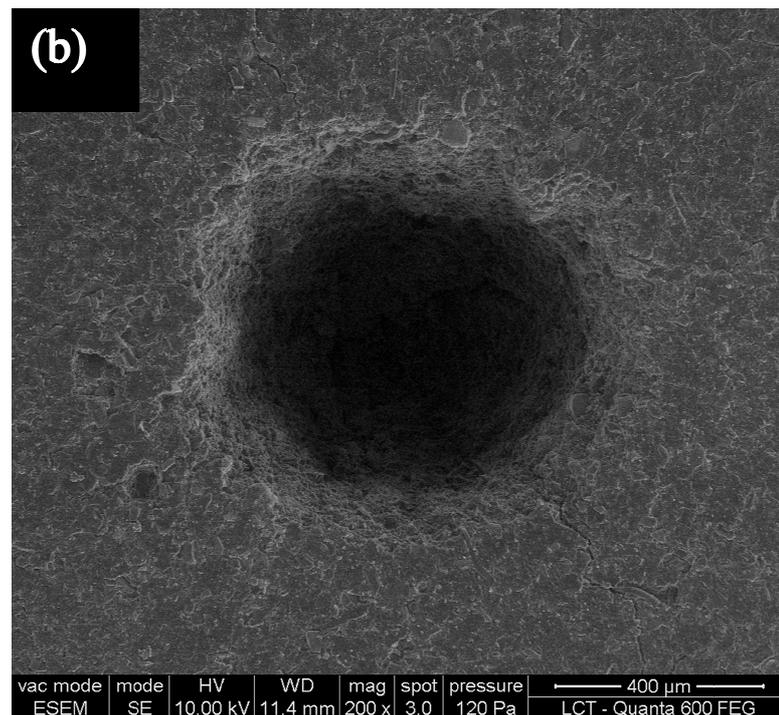
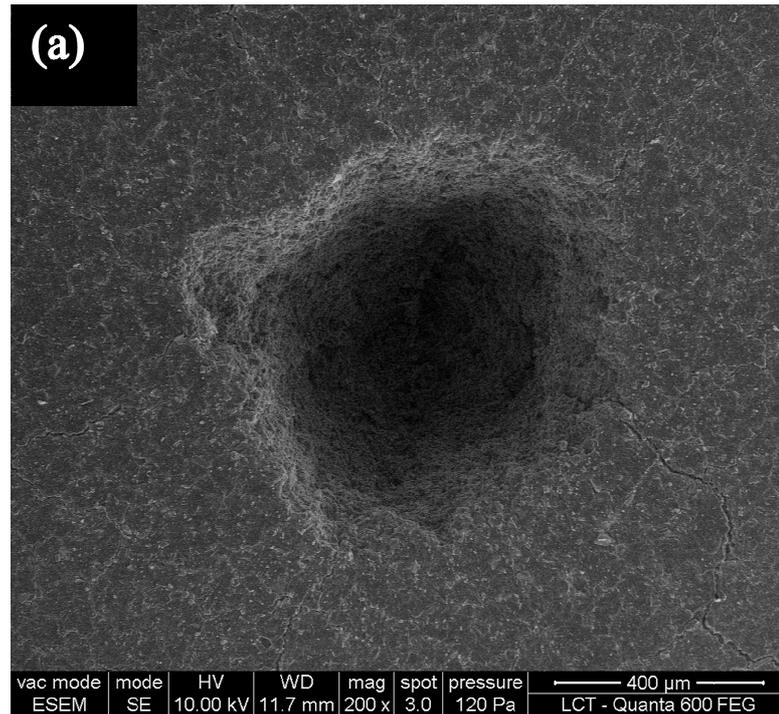


Figura 5.27 - Microscopia eletrônica de varredura das crateras formadas nas pastilhas de boldo preparadas com partículas (a) $< 20 \mu\text{m}$ e (b) entre $20\text{-}53 \mu\text{m}$ com 20 pulsos (10 Hz) de laser com 25 J cm^{-2} . Magnificação: 200x

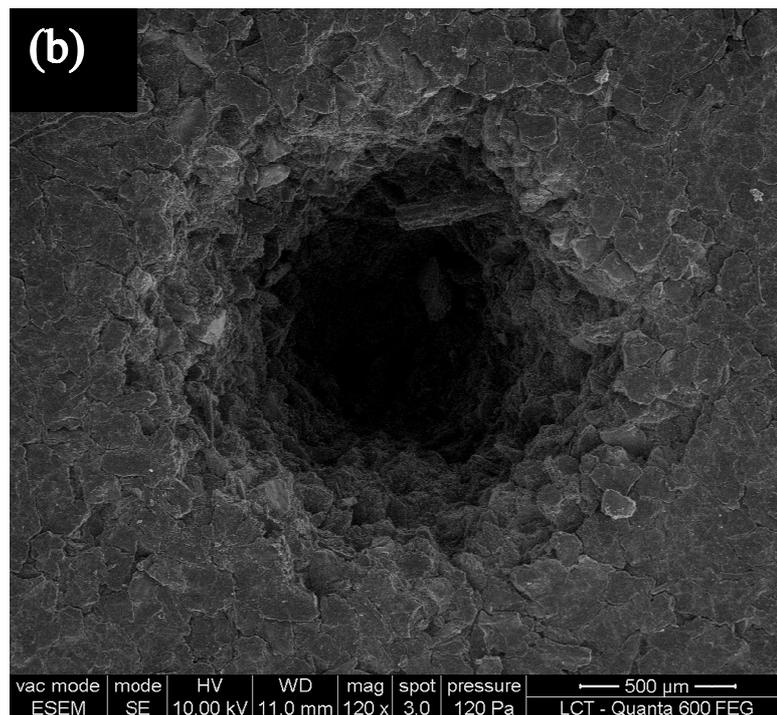
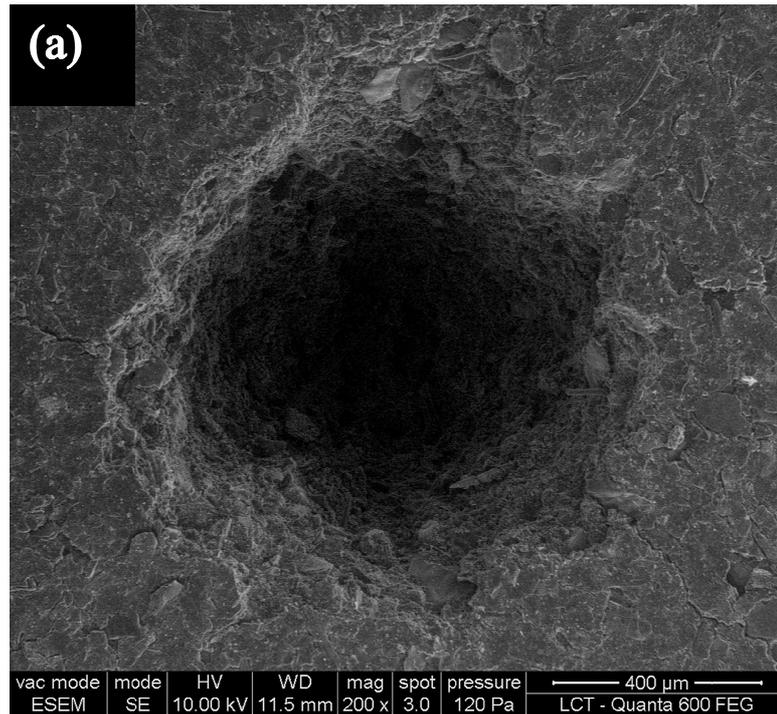


Figura 5.28 - Microscopia eletrônica de varredura das crateras formadas nas pastilhas de boldo preparadas com partículas (a) entre 23-75 μm e (b) entre 75-106 μm com 20 pulsos (10Hz) de laser com 25 J cm^{-2} . Magnificação: 200x

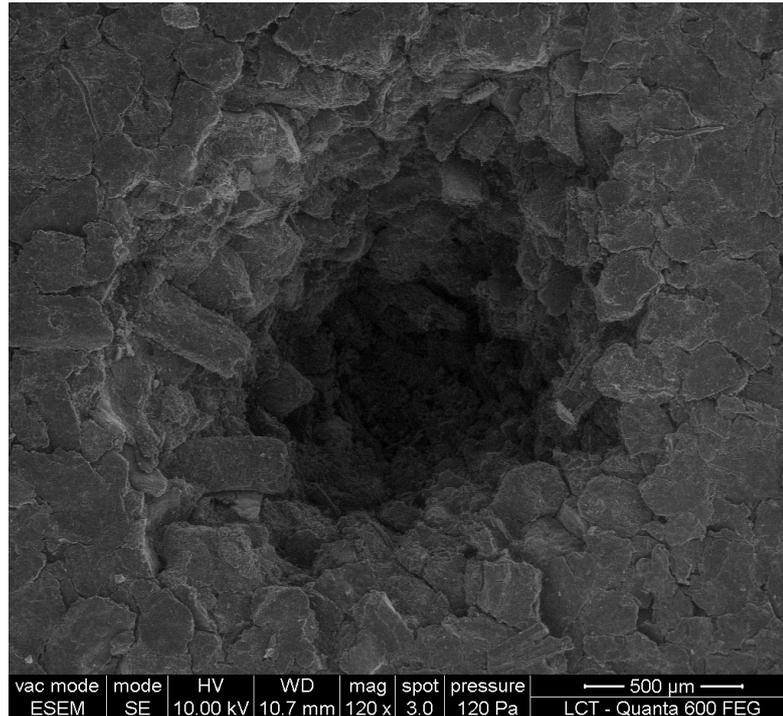


Figura 5.29 - Microscopia eletrônica de varredura das crateras formadas nas pastilhas de boldo preparadas com partículas entre 106 e 150 μm com 20 pulsos (10Hz) de laser com 25 J cm^{-2} . Magnificação: 200x

Além disso, deve-se ressaltar que as pastilhas preparadas com partículas maiores que 100 μm apresentaram-se quebradiças, e a ablação destes materiais resultou em crateras pouco uniformes. Desta forma, o preparo de pastilhas com os materiais moídos apenas com moinho de facas (*e.g.* 100 % das partículas < 600 μm) não é recomendado.

5.3.2 Análise das pastilhas após moagem criogênica

A moagem criogênica resultou em um processo de cominuição mais rápido do que o provocado pelo moinho de bolas planetário devido, principalmente, à fragilização provocada pelo congelamento. Os resultados indicaram que 90 % das partículas foram menores que 52 e 42 μm após 10 e 30 min de moagem, respectivamente. As distribuições do tamanho das partículas para folhas de boldo moídas durante 10 e 30 min são apresentadas nas Figuras 5.1 e 5.30, respectivamente. Em geral, para as amostras de boldo utilizadas no presente trabalho,

não houve variação significativa na distribuição do tamanho das partículas em função dos tempos de moagem. Similarmente, também não foram observadas diferenças significativas nos sinais de emissão dos analitos em função do tempo de moagem.

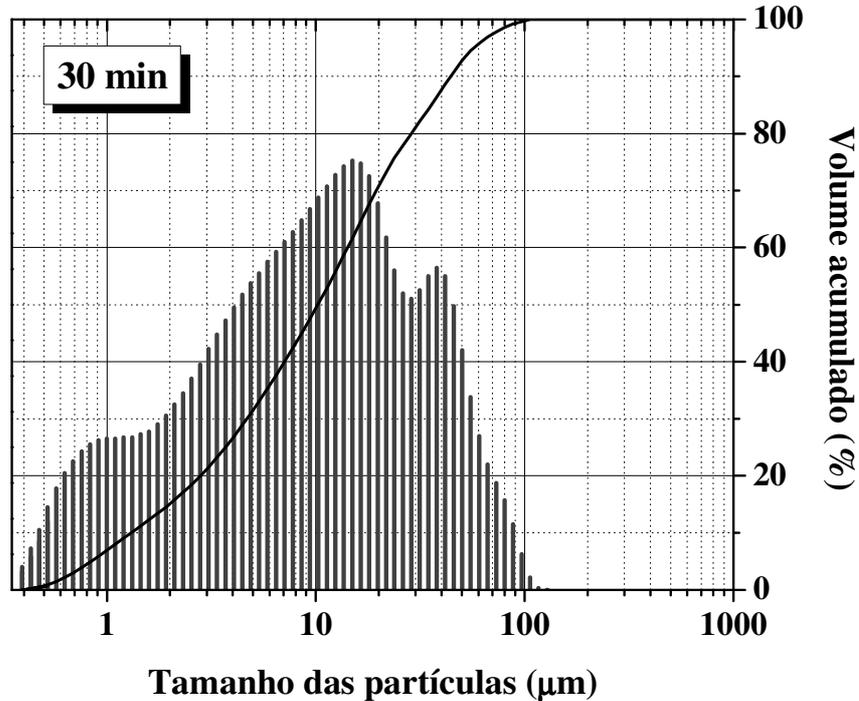


Figura 5.30 - Distribuição do tamanho das partículas de amostra de folhas de boldo-do-Chile após moagem criogênica por 30 min (5 min pré-congelamento, 15 ciclos de moagem de 2 min com 1 min de recongelamento entre ciclos)

Com base nos estudos com amostras de folhas com tamanho de partículas controlado (seção 5.1), pode-se inferir que a moagem criogênica durante 10 min foi suficiente, pois resultou em 90 % das partículas menores que 52 μm e, principalmente, em resultados analíticos apropriados. Além disso, esta estratégia de moagem é viável para o preparo das amostras previamente à prensagem. Neste sentido, para o preparo dos CRMs, fixou-se o tempo de moagem em 10 min.

