

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“Análise foliar de plantas por espectrometria de emissão óptica
com plasma induzido por laser (LIBS) e com plasma acoplado
indutivamente após ablação com laser (LA-ICP OES)”**

Marcos da Silva Gomes*

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS,
área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA

Orientador: Dr. Francisco José Krug

*** bolsista CNPq**

**São Carlos - SP
2013**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

G633af

Gomes, Marcos da Silva.

Análise foliar de plantas por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) e com plasma acoplado indutivamente após ablação com laser (LA-ICP OES) / Marcos da Silva Gomes. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

143 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Química analítica. 2. LIBS. 3. LA-ICP OES. 4. Análise foliar. 5. Macronutrientes. 6. Micronutrientes. I. Título.

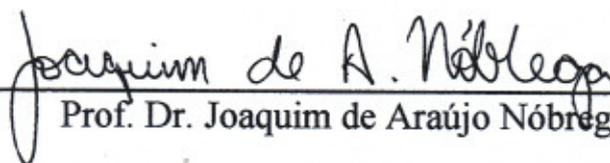
CDD: 543 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

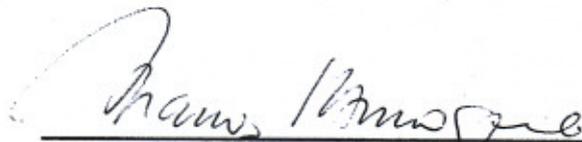
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado do candidato Marcos da Silva Gomes, realizada em 20 de setembro de 2013:



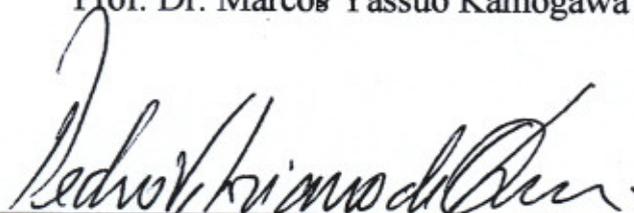
Prof. Dr. Francisco José Krug



Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega



Prof. Dr. Marcos Yassuo Kamogawa



Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira



Dra. Lilian Cristina Trevizan Felipe

Dedicatória

*Aos meus pais, Fátima e Luiz Carlos, por todo apoio
ao longo desses anos. Pelo imenso carinho, amor,
alegria e ensinamentos.*

*À minha esposa e amada Mariana, pelo
companheirismo, carinho, paciência e amor.*

“A tarefa não é tanto ver o que ninguém viu ainda, mas pensar o que ninguém pensou sobre algo que todos veem”.

Arthur Schopenhauer

AGRADECIMENTOS

Ao amigo e Prof. Dr. Francisco José Krug, pela orientação, confiança, amizade e oportunidade de crescer como profissional e pessoa.

Ao amigo e Prof. Dr. Dário Santos Júnior, pela amizade, momentos de descontração, imensa paciência e que muito contribuiu no desenvolvimento e conclusão desta etapa.

Aos professores Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira e Dr. Fabio Rodrigo Piovezani Rocha, membros da banca de qualificação, pelas sugestões.

Aos professores Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho e Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega pelas sugestões no seminário da Pós-Graduação.

Aos professores Dr. Joaquim de Araújo Nobrega, Dr. Marcos Yassuo Kamogawa, Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira e Dra. Lilian Cristina Trevizan Felipe pelas importantes contribuições e discussões na defesa de tese.

Aos meus amigos e antigos companheiros de laboratório, Flávio Leme, Lidiane Nunes, Paulino Souza, Lilian Trevizan, Marcelo Braga, Kennedy Aragão, Quienly Godoy, Gustavo Cofani, pela agradável convivência e contribuições.

Ao meu amigo Gabriel G. A. Carvalho pela amizade, grandes momentos de descontração e pela grande contribuição científica neste trabalho.

À Iolanda Rufini (carinhosamente Tatinha) pela amizade, conversas e enorme prontidão em ajudar.

Aos amigos, professores e técnicos do Laboratório de Química Analítica “Henrique Bergamin Filho” do CENA pelo agradável convívio.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da USP, onde a parte experimental foi realizada.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, pelo apoio institucional e facilidades oferecidas.

Aos professores do Departamento de Química da UFSCar que contribuíram para minha formação acadêmica desde o início da graduação.

Ao programa de Pós-Graduação em Química da UFSCar, e em especial, às funcionárias Ariane, Cristina e Luciani, pela enorme atenção e prontidão na providência de documentos e informações.

Ao Departamento de Química e Bioquímica da Universidade Internacional da Flórida (FIU) e Laboratório Internacional de Química Forense onde parte da tese foi desenvolvida.

Ao Prof. Dr. José Almirall pela orientação durante o estágio no exterior, pela contribuição neste projeto e por possibilitar sua realização.

Aos meus amigos que ajudaram durante o estágio na FIU: Emily Schenk, Sarah Jantzi, Tatiana Trejos, Keeran Subedi e Pupi Tomassini.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado no exterior (processo BEX: 8867/11-9).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado no país (processo 140926/2009-7).

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Obrigado!

LISTA DE ABREVIATURAS

CRM	Material de referência certificado
CV	Coeficiente de variação
ETV	Vaporização eletrotérmica
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama
FIA	Análise por injeção em fluxo
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente
ICP-MS	Espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente
INAA	Análise por ativação neutrônica instrumental
LA-ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente empregando ablação com laser
LA-ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente empregando ablação com laser
LIBS	Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser
LOD	Limite de detecção
LTSD	Distância entre a lente de focalização e a amostra
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
SNR	Razão sinal / ruído
SS-GFAAS	Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite
XRF	Espectrometria de fluorescência de raios-X

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Faixas de concentração de macro- e micronutrientes em plantas sadias de interesse agrônômico.....	11
TABELA 2 - Variação do tamanho de partículas e a massa mínima recomendada para diferentes CRMs.....	20
TABELA 3 - Programa de aquecimento para decomposição assistida por radiação micro-ondas de tecidos foliares de citros, soja e cana-de-açúcar.	51
TABELA 4 - Parâmetros operacionais utilizados nas análises por ICP OES. ...	52
TABELA 5 - Teores de fibra, lignina e celulose e a razão lignina/celulose em folhas de citros, soja e cana-de-açúcar.....	76
TABELA 6 - Tamanho das partículas obtido após a cominuição de folhas de citros, soja e cana-de-açúcar por moagem com bolas e criogênica.....	80
TABELA 7 - Condições experimentais das amostras digeridas por ICP OES... 88	
TABELA 8 - Limites de detecção de Ca, Mg, P, Mn e Zn.....	102
TABELA 9 - Parâmetros instrumentais utilizados para a análise de materiais vegetais por LA-ICP OES.	108
TABELA 10 - Massa removida em pastilhas de materiais vegetais preparados com diferentes tempos de moagem e após análise por LA-ICP OES.	116
TABELA 11 - Figuras de mérito obtidas por LA-ICP OES.....	125

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Áreas de cultivo de plantações de cana-de-açúcar e os estados produtores na safra de 2010/11.....	5
FIGURA 2 - Crescimento da área de citros no mundo (milhões de ha) no período de 1978/79 e 2008/09..	7
FIGURA 3 - Produção mundial de grãos - 1970/71 a 2010/11.	9
FIGURA 4 - Número de publicações por ano sobre a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser entre 1980 até 2012.....	23
FIGURA 5 - Exemplo da evolução temporal do plasma em regime de nanossegundos... ..	25
FIGURA 6 - Arranjo experimental do sistema LIBS.....	41
FIGURA 7 - Imagens do sistema LIBS utilizado.....	42
FIGURA 8 - Moinho criogênico e conjunto de moagem utilizado na cominuição de folhas de materiais vegetais.	44
FIGURA 9 - Moinho com bolas com movimento planetário, recipiente e esferas de ágata.	45
FIGURA 10 - Ilustração da sequência analítica para o preparo de pastilhas de materiais vegetais até a determinação dos nutrientes por LIBS.....	47
FIGURA 11 - Sequência ilustrando o procedimento de extração ácida e preparo de pastilhas de padrões de calibração sólidos.	54
FIGURA 12 - Espectros de emissão de pastilha de folhas de citros (a) entre 200 e 780 nm e (b) fragmento de 250 a 262 nm..	56

