

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

RAFAEL GIOVANINI DE LIMA

Alinhamento, programação e comissionamento de um sistema de fluorescência de raios X em regime de reflexão total (TXRF) sob vácuo e automático para aplicação em pesquisas agropecuárias e ambientais

Piracicaba

2020

RAFAEL GIOVANINI DE LIMA

Alinhamento, programação e comissionamento de um sistema de fluorescência de raios X em regime de reflexão total (TXRF) sob vácuo e automático para aplicação em pesquisas agropecuárias e ambientais

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

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: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Hudson Wallace Pereira de Carvalho

Piracicaba

2020

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

De Lima, Rafael Giovanini

Alinhamento, programação e comissionamento de um sistema de fluorescência de raios X em regime de reflexão total (TXRF) sob vácuo e automático para aplicação em pesquisas agropecuárias e ambientais / Rafael Giovanini De Lima; orientador Hudson Wallace Pereira de Carvalho. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2020.

97 p. : il.

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

1. Amostras 2. Análise por fluorescência de raios X 3. Instrumentação (Física)
4. Tecidos vegetais I. Título

CDU 53.082 : 543.427.4

Elaborada por:

Marilia Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB N° 184 de 29 de setembro de 2017

Aos meus pais, irmão e namorada, por todo apoio e base para a elaboração desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao Professor Hudson Wallace Pereira de Carvalho, pela oportunidade de elaborar e realizar esse projeto, por todo o apoio, paciência e orientação ao longo dos 2 anos em que estive no laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN) realizando este projeto. Ao especialista de laboratório, Dr. Eduardo de Almeida, por todo seu conhecimento e paciência, e por auxiliar em todos os momentos.

Agradeço ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) e todos os funcionários da instituição e à Universidade de São Paulo (USP) por toda infraestrutura e auxílio que possibilitaram a realização do trabalho. À FAPESP (Projeto número 2018/02462-5) e a CAPES pelas bolsas de estudo e apoio financeiro durante o projeto.

Agradeço também a todos os colegas de trabalho do LIN, João Paulo R. Marques, Susilaine M. Savassa, Joyce R. P. Santos, Geovani T. Costa Jr, Marcos H. F. Gomes, Eduardo S. Rodrigues, Bianca A. Machado, Sara L. Z. Romeu, Gabriel S. Montanha, Antônio C. S. Mendes e Camila G. Corrêa, pela amizade, cooperação, auxílio e apoio no desenvolvimento do projeto. Agradeço em especial ao meu amigo de graduação Jonatha D. Gozetto pelo seu trabalho no desenvolvimento e construção do suporte do TXRF.

Gostaria também de agradecer a todos meus amigos e familiares, que de algum modo fizeram parte disso e me ajudaram nesta importante etapa da minha vida.

“Não se trata de bater forte. Se trata de quanto
você aguenta apanhar e seguir em frente...”
(Sylvester Stallone, Rocky Balboa, 2006)

RESUMO

DE LIMA, R. G. **Alinhamento, programação e comissionamento de um sistema de fluorescência de raios X em regime de reflexão total (TXRF), sob vácuo e automático para aplicação em pesquisas agropecuárias e ambientais.** 2020. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020.

A avaliação elementar dos constituintes de uma amostra tem grande importância nas ciências agrárias e ambientais. Essas análises podem ser realizadas por diversos métodos e equipamentos. Nesse contexto, a técnica de fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF) tem se consolidado devido aos limites de detecção na ordem $\mu\text{g L}^{-1}$ ou $\mu\text{g kg}^{-1}$, uma ampla faixa de resposta linear, sua aplicabilidade a elementos com $Z > 11$, forma de análise não destrutiva, uma diminuta quantidade de amostra e baixo custo operacional. Esse projeto de pesquisa propôs a montagem e comissionamento de um sistema de TXRF com tubo de raios X de alta potência e trocador automático de amostras. Como resultado, a execução desse projeto disponibiliza para a comunidade científica uma ferramenta alternativa às convencionais técnicas analíticas. Esse texto explica detalhadamente os processos de montagem do equipamento, os ajustes das partes móveis - como o monocromador e o substrato refletor -, e os experimentos desenvolvidos. Como validação do equipamento, foram construídas curvas de calibração para amostras líquidas, tecidos vegetais e solos. Análises líquidas tiveram limite de detecção de: $22,3 \mu\text{g L}^{-1}$ para Fe; $14,7 \mu\text{g L}^{-1}$ para Ga; e $14,3 \mu\text{g L}^{-1}$ para Se. Análises de tecido vegetal obtiveram limites de detecção de: 856 mg kg^{-1} para P; 425 mg kg^{-1} para K; 289 mg kg^{-1} para Ca; 10 mg kg^{-1} para Mn; 16 mg kg^{-1} para Fe; 3 mg kg^{-1} para Cu; 5 mg kg^{-1} para Zn; 2 mg kg^{-1} para Rb; e 4 mg kg^{-1} para Sr. Já amostras de solo tiveram limites de detecção de: 914 mg kg^{-1} para K; 313 mg kg^{-1} para Ca; 254 mg kg^{-1} para Ti; 114 mg kg^{-1} para Mn; 69 mg kg^{-1} para Fe; 15 mg kg^{-1} para Rb; 19 mg kg^{-1} para Sr; e 132 mg kg^{-1} para Th. As faixas lineares de trabalho das curvas de calibração eram, constantemente, da ordem de 4 à 5 ordens de grandeza, salvo alguns casos onde as curvas foram feitas com amostras de referência certificada que não abrangiam tamanha faixa linear. Por fim, foram feitas análises comparativas entre seiva de soja e solução nutritiva, entre seiva de soja e tecido vegetal e entre tecido vegetal e análises de referência.

Palavras-chave: Fluorescência de raios X. Fluorescência de raios X por Reflexão Total.

Análise elementar. Amostras. Instrumentação (Física)

ABSTRACT

DE LIMA, R. G. **Alignment, programming and commissioning of a total reflection X-ray fluorescence (TXRF) vacuum system for application in agricultural and environmental research.** 2020. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020.

The elementary evaluation of the constituents of a sample is of major importance in agricultural and environmental sciences. These analyses can be performed by various methods and equipments. In this context, the total reflection X-ray fluorescence technique (TXRF) is becoming more consolidated due to detection limits in the order of $\mu\text{g L}^{-1}$ or $\mu\text{g kg}^{-1}$, a wide range of linear response, applicability to elements with $Z > 11$, a non-destructive form of analysis, a small amount of samples and low operational cost. This research project proposed the assembly and commissioning of a TXRF system with high power X-ray tube and automatic sample changer. As a result, the execution of this project provides the scientific community with an alternative tool to conventional analytical techniques. This text explains in detail the equipment assembly processes, the adjustments of the moving parts - such as the monochromator and the reflective substrate - and the experiments developed. As validation of the equipment, calibration curves were built for liquid samples, plant tissues and soils. Liquid analyses had detection limits of: 22.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Fe; 14.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Ga; and 14.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Se. Vegetable tissue analyses had detection limits of 856 mg kg^{-1} for P; 425 mg kg^{-1} for K; 289 mg kg^{-1} for Ca; 10 mg kg^{-1} for Mn; 16 mg kg^{-1} for Fe; 3 mg kg^{-1} for Cu; 5 mg kg^{-1} for Zn; 2 mg kg^{-1} for Rb; and 4 mg kg^{-1} for Sr. Soil samples had detection limits of 914 mg kg^{-1} for K; 313 mg kg^{-1} for Ca; 254 mg kg^{-1} for Ti; 114 mg kg^{-1} for Mn; 69 mg kg^{-1} for Fe; 15 mg kg^{-1} for Rb; 19 mg kg^{-1} for Sr; and 132 mg kg^{-1} for Th. The linear work ranges for the calibration curves were constantly of the order of 4 to 5 orders of magnitude, except in some cases where the curves were made with certified reference samples that did not cover such a linear range. Finally, comparative analyses were made between soybean sap and nutrient solution, between soybean sap and plant tissue and between plant tissue and reference analyses.

Keywords: X-ray fluorescence. Total reflection X-ray Fluorescence. Elemental analysis. Samples. Instrumentation (Physics).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Ilustração do processo de fluorescência de raios X em um átomo	23
Figura 1.2. Diferenças de posicionamento de equipamentos básicos na EDXRF.....	24
Figura 1.3. Sistema de TXRF utilizado no Laboratório de Instrumentação Nuclear do CENA/USP até 2012	25
Figura 3.1. Equipamento de TXRF montado em 2019 no Laboratório de Instrumentação Nuclear do CENA/USP e plano em 3 vistas do suporte.....	33
Figura 3.2. Vistas do módulo de TXRF com blindagem de chumbo	36
Figura 4.1. Esquema do módulo de TXRF e esquema isolado do monocromador	37
Figura 4.2. Ilustração onde através de cores, é demonstrado a influência de ter uma fenda maior após o monocromador	39
Figura 4.3. Fotografia do feixe sendo parcialmente refletido pelo monocromador, em uma tela fluorescente.....	39
Figura 4.4. Espectro de fluorescência de raios X obtido pela irradiação de um substrato de quartzo, com feixe policromático	40
Figura 4.5. Ilustração do cálculo feito para determinar o ângulo de incidência do tubo de raios X	41
Figura 4.6. Ilustração que demonstra os efeitos do ajuste da inclinação de incidência do tubo de raios X	42
Figura 4.7. Espectro de um feixe monocromático incidido em polietileno.....	43
Figura 4.8. Porta amostras de quartzo para TXRF	44
Figura 4.9. Ilustração do efeito da rugosidade do substrato refletor na reflexão do feixe	44
Figura 4.10. Gráficos que mostram como a refletividade se comporta de acordo com a rugosidade do substrato refletor	45
Figura 4.11 Imagem da reflexão ocorrendo no substrato de quartzo, incidindo numa placa fluorescente.....	45
Figura 4.12. Espectros de fluorescência de raios X obtidos para uma mesma amostra no equipamento de TXRF e num equipamento de microanálise por XRF.....	46

Figura 4.13. Ilustração da camisa de proteção feita para o detector	47
Figura 4.14. Sobreposição de um espectro obtido para uma mesma amostra, com e sem vácuo	51
Figura 5.1. Tela de abertura do software PyMCA	54
Figura 5.2. Tela de <i>fitting</i> de espectros do software PyMCA antes de ajustados os parâmetros	55
Figura 5.3. Tela de calibração de energia do software PyMCA	55
Figura 5.4. Tela de seleção de elementos do software PyMCA	56
Figura 5.5. Janela de configurações gerais do espectro, do software PyMCA.....	57
Figura 5.6. Tela de <i>fitting</i> de espectros do software PyMCA depois de ajustados os parâmetros.....	57
Figura 5.7. Diagrama das etapas envolvidas numa análise de TXRF.....	58
Figura 5.8. Comparações entre espectros obtidos por equipamentos de TXRF, EDXRF e μ -XRF para uma mesma amostra.....	60
Figura 5.9. Relação entre o tempo de análise e o limite de detecção obtido	62
Figura 5.10. Relação matemática do componente tempo isolado para a equação de limite de detecção.....	63
Figura 5.11. Curvas de calibração para padrões líquidos, para os elementos: P, S, K, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu e Zn	64
Figura 5.12. Relação entre número atômico e sensibilidade relativa para o equipamento de TXRF	65
Figura 5.13. Curvas de calibração para amostras de tecido vegetal em suspensão para os elementos: P, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Rb e Sr	66
Figura 5.14. Curvas de calibração para amostras de solo em suspensão para os elementos: K, Ca, Ti, Mn, Fe, Rb, Sr e Th.....	68
Figura 5.15. Diferenças na decantação entre duas suspensões com viscosidade diferente	69
Figura 5.16. Curvas de calibração para amostras de solo em suspensão com ácido poliacrílico, para os elementos: K, Ca, Ti, Mn, Fe, Rb, Sr e Th.....	70
Figura 6.1. Imagem da coleta de seiva de plantas de soja	74

Figura 6.2. Sobreposição de espectros de uma mesma amostra com volumes diferentes depositados no substrato refletor	75
Figura 6.3. Sobreposição de espectros de seiva e tecido vegetal, provenientes da mesma planta	81
Figura 6.4. Amostra de tecido vegetal antes e depois da moagem	85
Figura 6.5. Relação entre a quantidade que passou, e a quantidade que não passou por uma peneira com malha de 180 μm , de uma amostra de tecido vegetal moída	85
Figura 6.6. Relações entre os valores de referência e os valores obtidos em TXRF para diferentes moagens em amostras de tecido vegetal	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Faixas de movimento dos componentes do TXRF	34
Tabela 4.1. Intensidades e Coeficiente de variação para análises de repetibilidade do equipamento de TXRF	48
Tabela 4.2. Intensidades e Coeficiente de variação para análises de estabilidade do equipamento de TXRF	49
Tabela 4.3. Intensidades e Coeficiente de variação para amostras com diferentes números de análises	50
Tabela 4.4. Intensidades e Coeficiente de variação para análises feitas com e sem vácuo	51
Tabela 5.1. Limites de detecção obtidos com diferentes correntes e tensões.....	61
Tabela 5.2. Limites de detecção para a mesma amostra, analisada com diferentes equipamentos	61
Tabela 5.3. Limites de detecção obtidos com diferentes tempos de análise	62
Tabela 5.4. Limites de detecção para suspensões de tecido vegetal.....	67
Tabela 5.5. Limites de detecção e limites de quantificação para suspensões de solo	70
Tabela 5.6. Sensibilidade relativa para diferentes tipos de amostra	72
Tabela 6.1. Concentrações elementares de solução nutritiva utilizada	74
Tabela 6.2. Valores de coeficiente de determinação para as curvas de calibração das análises de seiva	76
Tabela 6.3. Limites de detecção, limites de quantificação e coeficientes de variação para análises com 10 μ L	76
Tabela 6.4. Limites de detecção, limites de quantificação e coeficientes de variação para análises com 20 μ L	76
Tabela 6.5. Concentrações e coeficientes de variação para amostras de seiva de soja feitas com 10 μ L.....	77
Tabela 6.6. Concentrações e coeficientes de variação para amostras de seiva de soja feitas com 20 μ L.....	78

Tabela 6.7. Recuperações de materiais de referência certificados analisados por TXRF para amostras de referência certificadas de tecido vegetal	81
Tabela 6.8. Comparação entre concentrações de nutrientes encontrados em seiva e tecido vegetal para 10 plantas	82
Tabela 6.9. Recuperações de materiais de referência certificados analisados por TXRF em diferentes preparos de amostras de tecido vegetal	84
Tabela 6.10. Valores de coeficiente de determinação para a comparação entre os diferentes tipos de moagem e os valores de referência	87
Tabela 6.11. Concentrações encontradas para análises de tecido vegetal, com diferentes tipos de moagem e os valores de referência	88

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Importância da análise elementar agrícola e ambiental	21
1.2. Técnicas empregadas	21
1.3. Visão geral TXRF	23
1.4. TXRF no CENA	24
1.5. Objetivos	26
1.6. Estrutura da dissertação	26
2. ESTADO DA ARTE	27
3. MONTAGEM DO EQUIPAMENTO.....	33
3.1. Construção do suporte	33
3.2. Manutenção do sistema de refrigeração do gerador de raios X	34
3.3. Manutenção e testes do gerador de raios X	34
3.4. Proteção radiológica	35
4. ALINHAMENTO DO SISTEMA	37
4.1. Monocromador.....	38
4.2. Substrato refletor.....	43
4.3. Detector.....	46
4.4. Estabilidade e repetibilidade do equipamento	47
4.5. Número de repetições e uso de vácuo.....	49
5. PERFORMANCE DO EQUIPAMENTO.....	53
5.1. Modo de uso do equipamento e coleta de dados	53
5.2. Linearidade e curvas de calibração	58
5.2.1. Limite de detecção e relação com μ -XRF e EDXRF	58
5.2.2. Curvas analíticas de calibração a partir de padrões líquidos	63
5.2.3. Curvas analíticas de calibração para tecido vegetal	65

5.2.4.	Curvas analíticas de calibração em amostras de solo	67
5.2.5.	Sensibilidades em diferentes tipos de amostras	71
6.	ESTUDOS DE CASOS	73
6.1.	Comparação entre seiva e solução nutritiva	73
6.1.1.	Metodologia	73
6.1.2.	Resultados e discussão	75
6.2.	Comparação entre seiva e tecido vegetal	79
6.2.1.	Metodologia	79
6.2.2.	Resultados e discussão	79
6.3.	Determinação elementar em amostras de tecido vegetal e efeitos da moagem.....	83
6.3.1.	Metodologia	83
6.3.2.	Resultados e discussão	83
7.	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	93

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância da análise elementar agrícola e ambiental

A análise elementar é fundamental nas ciências agropecuárias e ambientais. Ela permite, por exemplo, avaliar quais nutrientes ou contaminantes estão presentes no solo e suas correspondentes concentrações, inferindo se elas são adequadas ao desenvolvimento de plantas. A concentração desses nutrientes e contaminantes é um importante indicativo na decisão de cultivar ou interditar um solo específico.

Na nutrição animal, através da análise do sangue, da urina e das fezes, é possível avaliar os efeitos da alimentação sobre a saúde e desenvolvimento dos animais. Pode-se também determinar os teores dos elementos presentes em amostras naturais e residuais de água. No tocante à poluição atmosférica, pode-se monitorar a composição do aerossol atmosférico, cuja presença de elementos potencialmente tóxicos em concentrações altas é prejudicial ao ser humano e ao (meio)ambiente. Apesar da variedade de técnicas analíticas disponíveis atualmente, suas disponibilidades são em grande parte limitadas pelos custos das análises. Isso impacta negativamente a produção agroindustrial e o monitoramento ambiental.

1.2. Técnicas empregadas

Há um extenso leque de técnicas analíticas instrumentais que permitem avaliar a composição elementar de amostras de interesse agrônômico e ambiental. Dentre essas, destacam-se a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS - *inductively coupled plasma mass spectrometry*), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES - *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*), as espectrometrias de absorção atômica (AAS - *atomic absorption spectrometry*) e a fluorescência de raios X (XRF - *X-ray fluorescence spectrometry*), incluindo a fluorescência de raios X por dispersão do comprimento de onda (WDXRF - *wavelength dispersive X-ray fluorescence*) e a fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF - *energy dispersive X-ray fluorescence*). Há também a fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF - *total reflection X-ray fluorescence*), uma técnica variante da EDXRF.

As técnicas de ICP-MS, ICP OES e AAS possuem limites de detecção (LOD) menores em comparação as técnicas de XRF. A EDXRF e a WDXRF possuem LOD em torno de alguns

mg/L, as técnicas ICP OES e GFAAS (Graphite furnace atomic absorption spectrometry) oferecem LOD em torno de algumas dezenas de $\mu\text{g L}^{-1}$ e a ICP-MS alcança até ng L^{-1} em certos casos.

A TXRF, por sua vez, apresenta LOD da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$. Trata-se de um método não destrutivo em que o preparo da amostra é mínimo e não requer gases - como argônio ou acetileno - para a formação de plasmas ou chamas. A TXRF tem sido empregada na análise dos mais variados tipos de amostra, como: água (ÓVÁRI et al., 2004), solo (BILO et al., 2019), alimentos (ASSIS et al., 2020), tecidos vegetais (BILO et al., 2017) e tecidos animais (GRUBER et al., 2020), *wafers* de silício (NEUMANN; EICHINGER, 1991), e até mesmo em peças de herança cultural, como obras de arte, pinturas, violinos, entre outros. (BOHLEN, 2004).

A ICP-MS é uma técnica extremamente sensível, que apresenta baixos limites de detecção, contudo seu custo de aquisição e operação são elevados. A aquisição de um equipamento requer cerca de US\$ 150.000,00, e o seu custo operacional, apenas considerando o gás argônio, é de cerca de R\$500,00 a cada 8 horas de operação. É recomendado o preparo das amostras sempre em frascos novos e descartáveis.

Um equipamento de ICP OES custa em torno de US\$75.000,00, apresentando uma demanda por argônio próxima a do ICP-MS. As técnicas de ICP-MS e ICP OES usualmente requerem que suas amostras sejam previamente digeridas, aumentando os gastos e o tempo de preparo, além de ser um método destrutivo.

Os equipamentos de AAS têm menor custo de aquisição e operação que as técnicas de plasma, porém, oferecem limites de detecção maiores, apenas a GFAAS tem LOD similar à ICP OES. As análises em ICP-MS, ICP OES e AAS são mais onerosas do que as análises feitas em TXRF.

Enquanto as técnicas de ICP-MS, ICP OES e AAS exigem volumes mínimos de amostra da ordem de alguns mililitros (dois a cinco), a TXRF precisa de apenas poucos microlitros (5 a 20).

Os custos de análises para o ICP OES ficam em torno de R\$100,00 por amostra quando se investiga micronutrientes em plantas, por exemplo (orçamento baseado numa quantidade de 50 amostras). Já por ICP-MS, o custo é de aproximadamente R\$60,00 por elemento (orçamento baseado numa quantidade de 50 amostras). Esses preços foram fornecidos no mês de outubro de 2017 por uma empresa de análises químicas terceirizada. Embora os custos operacionais possam ser parecidos, a manutenção e reposição de peças para o ICP-MS têm um custo muito maior.

1.3. Visão geral TXRF

A fluorescência de raios X consiste na emissão de radiação característica dos átomos. Ela ocorre após a excitação de elétrons, principalmente das camadas mais internas do átomo (K e L), pois é onde se encontram as energias de ligação da mesma ordem de grandeza dos raios X. Devido a excitação de ondas eletromagnéticas com energia na região dos raios X, esses elétrons são ejetados através do efeito fotoelétrico, daí a classificação de radiação ionizante.

Ao ter um elétron ejetado, o átomo fica com uma vacância em uma de suas camadas internas, essa vacância é suprida por um outro elétron de uma camada externa, que devido a diferença de energia entre as camadas, ou níveis energéticos, pode liberar energia na forma de radiação para atingir a energia necessária do nível mais interno, ilustrado na Figura 1.1. Essa energia é dada pela diferença das duas camadas, e é única para cada nível energético de cada elemento químico. Ao conseguirmos detectar e diferenciar essas energias, pode-se dizer quais elementos químicos têm-se numa amostra. Generalizando, trabalha-se com elementos químicos com número atômico maior que 11 (Na).

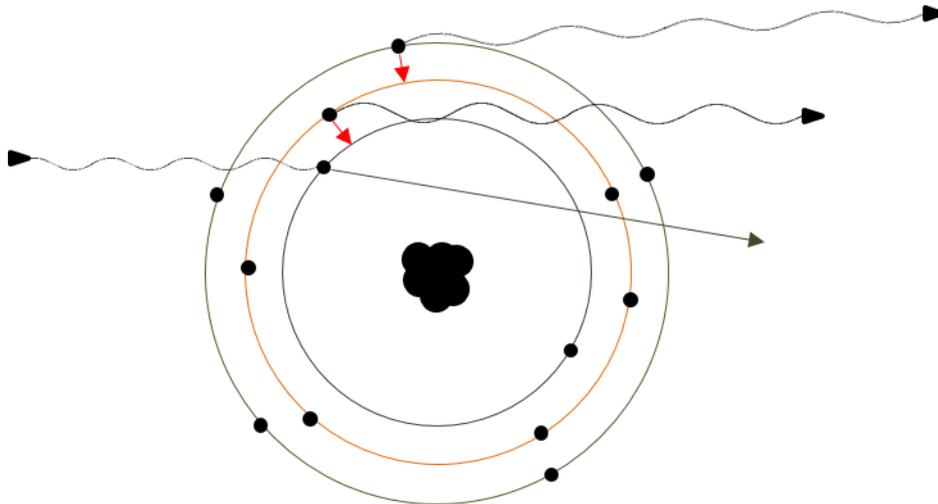


Figura 1.1. Ilustração das etapas envolvidas em um átomo na fluorescência de raios X. Um elétron absorvendo a radiação e sendo ejetado do átomo, elétrons de camadas superiores liberando energia (fluorescência) para suprir a lacuna deixada pelo elétron ejetado.

Os principais componentes de um equipamento de EDXRF são a fonte de raios X que pode ser um gerador ou uma fonte radioativa, a amostra e o detector. A EDXRF convencional possui um ângulo de incidência entre 30 e 45 graus e o detector fica a 90 graus da fonte, assim o feixe incide na amostra e também no porta-amostras, gerando uma radiação de fundo considerável, assim como alto espalhamento e refração, diminuindo a razão sinal ruído.

A TXRF é uma variante da EDXRF, porém ela trabalha com ângulos diferentes. O ângulo de incidência é próximo à 0,1 grau (ângulo crítico de reflexão total), pois assim o feixe incide na amostra, mas não penetra no porta-amostras, agora chamado de substrato refletor. O detector é posto perpendicular e próximo à amostra, aumentando o ângulo sólido. Essa junção de fatores faz com que a radiação de fundo seja menor, e a razão sinal ruído seja maior. Assim consegue-se limites de detecção até mil vezes melhores. A Figura 1.2 ilustra os componentes básicos de um equipamento de raios X e suas posições.

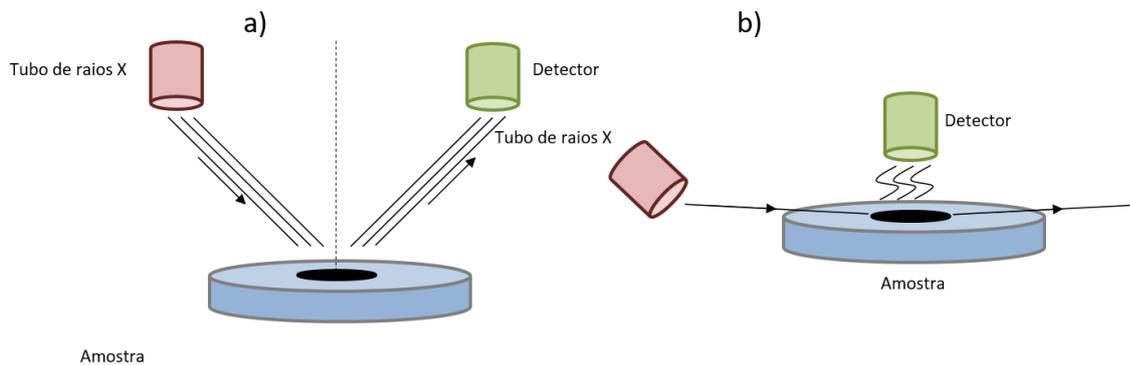


Figura 1.2. Componentes indispensáveis para um equipamento de EDXRF funcionar e seus diferentes arranjos para EDXRF convencional (a) e TXRF (b).

1.4. TXRF no CENA

No ano de 2018, início deste trabalho de mestrado, a instituição já possuía um sistema de TXRF (Figura 1.3). De acordo com Parreira (2000) esse foi o primeiro exemplar desse tipo de equipamento no Brasil. O sistema operou no Laboratório de Instrumentação Nuclear do CENA até o ano de 2012, quando deixou de ser utilizado por conta de um defeito no detector. Esse equipamento não permitia o uso de vácuo e nem a troca automatizada de amostras. Mais de 30 artigos científicos foram produzidos a partir desse sistema, que também contribuiu na formação de ao menos 15 mestres e doutores



Figura 1.3. Sistema de TXRF utilizado até 2012 no Laboratório de Instrumentação Nuclear do CENA-USP (PARREIRA, 2000).

Os limites de detecção para este equipamento estavam entre 35 e 8 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os elementos V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn e As. (CUNHA E SILVA et al., 2004). A detecção era feita por um detector semicondutor Si(Li) - fabricado pela Canberra - que utilizava nitrogênio líquido com área ativa de 80 mm². A aquisição de dados era feita pelo software AXIL.

É sabido que o custo operacional da TXRF é muito baixo - desconsiderando a depreciação da máquina e substratos -, ela necessita apenas de energia elétrica para o seu funcionamento. Os equipamentos modernos com detectores resfriados por efeito Peltier não requerem nitrogênio líquido. O preparo das amostras é simples, consistindo apenas na dissolução ou dispersão em meio líquido (se forem sólidas), podendo também ser digeridas em casos específicos. Os líquidos ou dispersões são gotejados sobre um suporte - também chamado de substrato - de acrílico ou quartzo e secos em estufa em temperatura por volta de 60°C. O custo de aquisição de um aparelho de TXRF comercial é próximo a U\$200.000,00 (Picofox fabricado pela Bruker).