5.3.3 Análise das pastilhas após moagem com bolas

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que 30, 60 e 120 min de moagem resultaram em 90 % das partículas com diâmetros menores que 91, 31 e 20 μm , respectivamente. As distribuições do tamanho das partículas para folhas de boldo são apresentados na Figura 5.31 e 5.32. Observou-se variação na distribuição do tamanho das partículas em função dos tempos de moagem, com partículas menores e distribuição mais estreita, para os tempos maiores de moagem.

As variações dos sinais analíticos em função do tempo de moagem são apresentados nas Figuras 5.33 e 5.37. Os resultados são concordantes com os obtidos com a distribuição do tamanho das partículas e indicam que 30 min de moagem com bolas resultou em cominuição apropriada para a determinação dos analitos. Não foram verificadas diferenças significativas entre os resultados obtidos com 30, 60 e 120 min de moagem para a maioria dos analitos. As amostras preparadas com 10 e 20 min apresentaram as menores intensidades de emissão, decorrentes de uma moagem menos eficiente.

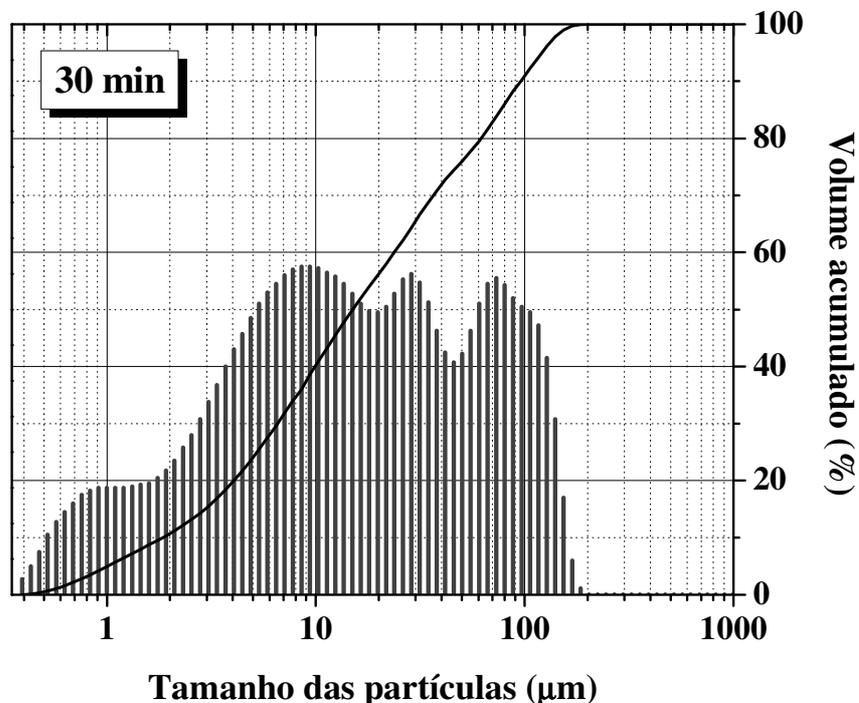


Figura 5.31 - Distribuição do tamanho das partículas de amostras de folhas de boldo-do-Chile após moagem com bolas por 30 min

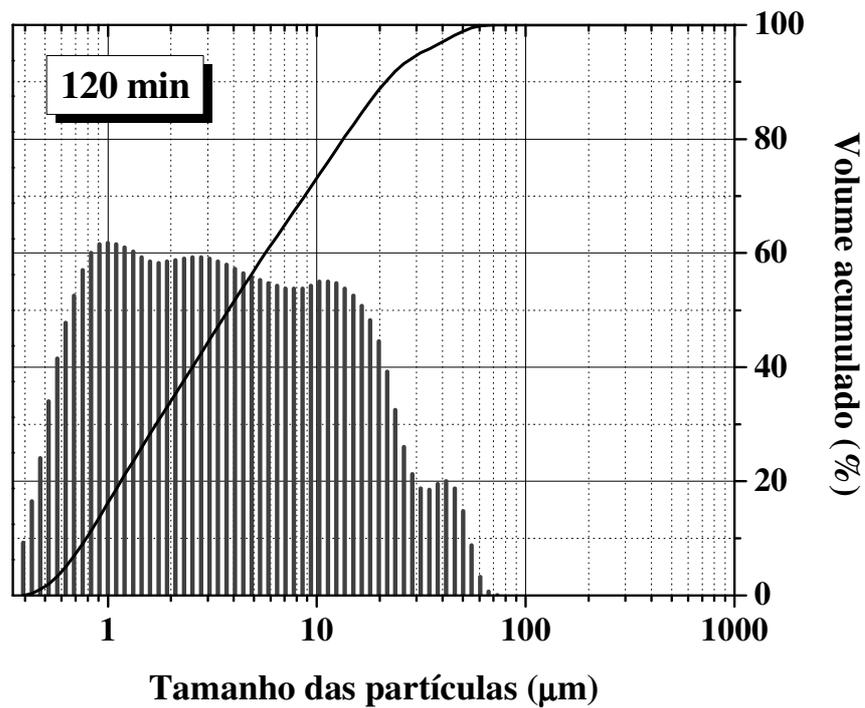
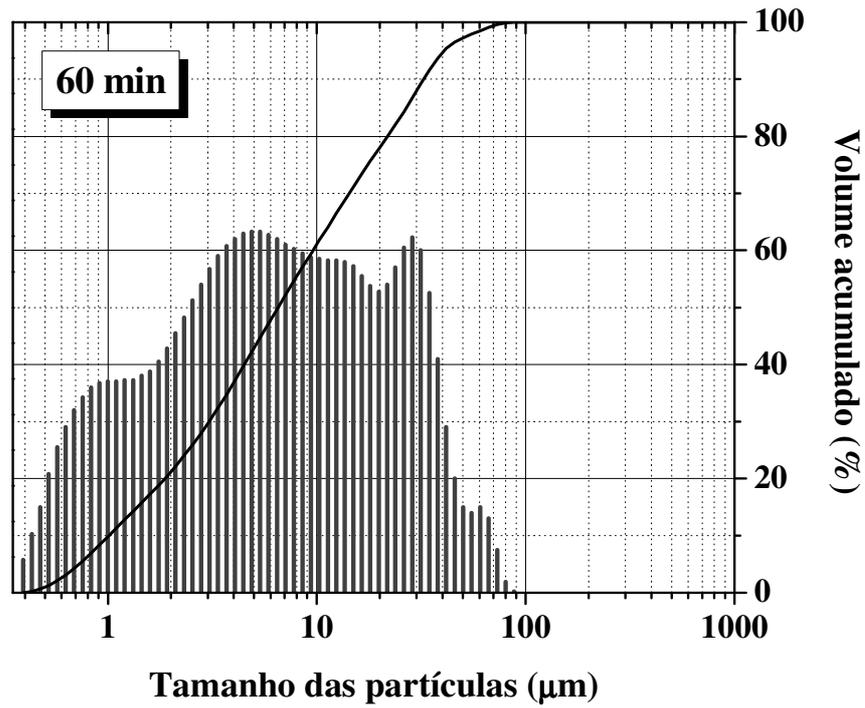


Figura 5.32 - Distribuição do tamanho das partículas de amostras de folhas de boldo-do-Chile após moagem com bolas por 60 e 120 min

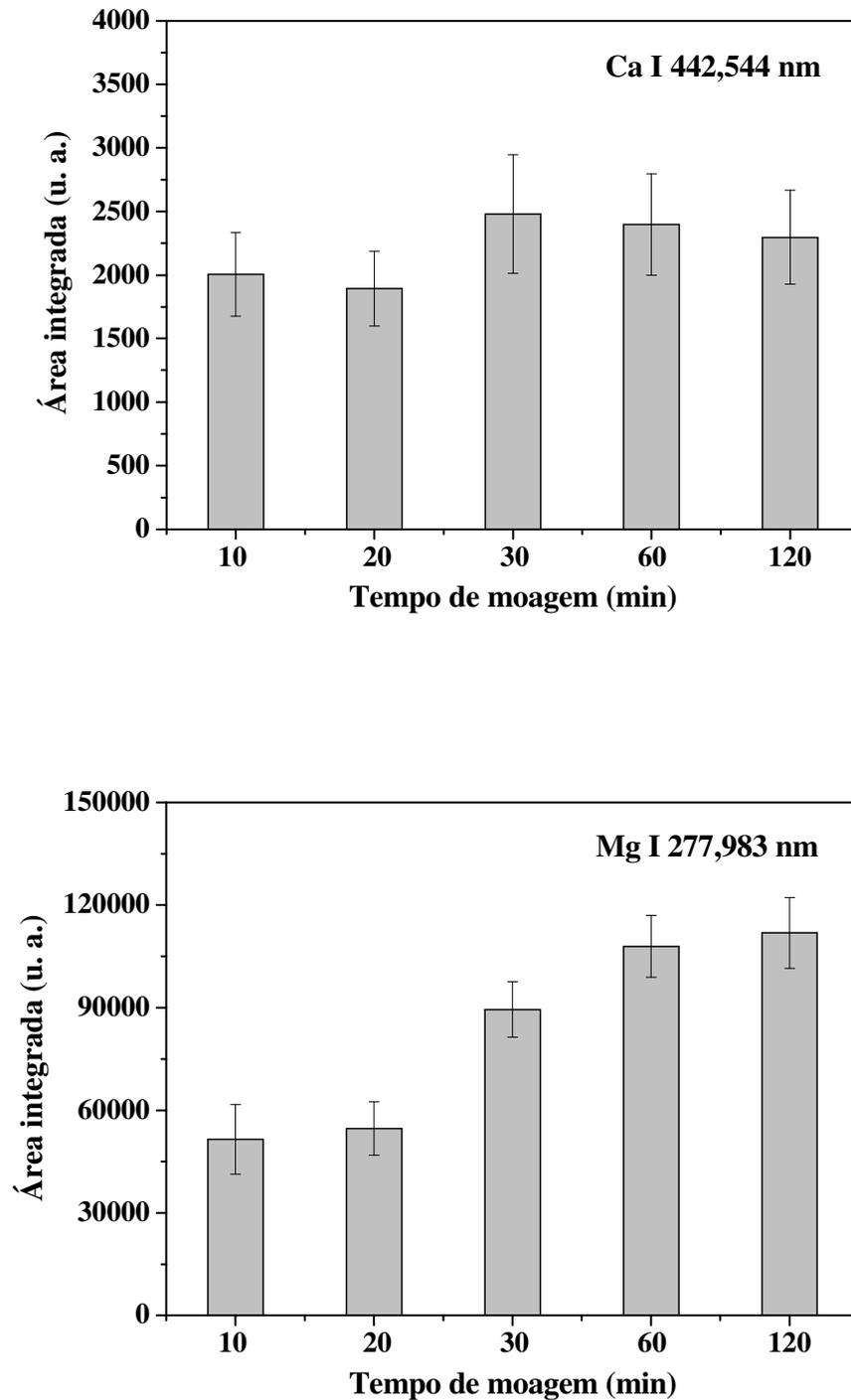


Figura 5.33 - Intensidades de emissão de Ca I 442,544 nm e Mg I 277,983 nm das pastilhas preparadas com com folhas de boldo em diferentes tempos de moagem com bolas usando 50 J cm^{-2} . As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão ($n = 30$ crateras, 20 pulsos/cratera)