FIGURA 13 - Fragmento do espectro de emissão em pastilhas de citros ilustrando a máxima intensidade de emissão e as regiões BGs vizinhas ao pico..	57
FIGURA 14 - Moinho vibratório com bolas Retsch modelo MM200 e imagens do frasco e tampa de carbeto de tungstênio.	59
FIGURA 15 - (a) Imagem do sistema LA-ICP OES e (b) visão da cela de ablação.....	61
FIGURA 16 - Visão do microscópio Keyence com imagem de material cominuído de citros espalhado em fita de carbono (ampliação: 100X).	63
FIGURA 17 - Intensidade dos sinais de (a) P I 213,619 nm e (b) Mg I 277,983 nm em função do número de pulsos acumulados em pastilhas de folhas de citros..	67
FIGURA 18 - Intensidade dos sinais de (a) B I 249,773 nm e (b) Fe II 259,940 nm em função do número de pulsos acumulados em pastilhas de folhas de citros..	68
FIGURA 19 - Fragmentos dos espectros de emissão de pastilhas de folhas de citros mostrando as linhas de (a) P I 213,619 nm e (b) Mg I 277,983 nm em função do aumento do tempo de atraso.....	70
FIGURA 20 - Fragmentos dos espectros de emissão de pastilhas de folhas de citros mostrando as linhas de (a) B I 249,773 nm e (b) Fe II 259,940 nm em função do aumento do tempo de atraso.....	71
FIGURA 21 - Intensidades dos sinais emissão (área de pico) de B I 249,773, Mn II 257,610, P I 213,619 e Mg I 277,669 nm a partir das análises de pastilhas	

de folhas de (a) citros, (b) soja e (c) cana-de-açúcar, após 10, 20, 30, 40 e 50 min de moagem criogênica.....	74
FIGURA 22 - Intensidades dos sinais de emissão de B I 249,773, Mn II 257,610, P I 213,619 e Mg I 277,669 nm de pastilhas de folhas de (a) citros, (b) soja e (c) cana-de-açúcar, após moagem com bolas.....	78
FIGURA 23 - Distribuição do tamanho das partículas (Figuras (a) e (d)), MEV (Figuras (b) e (e)) e perfilometria (Figuras (c) e (f)) das crateras formadas em pastilhas de folhas de citros após moagem com bolas e moagem criogênica... ..	83
FIGURA 24 - Distribuição do tamanho das partículas (Figuras (a) e (d)), MEV (Figuras (b) e (e)) e perfilometria (Figuras (c) e (f)) das crateras formadas em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar após moagem com bolas e moagem criogênica.....	84
FIGURA 25 - Distribuição do tamanho das partículas (Figuras (a) e (d)), MEV (Figuras (b) e (e)) e perfilometria (Figuras (c) e (f)) das crateras formadas em pastilhas de folhas de soja após moagem com bolas e moagem criogênica.....	85
FIGURA 26 - Concentração de (a) Ca e (b) Mg em folhas de citros, soja e cana-de-açúcar em diferentes condições experimentais.	89
FIGURA 27 - Concentração de (a) Fe e (b) Zn em folhas de citros, soja e cana-de-açúcar em diferentes condições experimentais.	90
FIGURA 28 - Fragmentos de espectros obtidos em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar mostrando os sinais de emissão de (a) Mn II 257,610 e (b) Mg I 277,669 nm antes e após extração com 0,2 mol L ⁻¹ HCl ou HNO ₃	92

FIGURA 29 - Espectro LIBS entre 200 e 780 nm em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar preparada (a) antes e (b) após a extração com 0,2 mol L ⁻¹ HNO ₃	94
FIGURA 30 - Espectros das linhas de emissão de (a) Ca, (b) Mg, (c) P e (d) K antes e após extrações com 0,2 mol L ⁻¹ HNO ₃	96
FIGURA 31 - Espectros das linhas de emissão de (a) Cu, (b) Fe, (c) Mn e (d) Zn antes e após extrações com 0,2 mol L ⁻¹ HNO ₃	97
FIGURA 32 - Curvas de calibração obtidas para (a) Ca, (b) K, (c) Mg e (d) P em pastilhas preparadas a partir da mistura entre o material extraído com o material original.....	99
FIGURA 33 - Curvas de calibração de Mn e Zn em pastilhas preparadas a partir de misturas com o material extraído e o material original.....	100
FIGURA 34 - Correlação entre os resultados obtidos para (a) Ca e (b) K em pastilhas de cana-de-açúcar por LIBS em comparação às análises dos correspondentes digeridos por ICP OES.	104
FIGURA 35 - Correlação entre os resultados obtidos para (a) Mg e (P) em pastilhas de cana-de-açúcar por LIBS em comparação às análises dos correspondentes digeridos por ICP OES.....	105
FIGURA 36 - Correlação entre os resultados obtidos para (a) Mn e (b) Zn em pastilhas de cana-de-açúcar por LIBS em comparação às análises dos correspondentes digeridos por ICP OES.....	106
FIGURA 37 - Exemplos de sinais característicos de emissão de (a) Ca e (b) P em pastilhas de folhas de citros (20 min de moagem) obtidos por LA-ICP OES. (n = 10 crateras, 500 pulsos/cratera).	109

FIGURA 38 - Intensidade de emissão de (a) B I 249,772 nm e (b) Ca II 315,887 nm normalizada com Sc II 361,382 nm em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar preparadas com tempos de moagem de 5 a 120 min para análises por LA-ICP OES.....	111
FIGURA 39 - Intensidades de emissão de P I 213,618 e Mn II 257,610 nm na análise de pastilhas de (a) folhas de cana-de-açúcar, (b) citros e (c) soja por LA-ICP OES na ausência de Sc como padrão interno. Dados para tempos de moagem de 5 a 120 min..	113
FIGURA 40 - Imagens de folhas de cana-de-açúcar cominuídas por moinho com bolas nos tempos de moagem de (a) 5, (b) 10, (c) 20, (d) 40, (e) 60 e (f) 120 min, capturadas com microscópio óptico com ampliação de 200x.....	117
FIGURA 41 - Imagens de folhas de citros cominuídas por moinho com bolas nos tempos de moagem de (a) 5, (b) 10, (c) 20, (d) 40, (e) 60 e (f) 120 min, capturadas com microscópio óptico com ampliação de 200x.....	118
FIGURA 42 - Imagens de folhas de soja cominuídas por moinho com bolas nos tempos de moagem de (a) 5, (b) 10, (c) 20, (d) 40, (e) 60 e (f) 120 min, capturadas com microscópio óptico com ampliação de 200x.....	119
FIGURA 43 - Imagens das crateras formadas após a ablação empregando LA-ICP OES em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar (a e b), citros (c e d) e soja (e e f). Figuras a, c, e, e Figuras b, d, f, representam pastilhas preparadas após 5 e 120 min de moagem com bolas, respectivamente.....	121
FIGURA 44 - Perfis das crateras formadas por 500 pulsos do laser em pastilhas de (a) citros, (b) soja e (c) cana-de-açúcar após 5, 20 e 40 min de cominuição.....	123