1.5. Objetivos

Esse trabalho experimental - parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências - teve dois objetivos: o primeiro deles foi a construção, alinhamento e comissionamento de um equipamento de TXRF. Foram utilizados materiais que o laboratório já possuía, propiciando sem custos excessivos, uma ferramenta alternativa de análise elementar. O segundo objetivo compreendeu a aplicação da técnica de TXRF em dois estudos envolvendo matrizes de interesse agrônomo e ambiental, mais especificamente amostras de seiva e tecido vegetal moído.

1.6. Estrutura da dissertação

A dissertação está dividida em seções:

O Capítulo 2 apresenta uma breve revisão de literatura tratando dos aspectos históricos e aplicações da técnica de TXRF nos mais variados tipos de amostras. Os Capítulos 3 e 4 tratam da construção do equipamento. Eles detalham a montagem dos componentes, a construção do suporte, a manutenção do sistema de refrigeração, do gerador de raios X e da proteção radiológica. É também abordado o alinhamento do sistema, detalhando os ajustes do monocromador e do substrato refletor. Descreve-se ainda o desenvolvimento de um sistema de proteção para o detector, testes de uso de vácuo, e por fim trata da linearidade e repetibilidade do sinal analítico.

O Capítulo 5 detalha o desempenho apresentado pelo equipamento frente à análise de soluções aquosas, suspensões de tecido vegetal e de solo. Essa seção também explora os métodos de preparo das amostras, os limites de detecção obtidos, coeficientes de variação e traz uma comparação com EDXRF em geometria convencional.

No Capítulo 6 foram exploradas possibilidades de aplicação da técnica em situações nas quais a quantidade de amostra disponível é um limitante. Ele está dividido em três subcapítulos tratando do preparo de amostras, parâmetros de análise e resultados. O 6.1 mostra uma comparação entre os nutrientes encontrados em seiva e em solução nutritiva. O 6.2 contém uma comparação entre a seiva e o tecido vegetal, enquanto que o 6.3 contém comparações com amostras de referência analisadas em outras técnicas.

2. ESTADO DA ARTE

Tendo em vista que a não linearidade das intensidades da fluorescência de raios X está relacionada a efeitos de matriz, e que a diminuição (melhora) do limite de detecção pode ser obtido de forma mais eficaz pela diminuição do *background* ao invés do aumento do sinal, em 1971, Yoneda e Hiriuchi estabeleceram uma nova geometria para a fluorescência de raios X. Eles produziram um porta-amostra ótico plano, e o arranjaram de maneira que o feixe incidisse sobre ele com ângulo menor ou igual ao ângulo crítico de refração. Graças a esse ângulo, a maior parte do feixe é refletida na superfície do plano ótico, não gerando radiação proveniente do porta-amostras, diminuindo consideravelmente a radiação de fundo. Na ocasião, empregou-se um detector de (Ge(Li)) que foi posicionado a 10 mm da amostra e uma fonte de raios X com ânodo de W (YONEDA; HORIUCHI, 1971).

Diversos parâmetros na TXRF podem ser ajustados para aumentar a sensibilidade analítica. Pode-se variar o material do substrato refletor e conseqüentemente os ângulos críticos, melhorar a refletividade ou diminuir a profundidade de penetração do feixe incidente no substrato refletor. Cada um desses fatores tem capacidade de melhorar uma análise. Há também todo um esforço empregado para fazer com que a técnica tenha seu uso cada vez mais prático, seja no preparo e posicionamento das amostras, no controle das medidas e do tubo, no uso de vácuo, no uso de monocromadores ou filtros que cortam energias acima da energia de corte selecionada. Para cada material de ânodo da fonte de raios X, do monocromador ou do porta-amostra, todos os valores para ângulos, intensidades ou refletividade mudam, sendo assim, os desenvolvimentos teóricos e práticos influenciam de maneira mútua no desenvolvimento da TXRF. (AIGINGER, 1991).

Talvez o principal desafio enfrentado na análise de concentrações muito baixas de elementos químicos, seja a diferenciação do sinal gerado por eles e da radiação de fundo. Na tentativa de reduzir a radiação de fundo, foram utilizadas superfícies óticas superpolidas e sais de diversos elementos diluídos em água destilada, o tubo utilizado foi de Cu e o detector foi um Si(Li) semicondutor, também foi utilizado vácuo. Nesse sistema foi possível determinar elementos com número atômico a partir do Mg. O efeito matriz é desprezado devido ao baixo volume amostrado. (AIGINGER; WOBRAUSCHEK, 1974).

Após os primeiros testes feitos por Yoneda e Horiuchi no Japão em 1971, Aiginger e Wobrauschek em 1975, na Áustria, investiram tempo e conhecimento para trabalhar de maneira mais intensa com a técnica. Eles desenvolveram tecnologias capazes de melhorar os resultados e que acabavam por facilitar as análises, como o desenvolvimento de um módulo compacto com os recursos necessários para a TXRF. Knoth e Schenke, na Alemanha, construíram equipamentos mais sofisticados que logo vieram a ser fabricados comercialmente pela Seifert & Co (Alemanha) como o primeiro equipamento de TXRF a ser vendido. Desde então, as principais frentes de inovação estavam relacionadas com a fonte de raios X, o uso da radiação sincrotron, o conjunto do monocromador e em softwares de análise de dados. (AIGINGER, 1991).

Cortes de biomateriais feitos com micrótomo foram analisados com TXRF EXTRA II (Seifert & Co), que contava com tubo de Mo, detector Si(Li), filtro passa baixa com energia de corte a 20 keV e substratos de quartzo. Os cortes variaram entre 0,5 e 60 μm e foram analisados K, Ti, Cr, Co, Fe, Cu, Zn, As, Rb, Sm, Au, Ga, Pb, Sr, Yb, Ta, Pt, e U. (VON BOHLEN et al., 1988).

Análises de sangue e soro sanguíneo foram conduzidas com o TXRF EXTRA II (Rich. Seifert & Co), com tubos de Mo e W e detector Si(Li) com área de 80 mm^2 . Foram encontrados limites de detecção de: 14 mg L^{-1} para P; 10 para S; 5 para K; 1,5 para Ca; 0,8 para Fe; 0,08 para Cu; 0,08 para Zn; 0,04 para Sc; 0,04 para Rb; 0,04 para Sr; e 0,03 para Pb (PRANGE; BÖDDEKER; MICHAELIS, 1989).

A determinação de contaminantes na superfície de *wafers* de silício foi realizada por TXRF modelo 8010 e 8030 (Atomika Instruments, Alemanha) e também no modelo 3762 Rigaku (Japão), utilizando detectores SDD. Combinando a TXRF com a digestão e fase vapor (VPD), foram obtidos melhores limites de detecção, dados em átomos por centímetro quadrado. (PAHLKE et al., 2001).

Em amostras de fluido amniótico, os limites de detecção encontrados foram de: 1,3 mg L^{-1} para K; 1,1 mg L^{-1} para Ca; 0,16 mg L^{-1} para Mn; 0,10 mg L^{-1} para Fe; 0,05 mg L^{-1} para Cu; 0,05 mg L^{-1} para Zn; e 0,04 mg L^{-1} para Se. Amostras de sêrum tiveram limites de detecção de: 0,97 mg L^{-1} para K; 0,54 mg L^{-1} para Ca; 0,2 mg L^{-1} para Mn; 0,16 mg L^{-1} para Fe; 0,11 mg L^{-1} para Cu; 0,09 mg L^{-1} para Zn; e 0,07 mg L^{-1} para Se. Análises diretas de urina geraram limites de detecção de: 2,5 mg L^{-1} para K; 1,73 mg L^{-1} para Ca; 0,12 mg L^{-1} para Mn; 0,08 mg L^{-1} para Fe; 0,05 mg L^{-1} para Cu; 0,05 mg L^{-1} para Zn; e 0,05 mg L^{-1} para Se (MARCÓ P.; HERNÁNDEZ-CARABALLO, 2004).

Amostras podem ser analisadas diretamente, principalmente se forem líquidas. Para análises de água obtiveram-se limites de detecção de: 0,8 mg L⁻¹ para K; 0,65 mg L⁻¹ para Ca; 0,15 para Mn; 0,10 mg L⁻¹ para Fe; 0,04 mg L⁻¹ para Cu; 0,03 mg L⁻¹ para Zn; e 0,02 mg L⁻¹ para Se (MARCÓ P.; HERNÁNDEZ-CARABALLO, 2004).

Tecidos de biopsia de fígado humano foram digeridos em meio ácido e analisados por TXRF pelo espectrômetro Atomika Extra IIA TXRF, com um ânodo de Mo, detector Si(Li) e tempo de análise de 1000 segundos. O limite de detecção foi de 0,92 mg kg⁻¹ para Cr, e conseguiram medir K, Mn, Fe, Cu, Zn e Rb (VARGA et al., 2005).

Amostras de gergelim foram digeridas e analisadas no equipamento de TXRF construído com um gerador de raios X COMPACT 3K5 (*Model IS 221520*), com tubo de Mo (Ital Structures), um detector Si(Li) (Canberra SL 80175) e foi utilizado o software Canberra Inspector-2000 para aquisição de dados. Os autores conseguiram quantificar P, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn e Sr (OBIAJUNWA; ADEBIYI; OMODE, 2005).

Estudos de amostras biológicas, nesse caso biofilmes e líquido cefalorraquidiano, sem preparo, foram analisadas no Wobistrax (*TU Wien*), com tubo de Cr, monocromador Ni/C e um detector SiLi (*Oxford premiugrade B35*) com área de 30 mm² (HOEFLER et al., 2006).

Avaliação de flúor (F) por TXRF é complicada devido a seu baixo número atômico e conseqüentemente, baixa energia da linha Ka. Estando o F em uma solução aquosa, ele foi medido no equipamento Wobistrax (*TU Wien*), com um tubo de Cr com tensão de 30 kV e corrente de 30 mA, com um monocromador Ni/C, um detector SDD KETEK com área de 10 mm² e medidas por 500 segundos. O Limite de detecção para o F variou de acordo com contaminantes presentes na água (sempre em concentração de 100 mg L⁻¹). Em água pura o LOD foi de 5 mg L⁻¹, na presença de Cl e de Br o LOD foi de 20 mg L⁻¹, com I e sulfato foi de 35 mg L⁻¹ (TARSOLY; ÓVÁRI; ZÁRAY, 2010). O TXRF S2 Picofox (Bruker, Alemanha) foi utilizado para controle de impurezas em ingredientes de medicamentos, contando com tubos de Mo e W, detector SDD com área de 30 mm² para o tubo de Mo e 10 mm² para o tubo de W. As amostras foram diluídas em solventes orgânicos e encontraram-se limites de quantificação de 0,1 mg L⁻¹ para K, Ni, Sr e Pd; 0,4 para Fe; 0,2 mg L⁻¹ para Ca e 1,7 mg L⁻¹ para Al (ANTOSZ et al., 2012).

Amostras de filtros de aerossol atmosférico digeridos em ácido nítrico, analisados no equipamento PicoTax (Intax, Alemanha), tiveram limites de detecção de: 35 µg kg⁻¹ para S; 8,46 µg kg⁻¹ para K; 6,17 µg kg⁻¹ para Ca; 1,91 µg kg⁻¹ para Mn; 1,53 µg kg⁻¹ para Fe; 0,93 µg kg⁻¹ para Cu; 0,79 µg kg⁻¹ para Zn e 0,64 µg kg⁻¹ para Sr (SCHMELING, 2004). Suspensões de solo moídos e peneirados a 50 µm, pipetadas em substratos de quartzo, obtiveram limites de

detecção de: 35 mg kg⁻¹ para P; 30 mg kg⁻¹ para S; 10 mg kg⁻¹ para K; 4 mg kg⁻¹ para Ca; 1 mg kg⁻¹ para Mn e Fe e abaixo de 1 mg kg⁻¹ para Cu, Zn, Se, Rb, Sr (TOWETT; SHEPHERD; CADISCH, 2013).

A água de um rio foi analisada em campo sem nenhum tratamento pelo equipamento portátil PicoTAX (Intax, Alemanha). Amostras de água coletadas, sem nenhum tratamento e digestões de biofilmes foram analisadas pelo equipamento TXRF *Spectrometer 8030C* (FEI Company, Alemanha), com um detector Si(Li) com área de 80 mm². As análises levaram 1000 segundos por amostra (ÓVÁRI et al., 2004). Utilizando o procedimento de micro extração dispersiva líquido-líquido (DLLME) para separar o Cd de amostras de águas naturais, foi obtido limite de detecção de 0,04 µg L⁻¹, já sem tratamento o LOD foi de 5 µ L⁻¹ (MARGUÍ; QUERALT; HIDALGO, 2013).

A maior parte do espectro produzido pela fonte de raios X é rejeitada no cristal monocromador, geralmente o cristal seleciona energias mais altas. Entretanto, uma recente inovação permitiu que fossem usadas duas bandas de excitação, ao invés de um feixe monocromático. Empregou-se um monocromador de duas bandas (Pd/B₄C) que seleciona a reflexão de Bragg da linha K_α do Rh e um filtro passa baixa com energia de corte no L_α do Rh. Com isso, foram encontrados menores limites de detecção para elementos leves, como por exemplo: 138 µg kg⁻¹ para Mg, 46 µg kg⁻¹ para K, e 29 µg kg⁻¹ para Ca (PROST; WOBRAUSCHEK; STRELI, 2018).

Também encontraram limites de detecção em suspensões de solo de: 17 mg kg⁻¹ para Cd; 0,4 mg kg⁻¹ para Pb; e 0,6 mg kg⁻¹ para Zn (BILO et al., 2019). Em outro trabalho, obtiveram-se limites de detecção de: 18 mg kg⁻¹ para K; 4,5 mg kg⁻¹ para Ca; 2,3 mg kg⁻¹ para Mn, 0,7 mg kg⁻¹ para Fe; 0,7 mg kg⁻¹ para Cu; 0,6 mg kg⁻¹ para Zn; 1,2 mg kg⁻¹ para Sr e 0,5 mg kg⁻¹ para Pb em amostras de tecido vegetal (BILO et al., 2017). Em ambos os trabalhos, foi utilizado o equipamento S2 Picofox, produzido pela Bruker.

Mais recentemente foram reportados limites de detecção abaixo de 1 µg kg⁻¹ para elementos como Cu, Fe, Se, Zn e Rb em amostras de tecido animal digeridas em ácido, utilizando substrato de quartzo e analisados no Picofox S2, com fonte de Mo (GRUBER et al., 2020).

TXRF foi aplicada no estudo de elementos traço em usinas de biogás- analisando chorume de palha de trigo digerida, com o equipamento S2 Picofox (Bruker, Alemanha), com tubo de Mo e detector SDD XFlash (B-A20B42R) com área de 30 mm². Os limites de detecção obtidos foram de: 0,93 mg kg⁻¹ para K; 0,46 mg kg⁻¹ para Ca; 0,06 para Mn; 0,06 mg kg⁻¹ para

Fe; 0,04 mg kg⁻¹ para Ni; 0,05 mg kg⁻¹ para Cu; e 0,04 mg kg⁻¹ para Zn (ARTHUR; SCHERER, 2020).

Tintas de tatuagem foram analisadas por TXRF devido ao uso de metais em sua fabricação. Utilizou-se o Picofox S2 (Bruker) com um tubo de Mo de 50 W e um detector SDD com área de 30 mm². Foram analisados os elementos S, CL, K, Ca, Ti, Cr, Fe, Cu, Zn, As, W Rb, Sr, Zr, Ba e Hf, e concluiu-se que a composição variou muito entre os diferentes fabricantes, inclusive na quantidade de materiais potencialmente tóxicos a seres humanos (RIFFO; RAMÍREZ-LAMA; BENNUN, 2020). Misturas de café foram analisadas unindo informações de espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS) e fluorescência de raios X. Foram analisados extratos das sementes de café, o equipamento de TXRF utilizado foi um S2 Picofox (Bruker, Alemanha), com ânodo de Mo e detector SDD com área de 10 mm². Os resultados e a análise multivariada foram feitos no software Matlab. Os elementos avaliados por TXRF foram Ti, Mn, Fe, Cu, Zn, Br, Rb e Sr e, após as análises, foi possível definir um método para avaliar misturas em cafés comerciais com base na quantidade de cada nutriente encontrado em cada espécie. (ASSIS et al., 2020).

3. MONTAGEM DO EQUIPAMENTO

3.1. Construção do suporte

Para o projeto de construção, empregou-se o software Autodesk Inventor Professional. Ao passo que a manufatura foi realizada parcialmente no CENA-USP e em uma empresa terceirizada. Adotou-se tal estratégia uma vez que o maquinário de usinagem do CENA é antigo e não apresenta a precisão requerida por alguns dos componentes. Além disso, o limite de tamanho das peças que podem ser usinadas no CENA foi um fator limitante.

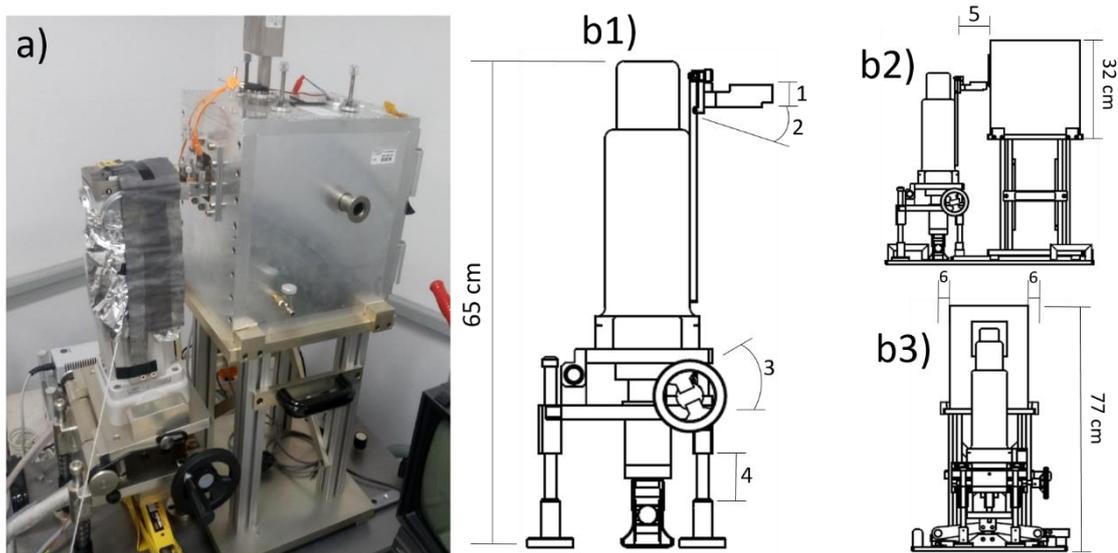


Figura 3.1. a) Suporte de acoplamento do sistema de TXRF. b) Esquema de movimentos do suporte do TXRF. b1) Suporte do tubo de raios X, b2) visão lateral do sistema de TXRF, b3) visão traseira do sistema de TXRF. A numeração nas Figuras designa os componentes móveis

A Figura 3.1 (a) apresenta o sistema de TXRF após o encaixe dos componentes (módulo com o trocador de amostras, detector, tubo de raios X e sistema monocromador) no suporte. A Figura 3.1 (b (1, 2 e 3)) aponta as peças do suporte que foram construídas na primeira etapa do projeto. Tais peças apresentam movimentos angulares (2 e 3), verticais (1 e 4) e horizontais (5 e 6). A Tabela 3.1 apresenta a faixa de movimento dessas peças.

Os movimentos 1 e 2 na Figura 3.1 (b) são responsáveis pela posição do monocromador, os movimentos 3 e 4 pela inclinação e altura em que o feixe de raios X incide no módulo de amostras. Por fim, os movimentos 5 e 6 ajustam o módulo de amostras para que ele se encaixe com o monocromador. Todos estes ajustes são manuais.

Testaram-se também os motores de passo que conduzem os movimentos angulares e verticais do porta-amostras. Foi adquirida uma câmera ccd que detecta a imagem do feixe de raios X em uma tela fluorescente.

Tabela 3.1. Faixas de trabalho das peças que compõe o suporte do sistema de TXRF. Os movimentos são indicados na Figura 1 (b)

Figura 1(b)	Posição	Faixa de movimento (cm)	Faixa de movimento (°)
b1	1	1	
	2		7
	3		20
	4	8	
b2	5	15	
b3	6	1	

3.2. Manutenção do sistema de refrigeração do gerador de raios X

Antes do início dos testes de funcionamento do gerador de raios X, o sistema de refrigeração foi reparado. A fonte de raios X trabalha em temperaturas entre 10 e 25°C, ela é abastecida por mangueiras que trazem água resfriada também ao gerador. Como a precisão do sistema de refrigeração é baixa ($\pm 3^\circ\text{C}$), selecionou-se 17°C como a temperatura de trabalho do sistema de refrigeração para operação do tubo. Todas as mangueiras foram substituídas, o sistema foi limpo e preenchido com aditivo de arrefecimento e água deionizada.

3.3. Manutenção e testes do gerador de raios X

As fontes empregadas em sistemas de TXRF podem ser muito variadas. Existem diversas potências de trabalho, definidas pela tensão e pela corrente, que acabam por controlar o brilho do feixe. Os ânodos mais comuns são feitos de Cu, Mo, W, Ag, Rh, Pt. O ânodo utilizado nesse trabalho foi de Mo

No início do procedimento de alinhamento, o gerador de raios X apresentou falhas intermitentes. É possível que após cerca de seis anos sem uso, parte dos componentes tenha sido danificada. Um dos problemas foi solucionado por uma empresa terceirizada, que também conduziu uma manutenção preventiva no gerador. O outro problema, uma falha da lâmpada de alerta de raios X, foi corrigido no laboratório. Mesmo tendo operado por mais de 20 anos, o gerador não possuía aterramento elétrico, o que foi solucionado pela oficina de manutenção do CENA.

3.4. Proteção radiológica

Todo o processo de montagem, alinhamento, e análises foi verificado pela seção de proteção radiológica do CENA. A cada alteração no *layout* do equipamento, era solicitada à seção de proteção radiológica que verificasse quais medidas de proteção teriam de ser tomadas. A dose média para trabalhadores é de 20 mSv ao ano, por um período de 5 anos, nunca podendo ultrapassar 50 mSv em um único ano (COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR - CNEN, 2014).

Antes da instalação da blindagem (Figura 3.2), as doses em pontos próximos ao tubo de raios X eram superiores a 100 mSv. Na região onde o operador trabalha, as doses eram de cerca de 20 mSv. Após a instalação da blindagem de chumbo em volta do tubo, a radiação nesses mesmos pontos ficou abaixo de 1 mSv. É importante ressaltar que como medida de segurança foi instalado um dosímetro próximo ao equipamento, além de fornecido um dosímetro pessoal para o operador, nesse caso, o autor desse trabalho.

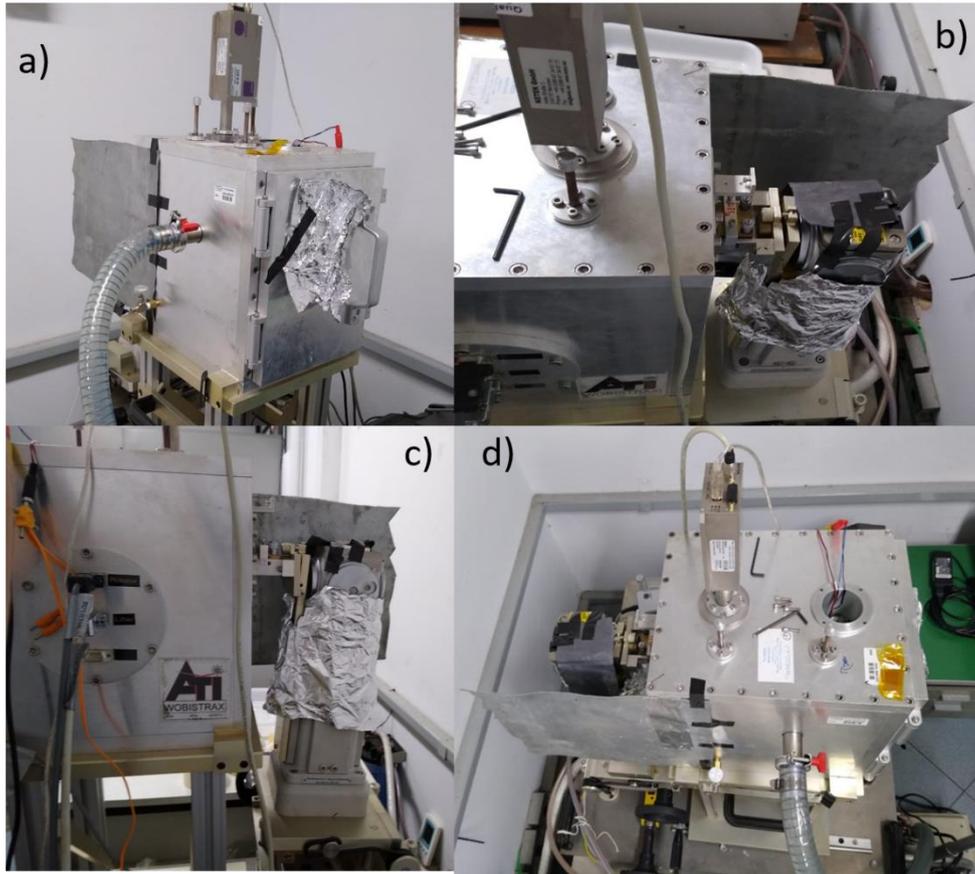


Figura 3.2. Fotos do módulo de TXRF onde se encontra a blindagem de chumbo para barragem da radiação proveniente do tubo de raios X

4. ALINHAMENTO DO SISTEMA

O alinhamento da reflexão total foi realizado em duas etapas: inicialmente no monocromador e em seguida no porta-amostras (substrato refletor). A Figura 4.1 apresenta um esquema do sistema construído, com destaque às posições do monocromador, do porta-amostras e ao caminho percorrido pelos feixes policromático (verde) e monocromático (vermelho).

O monocromador é o componente que permite a seleção da energia de excitação. Visto que o ânodo é constituído de molibdênio, o objetivo da primeira etapa de alinhamento consistiu em selecionar a linha Mo K_α . Ou seja, todo espectro policromático produzido pelo tubo de raios X é desprezado e a amostra é excitada apenas pela estreita faixa da linha K_α do molibdênio.