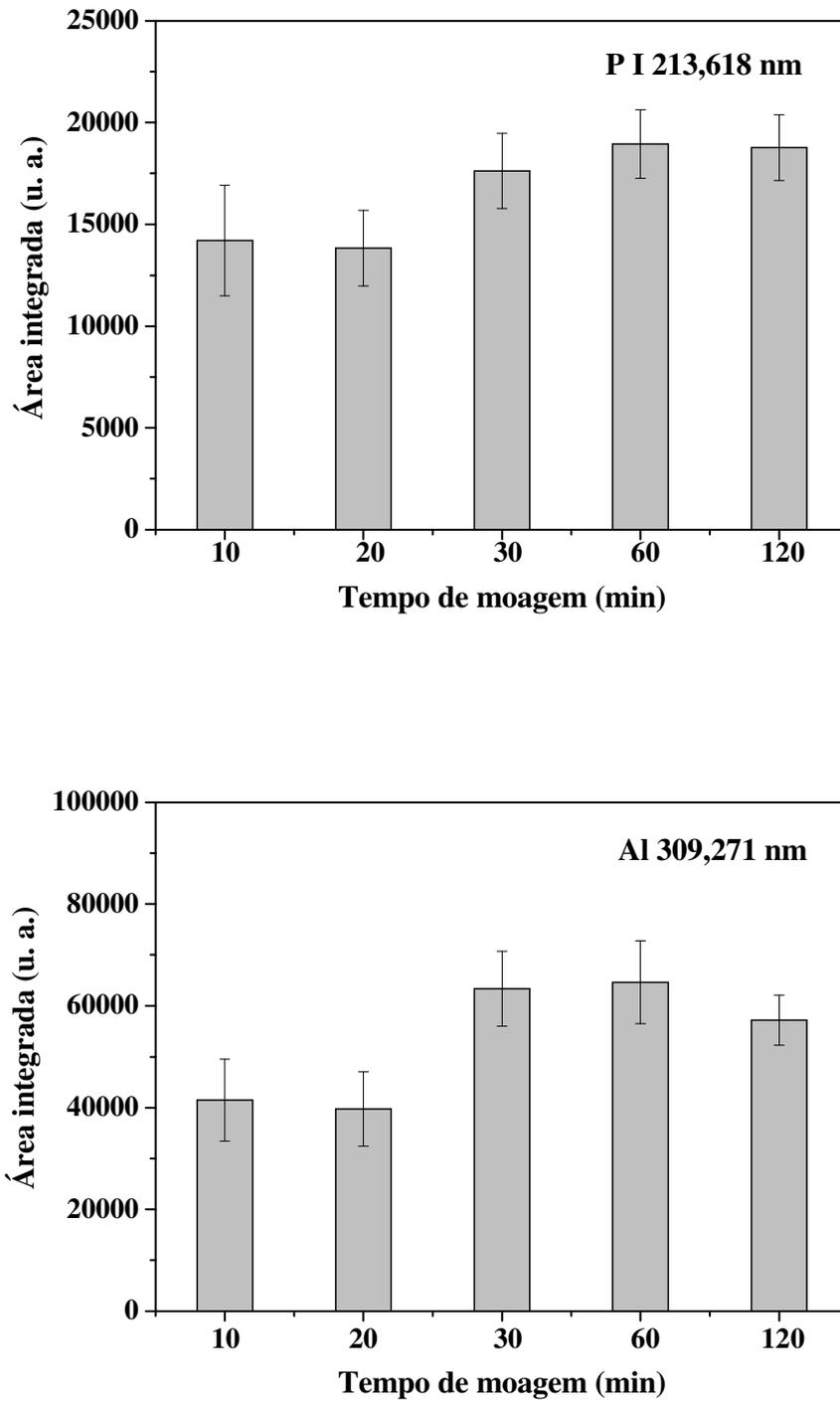


Figura 5.34 - Intensidades de emissão de P I 213,618 nm e Al I 309,271 nm das pastilhas preparadas com com folhas de boldo em diferentes tempos de moagem com bolas usando 50 J cm^{-2} . As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão ($n = 30$ crateras, 20 pulsos/cratera)

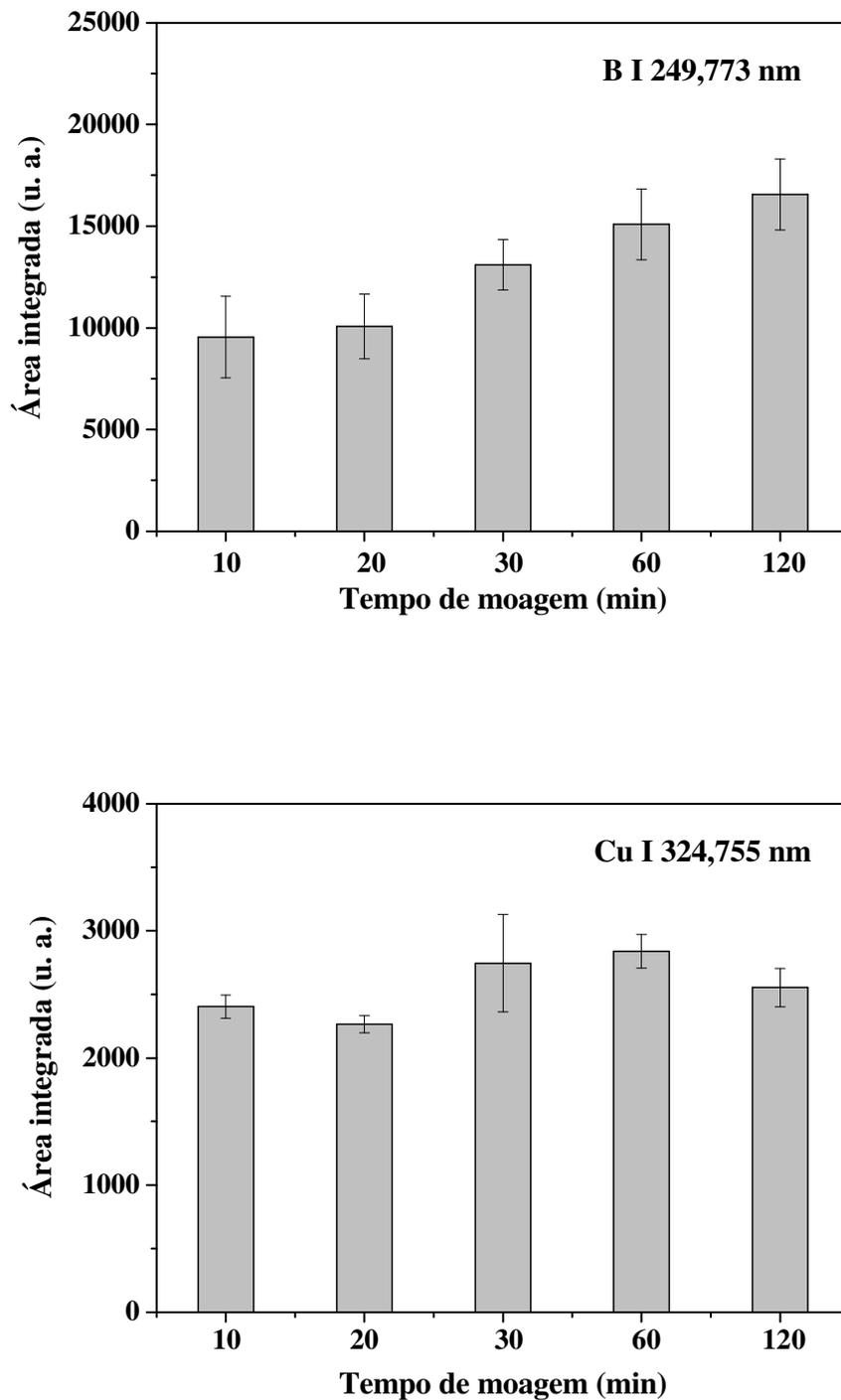


Figura 5.35 - Intensidades de emissão de B I 249,773 nm e Cu I 324,755 nm das pastilhas preparadas com com folhas de boldo em diferentes tempos de moagem com bolas usando 50 J cm^{-2} . As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão ($n = 30$ crateras, 20 pulsos/cratera)

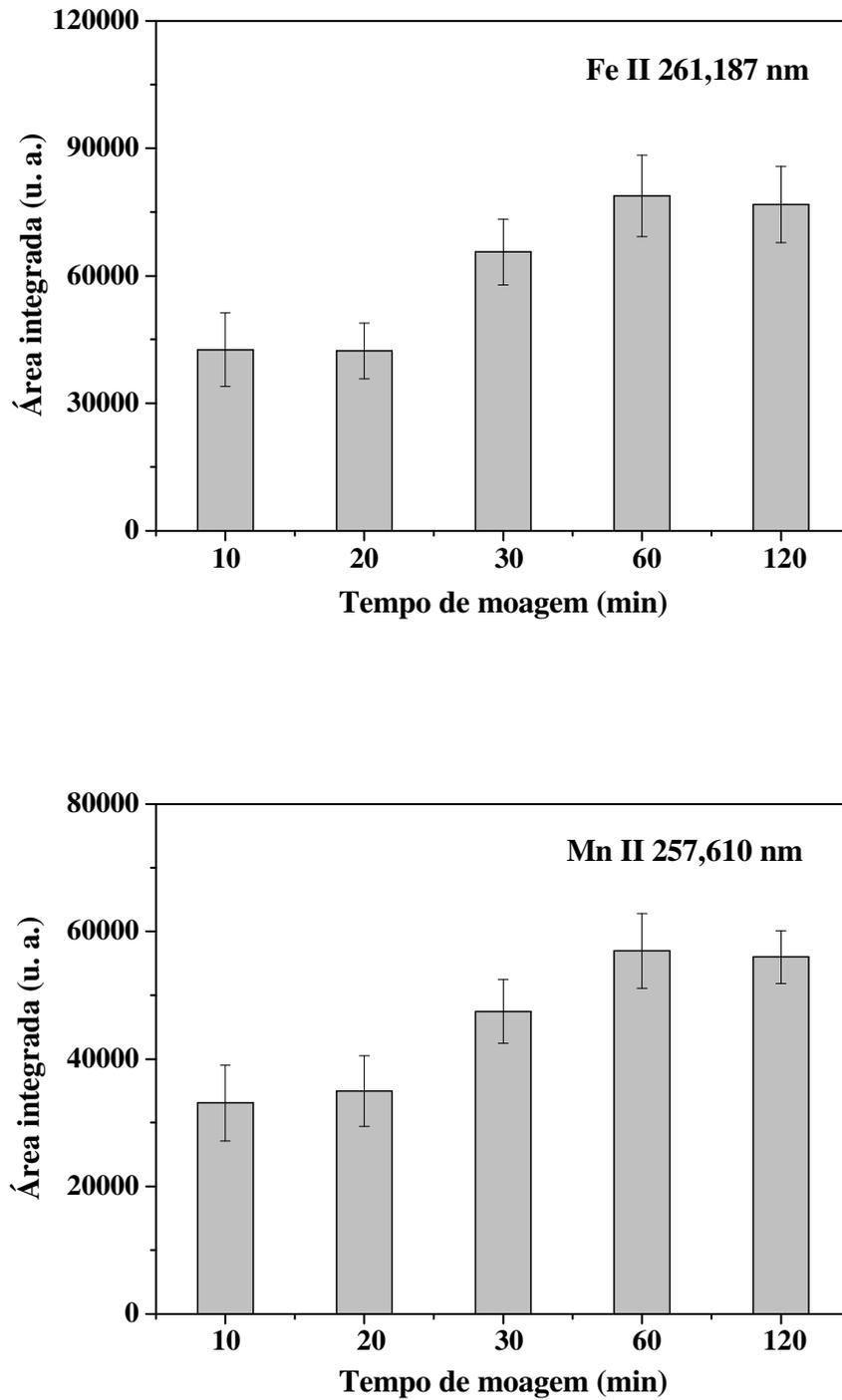


Figura 5.36 - Intensidades de emissão de Fe II 261,187 nm e Mn II 257,610 nm das pastilhas preparadas com com folhas de boldo em diferentes tempos de moagem com bolas usando 50 J cm^{-2} . As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão ($n = 30$ crateras, 20 pulsos/cratera)

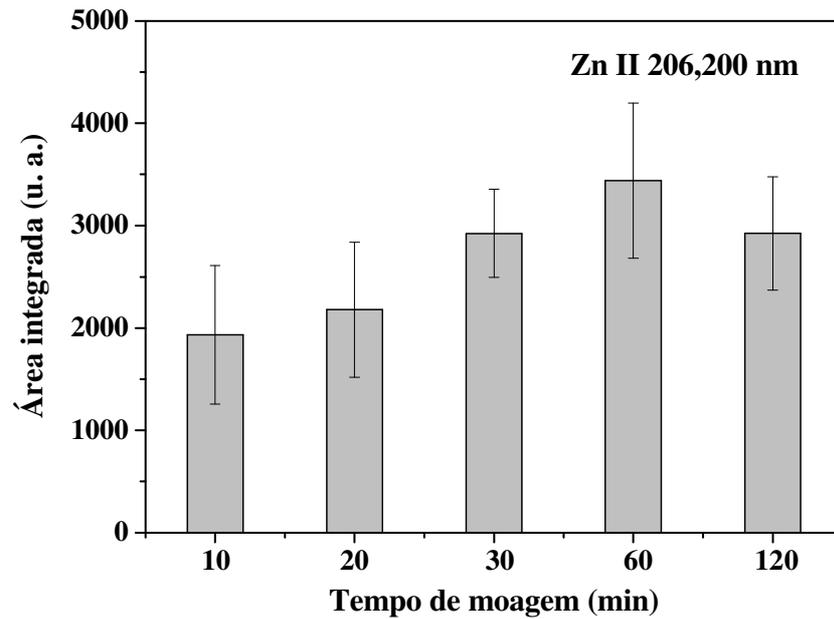


Figura 5.37 - Intensidades de emissão de Zn II 206,200 nm das pastilhas preparadas com com folhas de boldo em diferentes tempos de moagem com bolas usando 50 J cm^{-2} . As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão ($n = 30$ crateras, 20 pulsos/cratera)

A Tabela 5.4 apresenta os CVs ($n = 30$ crateras) referentes às medidas dos sinais de emissão de Ca, Mg, P, Al, B, Cu, Fe, Mn e Zn utilizando 50 J cm^{-2} em pastilhas de boldo moídas com moinho de bolas planetário por 10, 20, 30, 60 e 120 min. De maneira geral, verificou-se que o CV das medidas foi reduzido conforme o tempo de moagem foi aumentado. Os valores elevados de CV observados nas amostras menos cominuídas (i.e. material moído por 10, 20 e 30 min) podem estar relacionados à presença de partículas maiores denominadas *nuggets*.^{43, 105}

Tabela 5.4 - Coeficientes de variação (%), n = 30 crateras, 20 pulsos por cratera) das medidas de Ca, Mg, P, Al, B, Cu, Fe, Mn e Zn com 50 J cm^{-2} em pastilhas de boldo preparadas após moagem com bolas por 10, 20, 30, 60 e 120 min

min	10	20	30	60	120
Ca	16	16	19	17	16
Mg	20	14	9	8	9
P	19	13	10	9	9
Al	19	18	12	13	9
B	21	16	10	12	11
Cu	8	9	14	5	6
Fe	20	16	12	12	12
Mn	18	16	11	10	7
Zn	35	30	15	22	19

As micrografias eletrônicas das crateras produzidas pela ablação com laser aplicando-se 25 J cm^{-2} são mostradas nas Figuras 5.38 a 5.40. Crateras mais uniformes foram obtidas nas pastilhas produzidas com menores tamanhos de partículas.