FIGURA 45 - Curvas de calibração de (a) Ca II 315,887, (b) K I 404,721, (c) Mg I 285,213 e (d) P I 213,619 obtidas a partir da análise de CRMs por LA-ICP OES com $9,0 \text{ J cm}^{-2}$ 126

FIGURA 46 - Curvas de calibração de (a) B I 249,772, (b) Fe I 259,939, (c) Mn II 257,610 e (d) Zn I 213,617 obtidas a partir da análise de CRMs por LA-ICP OES com $9,0 \text{ J cm}^{-2}$ 127

RESUMO

ANÁLISE FOLIAR DE PLANTAS POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUZIDO POR LASER (LIBS) E COM PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE APÓS ABLAÇÃO COM LASER (LA-ICP OES). Foi demonstrado que a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) pode ser utilizada como um método alternativo para a determinação de macro (P, K, Ca e Mg) e micronutrientes (B, Fe, Cu, Mn e Zn) em pastilhas de materiais vegetais. Entretanto, é necessário obter informações sobre o preparo das amostras para as análises por LIBS. Neste trabalho, foram avaliados procedimentos de cominuição de folhas de plantas utilizando moagem criogênica ou moagem com bolas. Os tamanhos das partículas obtidos foram associados com algumas propriedades químicas das amostras como teores de fibras, celulose e lignina, bem como a densidade e porosidade das pastilhas. As pastilhas foram analisadas em 30 diferentes pontos de amostragem (crateras) aplicando-se 25 pulsos de laser acumulados por cratera (Nd:YAG@1064 nm, 5 ns, 10 Hz, 25 J cm⁻²). A emissão do plasma, coletada por lentes, foi direcionada através de uma fibra óptica para um espectrômetro Echelle de alta resolução equipado com detector ICCD. Os tempos de atraso e integração foram estabelecidos em 2,0 e 4,5 μs, respectivamente. Os experimentos realizados em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar, citros laranja e soja mostraram um efeito bastante significativo das condições do tempo de moagem para cada tipo de espécie de planta. Utilizando-se a moagem com bolas com recipientes de ágata, 20 min de moagem para folhas de citros e soja e, 60 min de moagem para folhas de cana-de-açúcar, permitiram obter distribuição do tamanho das partículas inferior a 75 μm. A moagem criogênica permitiu obter semelhante distribuição do tamanho das partículas após 10 min em folhas de citros, 20 min em folhas de soja e 30 min em folhas de cana-de-açúcar. Observou-se melhora de até 50 % nas intensidades dos sinais de emissão para a

maioria dos elementos quando a distribuição do tamanho das partículas foi melhorada e, conseqüentemente, a porosidade das pastilhas. Entretanto, a calibração é, ainda, um dos principais desafios em análise direta de sólidos. Isto é particularmente verdadeiro para LIBS, bem como para a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente após ablação com laser (LA-ICP OES) e espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente após ablação com laser (LA-ICP-MS), quando a calibração é dependente da matriz e / ou materiais de referência certificados não são disponíveis. Dessa forma, foi desenvolvida uma nova estratégia de calibração para a análise de pastilhas de materiais vegetais por LIBS, baseando-se na compatibilidade da matriz. Amostras de folhas de cana-de-açúcar cominuídas foram submetidas a um procedimento de extração ácida visando obter um branco desse material vegetal, ou obter um material contendo baixas concentrações dos analitos. O material extraído resultante foi então, usado com branco ou como padrão contendo baixa concentração de analitos e, também foi misturado e homogeneizado com o material original em diferentes proporções. As pastilhas correspondentes foram analisadas em 30 diferentes pontos de amostragem (crateras) aplicando-se 25 pulsos de laser acumulados por cratera (Nd:YAG@1064 nm, 5 ns, 10 Hz, 25 J cm⁻²). A emissão do plasma, coletada por lentes, foi direcionada através de uma fibra óptica para um espectrômetro Echelle de alta resolução equipado com detector ICCD. Os tempos de atraso e integração foram estabelecidos em 2,0 e 5,0 µs, respectivamente. A estratégia de calibração foi investigada para a determinação de Ca, P, K, Mg, Cu, Mn e Zn por LIBS em pastilhas de 17 variedades de cana-de-açúcar e boa correlação foi obtida com os resultados de ICP OES nos correspondentes digeridos ácidos. Com esta nova proposta foi possível estimar os limites de detecção utilizando as medidas do branco, de acordo com as recomendações da IUPAC, ou usando baixas concentrações do padrão. Em um último estudo, a utilidade de LA-ICP OES para a determinação

de macro (Ca, K, P, e Mg) e micronutrientes (B, Mn, Fe e Zn) em folhas de plantas foi reportada pela primeira vez. Folhas de cana-de-açúcar, citros laranja e soja foram previamente moídas em moinho com facas e posteriormente cominuídas em moinho vibratório com bolas com tempos variando de 5 a 120 min para investigar o efeito dos tamanhos de partículas nas intensidades dos sinais de emissão de LA-ICP OES. As amostras foram pressionadas na forma de pastilhas por 5 min, aplicando-se $0,3 \text{ ton cm}^{-2}$ e abradas em 10 replicatas aplicando-se 500 pulsos do laser por replicata. Utilizou-se um sistema de ablação com laser comercial composto por um laser de Nd:YAG a 266 nm (pulsos de 6 ns, 10 Hz). Todos os experimentos foram realizados com 9 J cm^{-2} ($3,0 \text{ mJ/pulso}$ e diâmetro de focalização de $200 \mu\text{m}$). Escândio foi avaliado como padrão interno. Em geral, não foram observadas diferenças significativas nos sinais de emissão quando as pastilhas foram preparadas após 5 min de cominuição. Em pastilhas preparadas a partir de materiais cominuídos com piores distribuições de tamanho das partículas, como em folhas de cana-de-açúcar, o uso de Sc como padrão interno mostrou-se apropriado para corrigir as diferenças nas intensidades de emissão causadas por diferenças entre as massas abradas nas diferentes pastilhas dos materiais analisados. A estratégia de calibração foi baseada no uso de diferentes materiais de referência certificado. Os limites de detecção obtidos foram $\sim 14 \text{ mg kg}^{-1}$ Ca, 94 mg kg^{-1} K, $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ Mg, 10 mg kg^{-1} P, $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ B, $0,8 \text{ mg kg}^{-1}$ Fe, $2,0 \text{ mg kg}^{-1}$ Mn e $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ Zn.

ABSTRACT

FOLIAR ANALYSIS OF PLANTS BY LASER INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY (LIBS) AND LASER ABLATION INDUCTIVELY COUPLED PLASMA OPTICAL EMISSION SPECTROMETRY (LA-ICP OES). It has been demonstrated that laser induced breakdown spectrometry (LIBS) can be used as an alternative method for the determination of macro (P, K, Ca, Mg) and micronutrients (B, Fe, Cu, Mn, Zn) in pellets of plant materials. However, information is required regarding the sample preparation for plant analysis by LIBS. In this work, methods involving cryogenic grinding and planetary ball milling were evaluated for leaves comminution before pellets preparation. The particle sizes were associated to chemical sample properties such as fiber and cellulose contents, as well as to pellets porosity and density. The pellets were ablated at 30 different sites by applying 25 laser pulses per site (Nd:YAG@1064 nm, 5 ns, 10 Hz, 25 J cm⁻²). The plasma emission collected by lenses was directed through an optical fiber towards a high resolution Echelle spectrometer equipped with an ICCD. Delay time and integration time gate were fixed at 2.0 and 4.5 μs, respectively. Experiments carried out with pellets of sugarcane, orange tree and soy leaves showed a significant effect of the plant species for choosing the most appropriate grinding conditions. By using ball milling with agate materials, 20 min grinding for orange tree and soy, and 60 min for sugarcane leaves led to particle size distributions generally lower than 75 μm. Cryogenic grinding yielded similar particle size distributions after 10 min for orange tree, 20 min for soy and 30 min for sugarcane leaves. There was up to 50% emission signal enhancement on LIBS measurements for most elements by improving particle size distribution and consequently the pellet porosity. Calibration is still a challenging task when dealing with the direct analysis of solids. This is particularly true for LIBS, and laser ablation inductively coupled plasma optical