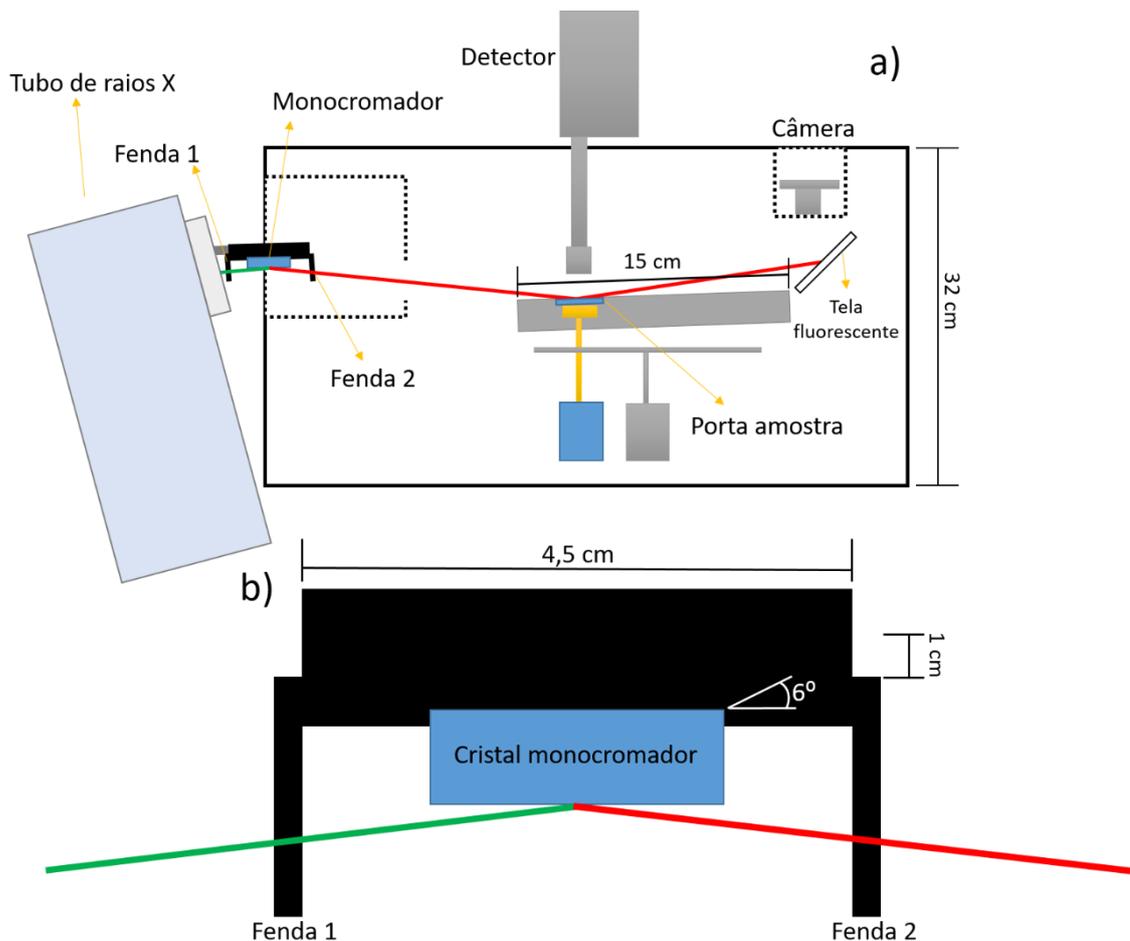


Figura 4.1. (a) esquema do caminho percorrido pelo feixe e dos componentes que geram a monocromatização e a reflexão total. (b) esquema do monocromador, com as duas fendas e o cristal. Em verde o feixe policromático e em vermelho o feixe monocromático

4.1. Monocromador

Existem diversas formas de se induzir o fenômeno de reflexão total. Pode-se empregar filtros passa-baixa que permitem a seleção de energias iguais e inferiores a uma determinada borda, bloqueando as energias superiores. Com isso, ao se ajustar o substrato para a energia da borda, geralmente correspondente ao máximo de emissão da fonte, os comprimentos de onda maiores também são refletidos. Também há os monocromadores, que podem ser formados por um ou múltiplos elementos. Nesse caso, cada camada é feita por um elemento. Os componentes dos monocromadores podem ser variados, como Si, Li, W, C, Mo e etc. (KLOCKENKÄMPER; VON BOHLEN, 2015). As distâncias típicas das camadas são da ordem de nanômetros, o monocromador utilizado neste trabalho tem uma distância de 4 nm. (STRELI et al., 2004).

O monocromador é ilustrado na Figura 4.1 (b). Ele é constituído por uma fenda de entrada (Fenda 1), um cristal de molibdênio e silício, e uma fenda de saída (Fenda 2), além de três parafusos micrômetros que regulam a inclinação do cristal e altura. As aberturas das fendas são ajustadas por parafusos.

As Fendas 1 e 2, mostradas na Figura 4.1 (b), foram reguladas com aberturas de *ca.* 50 μm e *ca.* 70 μm , respectivamente. Esses valores foram determinados a partir de um sistema de TXRF previamente instalado no laboratório, e de projeções de feixe obtidas em tela fluorescente. A primeira fenda colima o feixe, enquanto o cristal, através de difração o monocromatiza, já a segunda fenda barra energias superiores e inferiores à desejada. Uma vez definida a abertura das fendas, iniciou-se o ajuste vertical e angular do cristal monocromador. O cálculo do ângulo foi feito através da Equação 4.1 (KLOCKENKÄMPER; VON BOHLEN, 2015).

$$\alpha_m^2 \approx \alpha_{01}^2 + \left(m \frac{\lambda}{2d}\right)^2 \quad (\text{Eq. 4.1})$$

Onde λ é o comprimento de onda referente a emissão K_α do molibdênio (ânodo) (0,7 Å); d é a distância entre as camadas do cristal monocromador (40 Å). α_m são os valores para os ângulos de Bragg, responsáveis pelas interações construtivas, onde m é um número inteiro que indica a ordem da reflexão, α_{01} é o ângulo crítico de reflexão total para a primeira camada do monocromador ($^\circ$). O cálculo indicou que o ângulo de difração deveria ser de 0,100392 $^\circ$.

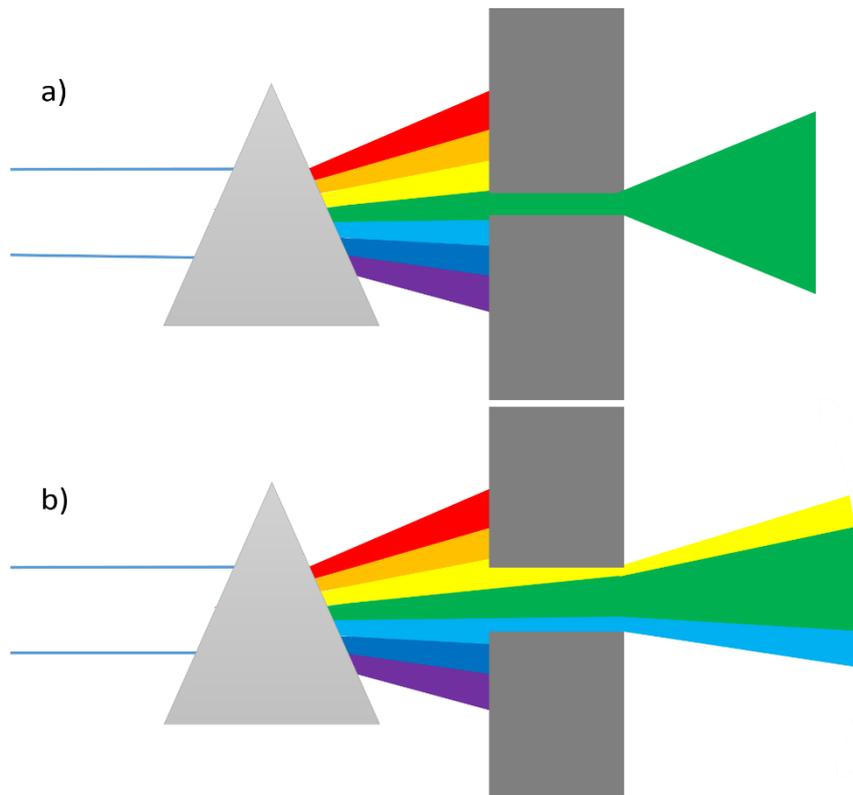


Figura 4.2. Efeito da abertura da fenda na monocromaticidade do feixe, (a) quando se tem uma fenda corretamente ajustada e (b) quando se tem uma fenda maior do que o necessário. Com o prisma representando o cristal monocromador e a fenda sendo a fenda 2 indicada na figura 4.1.

Após os cálculos, o cristal foi posicionado. O ajuste da posição foi realizado com os três parafusos micrômetros. O cristal monocromador foi ajustado até que dois feixes se tornassem visíveis na tela fluorescente como visto na Figura 4.3. O feixe inferior corresponde a fração refletida e o superior trata-se do feixe direto, ou seja, o componente que não interfere com o cristal.

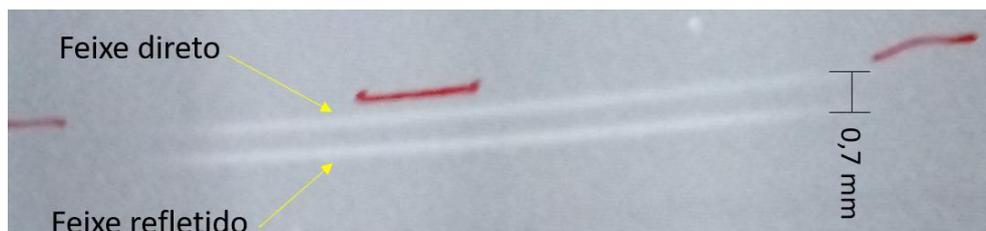


Figura 4.3. Fotografia do monitor no qual está ligada a câmera que filma a tela fluorescente, no momento em que ocorre a reflexão. Feixe passando direto (acima) e feixe refletido (abaixo)

A distinção entre os componentes refletido e direto é possível, pois a posição vertical da primeira responde ao movimento do cristal do monocromador, bem como a intensidade da segunda. Inicialmente acreditávamos que o feixe espalhado (inferior) tratava-se do feixe refletido pelas multicamadas (monocromático). Dessa forma, a segunda fenda foi posicionada permitindo apenas a passagem do feixe inferior, barrando o feixe direto (superior)

Baseado num sistema similar instalado na Universidade Técnica de Viena (*TU Wien*) (STRELI et al., 2004), acreditávamos que o ângulo de saída do feixe de raios X em relação à posição horizontal do tubo era de 6° . Contudo, o espectro do feixe inferior sobre um anteparo de silício (Figura 4.4) mostrou as linhas K_α e K_β do Mo, além de elevada intensidade de radiação de fundo na faixa de 10-20 keV. Consequentemente, tal feixe não poderia tratar-se de radiação monocromática. No momento dessa redação sabemos que isso ocorreu porque o ângulo de saída suposto estava incorreto, contudo na época acreditávamos que o problema estava no monocromador. Essa etapa consumiu cerca de dois meses de trabalho.

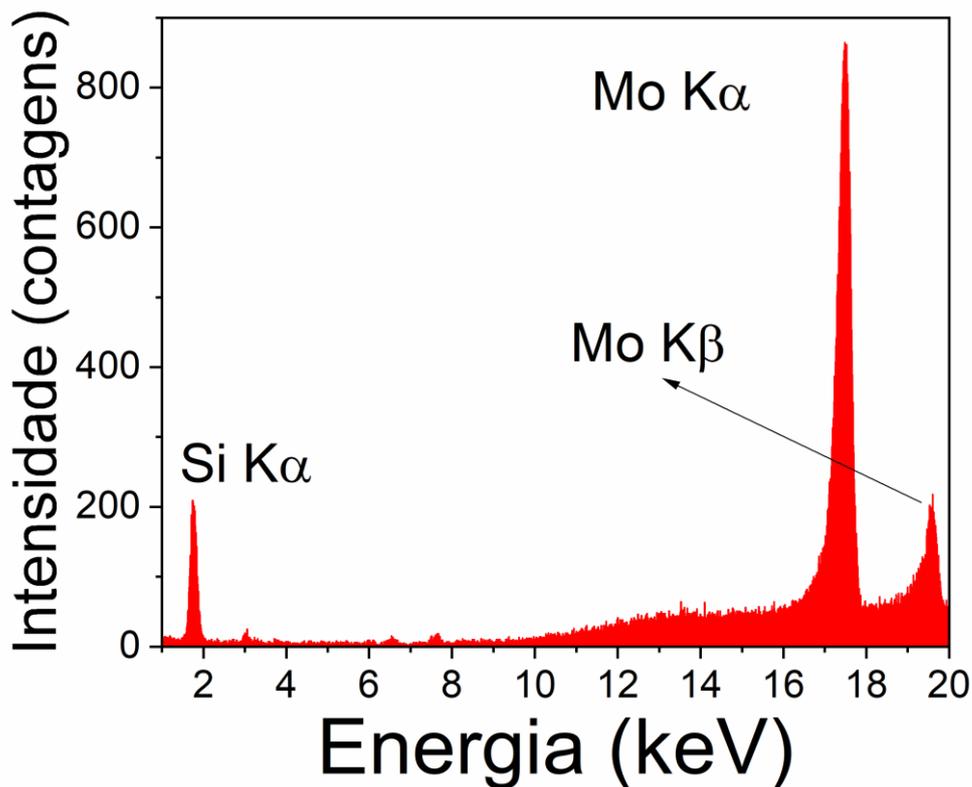


Figura 4.4. Espectro de fluorescência de raios X, gerado pela irradiação de um substrato de quartzo

O procedimento de alinhamento foi reiniciado, porém dessa vez, decidiu-se determinar o ângulo de saída do feixe experimentalmente. Para tanto, um anteparo fluorescente foi colocado na frente da fonte de raios X, conforme mostrado na Figura 4.5. Os cálculos

geométricos (feitos por relações de triângulo retângulo de Pitágoras) através das equações 4.2, 4.3, e 4.4, indicaram que o ângulo de saída correto era cerca de 2,4°, ao invés de 6°. HIP corresponde à hipotenusa do triângulo e CO ao cateto oposto.

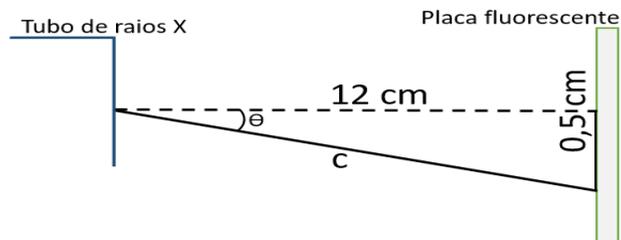


Figura 4.5. Determinação do ângulo de saída do feixe de raios X pela projeção em tela fluorescente

$$c = \sqrt{0,5^2 + 12^2} = 12,01 = \text{HIP} \quad (\text{Eq. 4.2})$$

$$\text{Sen}\theta = \frac{\text{CO}}{\text{HIP}} = \frac{0,5}{12,01} = 0,0416 \quad (\text{Eq. 4.3})$$

$$\arcsen(0,041) = 2,38^\circ \quad (\text{Eq. 4.4})$$

Sendo assim, o ângulo do tubo de raios X foi corrigido para 2,4°. A Figura 4.6 ilustra esse processo. A Figura 4.6 (a) apresenta o feixe de raios X antes do ajuste sendo absorvido pelo cristal, já a Figura 4.6 (b) mostra o feixe de raios espalhado (policromático) que escapa pela segunda fenda. A Figura 4.6 (c) apresenta o feixe de raios X transmitido sem qualquer contato com o cristal (policromático), por fim a Figura 4.6 (d) ilustra o feixe de raios X refletido pelas multicamadas (monocromático).

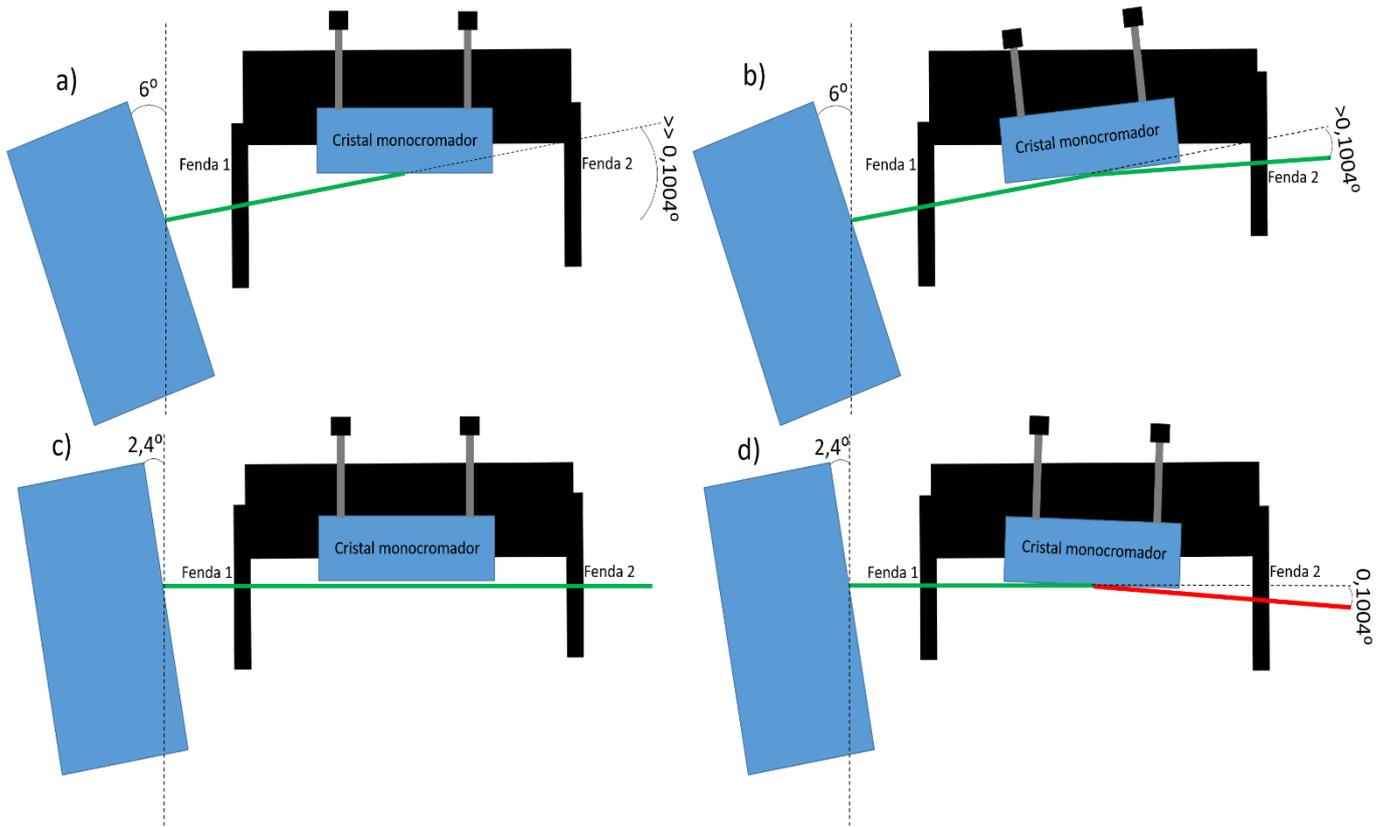


Figura 4.6. a) Inclinação incorreta do tubo de raios X antes do ajuste do monocromador. b) Inclinação incorreta do tubo de raios X durante o ajuste do. c) Inclinação correta do tubo de raios X antes do ajuste do feixe. d) Inclinação correta do tubo de raios X após o ajuste

A Figura 4.7 apresenta o espectro do feixe difratado pelo cristal obtido pelo espalhamento do feixe em um anteparo de polietileno. A ausência da linha K_β do molibdênio combinado a baixa intensidade da radiação de frenagem na região 10-20 keV confirmou a monocromaticidade do feixe. Os picos 5-10 keV correspondem a contaminantes do anteparo utilizado. Essa etapa de alinhamento compreendeu uma semana de trabalho.

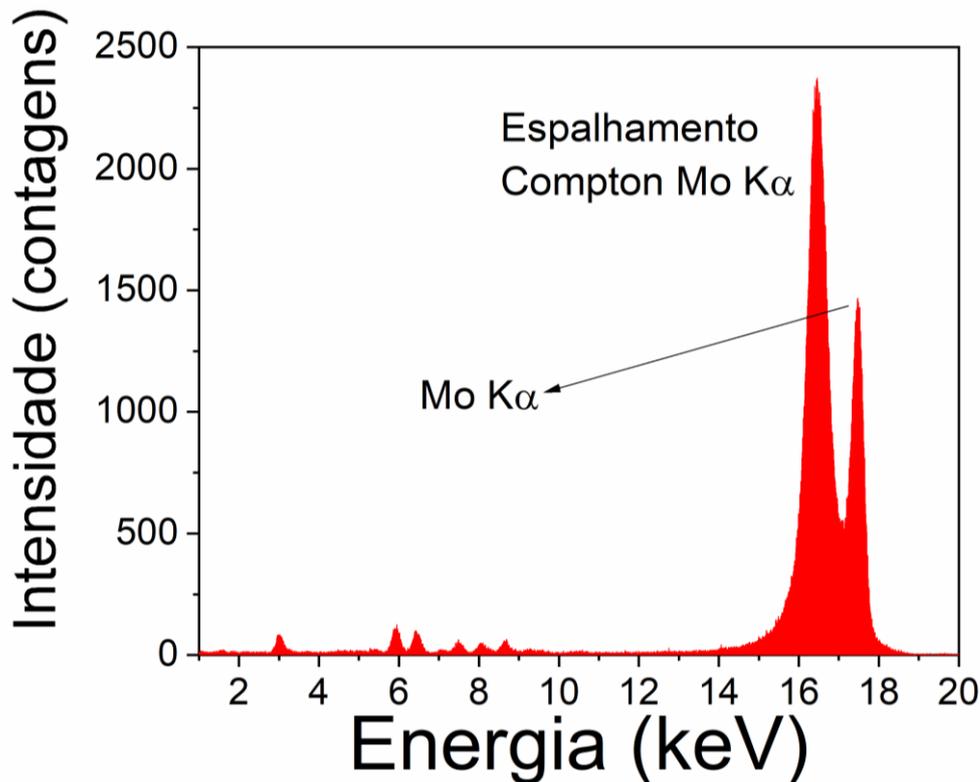


Figura 4.7. Espectro monocromático emitido pelo tubo, incidido numa superfície espalhadora de polietileno colocada a aproximadamente 45° do feixe

4.2. Substrato refletor

Os substratos refletores (porta-amostras) podem ser feitos de quartzo, acrílico, carbono vítreo, nitreto de boro, entre outros. O quartzo, apesar de conter silício, o que torna inviável a análise do mesmo, tem ótima pureza e resistência se comparado aos outros materiais. O porta-amostras, ou substrato refletor (Figura 4.8) é diretamente responsável pela reflexão total, trata-se de uma superfície ultrapolida. A rugosidade do porta-amostra tem clara importância para a definição da porcentagem do feixe a ser refletido, quando um feixe incide num substrato refletor, quanto mais rugosa for sua superfície, mais impreciso será o ângulo em que o feixe incidirá nela (KLOCKENKÄMPER; VON BOHLEN, 2015). A Figura 4.9 ilustra esse erro no ângulo de incidência causado pela rugosidade. Obviamente, uma superfície perfeitamente plana não existe, mas quanto mais polido e menos rugoso for o material, melhor será o resultado. No presente estudo foram empregados substratos de quartzo, os quais o laboratório já dispunha.



Figura 4.8. Porta amostra para TXRF, feito de quartzo, ultra polido. É depositado uma alíquota da amostra entre 5 e 10 μL e seco em estufa

Dentre os materiais que se fabricam substratos refletivos, o nitreto de boro e o quartzo têm um ângulo crítico ligeiramente maior ($0,10^\circ$) se comparado aos outros ($0,08^\circ$), o quartzo é o substrato que apresenta melhor rugosidade, e a pior rugosidade é encontrada no carbono vítreo. O substrato de menor custo é o acrílico e o de maior é o nitreto de boro. Carbono vítreo e quartzo têm custos semelhantes. (KLOCKENKÄMPER; VON BOHLEN, 2015).

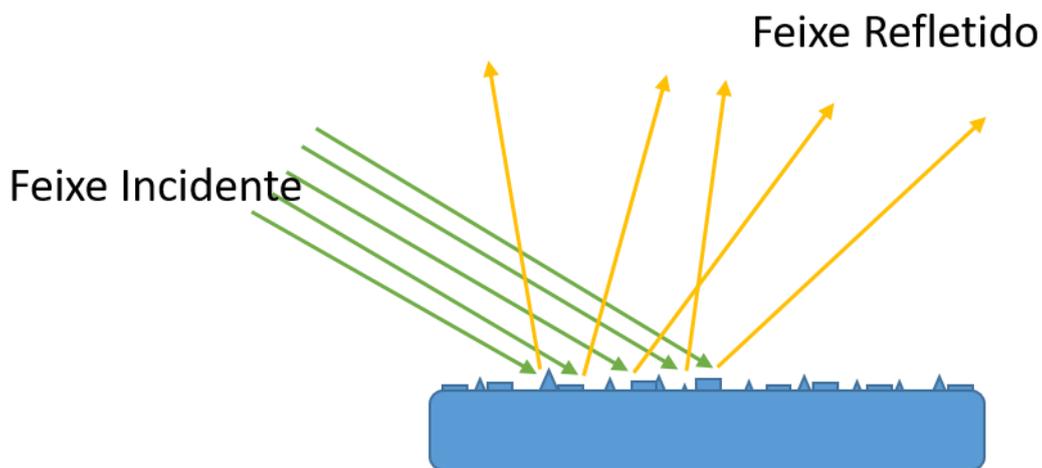


Figura 4.9. Ilustração do que acontece com o feixe incidente quando encontra uma superfície rugosa

Quando a radiação monocromática incide sobre o substrato abaixo do ângulo crítico de reflexão total, o feixe incidente é totalmente refletido, criando um campo de ondas estacionárias sobre a superfície. Visto que o feixe não penetra no substrato, o espalhamento de radiação para

o detector é reduzido, diminuindo-se assim o fundo espectral (KLOCKENKÄMPER; VON BOHLEN, 2015). A Figura 4.10 apresenta duas curvas que mostram a interferência da rugosidade na refletividade do feixe.

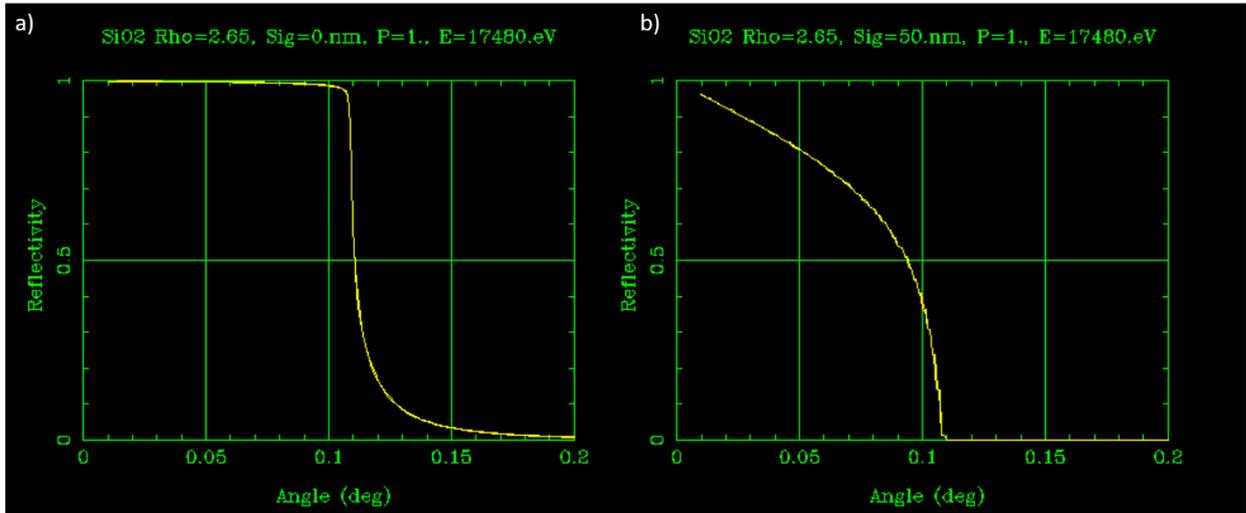


Figura 4.10. Gráficos que mostram o comportamento da refletividade (ordenada) em função do ângulo em substratos de SiO₂. Em ambas as curvas a energia do feixe monocromático é 17,48 keV, o refletor é de quartzo e em a) a rugosidade é 0 nm e em b) é 50 nm. Imagem gerada pelo site: http://henke.lbl.gov/optical_constants/mirror2.html (acesso em: 30/04/2020). Observa-se que a rugosidade diminui a refletividade no ângulo crítico de reflexão total

Semelhante ao monocromador, a regulagem do porta-amostras é feita por três parafusos micrômetros responsáveis pela inclinação do sistema. A Figura 4.11 apresenta o feixe totalmente refletido sobre a superfície do substrato (superior) e o feixe direto que passa acima da superfície do substrato (inferior).