Com base nos estudos com as amostras de folhas moídas com frações de tamanho das partículas (seção 5.1), pode-se inferir que 30 min de moagem com moinho de bolas planetário foi suficiente por proporcionar 90 % das partículas menores que $30 \mu\text{m}$ e resultados analíticos apropriados.

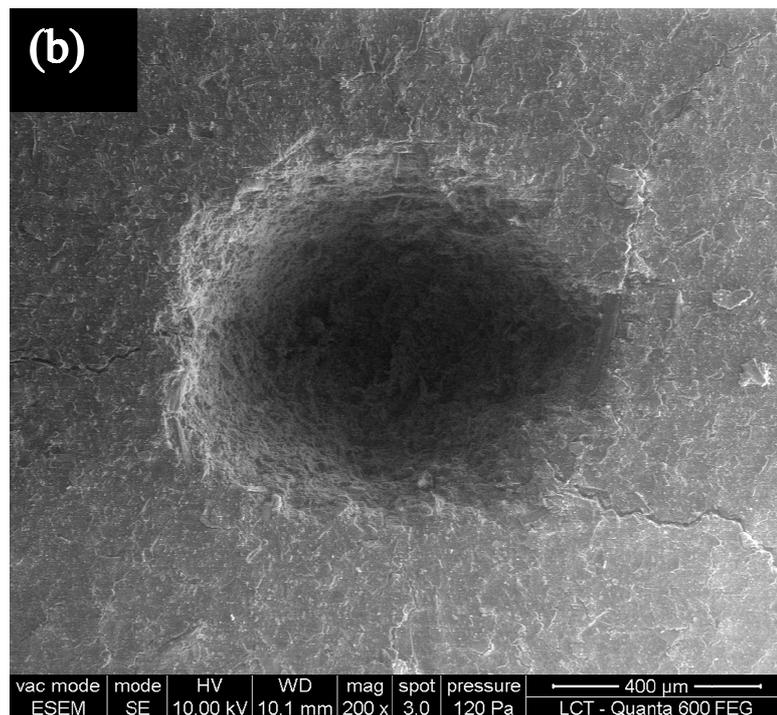
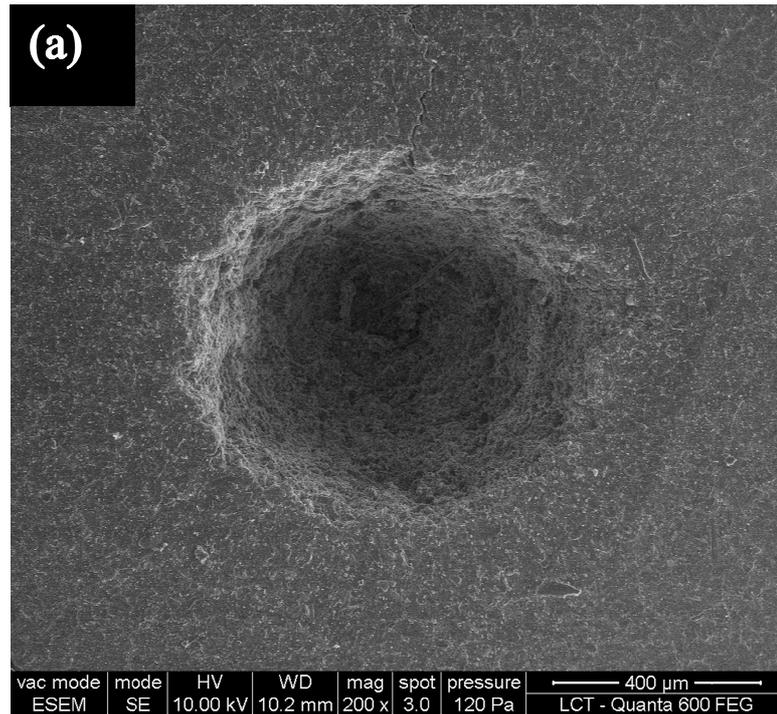


Figura 5.38 - Microscopia eletrônica de varredura de crateras formadas em pastilhas de boldo preparadas após moagem com bolas durante (a) 120 e (b) 60 min. Ablação com 20 pulsos (10Hz) de 25 J cm^{-2} . Magnificação: 200x

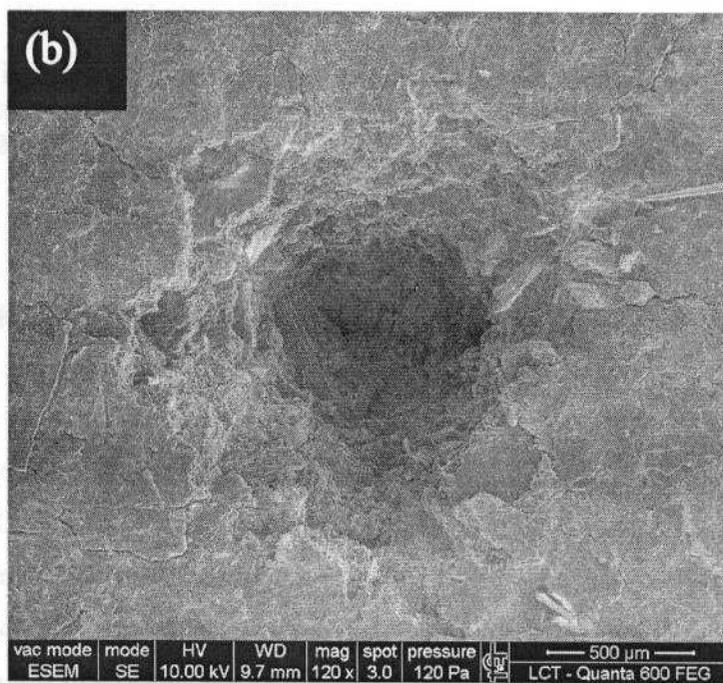
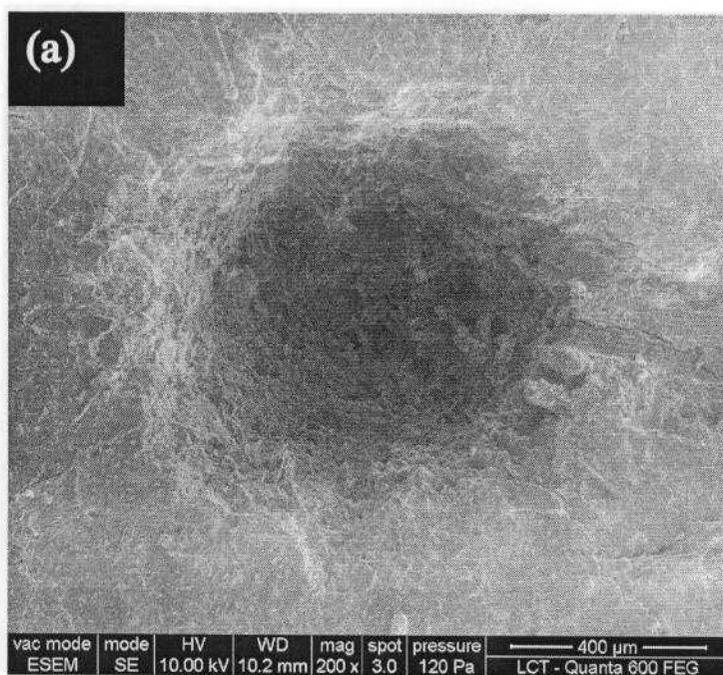


Figura 5.39 - Microscopia eletrônica de varredura de crateras formadas em pastilhas de boldo preparadas após moagem com bolas durante (a) 30 e (b) 20 min. Ablação com 20 pulsos (10Hz) de 25 J cm^{-2} . Magnificação: 200x

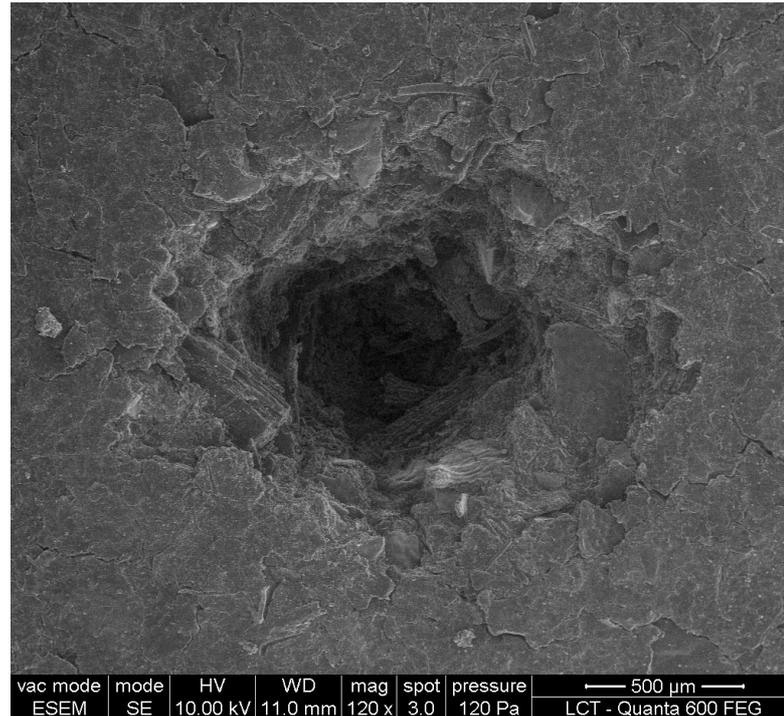


Figura 5.40 - Microscopia eletrônica de varredura de cratera formada em pastilha de boldo preparada após moagem com bolas durante 10 min. Ablação com 20 pulsos (10Hz) de 25 J cm⁻². Magnificação: 200x

5.4 Efeito da fluência nas curvas de calibração

As Figuras 5.41 a 5.43 mostram as curvas de calibração de Mg, P, B, Fe, Mn e Zn preparadas com CRMs de origem vegetal utilizando 25 e 50 J cm⁻². De maneira geral, os resultados indicaram que as intensidades de emissão, obtidas com as duas condições de fluência, apresentaram correlação satisfatória com os valores de frações de massa certificados.

Os resultados indicaram que o CV das medidas de Mn e Zn foi dependente da fluência. Menores CVs foram observados quando os CRMs foram analisados com 50 J cm⁻². Não foram observadas diferenças significativas na precisão das medidas de Mg, P, B e Fe. Isto é um indicativo de que os elementos Mg, P, B e Fe estão homogeneamente distribuídos nos CRMs para massas amostradas da ordem de 100 a 150 μg. Não foram observadas diferenças nos coeficientes de correlação das curvas de calibração obtidas com 25 e 50 J cm⁻².

Nas Figuras 5.41 a 5.43, as barras horizontais, referentes aos valores do eixo das

abscissas, correspondem às incertezas dos valores certificados ao nível de 95 % de confiança. As incertezas dos valores certificados variam de 1,8 a 16 % e as propriedades são certificadas para porções amostradas entre 100 e 250 mg. As barras verticais, referentes aos valores determinados por LIBS, correspondem a ± 1 desvio-padrão ($n = 30$ pontos de amostragem).