emission spectrometry (LA-ICP OES) / mass spectrometry (LA-ICP-MS), when the calibrations are matrix-dependent and/or appropriate certified reference materials are generally not available. Looking at the analysis of plant materials in the form of pressed pellets by LIBS, a new method to overcome and/or minimize this difficulty is proposed by keeping the matrix constant in order to produce matrix-matched calibration pellets. To achieve this goal and to test this novel approach, ground sugar cane leaves were chosen and submitted to acid extractions for obtaining the corresponding blank or a material containing very low concentrations of the analytes. The resulting dried solid material was used either as a blank or a low concentration standard, and also homogeneously mixed with the original plant material at appropriate ratios as well. The corresponding pellets were used as calibration standards and ablated at 30 different sites by applying 25 laser pulses per site with a Q-switched Nd:YAG at 1064 nm. The plasma emission collected by lenses was directed through an optical fiber towards a spectrometer equipped with Echelle optics and intensified charge-coupled device. Delay time and integration time gate were fixed at 2.0 and 5.0 μ s, respectively. This calibration strategy was tested for the determination of Ca, Mg, K, P, Cu, Mn, and Zn by LIBS in pellets of 17 varieties of sugar cane leaves and good correlations were obtained with inductively coupled plasma optical emission spectrometry results in the corresponding acid digests. The proposed approach was also useful to estimate the limits of detection based on measurements of blanks, as recommended by IUPAC, or with the aid of a low concentration standard. The utility of LA-ICP OES for the determination of macro- (Ca, K, P and Mg) and micronutrients (B, Mn, Fe and Zn) in plant materials is reported, for the first time. Plant leaves of orange citrus, soy and sugar cane were ground in a cutting mill and further homogenized using a high-speed ball mill for between 5 to 120 min to investigate the effect of particle size diameter on the element signal emission

intensities for the analytical method. The samples were pressed into pellets for 5 min at 0.3 ton cm^{-2} and ablated as 10 replicates by applying 500 laser pulses per replicate. Although particle size did decrease as total mill time increased, the difference in distribution did not have a significant statistical influence on the results. The best sensitivity and precision were observed by using a fluence of 9.0 J cm^{-2} for the LA-ICP OES at 10 Hz. The calibration strategy was based on the use of different certified reference materials prior to pelletizing and to create calibration curves, while Sc was generally used as an internal standard in the matrix to account for any differences in laser-material interactions. Typical precision and accuracy values were determined to be <6% and 8%. Limits of detection were determined to be $\sim 14 \text{ mg kg}^{-1}$ Ca, 94 mg kg^{-1} K, 5.0 mg kg^{-1} Mg, 10 mg kg^{-1} P, 0.2 mg kg^{-1} B, 0.8 mg kg^{-1} Fe, 2.0 mg kg^{-1} Mn and 0.1 mg kg^{-1} Zn, resulting in a method that is fit for the purpose of the analysis of macro- and micro nutrients in plant material.

Sumário

1 - Introdução.....	1
2 - Revisão bibliográfica	4
2.1 - Importância das culturas de cana-de-açúcar, citros e soja	4
2.1.1 - Cana-de-açúcar.....	4
2.1.2 - Citros.....	6
2.1.3 - Soja	8
2.2 - Macro- e micronutrientes em plantas.....	10
2.3 - Métodos de preparo de amostras para determinação de macro- e micronutrientes por FAAS e ICP OES.....	13
2.4 - Análise direta de plantas por LIBS e LA-ICP OES.....	16
2.4.1 - Preparo das amostras	16
2.4.2 - LIBS: um breve histórico, fundamentos e aplicações.....	20
2.4.3 - LA-ICP OES	35
3 - Objetivos.....	38
4 - Materiais e métodos	39
4.1 - Descrição das amostras e tratamentos preliminares	39
4.2 - Descontaminação dos materiais.....	39
4.3 - LIBS.....	40
4.3.1 - Instrumentação	40
4.3.2 - Cominuição dos materiais vegetais e preparo das pastilhas.....	43

4.3.2.1 - Moagem criogênica.....	43
4.3.2.2 - Moagem com bolas.....	45
4.3.3 - Determinação do tamanho final das partículas.....	46
4.3.4 - Preparo das pastilhas para análises por LIBS.....	46
4.3.5 - Microscopia eletrônica de varredura e perfilometria.....	48
4.3.6 - Porosidade e densidade das pastilhas.....	49
4.3.7 - Teores de celulose, fibra e lignina.....	49
4.3.8 - Decomposição das amostras e determinações de nutrientes por ICP OES.....	50
4.3.9 - Estratégia de calibração para a determinação de macro- e micronutrientes em materiais vegetais por LIBS.....	52
4.3.10 - Preparo das curvas de calibração a partir do material vegetal extraído.....	54
4.3.11 - Tratamento dos dados obtidos a partir da análise de pastilha de material vegetal por LIBS.....	55
4.4 - LA-ICP OES.....	58
4.4.1 - Cominuição dos materiais vegetais e preparo das pastilhas visando à determinação de macro- e micronutrientes por LA-ICP OES.....	58
4.4.2 - Uso de padrão interno nas análises por LA-ICP OES.....	59
4.4.3 - Instrumentação do sistema LA-ICP OES.....	60
4.4.4 - Materiais de referência certificados.....	62

4.4.5 - Caracterização das amostras	63
4.4.6 - Limites de detecção para LA-ICP OES.....	64
5 - Resultados e discussão	65
5.1 - LIBS.....	65
5.1.1 - Condições instrumentais do sistema LIBS	65
5.1.2 - Procedimentos de moagem	72
5.1.3 - Moagem criogênica	73
5.1.4 - Moagem com bolas.....	76
5.1.5 - Caracterização das pastilhas e das crateras.....	81
5.1.6 - Determinação dos macronutrientes (P, K, Ca e Mg) e micronutrientes (Fe, Cu, Mn, Zn e B) por ICP OES	87
5.1.7 - Preparo de branco ou material contendo baixa concentração de analitos a partir de folhas de cana-de-açúcar.....	91
5.2 - LA-ICP OES	107
5.2.1 - Procedimentos de moagem e influência da distribuição do tamanho das partículas nas análises por LA-ICP OES.....	110
5.2.2 - Estratégia de calibração e figuras de mérito	124
6 - Conclusão	128
7 - Referências	129

1 - Introdução

A evolução de técnicas instrumentais como a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS), a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) tem permitido a determinação quantitativa de elementos químicos com êxito, seja pela simplicidade e baixo custo envolvidos (*e.g.* FAAS), por possibilitar determinações simultâneas (*e.g.* ICP OES e ICP-MS), por permitir acoplamentos com técnicas de separação empregando sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA), ou especificação química (cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)), sistemas de ablação com laser (LA) e atomização eletrotérmica (ETV), além de cobrir ampla faixa de concentração e limites de detecção da ordem de mg L^{-1} a pg L^{-1} . Esses avanços contribuíram para a caracterização, desenvolvimento e aplicação desses materiais nas áreas da agricultura, meio ambiente, química, medicina etc. Nessas técnicas, os analitos são introduzidos na forma de soluções aquosas e, embora seja possível a determinação de vários elementos, a etapa de conversão da amostra sólida em solução pode ser morosa dependendo da complexidade da matriz, do elemento de interesse e sua concentração, da precisão e da exatidão requeridas.