Figura 4.11. Imagem captada durante ajuste da reflexão total, onde é possível ver o feixe refletido e o feixe que passa direto sem contato com o substrato refletor

A Figura 4.12 (a) apresenta o espectro de fluorescência de raios X obtido em regime de reflexão total para uma amostra contendo 10 mg L⁻¹ de ferro (Fe), gálio (Ga) e selênio (Se). Já a Figura 4.12 (b) apresenta um espectro de uma amostra semelhante contendo 30 mg L⁻¹ de

ferro, 10 mg L⁻¹ de gálio e 30 mg L⁻¹ de selênio, registrado em um equipamento de fluorescência de raios X com geometria convencional (30 e 45°). A baixa contagem do silício (Si) verificada na medida em geometria de reflexão total evidencia que o feixe não penetra no substrato, diferentemente do arranjo convencional.

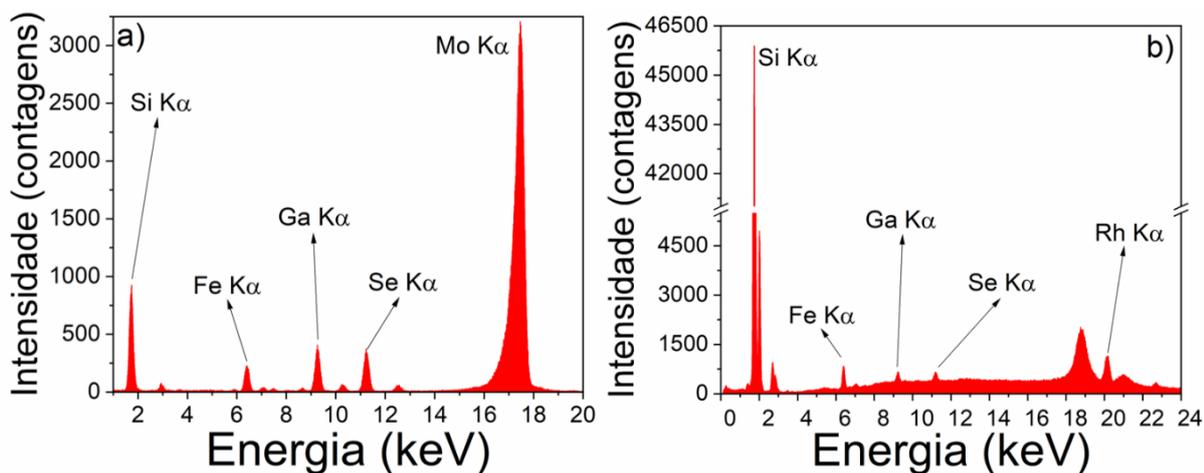


Figura 4.12. a) Espectro de fluorescência de raios X por reflexão total com adição de padrão líquido com os elementos ferro, gálio e selênio. b) Padrão líquido depositado sobre o porta-amostra de quartzo utilizado no TXRF, analisado sem reflexão total no equipamento μ -XRF EDAX Orbis PC. É possível ver um pico de silício, devido a penetração do feixe no quartzo

4.3. Detector

O detector é o responsável por converter os fótons em sinais elétricos, assim, bandas de energias são divididas em canais, que organizam os sinais elétricos e os contabilizam por determinado tempo (JAKLEVIC; GIAUQUE, 2002). Este trabalho utilizou o um detector SDD (Silicon drift detector), modelo AXAS-D, da marca KETEK (Alemanha), com área de 20 mm².

Baseado em relatos informais de operadores de XRF, vapores ácidos podem danificar a janela de berílio, e devido a sua fragilidade a contatos pode, por exemplo, ao subir excessivamente uma amostra, rompê-la. Para proteger a janela de berílio do detector, foi desenvolvida uma proteção feita de TeflonTM, que foi coberta com uma camada de filme de polipropileno de 6 μ m, como ilustrado na Figura 4.13. O detector foi colocado a aproximadamente 10 mm da amostra, conforme ajustes de tempo morto e intensidade obtida no espectro.

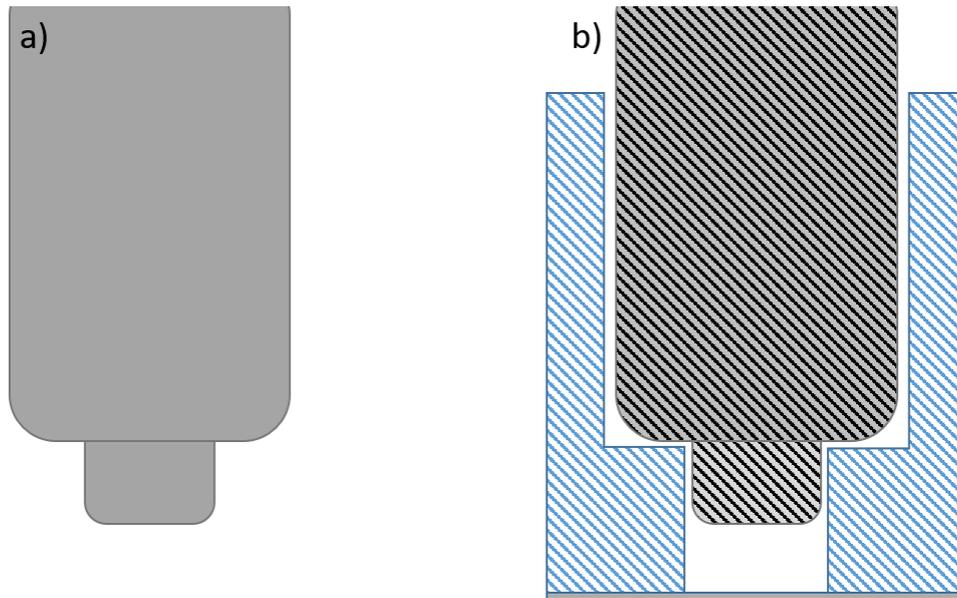


Figura 4.13. a) Ponta do detector, b) ponta do detector com a proteção feita para a janela de berílio

4.4. Estabilidade e repetibilidade do equipamento

Realizaram-se testes para avaliar a resposta do equipamento ao decorrer do tempo, se uma mesma amostra analisada dias depois teria um mesmo resultado, ou então se uma mesma amostra preparada novamente apresentaria o mesmo resultado. Para isso, foram utilizadas três amostras de CRM (Material de Referência Certificado) fabricados pelo NIST (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, Estados Unidos da América), sendo eles NIST 1515, NIST 1547 e NIST 1573a. Prepararam-se quatro suspensões (amostras) com cada material de referência, o preparo de amostras será detalhado posteriormente. As amostras foram analisadas três vezes com intervalos de três e seis dias. A Tabela 4.1 mostra a intensidade (contagens) dos elementos e o coeficiente de variação de três análises feitas no mesmo dia para todos os CRM. A primeira análise é um conjunto de 3 medidas para cada CRM feitas em um dia, a segunda análise é um conjunto de três medidas para cada CRM feitas três dias após a primeira, e a terceira análise é um conjunto de três medidas para cada CRM feitas 3 dias após a segunda. A Tabela 4.2 mostra a intensidade e o coeficiente de variação para as análises feitas nos três diferentes dias.

Tabela 4.1. Amostras analisadas em um mesmo dia, sendo Int ($I_Z I_{Ga}^{-1}$) a intensidade normalizada pelo padrão interno (Ga) e o coeficiente de variação sendo dado em porcentagem

Resultados de Intensidade ($I_Z I_{Ga}^{-1}$) e Coeficiente de Variação (%) para as amostras analisadas em diferentes dias

Elemento	Primeira Análise						Segunda Análise						Terceira Análise					
	NIST 1515		NIST 1547		NIST 1573a		NIST 1515		NIST 1547		NIST 1573a		NIST 1515		NIST 1547		NIST 1573a	
	Int	CV(%)	Int	CV(%)	Int	CV(%)	Int	CV(%)	Int	CV(%)	Int	CV(%)	Int	CV(%)	Int	CV(%)	Int	CV(%)
P	0,0101	27	0,0057	73	0,0056	70	0,0100	39	0,0122	78	0,0055	65	0,0118	6	0,0089	111	0,0049	28
S	0,0420	27	0,0229	57	0,2378	5	0,0407	6	0,0337	31	0,2207	18	0,0393	14	0,0376	26	0,2741	41
K	1,8418	8	3,0239	3	3,1209	8	1,8419	32	2,9122	1	3,0874	12	2,2514	31	2,8852	5	3,9063	39
Ca	3,0142	20	2,2146	51	8,8387	16	2,8826	11	2,5961	34	8,7144	4	2,6779	11	3,0193	29	10,9462	37
Mn	0,0338	14	0,0603	8	0,1478	2	0,0322	15	0,0597	6	0,1498	1	0,0321	14	0,0591	11	0,1778	40
Fe	0,1059	53	0,1596	33	0,2838	36	0,0678	11	0,1731	17	0,2818	13	0,0622	13	0,1980	22	0,3535	39
Cu	0,0108	18	0,0058	20	0,0030	55	0,0090	47	0,0035	14	0,0034	58	0,0079	57	0,0057	42	0,0033	58
Zn	0,0228	32	0,0287	64	0,0453	30	0,0558	94	0,0415	24	0,0342	9	0,0167	32	0,0234	19	0,0403	38
Rb	0,0135	22	0,0388	20	0,3301	9	0,0131	59	0,0377	10	0,3502	12	0,0158	47	0,0374	20	0,4321	39
Sr	0,0580	22	0,1088	48	0,1841	17	0,0569	9	0,1225	30	0,1784	5	0,0522	22	0,1415	25	0,2175	35

Tabela 4.2. Relação entre os coeficientes de variação para as amostras das três análises. Sendo Int a intensidade normalizada pelo padrão interno (Ga) e o coeficiente de variação sendo dado em porcentagem

Todas as análises						
Elemento	NIST 1515		NIST 1547		NIST 1573a	
	Int	CV(%)	Int	CV(%)	Int	CV(%)
P	0,0106	9	0,0089	36	0,0053	7
S	0,0407	3	0,0314	24	0,2442	11
K	1,9783	12	2,9404	2	3,3716	14
Ca	2,8583	6	2,6100	15	9,4998	13
Mn	0,0327	3	0,0597	1	0,1585	11
Fe	0,0787	30	0,1769	11	0,3064	13
Cu	0,0092	16	0,0050	26	0,0032	7
Zn	0,0318	66	0,0312	30	0,0399	14
Rb	0,0141	10	0,0379	2	0,3708	15
Sr	0,0557	5	0,1242	13	0,1933	11

Conclui-se que o equipamento se mantém estável durante 1 semana de análise, já que o coeficiente de variação entre análises feitas em sequência é similar ao coeficiente de variação para análises ao decorrer dos dias, indicando que o erro não aumenta conforme o tempo.

4.5. Número de repetições e uso de vácuo

Para aperfeiçoar o custo-benefício de uma análise, foi avaliado o número de medidas a serem realizadas numa mesma amostra, assim como o tempo de aquisição por medida. Concluiu-se que para cada caso a ser estudado cabe ao responsável pelas análises e pelas amostras decidir. A Tabela 4.3 mostra a intensidade normalizada pelo gálio e o coeficiente de variação para médias feitas com 2, 3, 4 e 5 análises. Após o estudo, estabeleceu-se um padrão de três análises para cada amostra analisada no TXRF.

Tabela 4.3. Relação entre o número de repetições de uma análise e o coeficiente de variação. Int sendo a intensidade relativa ao padrão interno (Ga) e o coeficiente de variação sendo dado em porcentagem

Elemento	Número de repetições							
	5		4		3		2	
	Int	CV(%)	Int	CV(%)	Int	CV(%)	Int	CV(%)
P	0,010	16	0,011	14	0,011	14	0,012	6
S	0,040	9	0,041	8	0,042	3	0,043	3
K	1,574	2	1,575	2	1,572	2	1,565	3
Ca	2,709	1	2,708	1	2,704	1	2,683	1
Mn	0,027	18	0,028	8	0,029	9	0,028	12
Fe	0,072	5	0,073	6	0,072	5	0,072	7
Cu	0,007	32	0,007	35	0,007	43	0,005	20
Zn	0,019	14	0,019	16	0,019	16	0,021	6
Rb	0,010	4	0,008	34	0,008	42	0,010	6
Sr	0,054	9	0,053	11	0,052	13	0,056	7

Outro ponto estudado foi o uso de vácuo, que aumenta a precisão do sinal de elementos leves (STRELI et al., 2004). Uma amostra foi analisada com e sem vácuo, e as intensidades podem ser vistas na Tabela 4.4. Observa-se aumento na intensidade para elementos com número atômico mais baixo, como P, S, K e Ca. A Figura 4.13 mostra a comparação entre a mesma amostra analisada com e sem vácuo, o resultado está em acordo com aquele reportado por Strelí et al. (2004). De acordo com a pressão encontrada com o uso do vácuo, o caminho percorrido pela fluorescência da amostra até o detector passa a ter menos moléculas de ar. Isso faz com que os elementos com menor energia de fluorescência tenham menos fótons absorvidos pelas moléculas de ar nesse caminho.

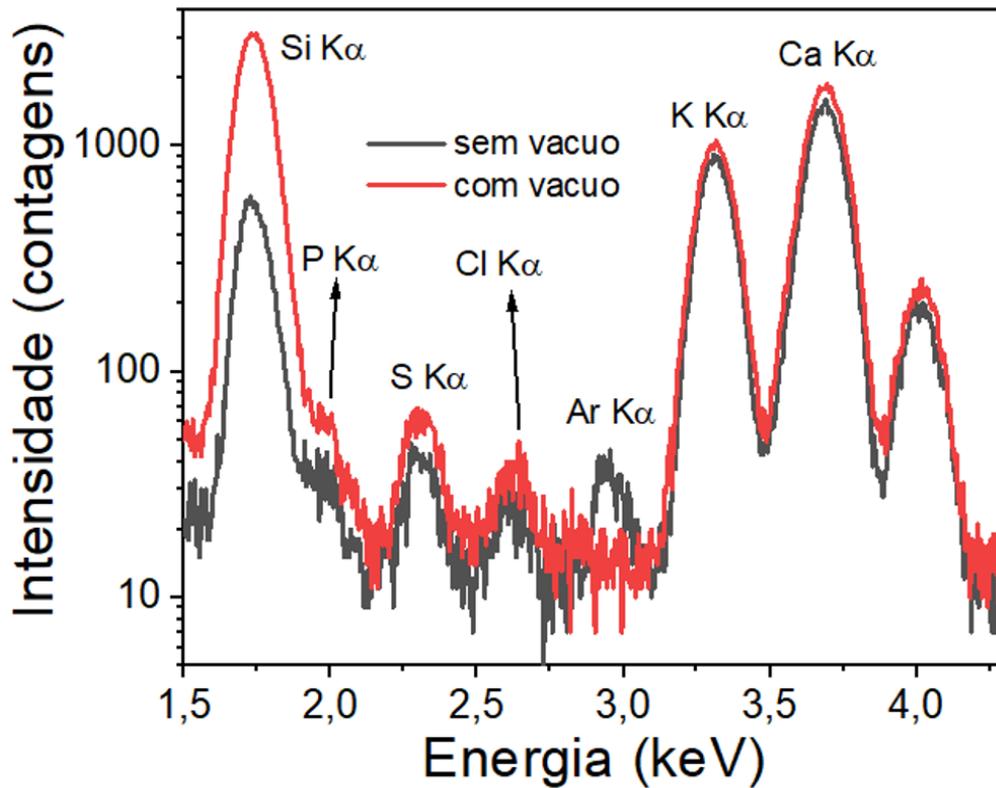


Figura 4.14. Região do espectro onde se encontram elementos beneficiados pelo uso do vácuo

Tabela 4.4. Comparação entre uma mesma amostra analisada com e sem vácuo

Elemento	Intensidades ($I_Z I_{Ga}^{-1}$)	
	Vácuo	
	Sem	Com
P	0,011	0,024
S	0,042	0,065
K	1,572	1,709
Ca	2,704	3,196
Mn	0,029	0,027
Fe	0,072	0,080
Cu	0,007	0,005
Zn	0,019	0,021
Rb	0,008	0,010
Sr	0,052	0,057

5. PERFORMANCE DO EQUIPAMENTO

5.1. Modo de uso do equipamento e coleta de dados

A primeira etapa da análise por TXRF é o preparo da amostra. O preparo de amostras líquidas e de suspensões será detalhado no Capítulo 5.2. Após o preparo da amostra, ela é inserida no carrossel do TXRF responsável pela troca automática das amostras.

O controle do gerador e do tubo de raios X é manual, por isso ele é ligado independentemente do detector e do trocador de amostras. Após ajustados os parâmetros do gerador (40 kV e 20 mA têm se mostrado bons valores iniciais), acionados o trocador de amostras e o detector, seleciona-se a amostra a ser analisada e o tempo de aquisição através do computador. Após o registro do espectro, ele é salvo em formato .mca, e em seguida é processado no software PyMCA (SOLÉ et al., 2007).

Ao abrir um espectro no PyMCA (Figura 5.1), clica-se na imagem *fit* (circulado em vermelho) e depois em *advanced*. Uma tabela será aberta. (Figura 5.2).

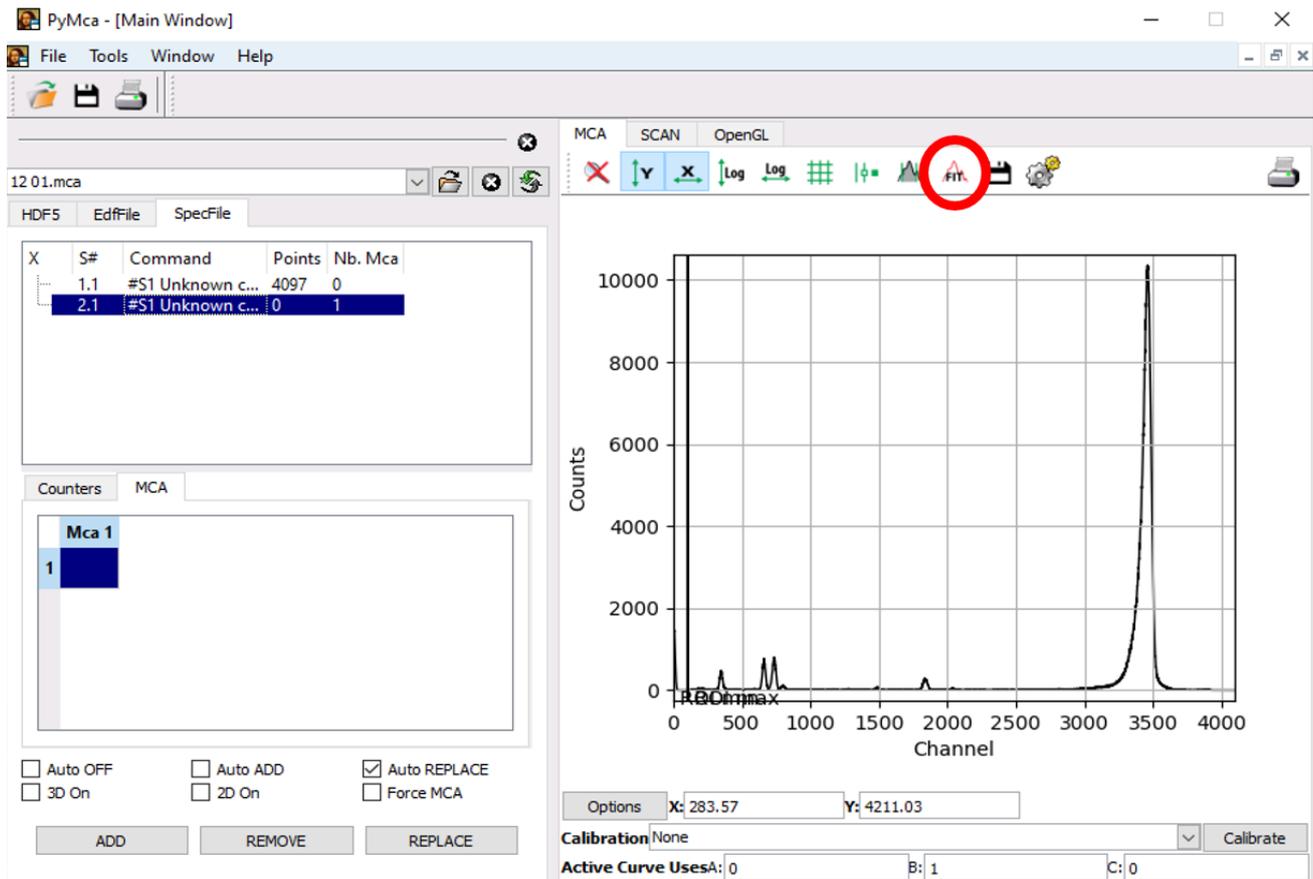


Figura 5.1. Tela de abertura do programa PyMCA

O espectro deve ser calibrado, clicando-se em *Tools* (indicado pelo círculo vermelho e pelo número 1) e depois em *calibrate*. Ao fazer isso será aberta a tela da Figura 5.3, onde seleciona-se as duas janelas (com círculo vermelho e número 1) e ao clicar em *search* seleciona-se os picos e suas energias manualmente. Para tanto é necessário identificar ao menos dois picos do espectro. Então de volta à tela da Figura 5.2, clicando-se no ícone circulado em vermelho e identificado pelo número 2, assim aplica-se a calibração do espectro no eixo X (energia).

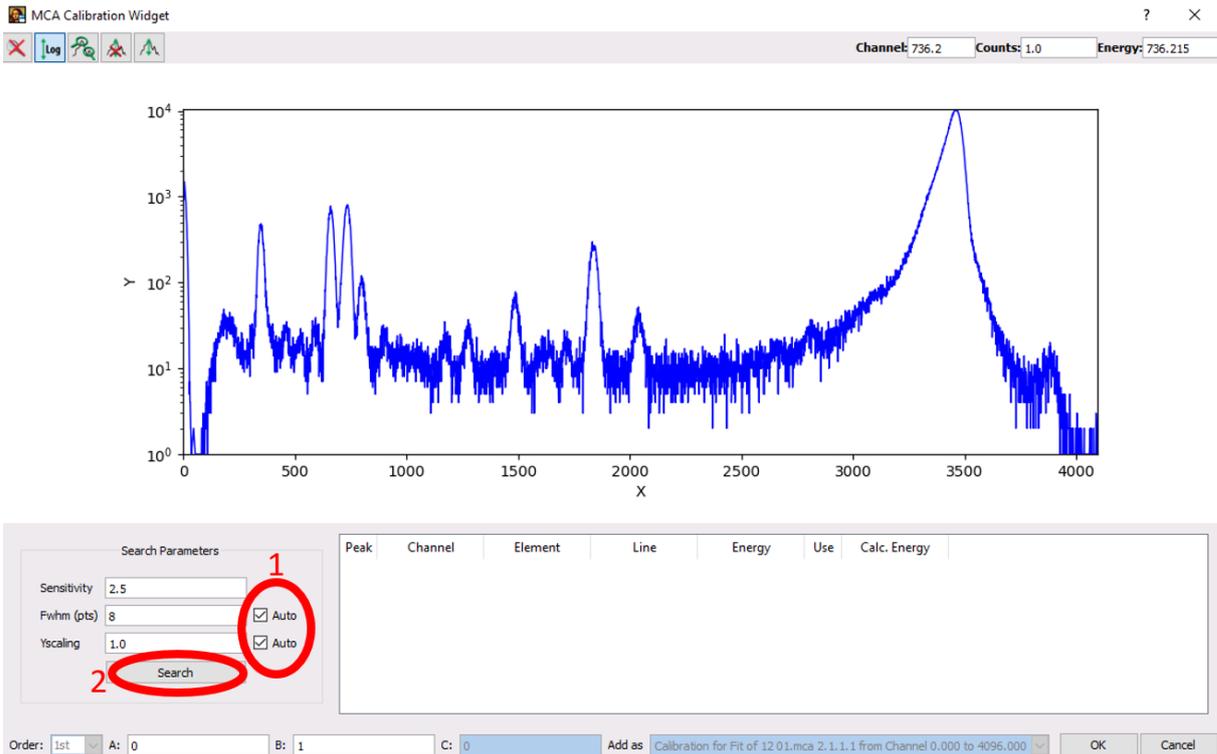


Figura 5.2. Tela de *fitting* de espectros do programa PyMCA.

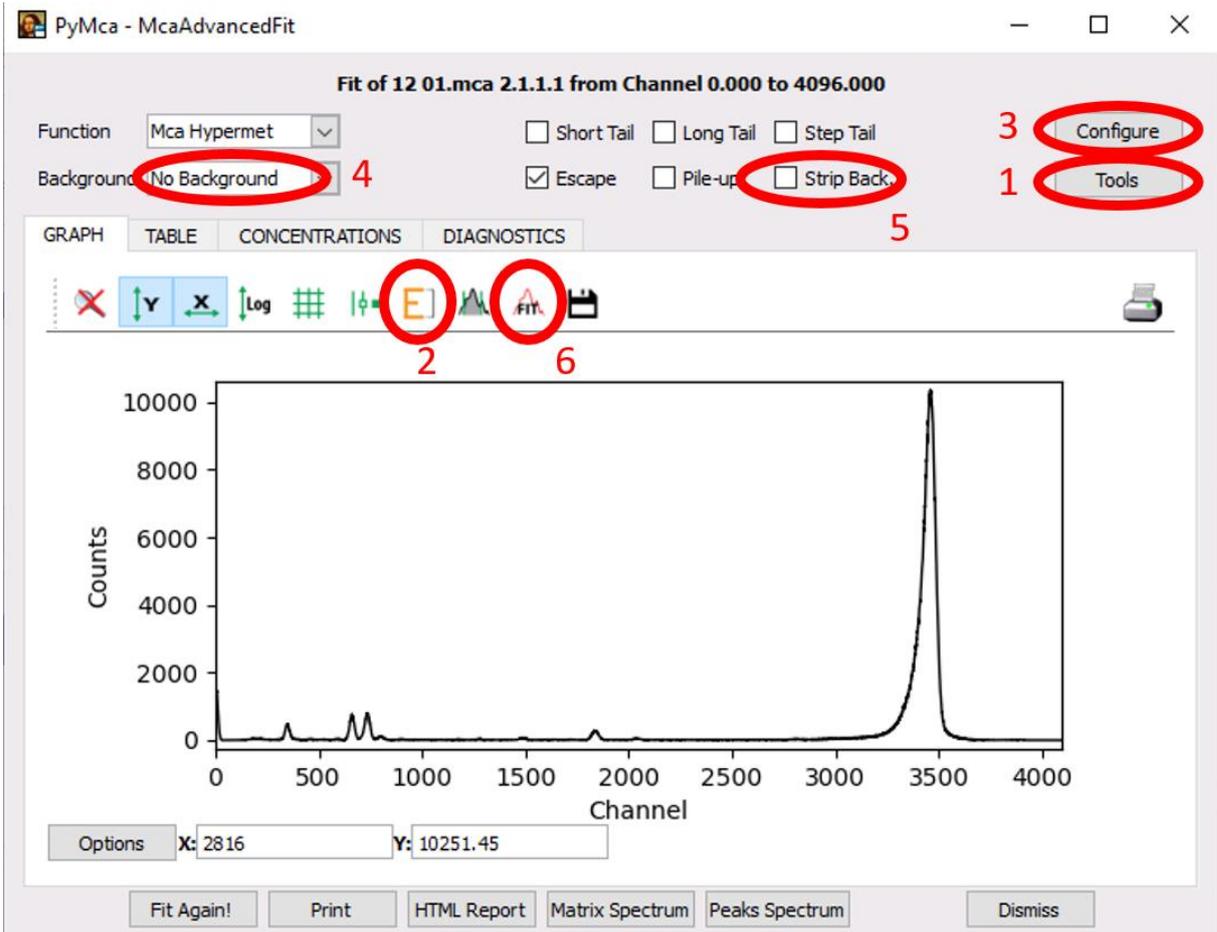


Figura 5.3. Tela de calibração de energia do espectro no programa PyMCA

Para escolher os elementos clica-se no botão *configure* (indicado por um círculo vermelho e pelo número 3) e será aberta uma tela como a da Figura 5.4. Na janela *Peaks* escolhe-se os elementos e suas respectivas linhas de fluorescência. Em seguida, na janela *Fit* (Figura 5.5) seleciona-se o início e o final do espectro (círculo vermelho), deixando apenas a área de interesse, este processo auxilia um melhor *background* posteriormente.