Os resultados indicaram que as curvas de calibração obtidas usando 50 J cm^{-2} apresentaram coeficientes angulares maiores do que os observados nas curvas de calibração usando 25 J cm^{-2} (Figuras 5.41 a 5.43). Segundo Cremers & Radziemski,⁵⁴ o aumento do coeficiente angular em função do aumento da energia do pulso é devido ao aumento de massa ablada e, conseqüentemente, aumento do número de espécies excitadas no plasma induzido por laser. Além disso, segundo os autores, o aumento do tamanho e temperatura do plasma com o aumento da energia do laser resulta em maior poder de excitação das espécies. Outros fatores que afetam o coeficiente angular das curvas de calibração em LIBS são a pressão atmosférica do local de ablação e o tamanho das partículas, sendo que o abaixamento da pressão e a diminuição do tamanho das partículas aumenta o coeficiente angular das curvas de calibração.^{54, 55}

A variação dos valores de fração de massa nos CRMs não foi apropriada para a construção das curvas de calibração de Ca. Os valores certificados agrupam-se em 2 conjuntos: o primeiro com 2 dados entre $0,25 \pm 0,01$ e $0,49 \pm 0,03 \text{ \% m/m}$, e o segundo com 3 dados entre $1,53 \pm 0,02$ e $1,56 \pm 0,02 \text{ \% m/m}$. Na prática, a construção de uma curva de calibração com esses CRMs resultaria em uma função definida por apenas 2 ou 3 padrões. Uma forma de contornar essa dificuldade seria misturar apropriadamente os CRMs com o objetivo de produzir padrões com frações de massa intermediárias.

Por outro lado, embora os CRMs analisados neste trabalho também apresentem propriedades certificadas para Al e Cu, não foram observadas correlações satisfatórias entre as frações de massa e os respectivos sinais de emissão obtidos com 25 e 50 J cm^{-2} . Deve-se ressaltar que existe uma pequena variação entre as frações de massa de Cu no conjunto de CRMs, de $2,8 \pm 0,2$ a $12,2 \pm 0,6 \text{ mg kg}^{-1}$, cujas incertezas são relativamente altas. Possivelmente, a inclusão do CRM BRC 60 ($51,2 \pm 1,9 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Cu}$) e misturas, em diferentes proporções, com os CRMs utilizados pudessem contornar esta dificuldade, mas esta estratégia não foi experimentada. Para Al, deve-se considerar a hipótese de contaminação uma vez que a concentração deste elemento em poeiras geológicas, por exemplo, pode atingir 3 mg g^{-1} .¹⁰⁶ No caso do Fe, a correlação pouco satisfatória também pode estar relacionada com contaminação.

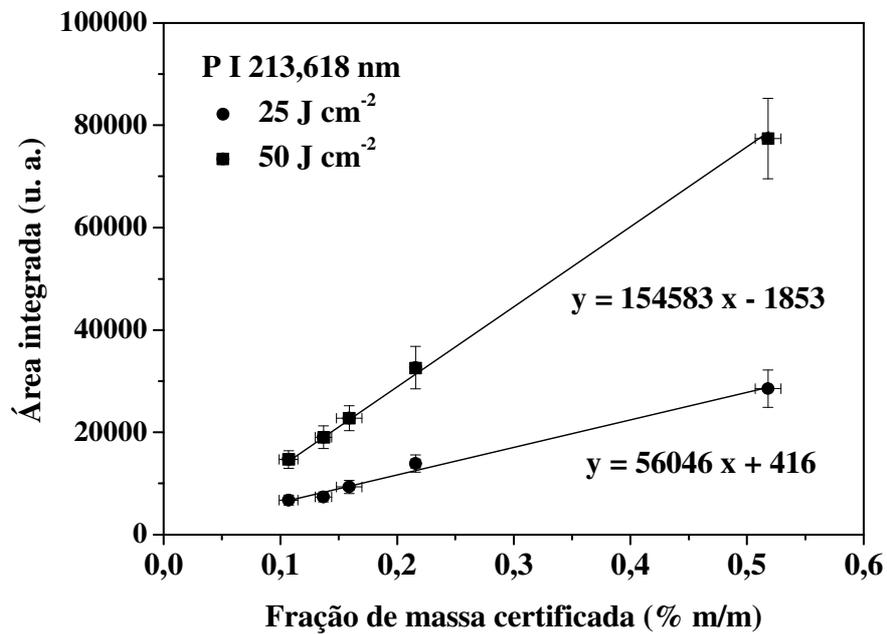
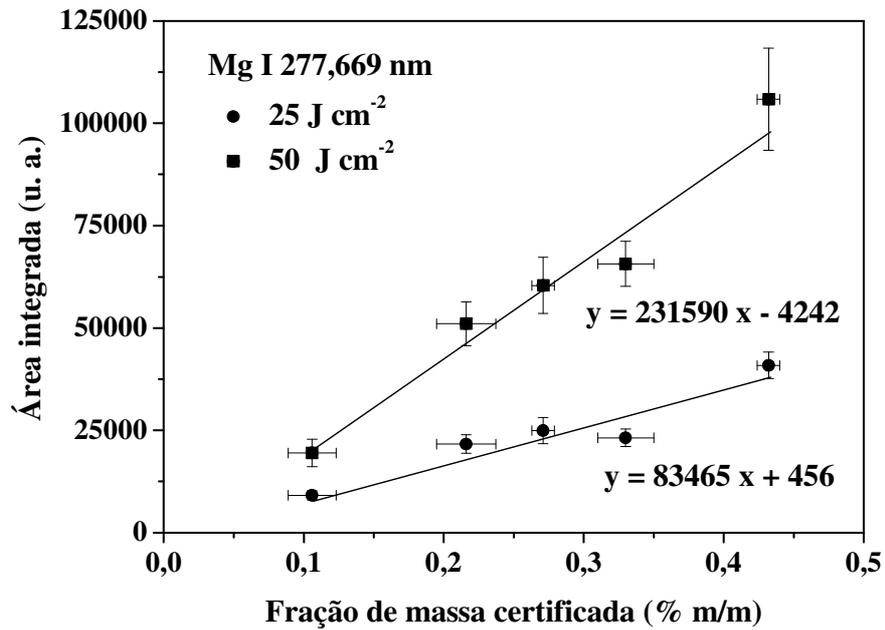


Figura 5.41 - Curvas de calibração para Mg I 277,669 nm e P I 213,618 nm construídas com CRMs aplicando-se 20 pulsos de 25 e 50 J cm⁻². As barras de erro horizontais correspondem às incertezas dos valores certificados (95 % de confiança). As barras de erro verticais correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 30 crateras).

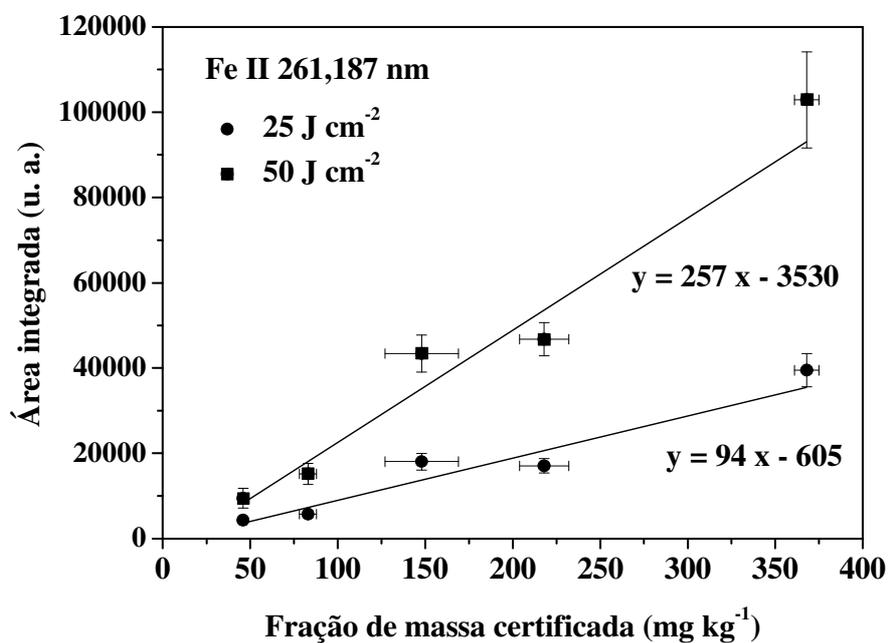
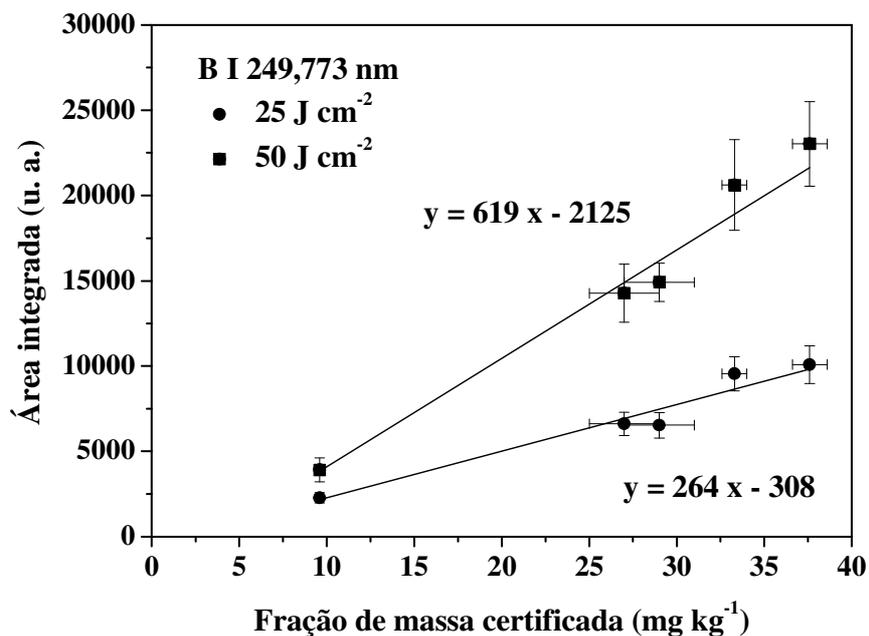


Figura 5.42 - Curvas de calibração para B I 249,773 nm e Fe II 261,187 nm construídas com CRMs aplicando-se 20 pulsos de 25 e 50 J cm⁻². As barras de erro horizontais correspondem às incertezas dos valores certificados (95 % de confiança). As barras de erro verticais correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 30 crateras).

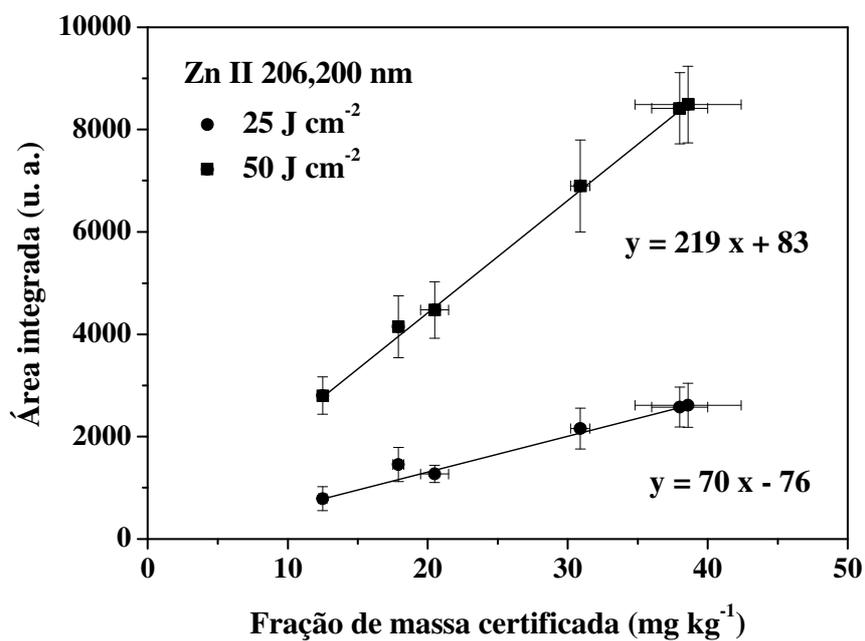
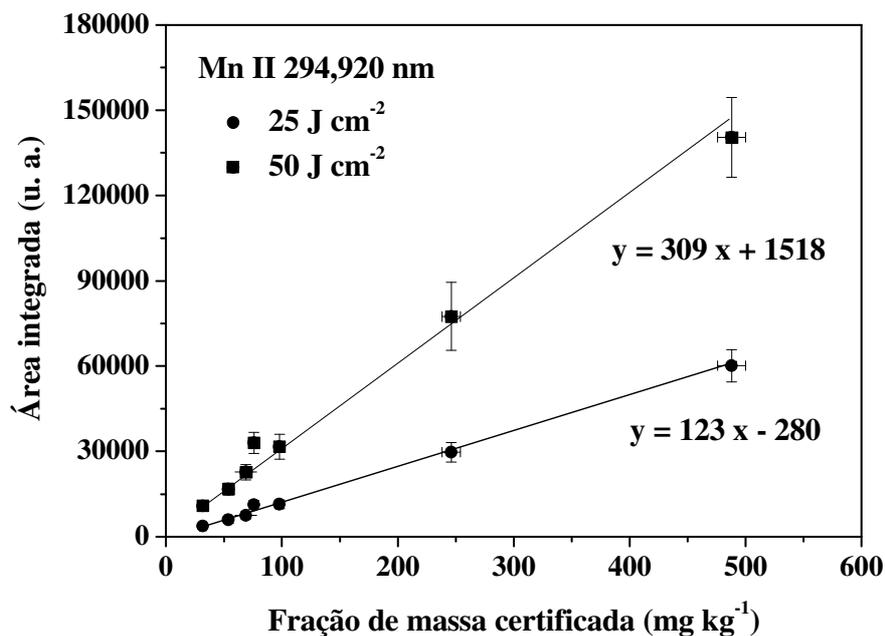


Figura 5.43 - Curvas de calibração para Mn II 294,920 nm e Zn II 206,200 nm construídas com CRMs aplicando-se 20 pulsos de 25 e 50 J cm⁻². As barras de erro horizontais correspondem às incertezas dos valores certificados (95 % de confiança). As barras de erro verticais correspondem a ± 1 desvio-padrão ($n = 30$ crateras).