O tratamento da amostra, o qual precede à determinação dos analitos é a etapa que geralmente demanda o maior tempo da análise, *e.g.* >60%, sendo responsável pelas maiores fontes de erros associados às medidas analíticas ¹. Geralmente, esta etapa pode ser realizada por simples diluição, ou através do aquecimento para solubilização parcial ou total da amostra. Entretanto, a maioria dos procedimentos requer, além da adição de reagentes à amostra, aplicar

energia suficiente para romper as ligações e as estruturas cristalinas dos sólidos. Dois procedimentos básicos são normalmente usados: decomposição por via seca ou úmida ², porém, os métodos para a decomposição de materiais biológicos que usam a radiação micro-ondas em frascos fechados na presença de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio têm se tornado referência ¹. Esse é um importante avanço em análises de rotina, uma vez que a rápida evolução da instrumentação caminha paralela ao desenvolvimento de estratégias simples e direta para o preparo da amostra ³. No entanto, dependendo da complexidade da matriz o tempo de preparo da amostra pode variar de poucos minutos até 48 h ou mais.

Neste contexto, a possibilidade de analisar diretamente as amostras sólidas com o mínimo ou nenhum tratamento prévio da amostra deve ser vista como uma atraente alternativa. A análise *in situ* seria ideal, pois permitiria a determinação dos elementos diretamente no local de amostragem, reduzindo o número de etapas da sequência analítica. Algumas técnicas permitem realizar este tipo de análise ⁴, porém são poucos os equipamentos com desempenho apropriado que podem ser miniaturizados e levados ao campo para a determinação dos analitos em diferentes tipos de amostras.

Nos últimos anos, a análise direta de amostras sólidas por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) vem se mostrando como um método alternativo e complementar aos já consolidados de espectrometria atômica, como FAAS e ICP OES, por exemplo. Um dos grandes atrativos na utilização de LIBS está relacionado ao avanço tecnológico da indústria de componentes ópticos e eletrônicos, o que possibilitou o desenvolvimento e miniaturização de diferentes tipos de laser, surgindo a possibilidade e desafio da aplicação em análises direta e em *in situ*.

O Grupo de Pesquisa de Espectrometria Atômica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) tem se dedicado à aplicação de LIBS para

análise em pastilhas de tecidos vegetais visando à determinação de macro (P, K, Ca e Mg) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn) ⁵⁻¹³. Vários estudos estão em andamento com objetivo de viabilizar a aplicação de LIBS em análises *in situ*.

Nesta tese, diferentes estudos focando a aplicação de LIBS e LA-ICP OES para a análise de folhas de cana-de-açúcar, citros e soja foram realizados. O efeito do tamanho das partículas que compõem as pastilhas dos materiais vegetais nas intensidades dos sinais de emissão de P, K, Ca, Mg, B, Cu, Fe, Mn e Zn foi investigado por LIBS e LA-ICP OES. Outra proposta baseou-se no preparo de padrões de calibração obtidos a partir de procedimentos de extração com ácido diluído. Misturas apropriadas entre o material vegetal original e o material extraído foram preparadas e as pastilhas foram analisadas por LIBS. Dessa forma, espera-se que estes estudos possam auxiliar na compreensão de alguns parâmetros que influenciam nas análises por LIBS ou LA-ICP OES e para que essas técnicas possam ser amplamente aplicadas em análises diretas de plantas.

2 - Revisão bibliográfica

2.1 - Importância das culturas de cana-de-açúcar, citros e soja

2.1.1 - Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L) foi introduzida no Brasil no período colonial e se constitui em uma das culturas mais importantes para a economia brasileira. O Brasil é o maior produtor dessa cultura, ocupando uma posição de destaque, juntamente com a Índia, Estados Unidos, Tailândia, China e México. Na safra 2011/12 a área plantada no Brasil foi de 8,5 milhões de hectares. Estima-se que em 2022 esta área ocupe 10,5 milhões ha. O Estado de São Paulo destaca-se como maior produtor nacional com 4,4 milhões ha (52 %), seguido por Minas Gerais com 769 mil ha (9 %), Goiás com 732 mil ha (8 %), Paraná com 614 mil ha (7 %), Mato Grosso do Sul com 541 mil ha (6 %), Alagoas com 458 mil ha (5 %) e Pernambuco com 298 mil ha (3 %). A produtividade média brasileira para a safra 2012/2013 está estimada em 70,3 ton/ha, 3 % maior do que na safra 2011/12 (68 ton/ha)¹⁴. Na safra 2011/12, foram moídas 571 milhões de toneladas de cana-de-açúcar e a previsão para a safra de 2012/13 é que sejam moídas cerca de 600 milhões ton. Em 2022 espera-se que sejam moídas 969 milhões ton. A Figura 1 mostra a área de cultivo de cana-de-açúcar na safra 2010/11 e os principais estados produtores¹⁵.

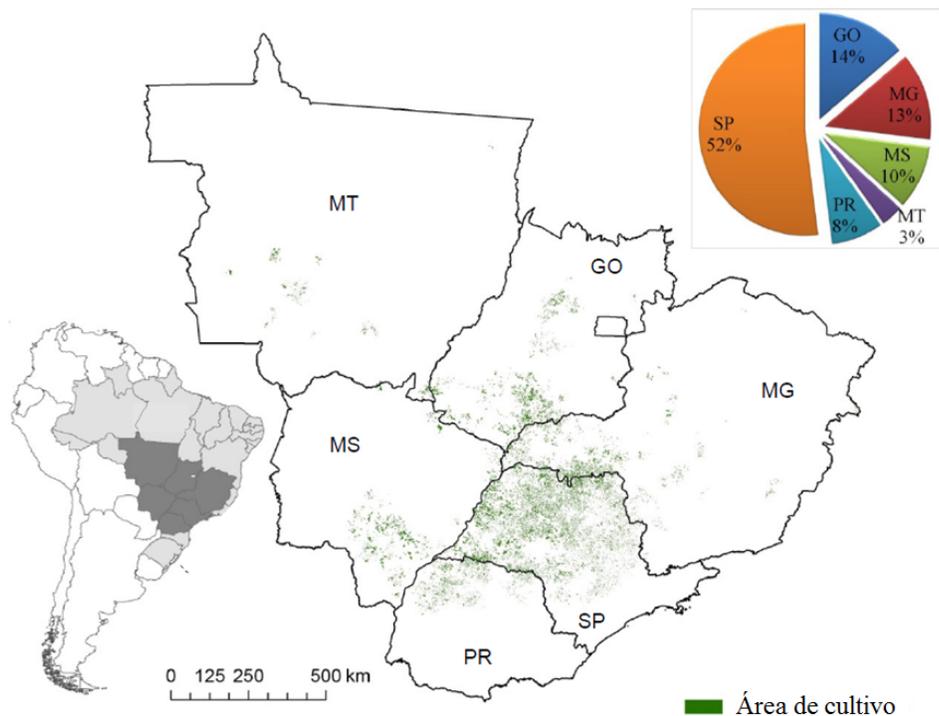


FIGURA 1 - Áreas de cultivo de plantações de cana-de-açúcar e os estados produtores na safra de 2010/11. Imagens adaptadas de Adami et al. ¹⁵.

O País domina o ciclo completo da produção de etanol, desde a lavoura de alta produtividade, até a instalação dos equipamentos para as destilarias que geram esse biocombustível a partir da fermentação do caldo extraído da cana-de-açúcar. O etanol também conta com projeções otimistas para os próximos anos. A produção estimada para 2019 é de 58,8 bilhões de litros e o consumo interno está projetado em 50 bilhões de litros e as exportações em 8,8 bilhões ¹⁶. Atualmente, o setor sucroalcooleiro brasileiro possui 437 unidades produtoras (usinas), sendo 168 produtoras de etanol, 16 de açúcar e 253 de açúcar e etanol ¹⁴.