Por fim, para definir o *background* retorna-se à tela da Figura 5.2, escolhe-se uma característica para o *background* no círculo vermelho indicado pelo número 4, e seleciona-se a janela *Strip back*, indicada pelo número 5. Então basta clicar em *Fit* indicado pelo número 6 e será definido no espectro o *fitting* e o *background* (Figura 5.6).

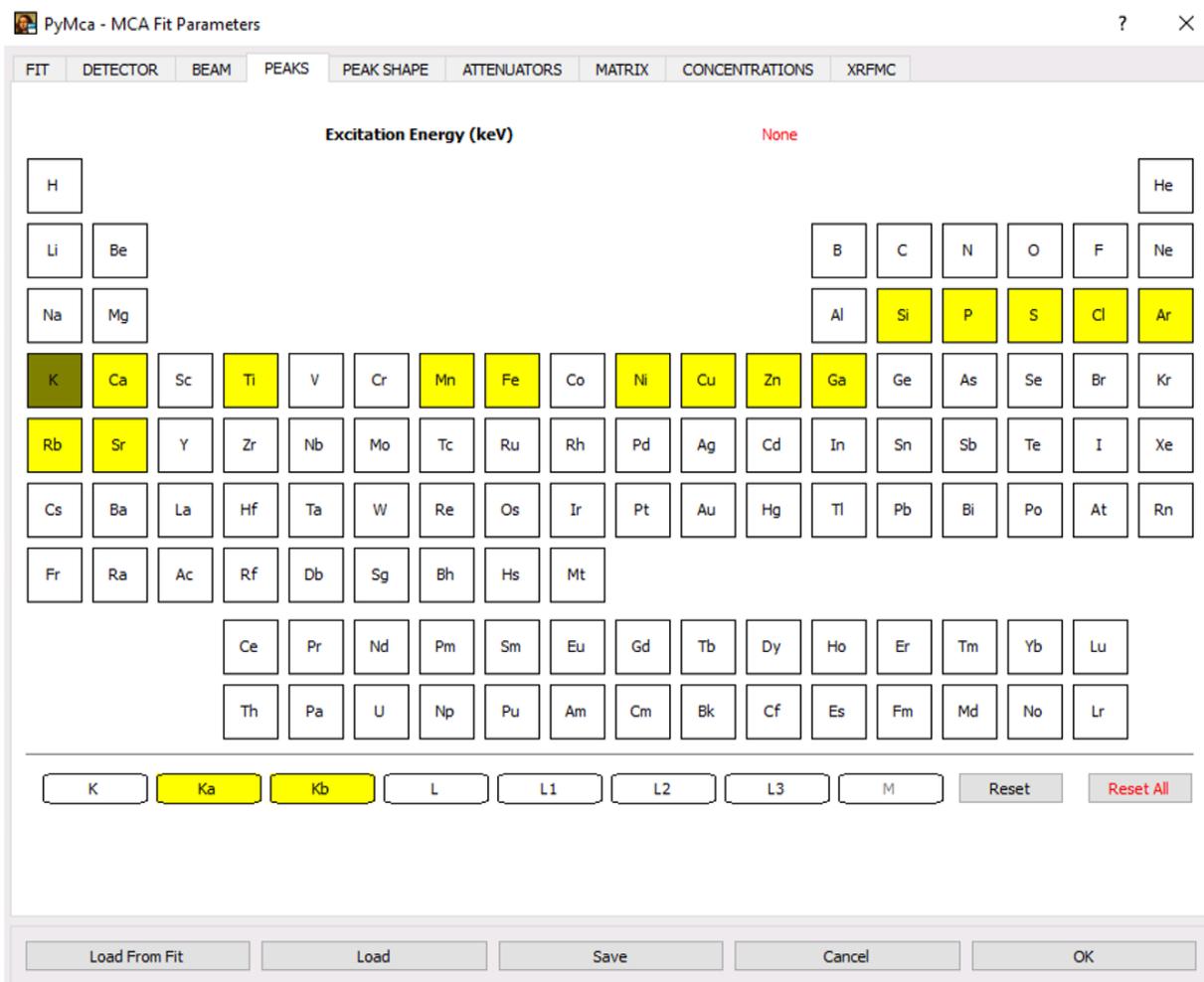


Figura 5.4 Janela no programa PyMCA na qual seleciona-se os elementos que são encontrados no espectro

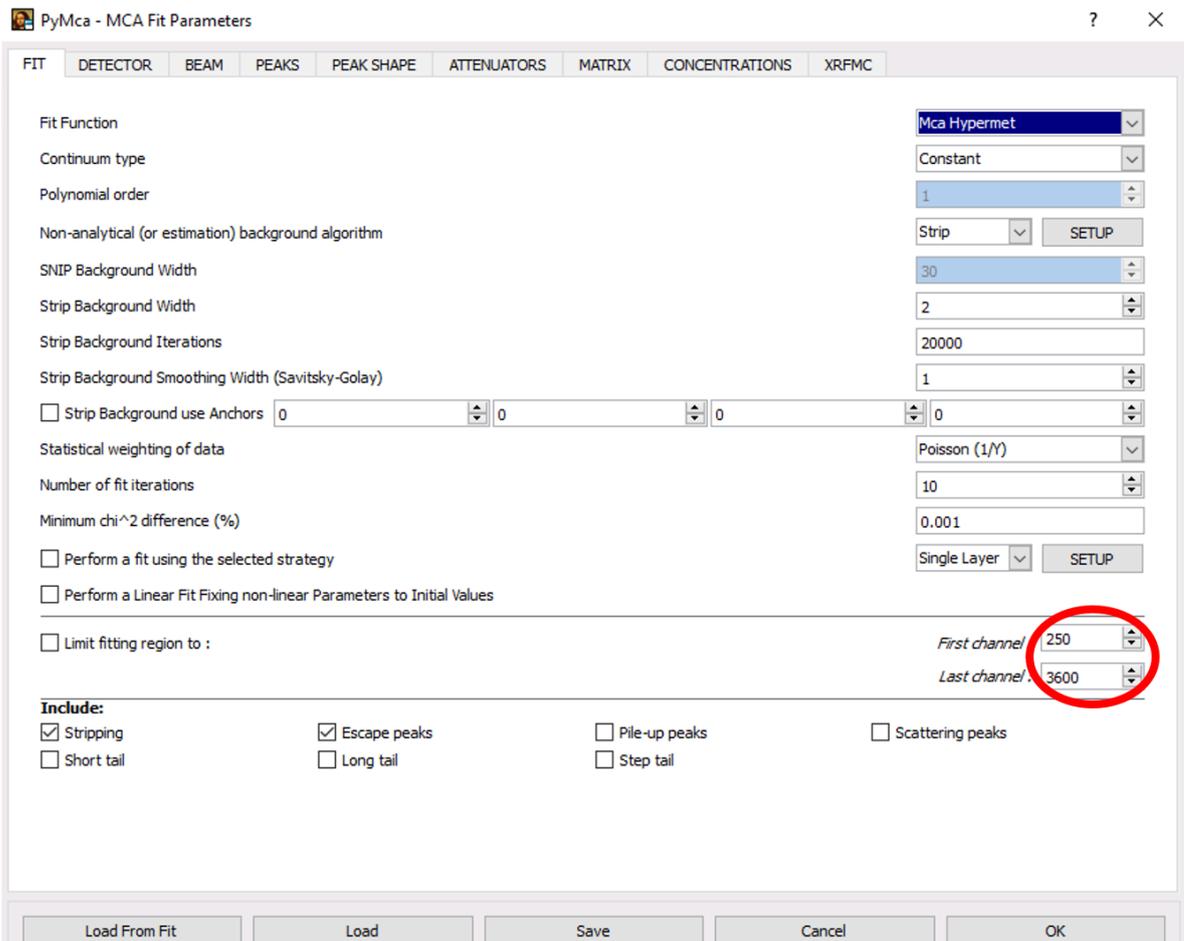


Figura 5.5. Janela na pode-se definir variáveis do espectro, como corte de regiões que não serão processadas

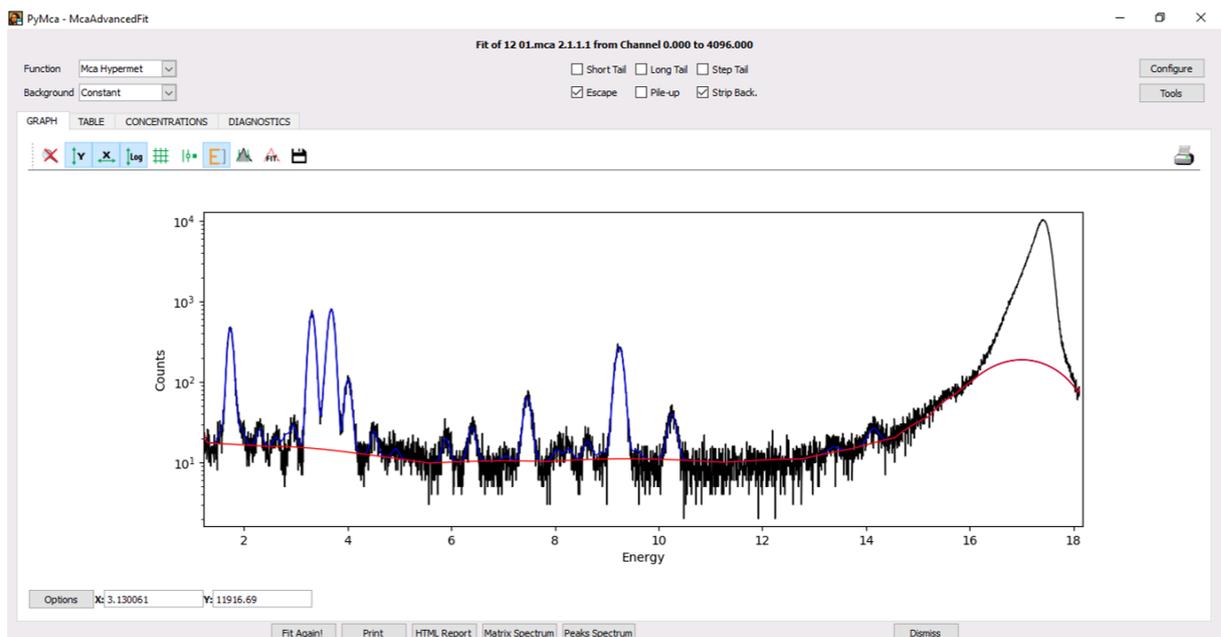


Figura 5.6. Tela onde é realizado o *fitting* ao final de um processo. Em vermelho destaca-se o *background* e em azul o *fitting* (ajuste) do espectro

A Figura 5.7 apresenta um diagrama que resume as etapas envolvidas no preparo de amostra, aquisição de dados e o processamento dos espectros.

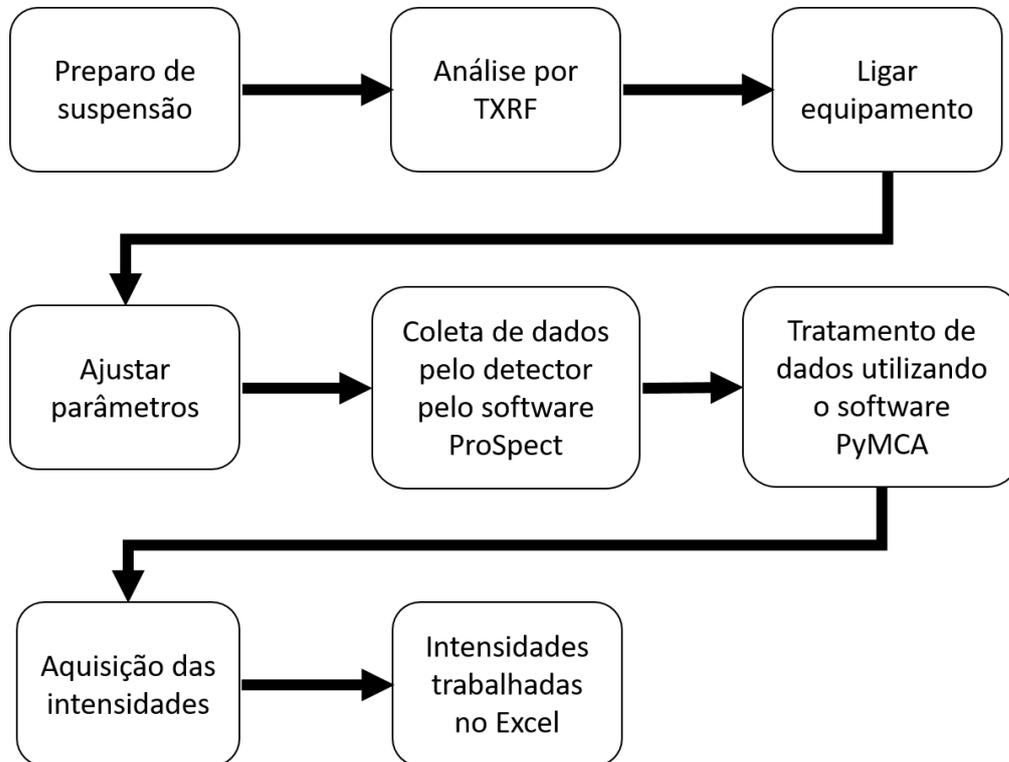


Figura 5.7. Etapas envolvidas durante a análise por TXRF

5.2. Linearidade e curvas de calibração

5.2.1. Limite de detecção e relação com μ -XRF e EDXRF

A função matemática utilizada para calcular o LOD é mostrada na Eq. 5.1 (NASCIMENTO, 1999):

$$\text{LOD} = 3 * \sqrt{\frac{I_{z(\text{BG})}}{t}} * \frac{C_{\text{Ga}}}{I_{\text{Ga}} S'} \quad (\text{Eq. 5.1})$$

Onde, $I_{i(\text{BG})}$ é a intensidade do *background* (contagens por segundo) para o elemento z, t é o tempo (s), C_{Ga} é a concentração do gálio (padrão interno), I_{Ga} é a intensidade obtida para o gálio e S' é a sensibilidade relativa, mostrada na Eq. 5.2.

$$S' = \frac{S_z}{S_{Ga}} \quad (\text{Eq. 5.2})$$

S_z é a sensibilidade do elemento Z e S_{Ga} é a sensibilidade do padrão interno (Ga). Pode-se obter a sensibilidade relativa através da curva de calibração construindo-a com os valores das intensidades relativas (intensidade do elemento de interesse dividida pela intensidade do padrão interno).

Para calcular o LOQ, utiliza-se a Eq. 5.3, porém com um fator de multiplicação 10, ao invés de 3. Como mostra a Eq. 5.1.

$$\text{LOQ} = 10 * \sqrt{\frac{I_{z(\text{BG})}}{t}} * \frac{C_{Ga}}{I_{Ga}S'} \quad (\text{Eq. 5.3})$$

O LOD é o sinal gerado por uma concentração de um elemento que pode ser claramente diferenciado do branco, ou no caso, da radiação de fundo. Já o LOQ é, na prática, o menor valor de concentração da curva de calibração, mostra o limite mínimo para que seja possível fazer uma análise quantitativa. Ambos os valores tem a ver com as médias das medidas no branco e com o desvio padrão dessas médias (VALCÁRCEL CASES; LÓPEZ-LORENTE; LÓPEZ-JIMÉNEZ, 2018).

Através da sensibilidade relativa ao padrão interno (Ga) obtida por meio da inclinação da curva de calibração, relacionando-a com as intensidades obtidas pelo espectro, calculou-se a concentração de cada elemento nas amostras com a equação 5.4.

$$C_z = \frac{I_z}{S'} \quad (\text{Eq. 5.4})$$

Onde C_z é a concentração do elemento, I_z a intensidade e S' a sensibilidade relativa, que é mostrada na Equação 6.

A Figura 5.8 compara os espectros obtidos para uma amostra contendo Fe, Ga e Se nos sistemas de TXRF, EDXRF (Shimadzu EDX-720) e microanálise por XRF (μ -XRF EDAX Orbis PC). Os preparos de amostra foram distintos, para TXRF a amostra foi depositada sobre o substrato quartzo, e nos demais a amostra foi depositada sobre filme de polipropileno de 6 μm montado em cubeta. Em resumo, observa-se que a razão sinal ruído é superior na TXRF, o que implica em limites de detecção menores. As principais causas desse resultado são a supressão do ruído e a excitação pelo campo de ondas estacionárias.

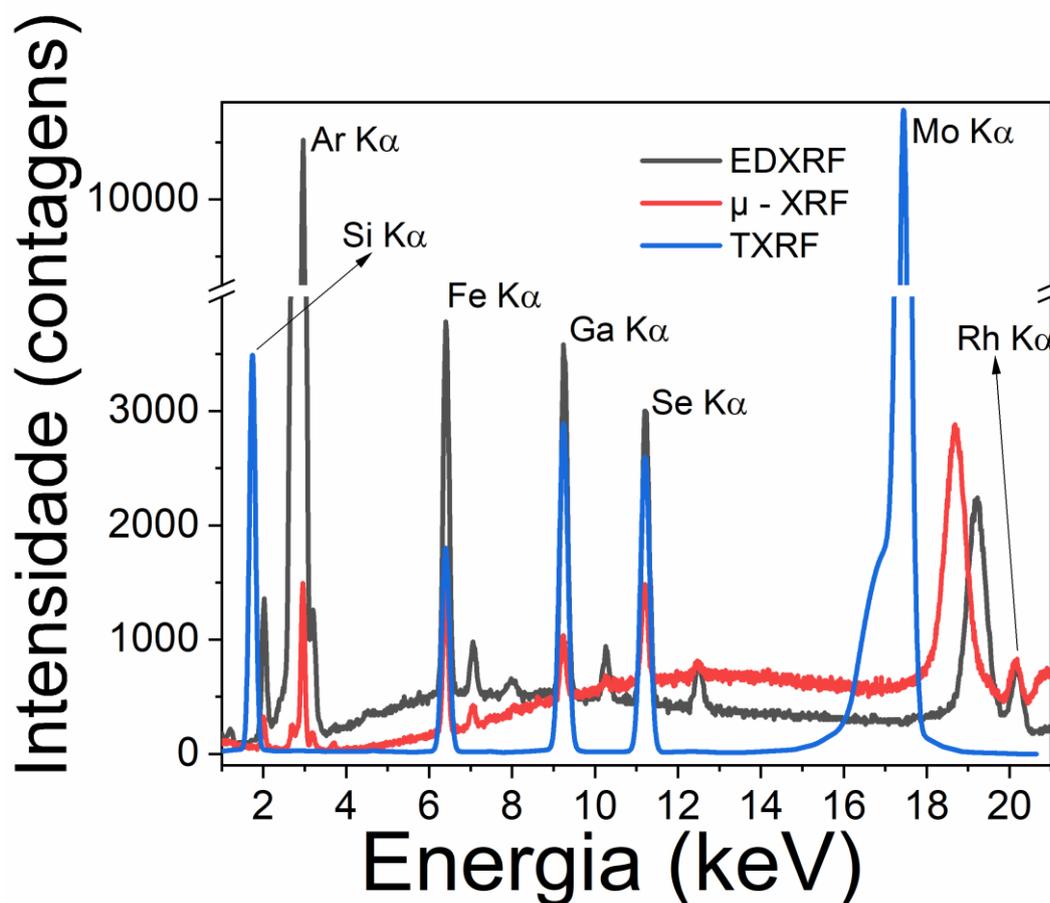


Figura 5.8. Comparação entre espectros obtidos nos equipamentos EDXRF convencional (1000 μ A, 50 kV e 300 s com feixe de 5 mm), μ -XRF (900 μ A, 40 kV e 300 s, com feixe de 30 μ m), e TXRF (30 mA, 45 kV e 300 s, com feixe monocromático) no laboratório de instrumentação nuclear, CENA – USP. Os padrões utilizados no EDXRF e no TXRF possuem concentrações de 10 mg L⁻¹ de Fe, Ga e Se, já o padrão utilizado no μ -XRF possui 10 mg L⁻¹ de Ga e 30 mg L⁻¹ de Fe e Se

A Tabela 5.1 apresenta os limites de detecção obtidos para Fe, Ga e Se durante a otimização da tensão e da corrente do sistema de TXRF. O limite de detecção foi calculado empregando-se a equação 5.5, que é o cálculo do limite de detecção sem a utilização de padrão interno. Os melhores limites de detecção foram obtidos empregando-se 50 kV e 25 mA.

$$\text{LOD} = 3 * \frac{\sqrt{\text{BG}/t}}{s} \quad (\text{Eq. 5.5})$$

Tabela 5.1. Limites de detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$) obtidos para diferentes correntes e tensões após 300 segundos de irradiação

Elemento	Limite de detecção				
	Tensão (kV) / Corrente (mA)				
	40 / 20	45 / 20	50 / 20	45 / 30	50 / 25
Ferro	76,8	60,5	44,9	51,7	44,1
Gálio	54,3	39,2	28,3	32,2	29,8
Selênio	48,8	35,6	24,6	29,8	25,9

A Tabela 5.2 fornece os limites de detecção obtidos nos três sistemas de fluorescência de raios X (μ -XRF, EDXRF convencional e TXRF). Observa-se que os limites de detecção proporcionados pela TXRF são de uma ordem de grandeza menor.

Tabela 5.2. Comparação entre limites de detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$) obtidos com 3 diferentes equipamentos de EDXRF. Todos com o tempo de análise de 300 segundos. O μ - XRF empregou corrente 900 μA e tensão 40 kV, o EDXRF utilizou corrente 1000 μA e tensão 50 kV e o TXRF empregou corrente 45 kV e tensão 30 mA (Não foi utilizada a melhor condição de tensão e corrente devido à instabilidade do equipamento ao elevar a próximo ao máximo (60 kV))

Elemento	Limite de detecção		
	Equipamento		
	μ - XRF	EDXRF	TXRF
Ferro	293,0	115,5	42,7
Gálio	312,4	116,2	30,4
Selênio	696,1	116,8	28,7

Por fim, a Tabela 5.3 mostra o efeito do tempo análise sobre o LOD no sistema de TXRF para uma amostra contendo 10 mg L^{-1} de ferro, gálio e selênio. A Figura 5.9 revela que o limite de detecção diminui conforme o tempo de análise aumenta, contudo, os incrementos são decrescentes, isso mostra que o resultado está de acordo com a Equação 5.1, onde o tempo está no denominador, dentro do radical, a Figura 5.10 mostra um gráfico dessa relação. Quanto mais se aumenta o tempo, mais próximo ficará do limite da técnica e com isso mais difícil será melhorar os resultados.

Tabela 5.3. Limites de detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$) obtidos com a corrente e tensão otimizadas, com variações do tempo de análise. Tensão utilizada: 50 kV. Corrente: 25 mA

Elemento	Limite de detecção						
	Tempo (s):						
	10	30	90	180	300	600	1000
Ferro	379,0	130,2	65,8	54,4	42,7	30,5	22,3
Gálio	224,9	87,1	49,5	39,0	30,4	20,9	14,7
Selênio	203,8	93,7	43,6	32,3	28,7	19,5	14,4

O equipamento utilizado na TU Wien, no qual esse trabalho foi baseado, utiliza o tempo otimizado de 1000 segundos por análise, e oferece os seguintes limites de detecção ($\mu\text{g kg}^{-1}$): 46 para K; 29 para Ca; 5,1 para Mn; 5,2 para Fe, 2,9 para Cu e 2,5 para Zn (STRELI et al., 2004). Os limites de detecção alcançados no equipamento descrito nessa dissertação foram maiores do que os obtidos pela TU Wien. Isso pode ser consequência da potência do tubo ou eficiência do detector.

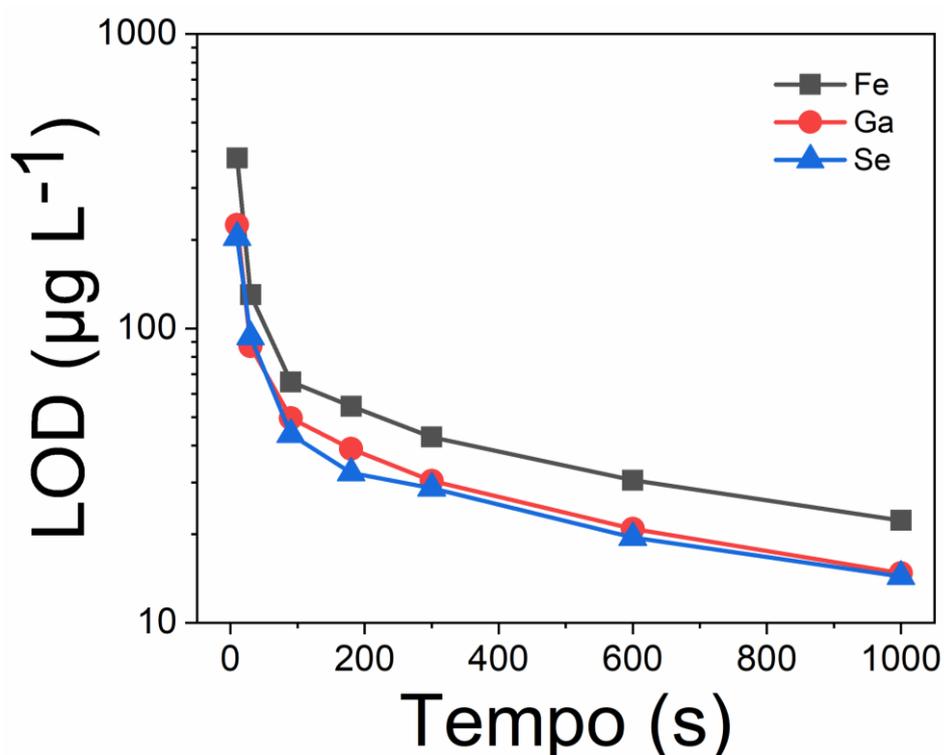


Figura 5.9. Relação entre o tempo de análise e o limite de detecção para o equipamento de TXRF

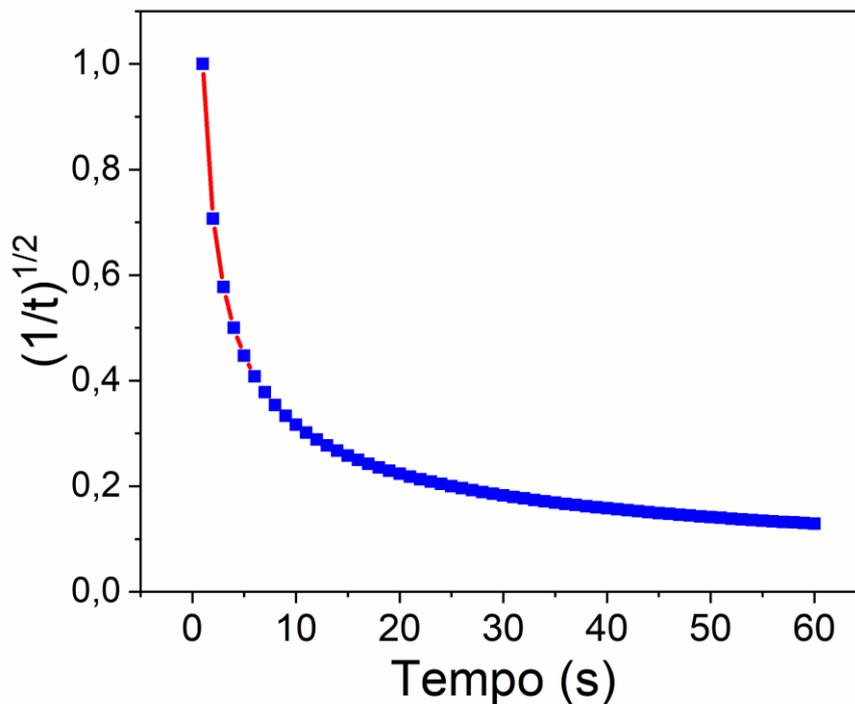


Figura 5.10. Gráfico do componente tempo da equação de limite de detecção

5.2.2. Curvas analíticas de calibração a partir de padrões líquidos

Foram obtidas curvas de calibração para os elementos: P, S, K, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu e Zn com cinco a sete pontos. As amostras foram feitas com padrões líquidos de 1000 mg L^{-1} dos elementos citados acima, com o auxílio de micropipetas e balança analítica de precisão.