Para as determinações de fósforo usando as linhas P I 213,618 nm e P I 214,914 nm não se observou saturação do detector ICCD para frações de massa acima de 0,6 % m/m, mas verificou-se perda de linearidade acima deste valor, devido ao alargamento das linhas provocado, principalmente, por efeitos de auto-absorção.⁵⁴ Para as determinações de magnésio, verificou-se saturação do detector na linha de emissão Mg I 277,983 nm para concentrações acima de 0,5 % m/m. Para este elemento não foi possível utilizar as linhas de emissão mais intensas (*e.g.* Mg II 279, 553, Mg II 280,271 nm e Mg I 285,213 nm). Da mesma forma, para as determinações de Ca, não foi possível o uso das linhas iônicas 325,887; 317,933; 393,366 e 396,847 nm para ambas as fluências estudadas. Neste caso, melhores resultados foram observados com Ca I 442,544 nm. Efeitos de auto-absorção foram verificados na análise do NIST 1573a ($5,05 \pm 0,09$ % Ca) com 25 e 50 J cm⁻².

De maneira geral, recomenda-se utilizar 25 J cm⁻² para a determinação de Ca e Mg em pastilhas de tecidos foliares para evitar que as linhas mais intensas saturam o ICCD. Deve-se ressaltar a necessidade de instrumentação mais apropriada que permita ajustar as condições de medida dos detectores, independentemente para cada região de comprimentos de onda. Assim, seria possível, por exemplo, selecionar diferentes ampliações (*i.e.* alterações no ganho do detector) para a determinação de cada elemento. Além disso, a possibilidade de selecionar o número de pulsos para cada região de comprimento de onda seria uma estratégia interessante para evitar a saturação do detector nas determinações de Ca e Mg, por exemplo.

Para as determinações de B, recomenda-se utilizar a linha atômica 249,773 nm. Para a linha B I 249,677 nm os sinais de emissão são muito baixos e próximos do ruído, dificultando a determinação deste elemento em concentrações inferiores a 10 mg kg⁻¹ B. Para as determinações de Fe observou-se que a linha Fe II 259,940 nm apresentou sinais de emissão muito intensos. No entanto, as determinações de Fe em tecidos vegetais não foram feitas com esta linha devido à saturação do ICCD para concentrações maiores que 148 mg kg⁻¹ Fe. Observou-se, também, saturação das linhas iônicas de emissão do Mn em 257,610 e 259,373 nm para a pastilha de NIST 1575a (488 ± 12 mg kg⁻¹ Mn) analisada com 50 J cm⁻². Neste caso, pode-se usar a linha Mn II 294,920 nm, cuja curva de calibração foi linear até, pelo menos, essa concentração.

De maneira geral, não foram observadas diferenças significativas nos LODs obtidos com 25 e 50 J cm⁻². No entanto, a condição de 50 J cm⁻² resultou em maior sensibilidade analítica (*i.e.* maiores coeficientes angulares). Considerando a faixa de concentração dos macro e micronutrientes em materiais vegetais de interesse agrônômico (Tabela 2.1), os resultados indicaram que os LODs, obtidos com as duas fluências estudadas, foram

apropriados para a determinação destes analitos em tecidos foliares (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 - Limites de detecção (LOD; $\sigma = 3,3s$) para macro (Ca, Mg e P) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn) nos comprimentos de onda utilizados neste trabalho, aplicando-se 20 pulsos de 25 e 50 J cm⁻²

Elemento*		25 J cm ⁻²	50 J cm ⁻²
Mg I 277,669	% m/m	0,01	0,02
P I 213,618	% m/m	0,004	0,003
B I 249,773	mg kg ⁻¹	1,0	1,3
Cu I 342,755	mg kg ⁻¹	0,8	0,9
Fe II 259,940	mg kg ⁻¹	1,2	**
Fe II 261,187	mg kg ⁻¹	1,6	1,7
Mn II 257,610	mg kg ⁻¹	0,9	0,8
Mn II 294,920	mg kg ⁻¹	1,5	6,2
Zn II 206,200	mg kg ⁻¹	1,9	1,0
Zn I 213,855	mg kg ⁻¹	2,6	1,6

* I = linha de emissão atômica; II = linha de emissão iônica.

** saturação do detector.

A faixa linear de trabalho é um item da validação de um método analítico que informa a faixa de concentração para a qual o método apresenta desempenho apropriado, i.e., a faixa de concentração onde a função matemática de calibração, para uma dada incerteza analítica, é linear. O valor mínimo da faixa linear de trabalho é definido pelo limite de quantificação do método, e o valor máximo é o ponto da função de calibração onde a resposta analítica deixa de ser proporcional à concentração do material.⁹¹ No caso de LIBS, os resultados indicaram que a faixa linear de trabalho é dependente da fluência do laser. Para os elementos presentes em concentrações menores como o Zn, por exemplo, a detectabilidade é favorecida em fluências mais altas, *e.g.* 50 J cm⁻² (Figura 5.44). Embora fluências maiores possam resultar em maior emissão dos sinais de fundo, maiores SNRs foram obtidas nesta condição. Pode-se observar, também, que esse comportamento foi dependente da região de comprimento de onda do espectro eletromagnético (Figura 5.44), pois menor emissão de fundo foi observada entre 200 e 250 nm. As SNRs para Zn II 206,200 nm foram 51 e 123 com 25 e 50 J cm⁻², respectivamente. Para Cu I 324,755 nm as SNRs foram 20 e 23 com 25 e 50 J cm⁻², respectivamente.

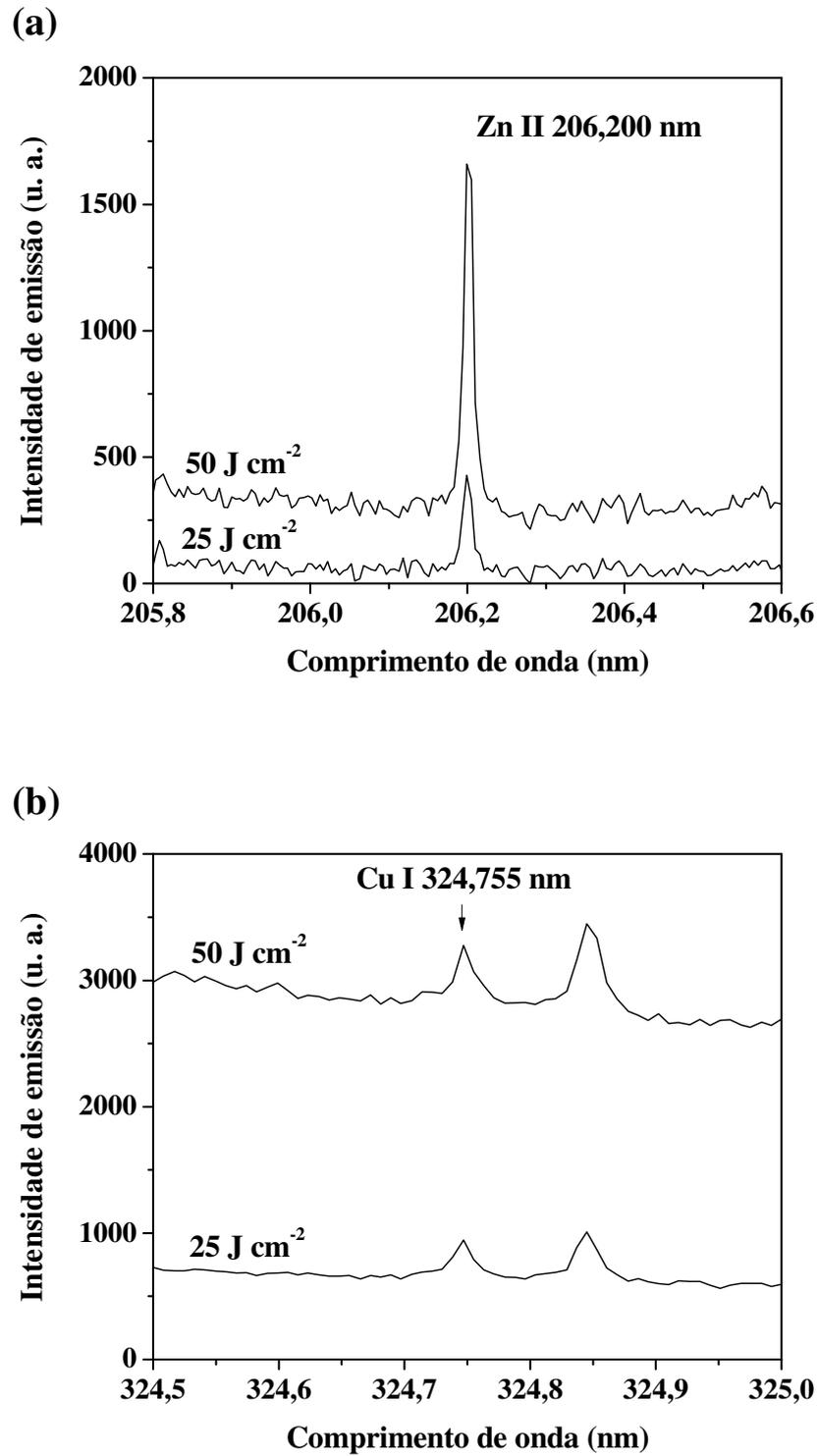


Figura 5.44 - Fragmentos do espectro de emissão de pastilha de boldo com os sinais líquidos de emissão de Zn II 206,200 nm e Cu I 324,755 nm aplicando-se 20 pulsos de 25 e 50 J cm⁻². (a) NIST 1515 (12,5 ± 0,3 mg kg⁻¹ Zn); (b) NIST 1575a (2,8 ± 0,2 mg kg⁻¹ Cu)

No caso dos elementos presentes em concentrações mais elevadas, como Ca e Mg, e para os elementos cujas linhas de emissão são bastante intensas, como é o caso das linhas de primeira ionização do Fe (259,940 nm) e do Mn (257,610 nm), por exemplo, verifica-se saturação do ICCD com 50 J cm^{-2} . Neste caso, o uso fluências menores (*e.g.* 25 J cm^{-2}) pode aumentar a faixa linear de calibração. Este é um aspecto que deve ser levado em consideração, pois lasers de baixa energia (*e.g.* 120 mJ por pulso) são de menor custo quando comparados aos de média-alta energia (*e.g.* 360 mJ por pulso).

6 CONCLUSÃO

Os resultados indicaram que existe uma condição de fluência e diâmetro de focalização do laser que concorre para um melhor desempenho analítico, i.e., maior sensibilidade e menor CV das medidas. Os melhores resultados foram obtidos com 750 μm de focalização e 50 J cm^{-2} . Demonstrou-se que, nestas condições, um processo mais representativo de amostragem assistido por ablação com laser pode ser estabelecido, resultando em CV menores que 15 % (n=30 carteras, 20 pulsos por cratera, 10 Hz).

Com relação ao tamanho das partículas, observou-se que pastilhas preparadas com partículas $> 75 \mu\text{m}$ mostraram-se pouco coesas, e que as crateras produzidas após a ablação foram pouco uniformes. Nesta condição, a análise desses materiais resultou em CV geralmente maiores que 15 %.

Por outro lado, quando as pastilhas foram preparadas com partículas $< 75 \mu\text{m}$, houve uma melhora de aproximadamente 2 vezes no CV das medidas. Quando se compararam as frações < 20 , entre 20 e 53 e entre 53 e 75 μm não foram observadas diferenças significativas nas intensidades dos sinais de emissão e na repetibilidade das medidas para a maioria dos analitos. Assim, em princípio, a estratégia de moagem mais apropriada para a produção de pastilhas de folhas deve se basear na cominuição de partículas para tamanhos $< 75 \mu\text{m}$.

De maneira geral, as curvas de calibração com CRMs apresentaram correlações satisfatórias entre os sinais de emissão e as frações de massa certificadas. O uso de fluências maiores resultou em curvas de calibração com maiores coeficientes angulares (maior sensibilidade). No entanto, não foram observadas diferenças significativas nos coeficientes de correlação das curvas de calibração e nos valores de LOD obtidos com 25 e 50 J cm^{-2} . Os LOD foram apropriados para a determinações de macronutrientes (Ca, Mg e P) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn) em tecidos foliares.