2.1.2 - Citros

As laranjas, os limões, as tangerinas, as limas e os pomelos são do gênero botânico *Citrus* e da família Rutáceae ¹⁷. Em 2009, as exportações de citros somaram 3,0 milhões de toneladas, sendo um terço de suco concentrado ¹⁸.

A citricultura é uma das mais destacadas agroindústria brasileira, sendo responsável por 60% da produção mundial de suco de laranja (*Citrus sinensis* L). O Brasil é também o maior exportador do produto. Produzimos a metade do suco de laranja do planeta cujas exportações trazem mais de US\$ 2,5 bilhões por ano ao país ¹⁹. Em todo o Brasil são mais de 3.000 municípios onde a cultura está presente ¹⁸.

Nos últimos anos, o crescimento da área plantada de citros no mundo foi de aproximadamente 17%, chegando a cerca de 7,6 milhões de hectares em todo o mundo (Figura 2). A área de citros é a segunda maior em relação às outras frutas, perdendo apenas para a produção de banana (10,2 milhões de ha). Entre os produtos cítricos, a área de laranja representa 55%, o que consolida essa cultura como a principal na citricultura ¹⁸.

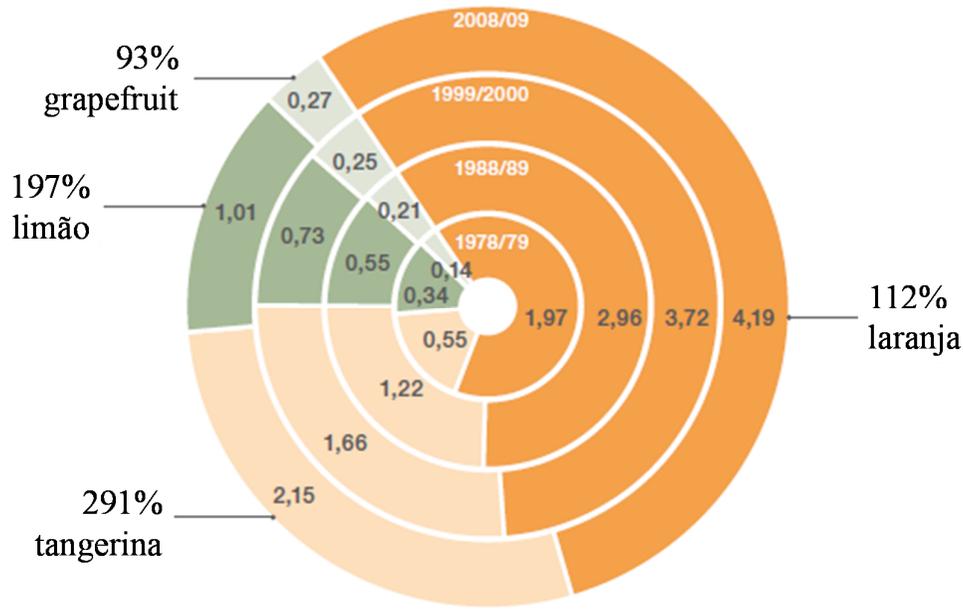


FIGURA 2 - Crescimento da área de citros no mundo (milhões de ha) no período de 1978/79 e 2008/09. Figura extraída de Neves ¹⁸.

Cerca de 50% da produção mundial de laranja e 80% da brasileira resultam em sucos industrializados. O principal comprador da bebida brasileira é a União Europeia. A maior parte das importações mundiais (i.e. 85%) é absorvida por apenas três mercados: Estados Unidos, União Europeia e Canadá ¹⁹. Os estados da Flórida e São Paulo detêm 81% da produção mundial de suco. O estado de São Paulo possui mais da metade do total. ¹⁸.

Da laranja, além do suco, são extraídos óleos essenciais e líquidos aromáticos. O bagaço de citros, com alto teor energético, é um subproduto industrial de expressivo valor econômico ¹⁹.

2.1.3 - Soja

A soja (*Glycine max* L.), além de ser a principal oleaginosa cultivada no mundo, faz parte do conjunto de atividades agrícolas com maior destaque no mercado mundial. Para a safra 2010/11, apenas as produções mundiais de milho, trigo e arroz superaram a produção de soja (Figura 3). Adicionalmente, considerando o crescimento das principais culturas agrícolas entre as safras de 1970/1971 e 2010/11, percebe-se que a exploração da soja é a atividade que apresentou a maior expansão, com um aumento de produção > 500 %. Além disso, é a cultura agrícola brasileira que mais cresceu nas últimas três décadas e corresponde a 49% da área plantada em grãos do país ²⁰.

A ampliação na produção de soja pode ser atribuída a diversos fatores, dentre os quais são destaque: i) apresenta elevado teor de proteínas (~ 40%) de excelente qualidade, tanto para a alimentação animal quanto humana; ii) possui considerável teor de óleo (~ 20%) que pode ser usado para diversos fins, especialmente associado à alimentação humana e à produção de biocombustíveis; iii) é uma mercadoria padronizada e uniforme, podendo, portanto, ser produzida e negociada por produtores de diversos países; iv) apresenta alta liquidez e demanda e; v) nas últimas décadas houve expressivo aumento da oferta de tecnologias de produção que permitiram ampliar significativamente a área e a produtividade da oleaginosa.

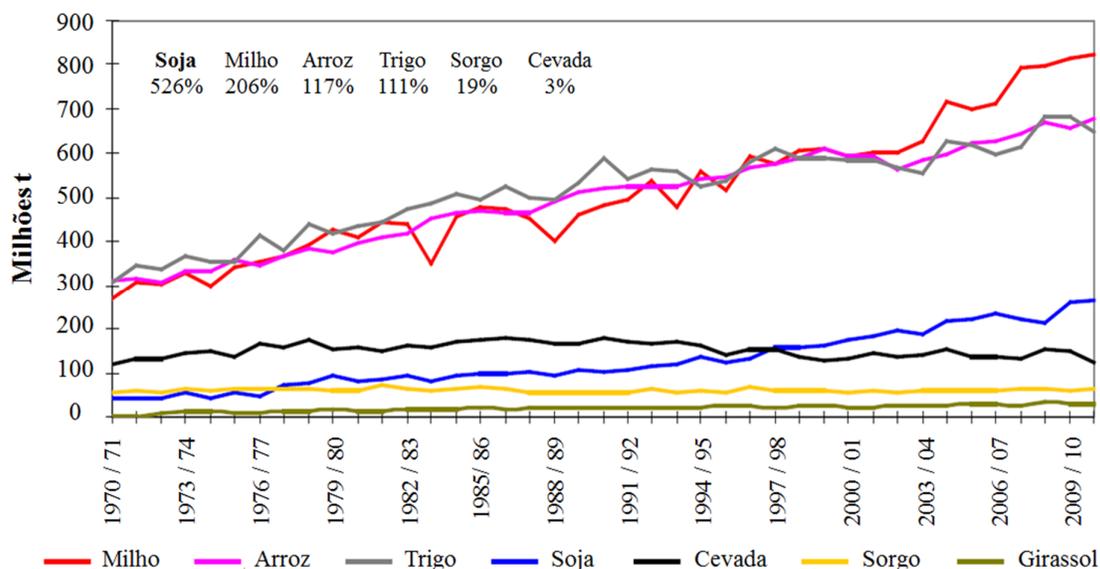


FIGURA 3 - Produção mundial de grãos - 1970/71 a 2010/11 ²⁰.