Tais elementos foram escolhidos por serem macro (P, S, K e Ca) e micro (Mn, Fe, Co, Ni, Cu e Zn) nutrientes minerais de plantas. A faixa de concentração em que as curvas foram construídas compreendeu $1\text{-}50 \text{ mg L}^{-1}$ para os macronutrientes e $0,1\text{-}30 \text{ mg L}^{-1}$ para os micronutrientes. Esses valores foram escolhidos de acordo com aqueles comumente encontrados em amostras agroambientais. A Figura 5.11 mostra as curvas analíticas de calibração para todos os elementos analisados e seus respectivos coeficientes de determinação. A Figura 5.12 mostra a relação entre a sensibilidade e número atômico.

Utilizou-se corrente de 20 mA, tensão de 40 kV, e tempo de 300 segundos, mantendo o tempo morto em aproximadamente 6%. Coletaram-se três espectros para cada amostra.

Normalizaram-se os espectros pela intensidade do gálio (padrão interno) para corrigir possíveis variações na secagem da amostra e no feixe, e geraram-se curvas relacionando as intensidades obtidas.

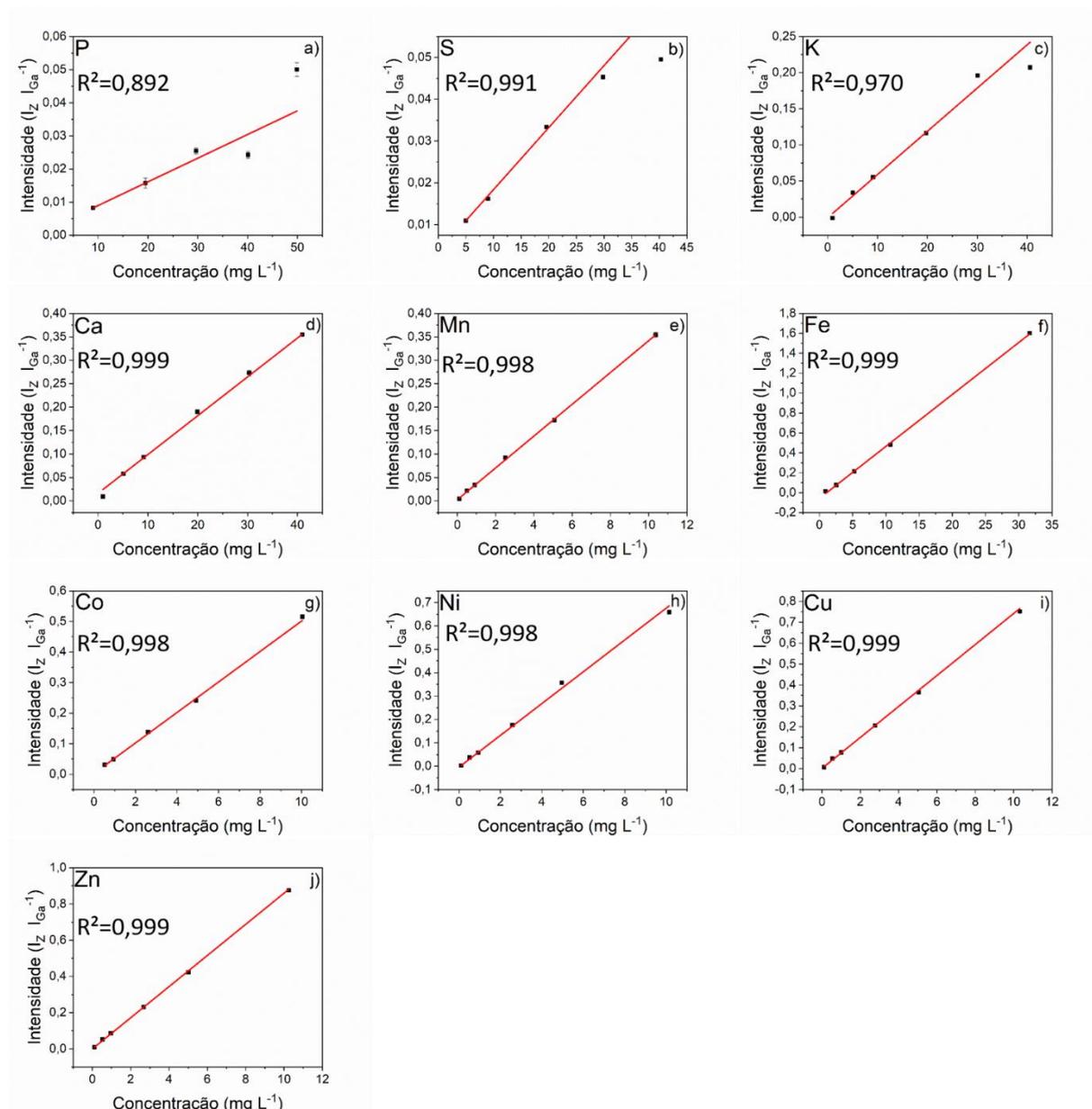


Figura 5.11. Curvas de calibração de padrões líquidos para a) fósforo, b) enxofre, c) potássio, d) cálcio, e) manganês, f) ferro, g) cobalto, h) níquel, i) cobre e j) zinco

O pior desempenho para os elementos leves pode ter sido causado pela atenuação da fluorescência de raios X pelo ar, bem como pelo baixo rendimento de fluorescência intrínseco. A faixa linear para XRF pode variar de acordo com o elemento e a sensibilidade devido à amostra, porém, costuma estar em torno de cinco ordens de grandeza em casos de amostras

líquidas, por exemplo, entre 0,001 e 10 mg L⁻¹, em elementos considerados micronutrientes em plantas. (BORGESSE et al., 2018).

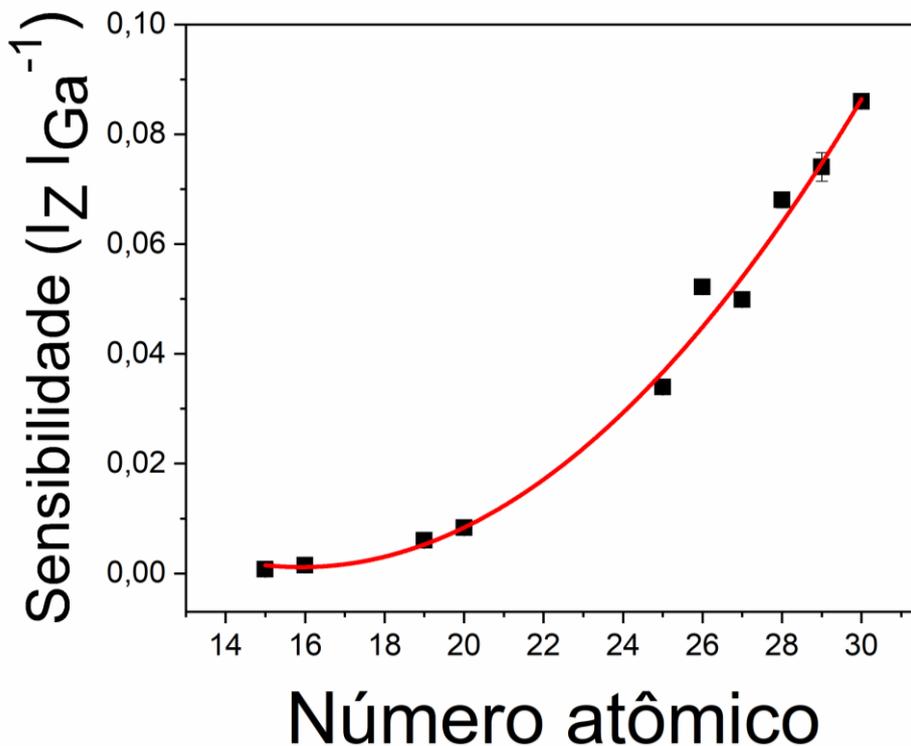


Figura 5.12. Relação entre o número atômico e a sensibilidade relativa (normalizada pelo gálio)

A energia de excitação dos elementos (17,48 keV) é ótima para a excitação de energias levemente inferiores. Visto que a energia absorvida por elétrons para trocas de camada eletrônica e ionizações é quantizada, a eficiência do processo aumenta quando a energia de excitação é ligeiramente superior a energia de ionização (KLOCKENKÄMPER; VON BOHLEN, 2015). Energias próximas ao Si tem piores resultados, pois o porta-amostra de Si interfere na análise, prejudicando a análise do Al e do P. Devido a isso, o Al não foi estudado nesse trabalho.

5.2.3. Curvas analíticas de calibração para tecido vegetal

Foram construídas curvas analíticas de calibração utilizando sete materiais de referência certificados (CRM) de tecidos vegetais, sendo eles: NIST 8412, NIES No. 3, BCR 60, NIST 1570, IAEA V-10, NIST 1547, NIST 1515 e NIST 1573a. As suspensões foram preparadas utilizando 20 mg de tecido vegetal e 1 mL de água deionizada contendo 10 mg kg⁻¹ de gálio

como padrão interno. Elas foram deixadas em banho ultrassônico por 5 minutos, e depois agitadas em vórtex a 2500 rpm por aproximadamente 1 minuto. Em seguida, foram pipetados 10 μL no centro de substratos refletor de quartzo (DALIPI et al., 2017).

As medidas dos espectros de XRF foram conduzidas no equipamento de TXRF montado no laboratório. Utilizaram-se parâmetros similares às análises de amostras líquidas, explicados acima (subcapítulo 5.2.2), geraram-se curvas relacionando as intensidades obtidas pelas análises com as concentrações indicadas em cada um dos CRM. As curvas e os valores do coeficiente de determinação podem ser vistas na Figura 5.13. Os limites de detecção podem ser vistos na Tabela 5.4.

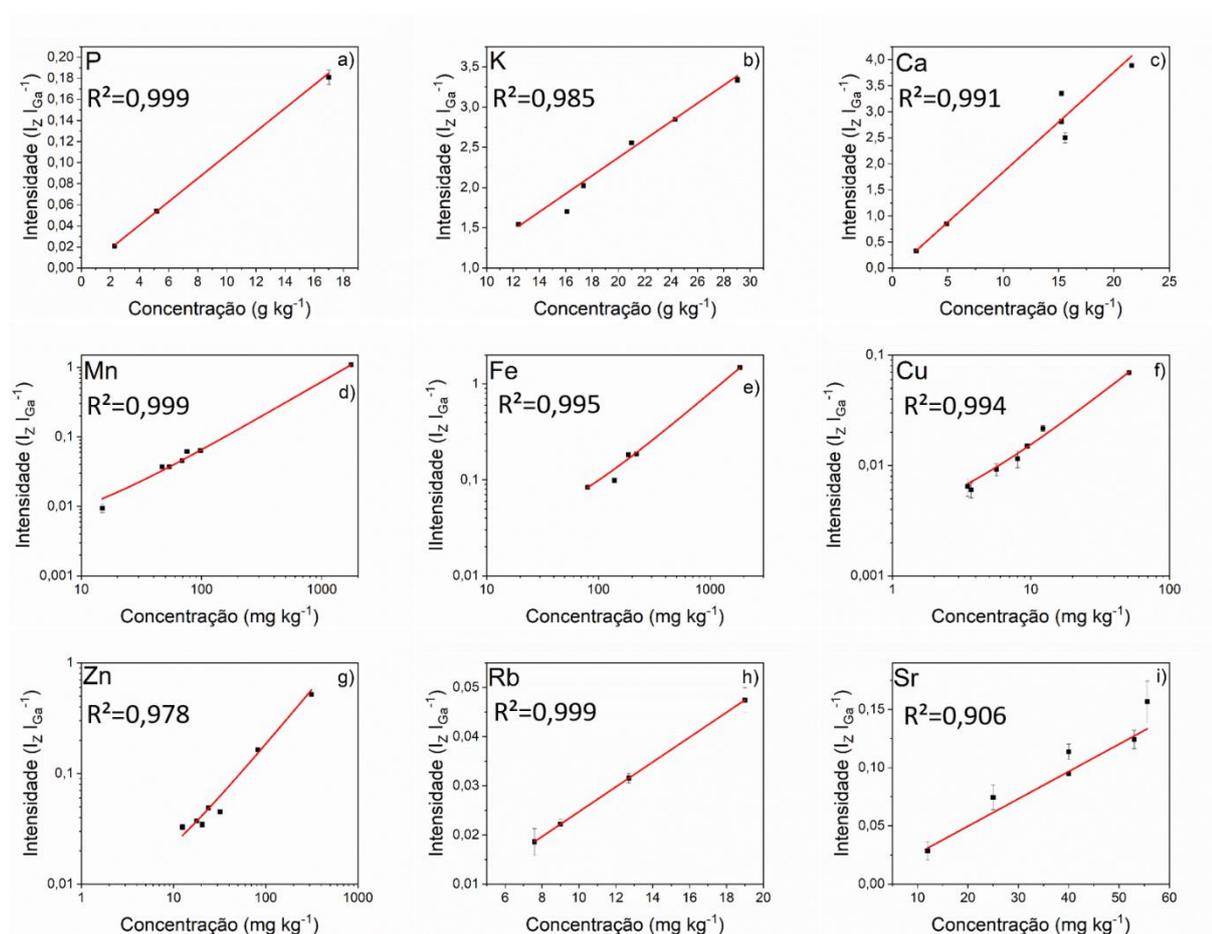


Figura 5.13. Curvas de calibração para tecido vegetal para os elementos, geradas a partir da análise por TXRF, com tensão de 40 kV, corrente de 20 mA e tempo de 300 segundos. Sendo a) fósforo, b) potássio, c) cálcio, d) manganês, e) ferro, f) cobre, g) zinco, h) rubídio e i) estrôncio

Nota-se que o número de pontos entre as curvas é diferente, isso se deve ao fato de alguns que CRMs não possuem valores certificados para alguns elementos estudados.

Tabela 5.4 Limites de detecção (mg kg^{-1}) encontrados para análises de tecido vegetal

Limite de detecção (mg kg^{-1})								
P	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Rb	Sr
856.67	425.60	289.74	10.60	16.52	3.67	5.67	2.69	4.86

5.2.4. Curvas analíticas de calibração em amostras de solo

Para fazer as curvas de calibração para solo, utilizaram-se 14 materiais de referência certificados, foram eles: BCR 142R, BCR 143R, IAEA Soil 7, NIST 2586, SARM 2, SARM 11, USGS AGV 2, USGS BCR 2, USGS COQ 1, USGS DNC 1a, USGS GSP 2, USGS QLO 1a, USGS SDC 1 e USGS W 2a.

As suspensões foram preparadas utilizando-se 10 mg de solo e 990 μL de solução aquosa contendo 1% de Triton™ (HW-1000 Surfactante, DOW) e 10 mg L^{-1} de bismuto como padrão interno. Diferente do método utilizado como base (BILO et al., 2019), em que é utilizado gálio empregado como padrão interno, utilizou-se o elemento bismuto, pois segundo os documentos de certificação dos materiais, alguns deles continham gálio. O bismuto foi escolhido por ser um elemento não presente na amostra e por sua linha de fluorescência L_{α} (10,839 keV) estar numa região próxima à linha K_{α} do Ga (9,25 keV), normalmente utilizado como padrão interno, e é uma boa região de excitação para a energia do tubo de raios X com ânodo de molibdênio (17,480 keV). Além disso, ela não sofre interferência do espalhamento Compton. Em seguida, as suspensões foram colocadas em banho ultrassônico por 15 minutos, agitadas em vórtex a 2500 rpm por aproximadamente um minuto, então foram pipetadas 10 μL , nos porta-amostras e secas em estufa a 60°C por uma hora.

Os parâmetros de análise foram tempo de 300 segundos, tensão de 40 kV, corrente de 20 mA, e coletou-se três espectros por amostra. O elemento tório foi adicionado na suspensão devido a um caso de estudo de solo que contém tório e que vem sendo utilizado no laboratório. As curvas de calibração e seus valores de coeficiente de determinação podem ser vistas na Figura 5.14.

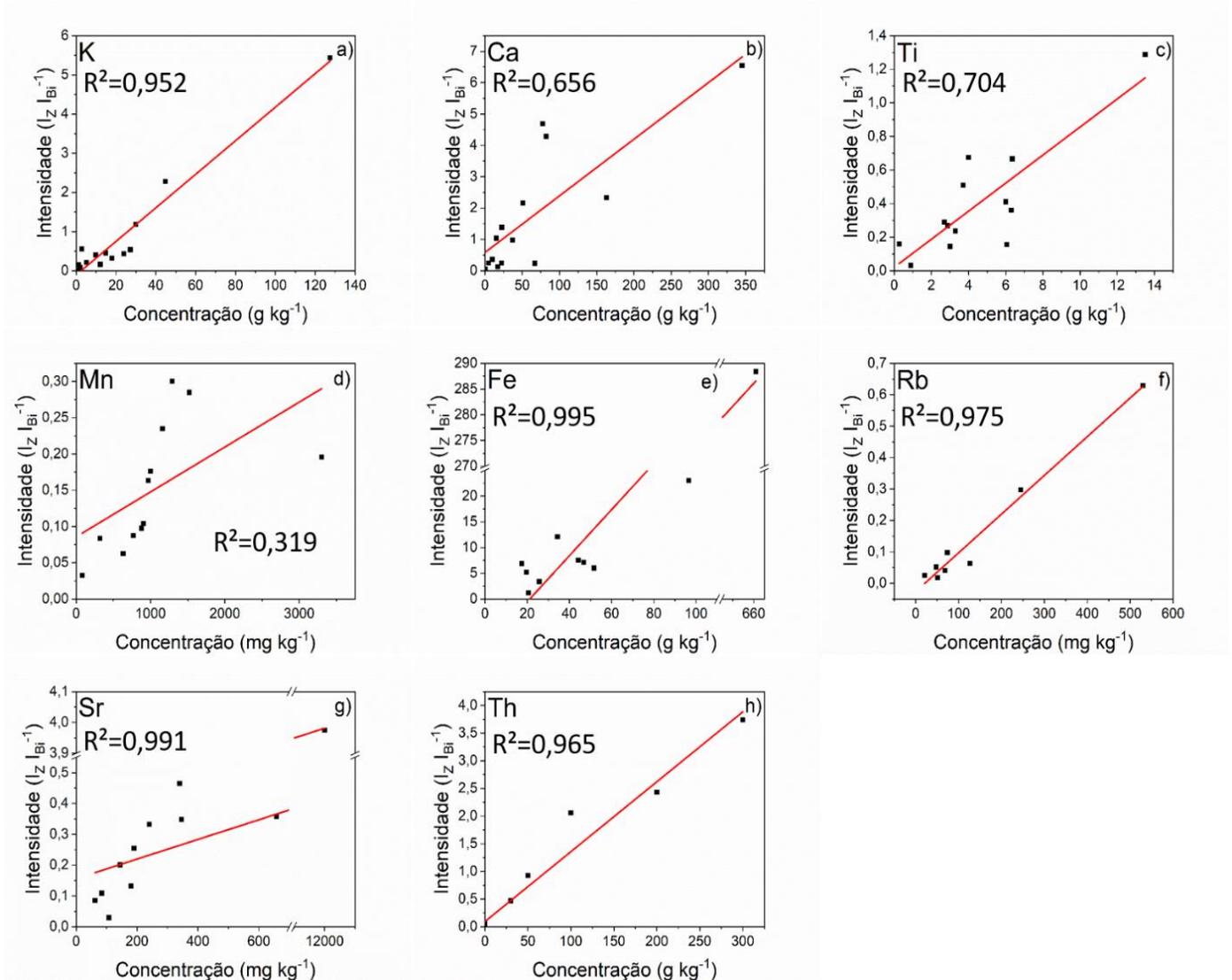


Figura 5.14. Curvas de calibração geradas a partir da análise de suspensões de amostras certificadas com a adição de TritonTM e sem espessantes. Sendo: a) potássio, b) cálcio, c) titânio, d) manganês, e) ferro, f) rubídio, g) estrôncio e h) tório

As correlações das curvas de calibração não foram satisfatórias para a maioria dos elementos, exceto os com número atômico maior ou em altas concentrações como K, Fe, Rb, Sr e Th. Avaliando os motivos, notou-se que as suspensões precipitavam rapidamente, afetando a representatividade da amostra na alíquota utilizada no substrato refletor. Então foram desenvolvidas estratégias para aumentar a viscosidade da suspensão. Testaram-se diferentes concentrações de ácido poliacrílico (Pol(acrylic acid) 25% em solução salina em água, Aldrich) e de amido de milho, e analisando o tempo em que a suspensão leva para precipitar, foi escolhido uma suspensão com 50% de ácido poliacrílico.

Outro problema encontrado foi a utilização do banho ultrassônico. Devido à alta viscosidade da amostra, a homogeneização não foi satisfatória. Então, a viscosidade foi afinada com diferentes volumes de água e de álcool para compensar o efeito do ácido poliacrílico na suspensão. Ao final, a suspensão com melhor resultado foi com 20% de etanol, 50% de ácido poliacrílico e 30% de solução aquosa com adição de padrão interno e 1% de Triton™. A Figura 5.15 mostra a diferença de decantação de uma suspensão com apenas água e Triton™ e de outra com água, Triton™, etanol e ácido poliacrílico.

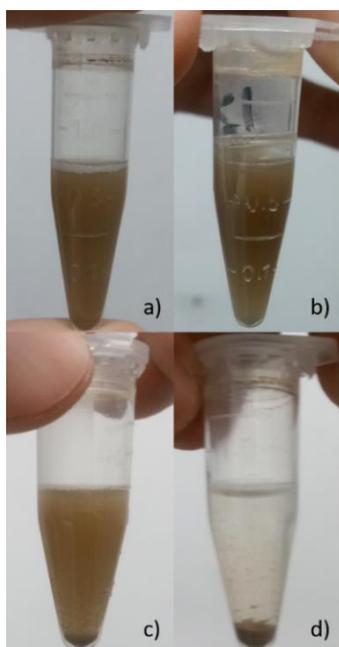


Figura 5.15. Diferenças entre as suspensões e a decantação da amostra certificada NIST SEM 2586: a) suspensão com água, Triton™, etanol e ácido poliacrílico logo após a agitação; b) suspensão com água, Triton™, etanol e ácido poliacrílico 1 minuto após a agitação; c) suspensão com água e Triton™ logo após a agitação, d) suspensão com água e Triton™ 1 minuto após a agitação

Nesse novo preparo de suspensões escolheu-se o selênio como padrão interno, pois as linhas L do bismuto interferiam com diversos elementos, por exemplo, a linha Bi L_{β} (13,023 keV) e a linha Th L_{α} (12,968 keV). Considerou-se não ter sido distinguido o sinal do selênio e do ruído nos dados anteriores. Não foi utilizado o gálio (padrão interno mais comumente utilizado) pelo fato dos documentos dos CRMs documentarem a presença de gálio em várias concentrações diferentes nas amostras.

Os parâmetros de análise foram os mesmos utilizados anteriormente (subcapítulo 5.2.2). Os resultados com controle tixotrópico foram melhores do que aqueles inicialmente obtidos. A Figura 5.16 apresenta as curvas analíticas de calibração. Os limites de detecção e quantificação são encontrados na Tabela 5.4.

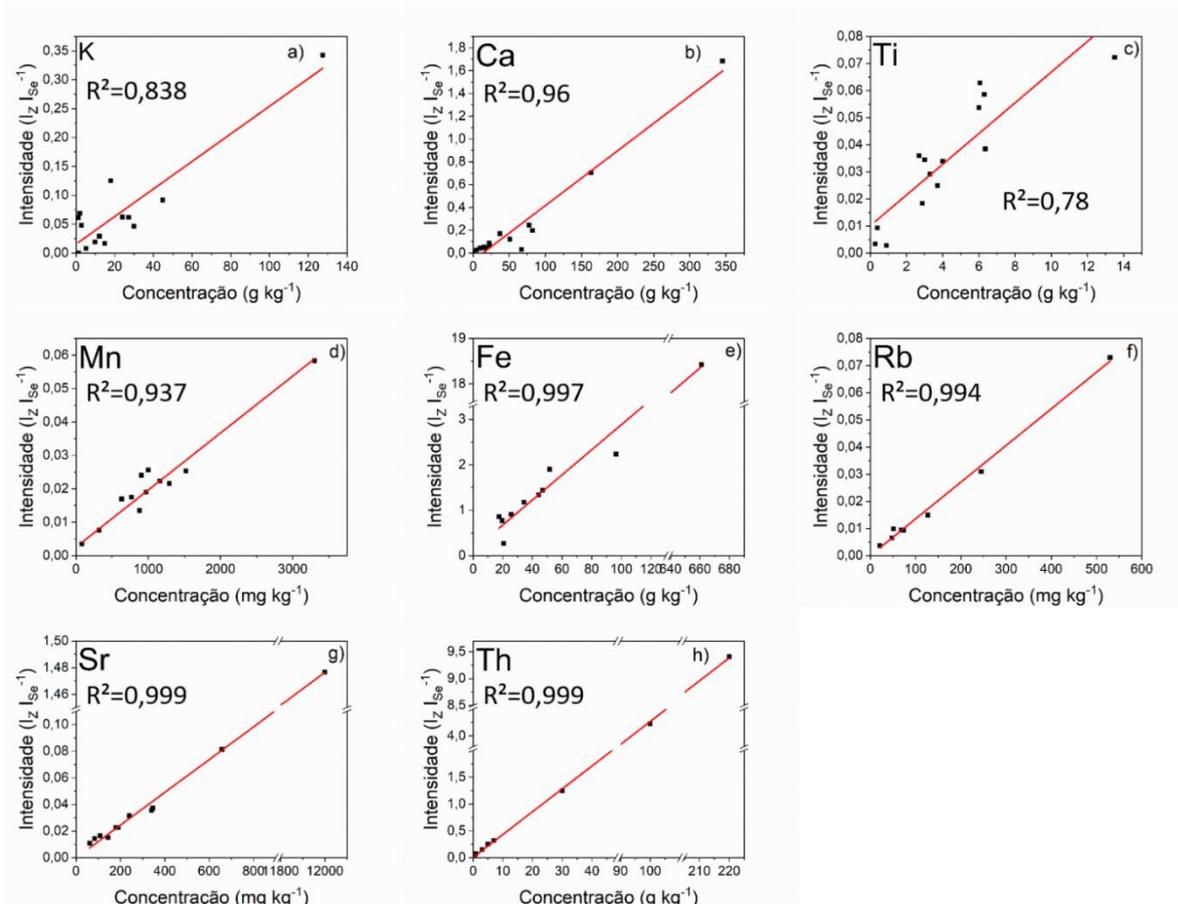


Figura 5.16. Curvas de calibração geradas a partir da análise de suspensões de amostras certificadas com a adição de Triton™ e com espessante. Sendo: a) potássio, b) cálcio, c) titânio, d) manganês, e) ferro, f) rubídio, g) estrôncio e h) tório.

Tabela 5.5. Limites de detecção e limites de quantificação para os elementos das curvas de calibração da Figura 5.16

Elemento	K	Ca	Ti	Mn	Fe	Rb	Sr	Th
LOQ (mg kg ⁻¹)	914,38	313,01	254,56	114,22	69,29	15,87	18,92	132,18
LOD (mg kg ⁻¹)	274,32	93,90	76,37	26,19	20,79	4,76	5,68	39,66

Os valores de limite de detecção encontrados foram: para cádmio, 17 mg kg⁻¹; para chumbo, 0,4 mg kg⁻¹; e para zinco, 0,6 mg kg⁻¹ (BILO et al., 2019). Os valores foram consideravelmente melhores do que aqueles reportados no presente estudo se comparados com resultados de números atômicos próximos. Talvez isso tenha se dado pela natureza do solo

avaliado. Como em nosso estudo utilizou-se vários tipos de solo e até mesmo rochas, gerando uma diferença de matrizes, isso pode ter afetado a curva de calibração e por consequência a sensibilidade e o limite de detecção.

Assim como foi observada melhora nas curvas de calibração ao adicionarmos um agente tixotrópico na suspensão, resultados com baixa linearidade em análises de lama por espectrometria de absorção atômica (AAS) foram estabilizados e tiveram uma melhora quando tiveram agentes tixotrópicos no preparo das amostras (MILLER-IHLI, 1988; STEPHEN; LITTLEJOHN; OTTAWAY, 1985).