REFERÊNCIAS

1. KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras** - Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. Piracicaba: Copiadora Luiz de Queiroz, 2008.
2. NOMURA, C. S.; DA SILVA, C. S.; OLIVEIRA, P. V. Solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry: A review. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, p. 104-113, 2008.
3. CREMERS, D. A.; CHINNI, R. C. Laser-induced breakdown spectroscopy-capabilities and limitations. **Applied Spectroscopy Reviews**, New York, v. 44, p. 457-506, 2009.
4. BRAGA, J. W. B.; TREVIZAN, L. C.; NUNES, L. C.; RUFINI, I. A.; SANTOS, D.; KRUG, F. J. Comparison of univariate and multivariate calibration for the determination of micronutrients in pellets of plant materials by laser induced breakdown spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 65, p. 66-74, 2010.
5. NUNES, L. C.; BRAGA, J. W. B.; TREVIZAN, L. C.; DE SOUZA, P. F.; DE CARVALHO, G. G. A.; SANTOS, D.; POPPI, R. J.; KRUG, F. J. Optimization and validation of a LIBS method for the determination of macro and micronutrients in sugar cane leaves. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 25, p. 1453-1460, 2010.
6. NUNES, L. C.; DA SILVA, G. A.; TREVIZAN, L. C.; SANTOS JÚNIOR, D.; POPPI, R. J.; KRUG, F. J. Simultaneous optimization by neuro-genetic approach for analysis of plant materials by laser induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 64, p. 565-572, 2009.
7. TREVIZAN, L. C.; SANTOS JUNIOR, D.; SAMAD, R. E.; VIEIRA JUNIOR, N. D.; NOMURA, C. S.; NUNES, L. C.; RUFINI, I. A.; KRUG, F. J. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for the determination of macronutrients in plant materials. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 63, p. 1151-1158, 2008.
8. TREVIZAN, L. C.; SANTOS JUNIOR, D.; SAMAD, R. E.; VIEIRA JUNIOR, N. D.; NUNES, L. C.; RUFINI, I. A.; KRUG, F. J. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for the determination of micronutrients in plant materials. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 64, p. 369-377, 2009.
9. MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006.
10. LAPORTE, J.; KOVACSIK, G.; PINTA, M. Milieu végétal. In: PINTA, M. **Spectrométrie d'absorption atomique**. 2. ed. Paris: Masson, 1980.
11. MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. **Principles of plant nutrition**. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 2001.
12. ARAÚJO, G. C. L.; GONZALEZ, M. H.; FERREIRA, A. G.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion

of plant materials. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 57, p. 2121-2132, 2002.

13. ANDERSON, R. **Sample pretreatment and separation**. Chichester: John Wiley, 1991.

14. KRUG, F. J.; BERGAMIM FILHO, H.; ZAGATTO, E. A. G.; JØRGENSEN, S. S. Rapid determination of sulphate in natural waters and plant digests by continuous flow injection turbidimetry. **Analyst**, London, v. 102, p. 503-508, 1977.

15. FLORES, E. M. M.; KRUG, F. J.; BARIN, J. S.; ARRUDA, M. A. Z. Decomposição de materiais orgânicos por via úmida. In: KRUG, F. J. (Ed.). **Métodos de preparo de amostras - Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1. ed. Piracicaba: Copiadora Luiz de Queiroz, 2008.

16. NOGUEIRA, A. R. A.; MORARES, D. P.; FLORES, É. M. M.; KRUG, F. J.; KNAPP, G.; NÓBREGA, J. A.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F. Decomposições assistidas por radiação microondas. In: KRUG, F. J. (Ed.). **Métodos de preparo de amostras - Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1. ed. Piracicaba: Copiadora Luiz de Queiroz, 2008.

17. KRACHLER, M.; RADNER, H.; IRGOLIC, K. J. Microwave digestion methods for the determination of trace elements in brain and liver samples by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 355, p. 120-128, 1996.

18. MILESTONE HELPING CHEMISTS. **UltraClave**. The next generation microwave digestion system. Sorisole, Italy, 2010. 6 p. Disponível em: <http://www.gomensoro.net/documentos/milestone/flippingbook/UltraCLAVE.pdf>. Acesso em: 20 nov.2010.

19. KRUG, F. J.; SANTOS JUNIOR, D. Erros sistemáticos no preparo das amostras. In: KRUG, F. J. (Ed.). **Métodos de preparo de amostras - Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1. ed. Piracicaba: Copiadora Luiz de Queiroz, 2008.

20. KORN, M. D. A.; MORTE, E. S. D.; DOS SANTOS, D.; CASTRO, J. T.; BARBOSA, J. T. P.; TEIXEIRA, A. P.; FERNANDES, A. P.; WELZ, B.; DOS SANTOS, W. P. C.; DOS SANTOS, E.; KORN, M. Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods - A review. **Applied Spectroscopy Reviews**, New York, v. 43, p. 67-92, 2008.

21. TREVIZAN, L. C.; NOBREGA, J. A. Inductively coupled plasma optical emission Spectrometry with axially viewed configuration: an overview of applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 18, p. 678-690, 2007.

22. BRENNER, I. B.; ZANDER, A. T. Axially and radially viewed inductively coupled plasmas - a critical review. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 55, p. 1195-1240, 2000.

23. REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G.; JACINTHO, A. O.; KRUG, F. J.; BERGAMIN F, H. Merging zones in flow injection analysis : Part 4. Simultaneous spectrophotometric determination of total nitrogen and phosphorus in plant material. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 119, p. 305-311, 1980.
24. KRUG, F. J.; MORTATTI, J.; PESSENDA, L. C. R.; ZAGATTO, E. A. G.; BERGAMIN, H. Flow injection spectrophotometric determination of boron in plant material with azomethine-H. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 125, p. 29-35, 1981.
25. NOMURA, C. S.; OLIVEIRA, P. V. Análise direta de sólidos. In: KRUG, F. J. (Ed.). **Métodos de preparo de amostras - Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1. ed. Piracicaba: Copiadora Luiz de Queiroz, 2008.
26. RESANO, M.; VANHAECKE, F.; DE LOOS-VOLLEBREGT, M. T. C. Electrothermal vaporization for sample introduction in atomic absorption, atomic emission and plasma mass spectrometry-a critical review with focus on solid sampling and slurry analysis. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 23, p. 1450-1475, 2008.
27. GALIOVÁ, M.; KAISER, J.; NOVOTNÝ, K.; SAMEK, O.; REALE, L.; MALINA, R.; PÁLENÍKOVÁ, K.; LISKA, M.; CUDEK, V.; KANICKÝ, V.; OTRUBA, V.; POMA, A.; TUCCI, A. Utilization of laser induced breakdown spectroscopy for investigation of the metal accumulation in vegetal tissues. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 62, p. 1597-1605, 2007.
28. PAUWELS, J.; HOFMANN, C.; VANDECASTEELE, C. On the usefulness of SS-ZAAS for the microhomogeneity control of CRM's. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 348, p. 418-421, 1994.
29. ROSSBACH, M.; ZEILLER, E. Assessment of element-specific homogeneity in reference materials using microanalytical techniques. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 377, p. 334-339, 2003.
30. SANTOS, D.; SAMAD, R. E.; TREVIZAN, L. C.; DE FREITAS, A. Z.; VIEIRA, N. D.; KRUG, F. J. Evaluation of femtosecond laser-induced breakdown spectroscopy for analysis of animal tissues. **Applied Spectroscopy**, Bound Brook, v. 62, p. 1137-1143, 2008.
31. SANTOS, D.; BARBOSA; BARBOSA, F.; TOMAZELLI; TOMAZELLI, A.; KRUG; KRUG, F.; NÓBREGA; NÓBREGA, J.; ARRUDA; ARRUDA, M. Determination of Cd and Pb in food slurries by GFAAS using cryogenic grinding for sample preparation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 373, p. 183-189, 2002.
32. KAISER, J.; GALIOVÁ, M.; NOVOTNÝ, K.; CERVENKA, R.; REALE, L.; NOVOTNÝ, J.; LISKA, M.; SAMEK, O.; KANICKÝ, V.; HRDLICKA, A.; STEJSKAL, K.; ADAM, V.; KIZEK, R. Mapping of lead, magnesium and copper accumulation in plant tissues by laser-induced breakdown spectroscopy and laser-ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 64, p. 67-73, 2009.
33. HOFFMANN, E.; LÜDKE, C.; SKOLE, J.; STEPHANOWITZ, H.; ULLRICH, E.; COLDITZ, D. Spatial determination of elements in green leaves of oak trees (*Quercus robur*)

by laser ablation-ICP-MS. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 367, p. 579-585, 2000.

34. HOLA, M.; KRASENSKY, P.; OTRUBA, V.; KANICKY, V. UV and IR laser ablation study of natural organic powdered materials - an example: ICP-OES with laser ablation of spiked infant formula cast pellets. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 21, p. 974-977, 2006.

35. MASSON, P.; DAUTHIEU, M.; TROLARD, F.; DENAIX, L. Application of direct solid analysis of plant samples by electrothermal vaporization-inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: Determination of Cd and Si for environmental purposes. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 62, p. 224-230, 2007.

36. CARVALHO, G. G. A.; NUNES, L. C.; DE SOUZA, P. F.; KRUG, F. J.; ALEGRE, T. C.; SANTOS JUNIOR, D. Evaluation of laser induced breakdown spectrometry for the determination of macro and micronutrients in pharmaceutical tablets. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 25, p. 803-809, 2010.

37. HUANG, M. D.; KRIVAN, V. A direct solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry method for the determination of silicon in biological materials. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 62, p. 297-303, 2007.

38. MARGUÍ, E.; QUERALT, I.; HIDALGO, M. Application of X-ray fluorescence spectrometry to determination and quantitation of metals in vegetal material. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 28, p. 362-372, 2009.

39. GEELHOED, B.; GLASS, H. J. Comparison of theories for the variance caused by the sampling of random mixtures of non-identical particles. **Geostandards and Geoanalytical Research**, Vandoeuvre-lès-Nancy, v. 28, p. 263-276, 2004.

40. KURFÜRST, U. Potential relevance of imprecise data from solid sample analysis with graphite furnace AAS. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 346, p. 556-559, 1993.

41. ROSSBACH, M.; OSTAPCZUK, P.; EMONS, H. Microhomogeneity of candidate reference materials: Comparison of solid sampling Zeeman-AAS with INAA. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 360, p. 380-383, 1998.

42. STOEPLER, M.; WOLF, W. R.; JENKS, P. **Reference materials for chemical analysis - Certification, availability, and proper usage**. Weinheim: Wiley-VCH, 2001.

43. ZEISLER, R. Reference materials for small-sample analysis. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 360, p. 376-379, 1998.

44. FAJGELJ, A.; ZEISLER, R. Particle size determination of some IAEA and NIST environmental and biological reference materials. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 360, p. 442-445, 1998.

45. PAUWELS, J.; VANDECASTEELE, C. Determination of the minimum sample mass of a solid CRM to be used in chemical analysis **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 345, p. 121-123, 1993.
46. KURFÜRST, U. Characteristics of solid sampling using the graphite furnace. In: _____. **Solid sample analysis - Direct and slurry sampling using GF-AAS and ETV-ICP**. Berlin: Springer, 1998.
47. BYRNE, A. R.; HEINZ-GROBECKER, K.; ISENGARD, H.-D.; KUCERA, J.; PAUWELS, J.; RÜCKOLD, S.; STOEPLER, M. Control of material properties. In: STOEPLER, M.; WOLF W. R.; JENKS, P. **Reference materials for chemical analysis - Certification, Availability, and Proper Usage**. Weinheim: Wiley-VCH, 2001.
48. MARKERT, B. Sample preparation (cleaning, drying, homogenization) for trace element analysis in plant matrices. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 176, p. 45-61, 1995.
49. ARROYO, L.; TREJOS, T.; GARDINALI, P. R.; ALMIRALL, J. R. Optimization and validation of a Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry method for the routine analysis of soils and sediments. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 64, p. 16-25, 2009.
50. ROSSBACH, M.; ZEISLER, R. Certified Reference Materials for Microanalytical Methods. In: STOEPLER, M.; WOLF W. R.; JENKS, P. **Reference materials for chemical analysis - Certification, availability, and proper usage**. Weinheim: Wiley-VCH, 2001.
51. WINEFORDNER, J. D.; GORNUSHKIN, I. B.; CORRELL, T.; GIBB, E.; SMITH, B. W.; OMENETTO, N. Comparing several atomic spectrometric methods to the super stars: special emphasis on laser induced breakdown spectrometry, LIBS, a future super star. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 19, p. 1061-1083, 2004.
52. SANTOS JUNIOR, D.; KRUG, F. J.; TARELHO, L. V. G.; VIEIRA JUNIOR, N. D.; MILORI, D. M. B. P.; MARTIN NETO, L. Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) - Fundamentos, aplicações e perspectivas. **Analytica**, São Paulo, v. 24, p. 72-81, 2006.
53. RADZIEMSKI, L. J. From LASER to LIBS, the path of technology development. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 57, p. 1109-1113, 2002.
54. CREMERS, D. A.; RADZIEMSKI, L. J. **Handbook of laser-induced breakdown spectroscopy**. Chichester: John Wiley & Sons, 2006.
55. MIZIOLEK, A. W.; PALLESCHI, V.; SCHECHTER, I. **Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) - Fundamentals and applications**. New York: Cambridge University Press, 2006.
56. PASQUINI, C.; CORTEZ, J.; SILVA, L. M. C.; GONZAGA, F. B. Laser induced breakdown spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 18, p. 463-512, 2007.