Cultivada especialmente nas regiões Centro-Oeste e Sul do país, responsável por 88 % da produção nacional, a soja se firmou como um dos produtos mais destacados da agricultura nacional e na balança comercial. Um levantamento realizado em janeiro de 2013 sobre a safra de grãos 2012/2013 pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) indica a produção de soja em 82,6 milhões de toneladas, o que corresponde a um aumento de 25% em relação à safra passada (2011/12), quando o Brasil produziu 66,38 milhões de toneladas de soja ²¹.

No cerrado, o cultivo da soja tornou-se possível graças às pesquisas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), em parceria com produtores, industriais e centros privados de pesquisa. Os avanços nessa área possibilitaram, também, o aumento da produtividade média por hectare, atingindo os maiores índices mundiais ²⁰.

A indústria nacional transforma, por ano, 30 milhões de toneladas de soja, produzindo cerca de 6,0 milhões de toneladas de óleo comestível e 24 milhões

de toneladas de farelo proteico, contribuindo para a competitividade nacional na produção de carnes, ovos e leite. A soja também se constitui em alternativa para a fabricação do biodiesel, combustível capaz de reduzir em 78% a emissão dos gases causadores do efeito estufa na atmosfera ²².

2.2 - Macro- e micronutrientes em plantas

Uma questão bastante importante e que deve ser compreendida é a forma como as plantas adquirem os nutrientes essenciais ou benéficos. Carbono, oxigênio e hidrogênio são obtidos a partir do CO₂ atmosférico e da água presente no solo. Depois de assimilados, eles são incorporados às plantas pelo processo de fotossíntese. Como consequência, átomos de C, O e H fazem parte de praticamente todas as moléculas orgânicas dos vegetais e são responsáveis por 94-97% do peso seco de uma planta. Os demais nutrientes (de 3-6 % restantes) fazem parte dos minerais presentes no solo ²³ e ou disponibilizados por fertilizantes.

Apesar de mais de 60 desses elementos químicos terem sido encontrados nos vegetais, apenas alguns são considerados essenciais. Pode-se dizer que um elemento é essencial quando o vegetal não consegue completar seu ciclo de vida (formar semente viável) na sua ausência ²⁴.

Quando consideramos a quantidade dos nutrientes minerais nos tecidos vegetais, observamos que alguns estão presentes em maiores proporções que os outros. Essas proporções dividem os nutrientes minerais em duas categorias: macronutrientes (nutrientes necessários em maior quantidade) e micronutrientes (nutrientes necessários em menor quantidade). A divisão entre macro e micronutrientes não tem correlação com uma maior ou menor essencialidade. Geralmente, macronutrientes realizam um papel estrutural, enquanto que os

micronutrientes estão mais relacionados à ativação de certas enzimas, exercendo um papel regulatório. Todos são igualmente essenciais, só que em quantidades diferentes ^{24,25}. A Tabela 1 mostra a faixa de concentração de macro e micronutrientes considerados essenciais para as plantas em bom estado nutricional.

TABELA 1 - Faixas de concentração de macro- e micronutrientes em plantas sadias de interesse agrônômico ⁵.

Nutriente	Faixa de concentração
	Macronutriente (g kg ⁻¹)
N	0,1 – 20
P	0,8 – 10
K	6 – 60
Ca	2 – 60
Mg	1 – 10
S	0,1 – 10
	Micronutriente (mg kg ⁻¹)
Cl	100 – 40000
B	10 – 200
Cu	3 – 50
Fe	50 – 900
Mn	20 – 2000
Zn	5 – 200
Mo	0,2 – 2
Ni	< 1,0

Como os nutrientes inorgânicos possuem funções específicas nos vegetais, os sintomas correspondentes à sua falta podem ser deduzidos considerando-se o não cumprimento de tais funções. Por exemplo, o nitrogênio, o ferro e o magnésio estão envolvidos na formação da clorofila. Como consequência, a carência desses nutrientes pode levar a um sintoma de clorose (amarelecimento pela falta de clorofila).

Como as reações metabólicas são bastante integradas, uma perturbação específica causada por um determinado nutriente pode desencadear uma série de reações que levam a uma sintomatologia geral como a clorose ou a necrose. No entanto, é muito difícil o diagnóstico do nutriente que está em falta a partir da observação de sintomas de deficiência. A análise de solos é uma das formas de se determinar quando uma cultura está bem nutrida ou não. Contudo, esta apenas fornece a quantidade de nutrientes que pode ser absorvido pelas raízes, mas não fornece informações se isso realmente irá ocorrer, já que a absorção depende de outros fatores. A alternativa mais correta e simples é a análise foliar. Através da quantificação dos nutrientes presentes nos tecidos vegetais podemos saber qual deles está presente em quantidades consideradas subótimas e assim corrigir sua deficiência no solo. Outra ferramenta bastante simples é a diagnose visual, que pode ser bastante útil na identificação de problemas nutricionais das plantas^{26,27}.

Existem diversos fatores, como espécie, variedade, idade fisiológica e posição a ser amostrada, que interferem na composição mineral das plantas. Por isso, antes de realizar a amostragem do material vegetal, é necessário que esses fatores estejam bem definidos. A amostragem dos tecidos vegetais é uma das etapas mais importantes para aumentar a probabilidade de sucesso no uso da análise foliar e, é nessa etapa onde ocorrem erros com maior frequência. Alguns dos aspectos que devem ser considerados com o objetivo de padronizar os critérios de amostragem são: (i) idade das folhas amostradas - as folhas recém-

maduras refletem bem o estado nutricional da planta; (ii) a época do ano, a posição da folha no vegetal e o número de folhas amostradas devem se padronizados; (iii) cada amostra deve ser coletada em plantas da mesma cultivar, com a mesma idade e que representem a média da população; (iv) folhas inteiras e sadias devem ser usadas, evitando-se as atingidas por pragas e doenças; (v) as áreas com plantas apresentando sintomas de deficiência, áreas com ocorrência de manchas de solo, afetadas por salinização ou sujeitas à inundação, devem ser amostradas separadamente; (vi) não se deve coletar as folhas após a aplicação de fertilizantes e defensivos ao solo ou nas folhas, ou após períodos intensos de chuvas; (vii) após a coleta, deve-se acondicionar as amostras em sacos de papel, identificando-as e enviando-as, imediatamente, para um laboratório^{24,25,28}.

2.3 - Métodos de preparo de amostras para determinação de macro- e micronutrientes por FAAS e ICP OES

Diversos tipos de amostras requerem etapas preliminares de pré-tratamento, as quais são necessárias dependendo do estado em que são coletadas e, em alguns casos, podem ser realizadas antes e/ou depois de serem encaminhadas ao laboratório.

Essas etapas geralmente envolvem métodos físicos como simples lavagem, secagem, moagem e peneiramento¹ e a sequência analítica, geralmente inclui uma decomposição em meio ácido em sistemas abertos ou fechados, com massas variando de 250 a 1000 mg e posterior determinação dos elementos por FAAS e ICP OES. A técnica de ICP OES é muito empregada em análise de rotina por sua capacidade de determinação simultânea de P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn e B em um único digerido²⁷.

A decomposição por via seca em mufla é um dos procedimentos mais simples para o preparo de amostras, onde a decomposição da matéria orgânica ocorre através da combustão e/ou pirólise em uma mufla, normalmente com temperaturas entre 450 e 550 °C de 4 a 8 h. A cinza resultante é dissolvida em solução diluída de ácido nítrico, clorídrico ou na mistura entre esses ácidos, *i.e.* água régia. Apesar da possibilidade de poder usar grandes quantidades de amostras (>10 g), podem ocorrer perdas de alguns analitos por volatilização (*e.g.* As, Cd, Hg, Pb e Se), além do elevado risco de contaminação, principalmente pelo tempo de exposição ao ambiente e elevado consumo de energia elétrica ¹.