5.2.5. Sensibilidades em diferentes tipos de amostras

A sensibilidade para os elementos analisados em líquidos (soluções aquosas) foram melhores do que para os elementos analisados em tecido vegetal, que por sua vez, foram melhores do que os elementos analisados em solo (Tabela 5.5). Isso está em acordo com os valores de coeficiente de determinação obtidos, que foram melhores para amostras líquidas seguido de amostras de tecido vegetal e por amostras em solo. Isso pode se dar pelo fato de a densidade e a granulometria da amostra afetar o filme fino formado no substrato (KREGSAMER; STRELI; WOBRAUSCHEK, 2002).

Tabela 5.6. Sensibilidade relativa entre amostras liquidas, de tecido vegetal e de solo

Sensibilidade relativa ($S_Z S_{PI}^{-1} 10^{-5}$)			
Elemento	Líquido	Tec. Veg.	Solo
P	69,5	1,09	
S	102		
K	504	12,44	0,24
Ca	831	19,22	0,48
Ti			0,57
Mn	3299	61,47	1,71
Fe	5343	78,62	2,76
Co	4667		
Ni	6404		
Cu	7128	133	
Zn	8485	180	
Rb		252	13,5
Sr		235	12,3
Th			4,26

6. ESTUDOS DE CASOS

6.1. Comparação entre seiva e solução nutritiva

Comumente, a determinação da fertilidade do solo é conduzida com o uso de soluções extratoras que emulam o comportamento químico dos exsudatos liberados na rizosfera, mas há ainda uma outra vertente. Ela defende que a seiva bruta transportada pela planta seja analisada para determinar a concentração dos nutrientes disponíveis no solo (QUAGGIO; DE SOUZA, 2020). Nesse caso, a própria planta atua como extrator, evitando possíveis erros na capacidade de extração fornecida pelos reagentes químicos.

Um dos principais desafios envolvidos na análise de seiva é seu diminuto volume, o que impede o uso de técnicas como AAS e ICP OES. Nesse contexto, a TXRF aparece como uma alternativa capaz de solucionar esse problema.

No presente estudo, as concentrações de elementos encontradas na seiva da planta foram comparadas com aquelas da solução nutritiva. Também se determinou quanto nutriente foi extraído pela planta num intervalo de 24 horas. Estudos de nutrição feitos pela análise da seiva de plantas em hidroponia não são algo novo, existem, por exemplo, estudos da absorção do tomate em casas de vegetação (ZEKKI; GAUTHIER; GOSSELIN, 1996) e para a reutilização de soluções nutritivas, estudando a taxa de absorção ((BUGBEE, 2004).

6.1.1. Metodologia

Foram utilizadas cinco plantas de soja (*Glycine max*- M7739 ipro) em estágio V6, mantidas com solução nutritiva de Hoagland modificada por 24 horas. A Tabela 6.1 mostra a composição da solução nutritiva. Até chegar nesse estágio as plantas foram cultivadas em hidroponia com a mesma solução. As plantas ficaram em um mesmo recipiente, onde compartilharam a mesma solução nutritiva.

Tabela 6.1. Componentes e concentrações de cada elemento da solução nutritiva onde as plantas de soja foram cultivadas

Solução nutritiva de Hoagland modificada		
Sal	Elemento	Concentração (mg L ⁻¹)
Macronutrientes		
KNO ₃	N	67,90
	K	23,50
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	Ca	80,00
NH ₄ H ₂ PO ₄	P	7,75
MgSO ₄ ·7H ₂ O	S	20,80
	Mg	15,60
Micronutrientes		
KCl	Cl	0,88
H ₃ BO ₃	B	0,13
MnSO ₄ ·H ₂ O	Mn	0,05
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Zn	0,06
CuSO ₄ ·5H ₂ O	Cu	0,01
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	Mo	0,02
NaFeEDTA	Fe	3,00

Cortou-se o caule da planta na região inferior ao pecíolo e adequou-se uma mangueira para que a seiva expelida fosse acumulada e retirada com o auxílio de uma micropipeta. Foram coletados em torno de 100 mg de seiva de cada planta. A Figura 6.1 mostra o processo de obtenção da seiva.

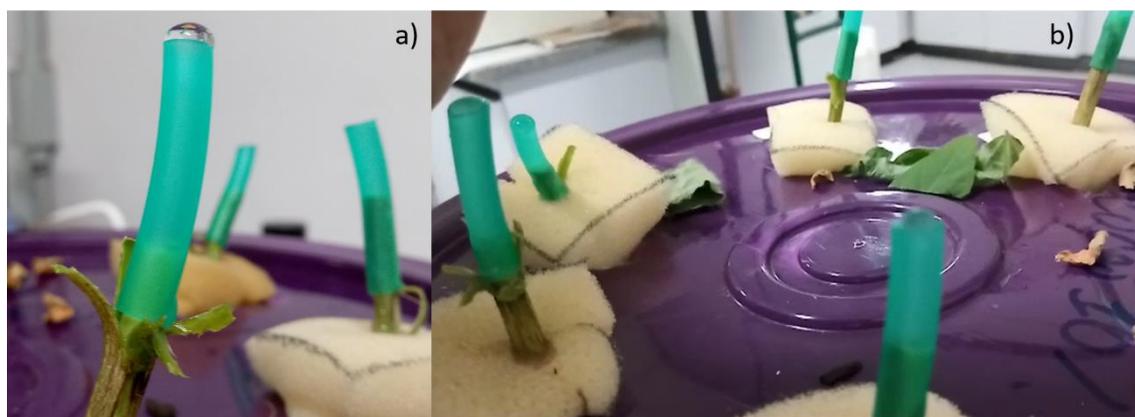


Figura 6.1. Coleta de seiva de plantas de soja, com canudos colocados na região cortada do caule

O volume de seiva de cada uma das replicatas variou entre 60 e 120 μL e foram adicionados a esse volume 10 mg L^{-1} de gálio como padrão interno. Em seguida pipetou-se 10 μL da amostra no substratos de quartzo para que fossem secos em estufa a 50° C. Foram coletados três espectros por amostra com os seguintes parâmetros de análise: tensão de 40 kV, corrente de 20 mA e tempo de 300 segundos, com tempo morto em torno de 6 %.

As curvas de calibração foram construídas a partir de padrões líquidos na concentração de 1000 mg L^{-1} (as mesmas do subcapítulo 5.2.2). A Tabela 6.2 apresenta os valores do coeficiente de determinação para as curvas de calibração. Para a análise, adicionou-se 10 μL de amostra no substrato refletor de quartzo, e mais 10 μL de amostra em uma segunda análise, totalizando 20 μL . Os resultados foram comparados.

6.1.2. Resultados e discussão

Os espectros obtidos para os dois volumes de amostra podem ser vistos na Figura 6.2.

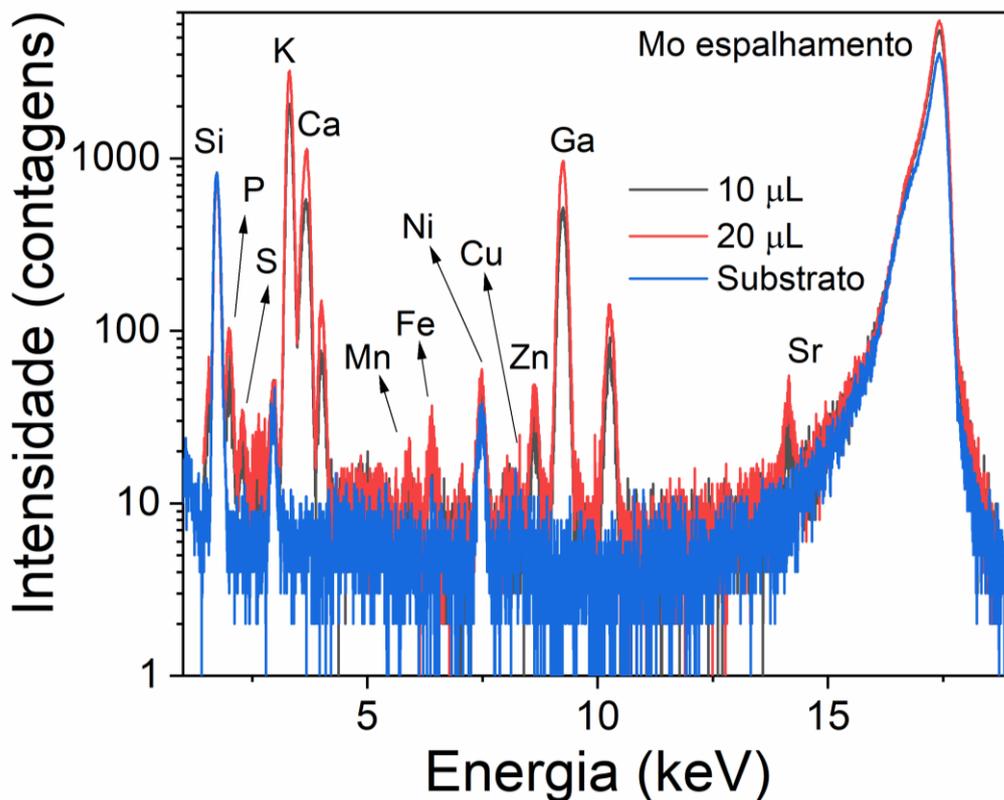


Figura 6.2. Espectros de fluorescência de raios X em regime de reflexão total, obtido pela análise da amostra 1 com 10 μL e com 20 μL e por um substrato refletor vazio

Tabela 6.2. Valores de coeficiente de determinação obtidos para os elementos químicos analisados

Elemento	P	S	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Sr
R ²	0,89	0,86	0,87	0,99	0,98	0,98	0,98	0,97	0,98

A Tabela 6.3 mostra os valores de LOD e LOQ para as análises feitas com 10 µL de amostra, e a Tabela 6.4 para as análises feitas com 20 µL de amostra. A Tabela 6.5 apresenta as concentrações obtidas com 10 µL de amostra, e a Tabela 6.6 mostra as concentrações obtidas para as análises com 20 µL.

É possível notar pelas Tabelas 6.5 e 6.6 que, principalmente para o K, a planta absorveu quase toda a concentração da solução nutritiva após 24 horas, para outros elementos, entretanto, essa diferença não pôde ser verificada nesses testes. Análises feitas com 20 µL tiveram um melhor desempenho de LOD e de CV, talvez pela baixa concentração de elementos com Z acima do Ca, que auxiliam para um baixo efeito matriz. Mesmo não tendo sendo adicionado intencionalmente Sr na solução nutritiva, ele foi encontrado na solução e na seiva da planta (motivo pelo qual foi decidido, possivelmente alguns sais utilizados na solução nutritiva continham o elemento).

Tabela 6.3. Resultados para LOD (mg kg⁻¹), LOQ (mg kg⁻¹) e coeficiente de variação (CV) (%) para as análises com 10 µL de amostra de seiva

	P	S	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Sr
LOD	20,143	10,046	2,982	0,613	0,125	0,038	0,054	0,047	0,031
LOQ	67,144	33,486	9,938	2,044	0,417	0,126	0,181	0,157	0,103
CV	28	27	25	32	26	25	23	25	21

Tabela 6.4. Resultados para LOD (mg kg⁻¹), LOQ (mg kg⁻¹) e coeficiente de variação (CV) (%) para as análises com 20 µL de amostra de seiva

	P	S	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Sr
LOD	11,314	5,466	1,496	0,332	0,068	0,020	0,028	0,025	0,016
LOQ	37,714	18,219	4,987	1,108	0,226	0,065	0,093	0,084	0,055
CV	29	25	14	18	34	33	26	25	27

Tabela 6.5. Concentrações (mg L⁻¹) obtidas para as amostras de seiva de soja para as análises com 10 µL de amostra. SND refere-se à solução nutritiva depois de 24 horas de contato com a planta e SNA refere-se à solução nutritiva antes do contato com a planta. CV refere-se a coeficiente de variação e med refere-se a valores médios

Amostra	Concentração (mg L ⁻¹)													
	1		2		3		4		5		SND		SNA	
Elemento	med	CV	med	CV	med	CV	med	CV	med	CV	med	CV	med	CV
P	241,2	4,0	272,8	1,8	181,6	5,4	147,2	1,5	155,3	21,6	0,0	0,0	0,0	0,0
S	24,2	37,7	32,4	3,7	26,7	40,6	28,7	2,4	14,8	45,9	106,2	14,4	87,4	22,6
K	1633,7	0,0	1464,3	0,3	1189,4	1,6	912,5	0,5	1195,9	0,8	0,0	0,0	53,6	19,3
Ca	87,8	0,6	117,9	0,2	148,3	0,9	100,6	1,6	72,1	0,1	64,0	9,9	55,5	23,1
Mn	0,2	9,6	0,2	131,5	0,2	22,6	0,2	52,0	1,2	3,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Fe	0,3	8,1	11,1	1,4	0,2	0,4	0,3	27,4	0,9	4,0	1,8	20,4	2,1	31,0
Cu	0,1	48,6	0,1	40,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Zn	0,3	3,2	0,3	7,9	0,4	0,4	0,3	5,2	0,2	2,6	0,1	121,1	0,4	149,5
Sr	0,2	0,4	0,2	4,7	0,3	5,8	0,2	1,2	0,1	9,5	0,1	7,6	0,1	29,4

* Resultados abaixo do LOQ e acima do LOD.

Tabela 6.6. Concentrações (mg L^{-1}) obtidas para as amostras de seiva de soja das análises com 20 μL de amostra. SND refere-se à solução nutritiva depois de 24 horas de contato com a planta e SNA refere-se à solução nutritiva antes do contato com a planta. CV refere-se a coeficiente de variação e med refere-se a valores médios

Concentrações (mg L^{-1}) - segunda pipetagem														
Amostra	1		2		3		4		5		SND		SNA	
Elemento	med	CV	med	CV	med	CV	med	CV	med	CV	med	CV	med	CV
P	250,7	0,6	214,8	1,9	178,3	4,6	154,5	9,0	165,4	6,5	0,0	0,0	0,0	0,0
S	23,9	2,6	28,4	20,0	17,0	22,1	31,3	1,1	17,2	10,7	105,9	32,0	89,2	27,8
K	1328,8	0,4	1481,9	2,4	846,4	1,2	808,2	0,9	1122,8	0,7	0,0	0,0	63,4	15,7
Ca	94,9	0,4	98,9	1,9	127,2	1,2	101,1	0,9	64,7	2,2	73,6	36,1	60,2	23,8
Mn	0,2	14,4	0,2	42,0	0,3	15,7	0,3	11,4	0,9	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0
Fe	0,2	5,0	4,2	0,2	0,2	0,8	0,2	3,5	0,2	17,4	2,4	33,2	2,1	19,2
Cu	0,0	12,8	0,1	5,2	0,0	0,0	0,0	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Zn	0,4	0,1	0,3	3,4	0,4	4,3	0,3	5,1	0,3	7,5	0,1	58,8	0,5	149,5
Sr	0,2	8,5	0,2	2,1	0,3	4,7	0,2	1,4	0,1	4,9	0,2	27,0	0,1	27,4

6.2. Comparação entre seiva e tecido vegetal

As análises da seiva da planta têm como objetivo observar as relações ou entre os teores nutricionais encontrados na diagnose da planta e, futuramente, relacionar a concentração dos nutrientes encontrados na seiva com a nutrição da planta. As análises objetivam também desenvolver um novo método de diagnose baseado na seiva da planta e não mais nas folhas e/ou grãos. Contudo esse foi um teste inicial, não obtendo nenhuma nova consideração sobre a possibilidade da análise além da motivação inicial.

A TXRF e a XANES (*X-Ray Absorption Near Edge Spectrometry*) foram utilizadas para estudar a especiação de As em seiva de pepino (MEIRER et al., 2007). A TXRF foi utilizada em conjunto com a (HPLC) cromatografia líquida de alta eficiência para a caracterização de Ni em seiva de pepino (MIHUCZ et al., 2001). A TXRF em conjunto com a HPLC também foi utilizada para estudar os efeitos da contaminação com Ni, V e Pb em seiva de pepino (TATÁR et al., 1999). A seiva de pepino também foi analisada por TXRF para determinar os efeitos de Cd, V, P e Ni (VARGA et al., 1999). Utilizando espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite, foram feitas análises minerais de Fe, Zn e Mn em seiva do pepino (BITYUTSKII et al., 2017).

6.2.1. Metodologia

Foram cultivadas 10 plantas de soja (*Glycine max*- M7739 ipro) em hidroponia, com solução nutritiva de Hoagland modificada (Tabela 6.1) até atingirem a etapa de desenvolvimento R1, correta para a diagnose (CARMELLO; OLIVEIRA, 2006). Coletou-se seiva e a terceira folha a partir do ápice da haste principal da planta, as folhas foram secas em estufa à 60°C, moídas com cadinho e pistilo com auxílio de nitrogênio líquido. As suspensões foram feitas de acordo com o subcapítulo 5.2.3. As análises foram realizadas conforme descrito no subcapítulo 6.1.

6.2.2. Resultados e discussão

A Figura 6.3 mostra a sobreposição dos espectros da seiva e do tecido vegetal, a Tabela 6.7 mostra o resultado da análise de dois CRMs utilizados na obtenção da curva de calibração, e a Tabela 6.8 mostra as concentrações obtidas para as amostras de seiva e de tecido vegetal, respectivamente. Os valores de LOD foram similares aos encontrados no subcapítulo 5.2.3.

Tendo como base o teor médio encontrado para esses elementos, a Tabela 6.8 apresenta os resultados encontrados no presente trabalho: os resultados para P e Ca ficaram acima do teor médio, enquanto que K e Mn ficaram dentro da média. Fe apresentou alguns resultados medianos e outros acima média. Já Cu e Zn tiveram alguns resultados medianos, porém, outros abaixo da média. Não foram obtidas relações entre as concentrações encontradas na seiva e no tecido vegetal, o que pode ter se dado pelo tempo de contato com a solução nutritiva, contudo, não é possível tirar nenhuma conclusão antes de serem feitos novos estudos sobre o caso. As concentrações encontradas na seiva foram sempre menores do que as encontradas em tecido vegetal, porém como não houve correção entre a seiva - analisada em base úmida -, e a folha - analisada em base seca -, isso era esperado pelo. Também se considera que a constituição elementar encontrada na seiva (majoritariamente proveniente do xilema, devido ao método de coleta) é feita de elementos da solução nutritiva que estão sendo absorvidos pela planta e transportados até as folhas naquele momento. A constituição elementar da folha é baseada em elementos já aceitos e transportados anteriormente pela planta, e que podem inclusive serem transportados novamente (MARSCHNER, 2011).

Em estudos com tecido vegetal não foram encontradas correlações entre as medidas de seiva e de tecido vegetal. O teor médio encontrado para o P é entre 2800 e 3900 mg kg⁻¹, para o K é entre 14400 e 20300 mg kg⁻¹, para Ca é entre 6200 e 11500 mg kg⁻¹, para Mn é entre 38 e 97 mg kg⁻¹, para Fe é entre 77 e 155 mg kg⁻¹, para Cu é entre 6 e 11 mg kg⁻¹ e para Zn é entre, 41 e 78 mg kg⁻¹ (KURIHARA; STAUT; MAEDA, 2014).

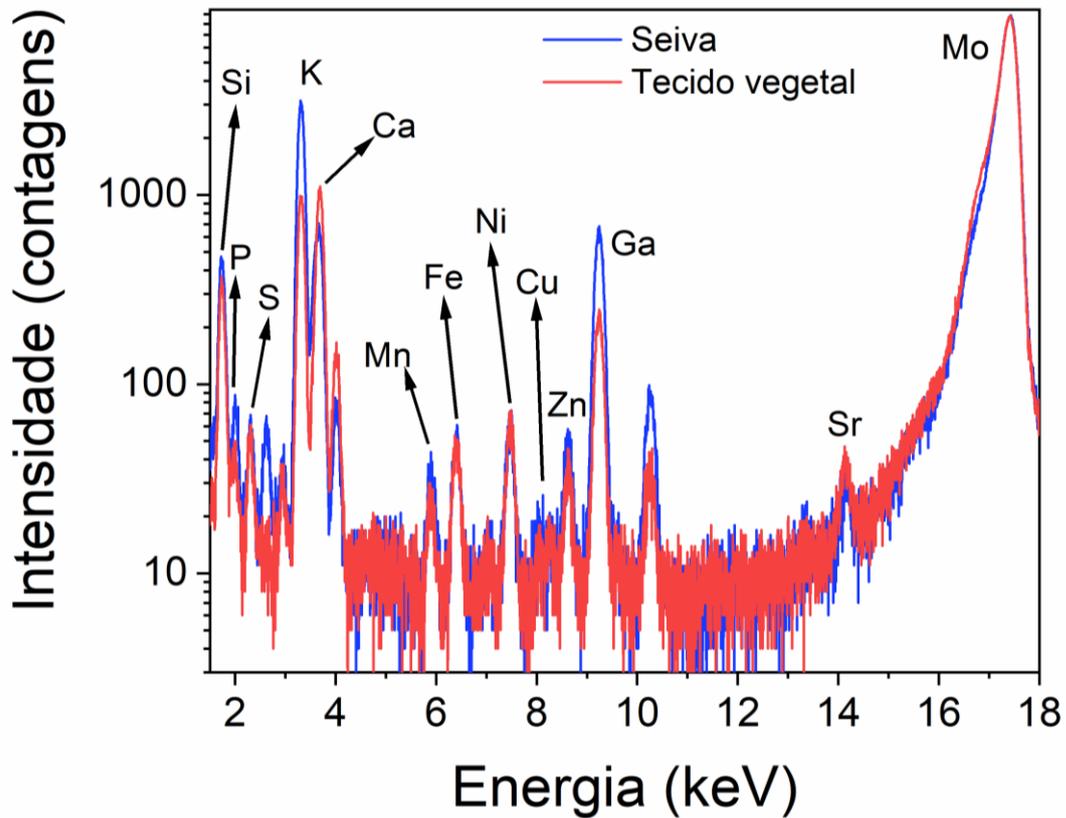


Figura 6.3. Espectros sobrepostos de seiva e de tecido vegetal

Tabela 6.7. Recuperações (%) encontradas nas análises do NIST 1515 e 1547, e concentrações (mg L^{-1}) documentadas, para comparação

Elemento	Recuperação (%)			
	1547		1515	
	NIST	Recuperação (%)	NIST	Recuperação (%)
K	24300	118	16100	118
Ca	15600	83	15260	93
Mn	98	98	54	105
Fe	220	103	80	110
Cu	3,7	25	5,64	144
Zn	17,9	51	12,5	02
Sr	53	94	25	99

Tabela 6.8. Concentrações (mg L⁻¹) encontradas na análise da seiva extraída da soja em estágio R1 e do tecido vegetal da respectiva planta. Os números de 1 a 10 indicam de qual planta é o resultado, para efeito de comparação com os resultados das análises em tecido vegetal

Elemento	Concentração (mg kg ⁻¹)																			
	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
	Seiva	Tec. Veg.	Seiva	Tec. Veg.	Seiva	Tec. Veg.	Seiva	Tec. Veg.	Seiva	Tec. Veg.	Seiva	Tec. Veg.	Seiva	Tec. Veg.	Seiva	Tec. Veg.	Seiva	Tec. Veg.	Seiva	Tec. Veg.
P	313	4470	391	5060	170	5143	473	4563	125	6574	300	6016	235	5565	176	3921	306	5357	245	3997
S	51	0	113	0	24	0	356	0	20	0	131	0	48	0	80	0	65	0	102	0
K	1129	14300	2873	20254	1047	18153	3210	13636	666	18285	2606	30912	667	18911	3141	15076	2102	17735	2195	11693
Ca	53	13397	50	17088	59	16119	28	19729	37	18751	78	19174	119	23073	91	14796	46	14338	78	15093
Mn	0,00	34,38	0,168*	63,72	0,00	40,19	0,120*	48,67	0,139*	75,39	0,91	82,05	0,091*	61,33	0,00	49,92	0,461*	45,35	0	31,17
Fe	0,47	229,13	0,30	134,40	0,21	133,42	0,22	134,36	1,12	134,21	0,63	185,57	0,39	166,35	0,23	112,90	0,19	113,93	0,18	91,15
Cu	0	2,852*	0,056*	4,984*	0	4,388*	0,081*	0,991*	0	5,40	0,064*	7,01	0,026*	6,93	0,042*	1,425*	0,043*	3,542*	0,050*	4,002*
Zn	0,33	34,68	0,36	33,45	0,15	39,86	0,52	27,47	0,35	39,02	0,59	53,79	0,27	23,13	0,00	18,61	0,25	33,75	0,18	19,12
Sr	0,12	39,78	0,09	50,07	0,12	44,19	0,047*	57,30	0,09	52,33	0,15	52,21	0,27	64,70	0,16	35,31	0,08	39,82	0,12	31,81

* Resultados abaixo do LOQ e acima do LOD

6.3. Determinação elementar em amostras de tecido vegetal e efeitos da moagem

As amostras utilizadas são do PIATV (Programa Interlaboratorial de Análise de Tecido Vegetal) desenvolvido pelo GAPE / ESALQ (Grupo de Apoio à Pesquisa e Extensão), que existe desde 1989. O PIATV é um programa que trabalha para otimizar e corrigir erros de análises de tecido vegetal. O programa conta atualmente com 145 laboratórios.

Os estudos feitos com amostras do PIATV foram desenvolvidos para que fosse possível fazer uma correlação entre os resultados referenciados das amostras e os resultados obtidos por TXRF. Não havia nenhum conhecimento sobre quais seriam as amostras, apenas que eram de tecido vegetal.

6.3.1. Metodologia

Foram utilizadas 10 amostras de tecido vegetal fornecidas pelo GAPE com concentrações de referência determinadas em exercícios interlaboratoriais. Essas mesmas amostras foram analisadas por TXRF.

Foram avaliados três tipos de preparo. Uma porção foi suspensa tal como recebida, ou seja, moída com moinho de facas. Essas foram então moídas com cadinho e pistilo. Uma porção foi moída com homogeneizador Modelo Bead Ruptor 24 Elite, marca Omni, com 3 ciclos de 30 segundos em velocidade de 6 m s^{-1} , sendo as amostras congeladas e nitrogênio líquido previamente. Após a moagem, o preparo das suspensões foi similar ao apresentado no Subcapítulo 5.2.

6.3.2. Resultados e discussão

A Tabela 6.9 mostra os resultados da análise de um CRM utilizado para fazer a curva de calibração. Valores de recuperação com alto erro, como o caso do Zn na Tabela 6.9, podem ser entendidos como provenientes da concentração reportada do CRM – principalmente em micronutrientes – ser muito próxima ao LOD encontrado para esses elementos (Tabela 5.4). Assim, por menor que seja a variação em termos de concentração, isso representará uma grande variação quando tratada como porcentagem.

Tabela 6.9. Recuperação (%) encontradas nas análises do NIST 1515 e concentrações documentadas (mg kg^{-1}), para comparação

Elemento	Recuperação (%)			
	Amostra (tratamento)			
	CRM	Sem moer	Cadinho	Moinho
K	16100	123	123	109
Ca	15260	102	96	97
Mn	54	97	108	71
Fe	80	110	110	130
Cu	6	88	67	123
Zn	13	227	116	228
Rb	9	82	109	35
Sr	25	105	90	103

Para propósitos de recomendação de adubação, onde os níveis de nutrientes são classificados simplesmente como baixo, adequado ou médio, e as faixas de concentração que compreendem essa classificação são largas, por exemplo, no caso do Zn alto $> 43 \text{ mg kg}^{-1}$, adequado entre 31 e 42 mg kg^{-1} e baixo $< 31 \text{ mg kg}^{-1}$ (KURIHARA; STAUT; MAEDA, 2014). Dessa forma, os valores de recuperação reportados para o Zn na Tabela 6.9 não são críticos. Por outro lado, em estudos ambientais nos quais se deseja verificar a concentração de elementos potencialmente tóxicos, sugere-se que o tempo de aquisição seja aumentado bem como a corrente a da fonte de raios X afim de diminuir o limite de detecção. Não obstante, o analista não deve se esquecer de que há custos associados ao incremento desses parâmetros supracitados.