57. RUSSO, R. E.; MAO, X. L.; MAO, S. S. The physics of laser ablation in microchemical analysis. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 74, p. 70A-77A, 2002.
58. VADILLO, J. M.; ROMERO, J. M. F.; RODRÍGUEZ, C.; LASERNA, J. J. Effect of plasma shielding on laser ablation rate of pure metals at reduced pressure. **Surface and Interface Analysis**, New York, v. 27, p. 1009-1015, 1999.
59. SIRVEN, J. B.; MAUCHIEN, P.; SALLÉ, B. Analytical optimization of some parameters of a Laser-Induced Breakdown Spectroscopy experiment. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 63, p. 1077-1084, 2008.
60. STAVROPOULOS, P.; PALAGAS, C.; ANGELOPOULOS, G. N.; PAPAMANTELOS, D. N.; COURIS, S. Calibration Measurements in laser-induced breakdown spectroscopy using nanosecond and picosecond lasers. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 59, p. 1885-1892, 2004.
61. TOGNONI, E.; PALLESCHI, V.; CORSI, M.; CRISTOFORETTI, G. Quantitative micro-analysis by laser-induced breakdown spectroscopy: a review of the experimental approaches. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 57, p. 1115-1130, 2002.
62. RUSSO, R. E. Laser-ablation. **Applied Spectroscopy**, Bound Brook, v. 49, p. A14-A28, 1995.
63. RUSSO, R. E.; MAO, X.; LIU, H.; GONZALEZ, J.; MAO, S. S. Laser ablation in analytical chemistry--a review. **Talanta**, London, v. 57, p. 425-451, 2002.
64. GODOI, Q.; SANTOS JUNIOR, D.; NUNES, L. C.; LEME, F. O.; RUFINI, I. A.; AGNELLI, J. A. M.; TREVIZAN, L. C.; KRUG, F. J. Preliminary studies of laser-induced breakdown spectrometry for the determination of Ba, Cd, Cr and Pb in toys. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 64, p. 573-581, 2009.
65. SANTOS JUNIOR, D.; NUNES, L. C.; TREVIZAN, L. C.; GODOI, Q.; LEME, F. O.; BRAGA, J. W. B.; KRUG, F. J. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for cadmium determination in soils. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 64, p. 1073-1078, 2009.
66. FANTONI, R.; CANEVE, L.; COLAO, F.; FORNARINI, L.; LAZIC, V.; SPIZZICHINO, V. Methodologies for laboratory Laser Induced Breakdown Spectroscopy semi-quantitative and quantitative analysis-A review. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 63, p. 1097-1108, 2008.
67. EVANS, E. H.; DAY, J. A.; PALMER, C. D.; SMITH, C. M. M. Atomic Spectrometry Update. Advances in atomic spectrometry and related techniques. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 24, p. 711-733, 2009.
68. GOTTFRIED, J. L.; HARMON, R. S.; DE LUCIA, F. C.; MIZIOLEK, A. W. Multivariate analysis of laser-induced breakdown spectroscopy chemical signatures for geomaterial classification. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 64, p. 1009-1019, 2009.

69. YAO, S. C.; LU, J. D.; LI, J. Y.; CHEN, K.; LI, J.; DONG, M. R. Multi-elemental analysis of fertilizer using laser-induced breakdown spectroscopy coupled with partial least squares regression. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 25, p. 1733-1738, 2010.
70. SVANBERG, S. Laser based diagnostics - From cultural heritage to human health. **Applied Physics B - Lasers and Optics**, Heidelberg, v. 92, p. 351-358, 2008.
71. LAZIC, V.; PALUCCI, A.; JOVICEVIC, S.; POGGI, C.; BUONO, E. Analysis of explosive and other organic residues by laser induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 64, p. 1028-1039, 2009.
72. BURAKOV, V. S.; TARASENKO, N. V.; NEDELKO, M. I.; KONONOV, V. A.; VASILEV, N. N.; ISAKOV, S. N. Analysis of lead and sulfur in environmental samples by double pulse laser induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 64, p. 141-146, 2009.
73. KUMAR, A.; YUEH, F. Y.; SINGH, J. P.; BURGESS, S. Characterization of malignant tissue cells by laser-induced breakdown spectroscopy. **Applied Optics**, Easton, v. 43, p. 5399-5403, 2004.
74. SUN, Q.; TRAN, M.; SMITH, B. W.; WINEFORDNER, J. D. Direct determination of P, Al, Ca, Cu, Mn, Zn, Mg and Fe in plant materials by laser-induced plasma spectroscopy. **Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy**, Quebec, v. 44, p. 164-170, 1999.
75. ASSION, A.; WOLLENHAUPT, M.; HAAG, L.; MAYOROV, F.; SARPE-TUDORAN, C.; WINTER, M.; KUTSCHERA, U.; BAUMERT, T. Femtosecond laser-induced-breakdown spectrometry for Ca²⁺ analysis of biological samples with high spatial resolution. **Applied Physics B - Lasers and Optics**, Heidelberg, v. 77, p. 391-397, 2003.
76. SAMEK, O.; LAMBERT, J.; HERGENRODER, R.; LISKA, M.; KAISER, J.; NOVOTNY, K.; KUKHLEVSKY, S. Femtosecond laser spectrochemical analysis of plant samples. **Laser Physics Letters**, Weinheim, v. 3, p. 21-25, 2006.
77. KAISER, J.; SAMEK, O.; REALE, L.; LISKA, M.; MALINA, R.; RITUCCI, A.; POMA, A.; TUCCI, A.; FLORA, F.; LAI, A.; MANCINI, L.; TROMBA, G.; ZANINI, F.; FAENOV, A.; PIKUZ, T.; CINQUE, G. Monitoring of the heavy-metal hyperaccumulation in vegetal tissues by X-ray radiography and by femto-second laser induced breakdown spectroscopy. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 70, p. 147-153, 2007.
78. POUZAR, M.; CERNOHORSKY, T.; PRUSOVA, M.; PROKOPCAKOVA, P.; KREJCOVA, A. LIBS analysis of crop plants. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 24, p. 953-957, 2009.
79. OHTA, T.; ITO, M.; KOTANI, T.; HATTORI, T. Emission enhancement of laser-induced breakdown spectroscopy by localized surface plasmon resonance for analyzing plant nutrients. **Applied Spectroscopy**, Bound Brook, v. 63, p. 555-558, 2009.

80. PEREIRA, F. M. V.; MILORI, D. M. B. P.; VENÂNCIO, A. L.; RUSSO, M. D. S. T.; MARTINS, P. K.; FREITAS-ASTÚA, J. Evaluation of the effects of *Candidatus Liberibacter asiaticus* on inoculated citrus plants using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) and chemometrics tools. **Talanta**, London, v. 83, p. 351-356, 2010.
81. SANTOS JUNIOR, D. **Moagem criogênica para o preparo de suspensões de alimentos visando à determinação de Cd, Cr, e Pb por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite**. 2001. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2001.
82. SANTOS, D.; BARBOSA, F.; DE SOUZA, S. S.; KRUG, F. J. Cryogenic sample grinding for copper, lead and manganese determination in human teeth by slurry sampling GFAAS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 18, p. 939-945, 2003.
83. MIO, H.; KANO, J.; SAITO, F.; KANEKO, K. Effects of rotational direction and rotation-to-revolution speed ratio in planetary ball milling. **Materials Science and Engineering A**, Lausanne, v. 332, p. 75-80, 2002.
84. MARQUES, A. P.; FREITAS, M. C.; WOLTERBEEK, H. T.; VERBURG, T. G.; DE GOEIJ, J. J. M. Grain-size effects on PIXE and INAA analysis of IAEA-336 lichen reference material. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, Woods Hole, v. 255, p. 380-394, 2007.
85. TRÄGER, F. **Springer handbook of lasers and optics**. New York: Springer, 2007.
86. BARNETT, C.; CAHOON, E.; ALMIRALL, J. R. Wavelength dependence on the elemental analysis of glass by Laser Induced Breakdown Spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 63, p. 1016-1023, 2008.
87. CAPITELLI, F.; COLAO, F.; PROVENZANO, M. R.; FANTONI, R.; BRUNETTI, G.; SENESI, N. Determination of heavy metals in soils by Laser Induced Breakdown Spectroscopy. **Geoderma**, Amsterdam, v. 106, p. 45-62, 2002.
88. SILVA, F. V.; TREVIZAN, L. C.; SILVA, C. S.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Evaluation of inductively coupled plasma optical emission spectrometers with axially and radially viewed configurations. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 57, p. 1905-1913, 2002.
89. TREVIZAN, L. C.; VIEIRA, E. C.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Use of factorial design for evaluation of plasma conditions and comparison of two liquid sample introduction systems for an axially viewed inductively coupled plasma optical emission spectrometer. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 60, p. 575-581, 2005.
90. HIBBERT, D. B.; GOODING, J. J. **Data analysis for chemistry - An introductory guide for students and laboratory scientists**. New York: Oxford University Press, 2006.

91. CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 67, n. 10, p. 1699-1723, 1995.
92. LI, J.; LU, J.; LIN, Z.; GONG, S.; XIE, C.; CHANG, L.; YANG, L.; LI, P. Effects of experimental parameters on elemental analysis of coal by laser-induced breakdown spectroscopy. **Optics & Laser Technology**, Guildford, v. 41, p. 907-913, 2009.
93. MULTARI, R. A.; FOSTER, L. E.; CREMERS, D. A.; FERRIS, M. J. Effect of sampling geometry on elemental emissions in laser-induced breakdown spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, Bound Brook, v. 50, p. 1483-1499, 1996.
94. AGUILERA, J. A.; ARAGÓN, C.; PEÑALBA, F. Plasma shielding effect in laser ablation of metallic samples and its influence on LIBS analysis. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 127-129, p. 309-314, 1998.
95. GORNUSHKIN, I. B.; STEVENSON, C. L.; SMITH, B. W.; OMENETTO, N.; WINEFORDNER, J. D. Modeling an inhomogeneous optically thick laser induced plasma: a simplified theoretical approach. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 56, p. 1769-1785, 2001.
96. SABSABI, M.; CIELO, P. Quantitative analysis of aluminum alloys by laser-induced breakdown spectroscopy and plasma characterization **Applied Spectroscopy**, Bound Brook, v. 49, p. 499-507, 1995.
97. D'ANGELO, C. A.; DÍAZ PACE, D. M.; BERTUCCELLI, G. Semiempirical model for analysis of inhomogeneous optically thick laser-induced plasmas. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 64, p. 999-1008, 2009.
98. MEISSNER, K.; LIPPERT, T.; WOKAUN, A.; GUENTHER, D. Analysis of trace metals in comparison of laser-induced breakdown spectroscopy with LA-ICP-MS. **Thin Solid Films**, Lausanne, v. 453-454, p. 316-322, 2004.
99. MERMET, J. M.; MAUCHIEN, P.; LACOUR, J. L. Processing of shot-to-shot raw data to improve precision in laser-induced breakdown spectrometry microprobe. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 63, p. 999-1005, 2008.
100. INGAMELLS, C. O.; SWITZER, P. A proposed sampling constant for use in geochemical analysis. **Talanta**, London, v. 20, p. 547-568, 1973.
101. ROSSBACH, M.; GROBECKER, K. H. Homogeneity studies of reference materials by solid sampling - AAS and INAA. **Accreditation and Quality Assurance**, Dordrecht, v. 4, p. 498-503, 1999.
102. MICHAUD, D.; LECLERC, R.; PROULX, É. Influence of particle size and mineral phase in the analysis of iron ore slurries by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 62, p. 1575-1581, 2007.
103. CREMERS, D. A.; RADZIEMSKI, L. J. Direct detection of beryllium on filters using the laser spark. **Applied Spectroscopy**, Bound Brook, v. 39, p. 57-63, 1985.

104. SAPKOTA, A.; KRACHLER, M.; SCHOLZ, C.; CHEBURKIN, A. K.; SHOTYK, W. Analytical procedures for the determination of selected major (Al, Ca, Fe, K, Mg, Na, and Ti) and trace (Li, Mn, Sr, and Zn) elements in peat and plant samples using inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 540, p. 247-256, 2005.
105. KURFÜRST, U.; PAUWELS, J.; GROBECKER, K. H.; STOEPLER, M.; MUNTAU, H. Micro-heterogeneity of trace elements in reference materials — determination and statistical evaluation. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 345, p. 112-120, 1993.
106. IYENGAR, G. V.; SANSONI, B. **Sample preparation of biological material for trace element analysis**. Viena: IAEA, 1980.