A Figura 6.4 mostra o estado das amostras moídas em moinho (a) e em cadinho (b), enquanto a Figura 6.5 mostra a porção de amostra que não passou por uma malha de $180 \mu\text{m}$ (a) e a porção da amostra que passou (b), sendo que aproximadamente 81% da amostra passou pela malha. Para a análise foi utilizado o total da amostra e não apenas a porção que passou pela peneira.

A Figura 6.6 mostra a linearidade entre as análises feitas por ICP-OES - que vieram como referência com o material - e as análises por TXRF, feitas de três maneiras diferentes: sem nenhum preparo, moído em cadinho e pistilo e moído em moinho citado anteriormente. A Tabela 6.10 mostra os valores de coeficiente de determinação encontrados para as curvas da Figura 6.7. Nela, temos coeficientes de determinação de 0,1 e de 0,98, isso mostra uma forte interferência da moagem para alguns elementos, como também da própria técnica, já que elementos como Ca, K, S, Fe, Mn, encontrados em maior concentração na planta tiveram melhores valores de coeficiente de determinação do que Cu, Zn e P.

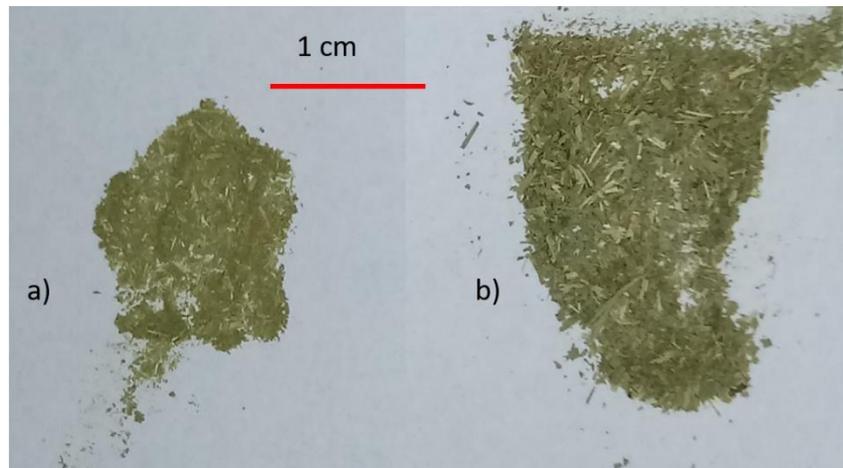


Figura 6.4. Amostra de tecido vegetal moída em Homogeneizador Modelo Bead Ruptor 24 Elite, marca Omni (a) e amostra moída em cadinho com pistilo (b)

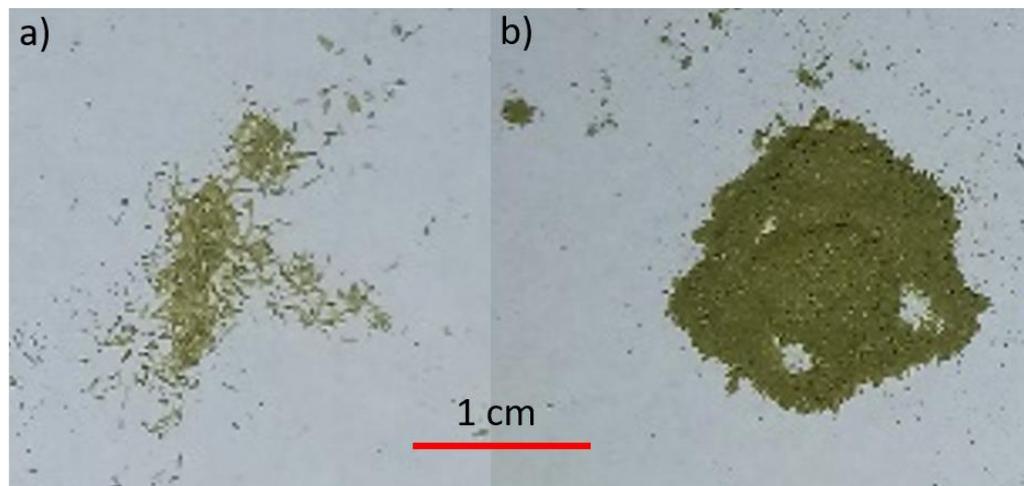


Figura 6.5. Porção de amostra que não passou pela malha de 180 µm (a) e porção da amostra que passou pela malha (b)

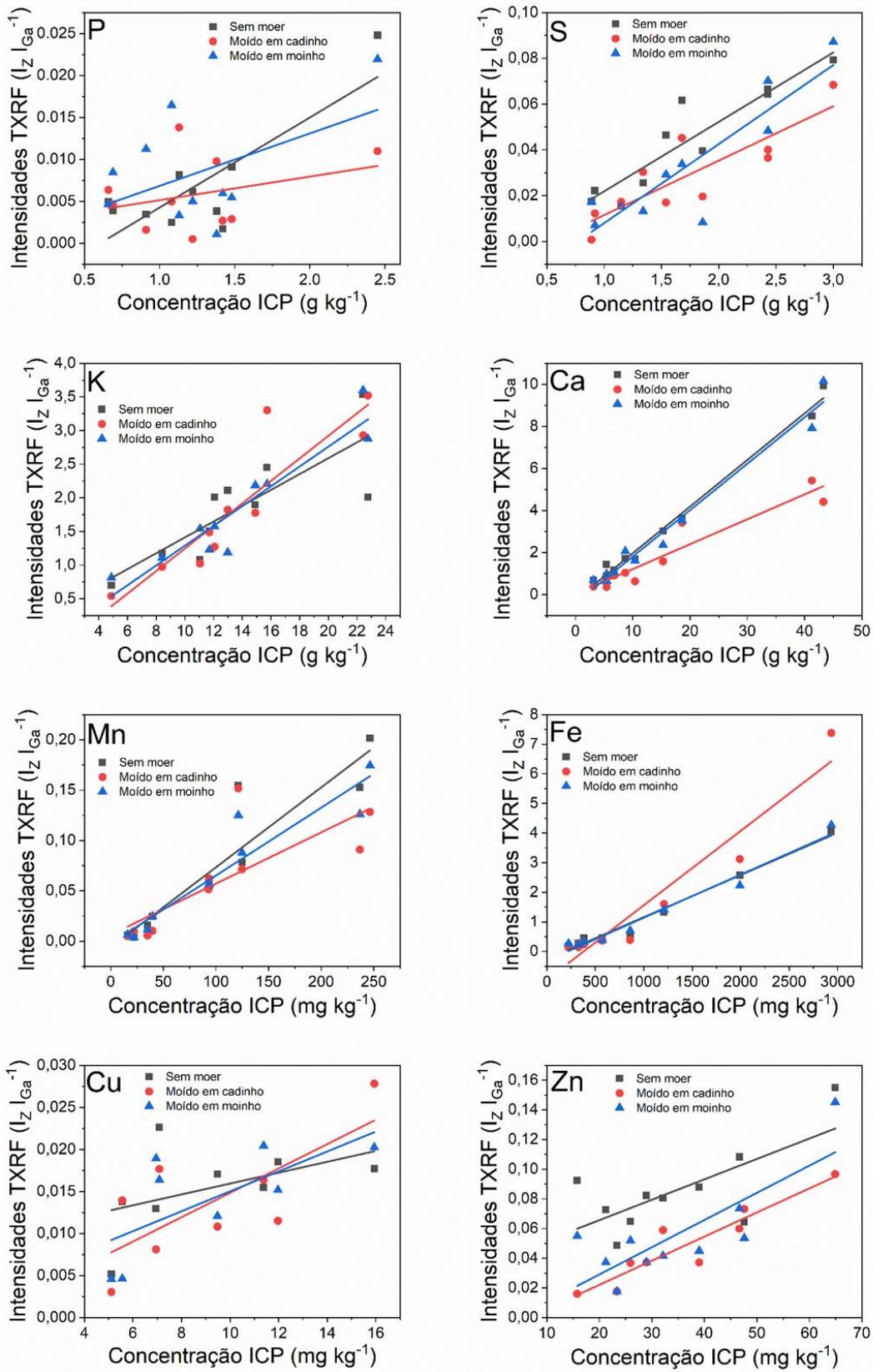


Figura 6.6. Relações entre os valores de referência e as análises de TXRF com três diferentes preparos; sem moagem, cadinho e pistilo, e moinho

Tabela 6.10. Valores de coeficiente de determinação para as curvas da Figura 6.6

Elemento	Coeficiente de determinação (R^2)		
	Tratamento		
	Sem moer	Cadinho	Moído
P	0,667	0,107	0,245
S	0,859	0,737	0,788
K	0,677	0,819	0,880
Ca	0,989	0,906	0,973
Mn	0,874	0,637	0,891
Fe	0,981	0,929	0,974
Cu	0,221	0,537	0,468
Zn	0,489	0,8672	0,630

A Tabela 6.11 mostra as concentrações obtidas para as amostras sem moagem, moídas com cadinho e moídas com o moinho Homogeneizador, assim como os valores de referência feitos por ICP OES.

Tabela 6.11. Recuperação (%) encontradas na análise de tecido vegetal, sem moagem (TX SM), moídas com cadinho e pistilo (TX C), moídas em moinho (TX M), e as concentrações de referência (CR), dadas em mg kg⁻¹. Os números na primeira coluna (amostra) indicam qual é a amostra

Amostra	Análise	Recuperação (%)						
		P	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn
2	CR	690	15730	6760	93,05	1208,81	11,38	39,01
	TX SM	51*	139	90	105	140	102	125
	TX C	61*	187	69	89	168	108	53
	TX M	110*	125	81	96	148	134	64
4	CR	1130	12990	5420	121,28	934,57	7,09	64,91
	TX SM	65	144	137	207	959	240	132
	TX C	110	125	85	203	1512	187	82
	TX M	27*	81	94	167	782	173	124
5	CR	1080	11710	5420	124,84	572,37	6,95	46,68
	TX SM	21*	114	85	101	101	139	128
	TX C	41*	113	34	93	81	87	71
	TX M	137	93	62	114	84	204	87
6	CR	1420	14910	41280	39,71	381,29	5,56	25,93
	TX SM	11*	113	107	100	152	186	138
	TX C	17*	106	68	41	78	188	78
	TX M	38*	130	100	100	108	61*	111
8	CR	1480	11060	43280	35,03	325,64	9,48	23,35
	TX SM	55	87	119	72	109	135	115
	TX C	18*	82	53	26*	56	85	41
	TX M	33*	124	122	51*	95	95	41
9	CR	2450	22420	18620	93,6	1991,39	15,94	32,12
	TX SM	91	140	102	101	164	83	139
	TX C	40*	116	96	108	199	131	101
	TX M	81	143	98	98	142	95	72
10	CR	910	4880	8700	236,85	333,84	4,58	15,78
	TX SM	34*	127	102	104	108	118	325
	TX C	16*	98	62	62	102	122	56
	TX M	111	148	123	86	84	69*	193
13	CR	1220	12080	3150	16,18	223,36	4,22	21,22
	TX SM	46*	148	112	58	107	181	189
	TX C	4*	94	62	47*	77	277	5334
	TX M	37*	116	111	64	152	219	97
14	CR	1380	22760	10390	22,11	859,67	5,11	47,6
	TX SM	25*	78	84	28*	84	75	75
	TX C	64*	138	31	71	57	44*	85
	TX M	7*	112	80	27*	104	66*	62
16	CR	660	8420	15290	246,4	2934,11	11,97	28,97
	TX SM	67*	124	102	132	175	116	157
	TX C	87*	103	54	84	320	72	71
	TX M	63*	117	80	115	185	95	71

*Resultados abaixo do LOQ

Os valores para coeficiente de determinação encontrados na Tabela 6.9 se relacionam com estudos que compararam resultados de XRF e ICP OES. Um estudo com ênfase em Fe e Zn em arroz e milhete, obteve coeficientes de determinação acima de 0,79 para gráficos feitos com dados de análises de XRF e ICP-OES (PALTRIDGE et al., 2012). Comparações entre análises de solo por ICP OES e XRF também obtiveram coeficientes de determinação de: 0,93 para Fe; 0,42 para Ni; 0,85 para Cu; 0,87 para Zn; 0,26 para Cd; 0,89 para Pb; 0,93 para As e 0,71 para Mn (KILBRIDE; POOLE; HUTCHINGS, 2006). Análises de folha de soja para K, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn tiveram coeficientes de determinação entre 0,42 e 0,86 (TADEU COSTA JUNIOR et al., 2020).

As recuperações ficaram razoáveis para praticamente todos os elementos, poucas amostras tiveram recuperação pior do que entre 70 e 130% para todos os tipos de moagem. Assim como as curvas que relacionam as análises (Figura 6.6 e Tabela 6.9) mostram certa linearidade e valor de coeficiente de determinação adequado, condizentes com a literatura encontrada e com as recuperações. Baseando-se na Tabela 6.9, os três tipos de moagem tiveram resultados semelhantes, porém a moagem em moinho homogeneizador teve menos resultados discrepantes.

7. CONCLUSÕES

Quando é necessário realizar uma análise elementar, a TXRF se destaca por utilizar baixo volume de amostras, ser multielementar e ter desempenho da ordem de $\mu\text{g kg}^{-1}$. Sua utilidade se mostra em análises ambientais, tecnológicas e culturais, onde não é possível disponibilizar vários mg de amostra ou há mais de um elemento de interesse. Seu carro chefe é, sem dúvida, a análise de águas residuais, já que o preparo de análise é mínimo e é possível detectar vários elementos simultaneamente. Com isso, tem-se uma técnica única. Mesmo sendo uma variante da EDXRF, ela fornece exclusividades vantajosas em inúmeros casos.

Existem pontos que necessitam de melhora para o ótimo funcionamento do equipamento. Por exemplo: a criação de um programa de computador que possibilite a comunicação entre os motores que movem a amostra e o detector, para que seja possível planejar análises em sequência sem a necessidade de um operador para alterar a amostra. O sistema de refrigeração do tubo de raios X, por ser antigo e ter ficado bastante tempo sem manutenção, exige um supervisor acompanhando as análises na maior parte do tempo. Análises a vácuo foram brevemente tratadas e, apesar de proporcionar ganhos de sinal para elementos com baixos Z (se comparado com análises sem vácuo), ainda não é conclusivo o quanto viável é o seu uso em análises de rotina.

Os resultados do equipamento para amostras líquidas mostraram-se satisfatórios, com limites de detecção próximos aos encontrados na literatura. Análises de tecido vegetal apresentaram resultados de limite de detecção ligeiramente melhores do que os de um equipamento de EDXRF convencional.

Para análises de amostra de referência certificada, as recuperações obtiveram valores de acordo com a literatura, e a correlação entre os valores de TXRF e de outras técnicas foram similares aos encontrados na literatura. Inicialmente, os resultados das análises de solo não tiveram bons desempenhos, e quando foi possível corrigi-las, os limites de detecção foram similares aos de EDXRF convencional, talvez por efeitos de matriz decorrentes do uso de um agente tixotrópico.

A concentração elementar em solução nutritiva antes e depois do contato com amostra foi condizente com a concentração encontrada na seiva. Os elementos encontrados em menor concentração na solução – após o contato com a planta – foram encontrados na seiva da planta, assim como elementos que não tiveram diminuição na sua concentração.

As amostras de seiva não puderam ser correlacionadas às amostras de tecido vegetal devido a diferenças na composição elementar. Os elementos encontrados na seiva é um retrato do que está sendo absorvido pela planta naquele momento, já os elementos encontrados no tecido vegetal contêm um histórico nutricional da planta.

Enquanto as análises de amostras do PIATV tiveram recuperações superiores as recuperações de CRM, as curvas de calibração – construídas com as intensidades obtidas em TXRF – tiveram coeficientes de determinação razoáveis, sendo adequados para S, K, Ca, Mn e Fe e inadequados para P, Cu e Zn.

Portanto, recomenda-se o uso deste equipamento preferencialmente em amostras líquidas. Recomenda-se também o uso para casos de tecido vegetal onde haja disponibilidade de pouco volume de amostra, ou então o estudo específico de alguns elementos em baixa concentração. Quanto a solos, a recomendação de uso é estritamente para casos onde estejam disponíveis baixíssimas quantidades de amostra, a ponto de não ser possível o uso do EDXRF convencional.

Assim como em outras técnicas analíticas, existem muitas variáveis que afetam o rendimento da TXRF, por isso é necessário conhecer especificamente o equipamento e o preparo das amostras que serão utilizados. A TXRF se destaca na investigação de elementos traço, o que a torna um ótimo recurso em investigações agroambientais, industriais e históricas. É por isso que, na opinião do autor, é importante que o pesquisador avalie os benefícios do uso da técnica, ao invés de utilizá-la rotineiramente para análises sem elementos de interesse específicos. Para tanto a EDXRF oferece maior praticidade.

REFERÊNCIAS

- AIGINGER, H. Historical development and principles of total reflection X-ray fluorescence analysis (TXRF). **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 46, n. 10, p. 1313–1321, 1991.
- AIGINGER, H.; WOBRAUSCHEK, P. A method for quantitative X-ray fluorescence analysis in the nanogram region. **Nuclear Instruments and Methods**, v. 114, n. 1, p. 157–158, 1974.
- ANTOSZ, F. J. et al. The use of total reflectance X-ray fluorescence (TXRF) for the determination of metals in the pharmaceutical industry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 62, p. 17–22, 2012.
- ARTHUR, R.; SCHERER, P. A. Monitoring dissolved active trace elements in biogas plants using total reflection X-ray fluorescence spectrometry. **X-Ray Spectrometry**, March 2020. doi: 10.1002/xrs.3151.
- ASSIS, C. et al. A data fusion model merging information from near infrared spectroscopy and X-ray fluorescence. Searching for atomic-molecular correlations to predict and characterize the composition of coffee blends. **Food Chemistry**, v. 325, art. 126953, 2020.
- BILO, F. et al. Elemental analysis of tree leaves by total reflection X-ray fluorescence: New approaches for air quality monitoring. **Chemosphere**, v. 178, p. 504–512, 2017.
- BILO, F. et al. Evaluation of different quantification modes for a simple and reliable determination of Pb, Zn and Cd in soil suspensions by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 34, n. 5, p. 930–939, 2019.
- BITYUTSKII, N. et al. Xylem sap mineral analyses as a rapid method for estimation plant-availability of Fe, Zn and Mn in carbonate soils: A case study in cucumber. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 17, n. 2, p. 279–290, 2017.
- BOHLEN, A. VON. Total Reflection X-ray Fluorescence Spectrometry - A Versatile Tool for Ultra - Micro Analysis of Objects of Cultural Heritage. **e-Preservation Science**, n. 1, p. 23–34, 2004.
- BORGESE, L. et al. Comprehensive approach to the validation of the standard method for total reflection X-ray fluorescence analysis of water. **Talanta**, v. 181, p. 165–171, 2018.
- BUGBEE, B. Nutrient management in recirculating hydroponic culture. **Acta Horticulturae**, v. 648, p. 99–112, 2004.
- CARMELLO, Q. A. DE C.; OLIVEIRA, F. Á. DE. Nutrição de lavouras de soja: situação atual e perspectivas. **Visão Agrícola**, v. 5, n. 1, p. 8–11, 2006.
- COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR - CNEN. **Entendendo um pouco sobre as doses de radiação e a sua unidade de medida Sievert**. Rio de Janeiro: CNEN, 2014. 2011 p.

CUNHA E SILVA, R. M. et al. Determination of Fe, Cu and Zn in sugar-cane spirits commercialized in Southeastern Brazil by TXRF. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 260, n. 1, p. 3–7, 2004.

DALIPI, R. et al. Multi-element analysis of vegetal foodstuff by means of low power total reflection X-ray fluorescence (TXRF) spectrometry. **Food Chemistry**, v. 218, p. 348–355, 2017.

GRUBER, A. et al. Total reflection X-ray fluorescence spectrometry for trace determination of iron and some additional elements in biological samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2020. doi: 10.1007/s00216-020-02614-8.

HOEFLER, H. et al. Analysis of low Z elements in various environmental samples with total reflection X-ray fluorescence (TXRF) spectrometry. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 61, n. 10-11, p. 1135–1140, 2006. Special issue.

JAKLEVIC, J. M.; GIAUQUE, R. D. Energy-dispersive x-ray fluorescence analysis using X-ray tube excitation. In: VAN GRIEKEN, R.; MARKOWICZ, A. (Ed.). **Handbook of X-ray spectrometry**. 2. ed. rev. London: Taylor & Francis, 2002. p. 199-238.

KILBRIDE, C.; POOLE, J.; HUTCHINGS, T. R. A comparison of Cu, Pb, As, Cd, Zn, Fe, Ni and Mn determined by acid extraction/ICP-OES and ex situ field portable X-ray fluorescence analyses. **Environmental Pollution**, v. 143, n. 1, p. 16–23, 2006.

KLOCKENKÄMPER, R.; VON BOHLEN, A. **Total-reflection X-ray fluorescence analysis and related methods**. 2. ed. New York: John Wiley, 2015.

KREGSAMER, P.; STRELI, C.; WOBRAUSCHEK, P. **Total-Reflection X-ray Fluorescence**. New York: Marcel Dekker, 2002. chap. 9, p. 559-602.

KURIHARA, C. H.; STAUT, L. A.; MAEDA, S. **Diagnose do estado nutricional de soja e algodoeiro, pelos métodos das faixas de suficiência e DRIS, em Mato Grosso do Sul e Mato Grosso**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2014. (Circular Técnica, 29).

MARCÓ P., L. M.; HERNÁNDEZ-CARABALLO, E. A. Direct analysis of biological samples by total reflection X-ray fluorescence. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 59, n. 8, p. 1077–1090, 2004.

MARGUÍ, E.; QUERALT, I.; HIDALGO, M. Determination of cadmium at ultratrace levels in environmental water samples by means of total reflection X-ray spectrometry after dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 28, n. 2, p. 266–273, 2013.

MARSCHNER, P. **Marschner's Mineral nutrition of higher plants**. 3. ed. Cambridge: Academic Press, 2011.

MEIRER, F. et al. Application of synchrotron-radiation-induced TXRF-XANES for arsenic speciation in cucumber (*Cucumis sativus* L.) xylem sap. **X-Ray Spectrometry**, v. 36, n. 6, p. 408-412, 2007.

MIHUCZ, V. G. et al. Application of total-reflection X-ray fluorescence spectrometry and high-performance liquid chromatography for the chemical characterization of xylem saps of nickel contaminated cucumber plants. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 56, n. 11, p. 2235–2246, 2001.

MILLER-IHLI, N. J. Slurry sample preparation for simultaneous multi-element graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 3, n. 1, p. 73–82, 1988.

NASCIMENTO, V. F. **Técnicas analíticas nucleares de fluorescência de raios X por dispersão de energia (Ed-Xrf) e por reflexão total (Txrf)**. Piracicaba: CENA/USP, 1999. 32 p.

NEUMANN, C.; EICHINGER, P. Ultra-trace analysis of metallic contaminations on silicon wafer surfaces by vapour phase decomposition/total reflection X-ray fluorescence (VPD/TXRF). **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 46, n. 10, p. 1369–1377, 1991.

OBIJUNWA, E. I.; ADEBIYI, F. M.; OMODE, P. E. Determination of essential minerals and trace elements in Nigerian sesame seeds, using TXRF technique. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 4, n. 6, p. 393–395, 2005.

ÓVÁRI, M. et al. Total reflection X-ray fluorescence spectrometric determination of element inlets from mining activities at the upper Tisza catchment area, Hungary. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 59, n. 8, p. 1173–1181, 2004.

PAHLKE, S. et al. Determination of ultra trace contaminants on silicon wafer surfaces using total-reflection X-ray fluorescence TXRF “state-of-the-art”. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 56, n. 11, p. 2261–2274, 2001.

PALTRIDGE, N. G. et al. Energy-dispersive X-ray fluorescence analysis of zinc and iron concentration in rice and pearl millet grain. **Plant and Soil**, v. 361, n. 1-2, p. 251–260, 2012.

PARREIRA, P. S. **Implantação da técnica de fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF) para a determinação de tório e urânio em amostras de interesse agrícola e ambiental**. 2000. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

PRANGE, A.; BÖDDEKER, H.; MICHAELIS, W. Multi-element determination of trace elements in whole blood and blood serum by TXRF. **Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie**, v. 335, n. 8, p. 914–918, 1989.

PROST, J.; WOBRAUSCHEK, P.; STRELI, C. Dual energy-band excitation from a low power Rh anode X-ray tube for the simultaneous determination of low Z and high Z elements (Na-U) using total-reflection X-ray fluorescence analysis (TXRF). **Review of Scientific Instruments**, v. 89, n. 9, 2018. doi: 10.1063/1.5044527.

QUAGGIO, J. A.; DE SOUZA, T. R. **Análise de seiva em plantas**. Campinas: IAC, Centro de Solos e Recursos Ambientais, [s.d.]. Disponível em: http://www.iac.sp.gov.br/imagem_informacoestecnologicas/63.pdf. Acesso em: 10 jun. 2020.

RIFFO, G.; RAMÍREZ-LAMA, C.; BENNUN, L. Elemental quantification in intradermal tattoo-inks by means of total reflection X-ray fluorescence. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, v. 10, n. 1, p. 33–53, 2020.

SCHMELING, M. Characterization of urban air pollution by total reflection X-ray fluorescence. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 59, n. 8, p. 1165–1171, 2004.

SOLÉ, V. A. et al. A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 62, n. 1, p. 63–68, 2007.

STEPHEN, S. C.; LITTLEJOHN, D.; OTTAWAY, J. M. Evaluation of a slurry technique for the determination of lead in spinach by electrothermal atomic-absorption spectrometry. **The Analyst**, v. 110, n. 9, p. 1147–1151, 1985.

STRELI, C. et al. A new total reflection X-ray fluorescence vacuum chamber with sample changer analysis using a silicon drift detector for chemical analysis. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 59, n. 8, p. 1199–1203, 2004.

TADEU COSTA JUNIOR, G. et al. Direct determination of mineral nutrients in soybean leaves under vivo conditions by portable X-ray fluorescence spectroscopy. **X-Ray Spectrometry**, v. 49, n. 2, p. 274–283, 2020.

TARSOLY, G.; ÓVÁRI, M.; ZÁRAY, G. Determination of fluorine by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 65, n. 4, p. 287–290, 2010.

TATÁR, E. et al. Effect of lead, nickel and vanadium contamination on organic acid transport in xylem sap of cucumber. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 75, n. 3, p. 219–223, 1999.

TOWETT, E. K.; SHEPHERD, K. D.; CADISCH, G. Quantification of total element concentrations in soils using total X-ray fluorescence spectroscopy (TXRF). **Science of the Total Environment**, v. 463–464, p. 374–388, 2013.

VALCÁRCEL CASES, M.; LÓPEZ-LORENTE, Á. I.; LÓPEZ-JIMÉNEZ, M. Á. **Foundations of analytical chemistry: a teaching-learning approach**. Heidelberg: Springer International Publishing, 2018. 487 p.

VARGA, A. et al. Investigation of effects of cadmium, lead, nickel and vanadium contamination on the uptake and transport processes in cucumber plants by TXRF spectrometry. **Spectrochimica acta, Part B: Atomic spectroscopy**, v. 54, n. 10, p. 1455–1462, 1999.

VARGA, I. et al. Determination of trace elements in human liver biopsy samples by ICP-MS and TXRF: Hepatic steatosis and nickel accumulation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 383, n. 3, p. 476–482, 2005.

VON BOHLEN, A. et al. Microtome sections of biomaterials for trace analyses by TXRF. **Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie**, v. 331, n. 3–4, p. 454–458, 1988.

YONEDA, Y.; HORIUCHI, T. Optical flats for use in X-ray spectrochemical microanalysis. **Review of Scientific Instruments**, v. 42, n. 7, p. 1069–1070, 1971.

ZEKKI, H.; GAUTHIER, L.; GOSSELIN, A. Growth, productivity, and mineral composition of hydroponically cultivated greenhouse tomatoes, with or without nutrient solution recycling. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 121, n. 6, p. 1082–1088, 1996.