Dentre os métodos que utilizam elevadas temperaturas em via úmida, destacam-se o aquecimento por convecção, *i.e.* blocos digestores, chama ou fornos convencionais, e por micro-ondas, normalmente empregando ácidos minerais oxidantes (*e.g.* HNO₃, HClO₄) e peróxido de hidrogênio ²⁶. Em geral, a decomposição de materiais vegetais por via úmida requer o aquecimento da amostra na presença de um ácido mineral oxidante concentrado, de misturas de ácidos, ou na mistura com peróxido de hidrogênio ¹. Uma das grandes vantagens em relação à maioria dos métodos de decomposição por via seca baseia-se nas menores temperaturas empregadas, o que diminui os riscos de perdas por volatilização.

A digestão nitro-perclórica é bastante usada na decomposição de materiais orgânicos. Basicamente, o HNO₃ promove a oxidação inicial do material, e, com a adição de HClO₄, ocorre a oxidação dos materiais não oxidados pelo HNO₃ e dos materiais de difícil dissolução. Através dessa estratégia é possível determinar P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn, Zn, Al e Na ²⁹. Eventualmente, elevados brancos analíticos podem ser observados. É importante lembrar o cuidado com o uso de HClO₄ para evitar riscos e acidentes de explosão ¹.

Um método bastante moderno e eficiente para a decomposição de diversos tipos de amostras consiste na digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados^{30,31}. Em geral, pode-se afirmar que o aquecimento por micro-ondas, quando realizado em equipamentos apropriados, proporciona decomposições rápidas e seguras quando comparadas às decomposições com aquecimento convencional (*e.g.* chapas aquecedoras, chamas). O uso de recipientes fechados para digestões com micro-ondas tem sido bastante recomendado quando é necessário aproveitar o efeito das altas temperaturas para dissolver amostras de difícil decomposição, nos quais os elementos de interesse são voláteis. Algumas das principais vantagens em relação aos sistemas abertos incluem¹: (i) maior eficiência na dissolução em altas temperaturas; (ii) diminuição dos riscos de perdas dos analitos por volatilização; (iii) diminuição dos riscos de contaminações pelo ambiente de trabalho e (iv) menor consumo de reagentes de elevada pureza.

Em contrapartida, uma das principais desvantagens dos sistemas fechados está relacionada à massa de amostra utilizada. Geralmente, não é possível digerir grandes quantidades de amostra, porque a pressão interna depende da pressão de vapor do ácido utilizado e da pressão resultante ocasionada pelos produtos gasosos gerados pela decomposição.

Outros sistemas que empregam micro-ondas para o aquecimento da amostra permitem a decomposição de um número maior de amostras utilizando alta pressão (*e.g.* 200 bar) e temperatura (*e.g.* 260 °C), além de permitir a digestão de massas entre 25 e 30 g. A possibilidade da decomposição ácida com ácidos diluídos e peróxido de hidrogênio também tem sido uma vantagem bastante discutida nas propostas que utilizam as micro-ondas^{3,32,33}.

A técnica mais utilizada e a que mais se destaca em análises de rotina para a determinação de nutrientes nos digeridos ácidos é ICP OES, principalmente por sua capacidade multielementar e simultânea. Geralmente, macronutrientes,

e.g. P, K, Ca, Mg e S e micronutrientes, *e.g.* B, Cu, Fe, Mn e Zn podem ser determinados em aproximadamente 30 s em cada digerido ¹². Alternativamente, FAAS pode ser utilizada na determinação de K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn e Zn em chama ar-acetileno, injeção em fluxo e espectrofotometria de absorção molecular para a determinação de P e B, e turbidimetria empregando sistemas de análise por injeção em fluxo para a determinação de S, nos mesmos digeridos ¹². Durante muitos anos, o Laboratório de Espectrometria Atômica do CENA tem empregado esses métodos nas análises de rotina.

Entretanto, ainda existe um grande desafio analítico visando à análise direta de sólidos de materiais vegetais. Os principais desafios analíticos estão associados à carência de materiais de referência certificados (CRMs) de plantas para a calibração e às dificuldades na homogeneização da amostra.

Na química analítica moderna, a análise direta de amostras sólidas tornou-se um grande desafio, pois, pode melhorar a eficiência analítica eliminando as etapas de digestão, reduzindo os riscos de contaminação das amostras, minimizando o uso ou geração de substâncias nocivas à saúde humana e contribuindo com uma química verde.

2.4 - Análise direta de plantas por LIBS e LA-ICP OES

2.4.1 - Preparo das amostras

Em geral, a análise de sólidos para a determinação de macro e micronutrientes em plantas é feita após os materiais vegetais serem apropriadamente coletados, necessitando de pelo menos três etapas de pré-tratamento: limpeza (lavagem), secagem e homogeneização ³⁴. Dependendo do

método escolhido, como, por exemplo, a análise direta de suspensões por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente, a análise direta de suspensões por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS), a análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (SS-GFAAS), a espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF), ICP-MS empregando a ablação com laser (LA-ICP-MS), ICP OES empregando a ablação com laser (LA-ICP OES), a análise por ativação neutrônica instrumental (INAA) e também LIBS, são necessários procedimentos para garantir a homogeneidade das amostras.

A distribuição do tamanho das partículas é um importante pré-requisito que deve ser considerado em análise direta de amostras sólidas ³⁵. Esse parâmetro depende de fatores como a natureza do material, a densidade, a massa de amostra utilizada e a concentração do elemento de interesse.

Segundo Markert ³⁴, a cominuição da amostra é uma das etapas principais do procedimento analítico. O termo cominuição geralmente faz referência ao procedimento de moagem de amostras sólidas com a diminuição das partículas grandes em pequenas. Quando apropriada, a micro-homogeneidade dos analitos pode ser melhorada, além de prevenir a segregação decorrente da ampla faixa de partículas dentro da amostra. No caso dos materiais vegetais que são naturalmente heterogêneos, os diferentes teores dos analitos nas partes das folhas podem dificultar as análises quantitativas. Exemplos de tal variabilidade em folhas de plantas já foram discutidos por Kratochvil et al. ³⁶.

De fato, a escolha do procedimento de moagem depende de alguns parâmetros ³⁴: (i) quantidade e número de amostras do material a ser homogeneizado; (ii) tamanho das partículas do material original; (iii) distribuição do tamanho de partículas desejada e (iv) propriedades físico-químicas da amostra a ser cominuída e o equipamento de moagem

(possibilidade de contaminação da amostra e/ou perdas por volatilização do analito).

Alguns autores³⁷ destacaram a necessidade da cominuição da amostra em partículas com diâmetros menores que 50 μm , embora outros^{38,39} tenham recomendado tamanhos de partículas com diâmetros da ordem de 10 μm para minimizar as dificuldades encontradas quando apenas pequenas massas de amostra são utilizadas em uma análise. De qualquer forma, os procedimentos para a cominuição devem ser eficientes para obter tamanhos de partículas apropriados, especialmente porque a massa de amostra analisada por algumas técnicas microanalíticas geralmente varia de 0,1 a 10 mg⁴⁰.

Apesar da possibilidade de analisar massas diminutas de amostras ser uma grande vantagem entre as técnicas microanalíticas disponíveis, essa característica é também um grande desafio, pois obter resultados precisos e exatos nessas condições não é uma tarefa simples. O uso de massas de amostra inferiores a 100 mg pode comprometer a homogeneidade e, conseqüentemente, a representatividade, já que os elementos presentes em baixas concentrações podem não estar homogeneamente distribuídos pelo material⁴¹. Quanto menor for a porção amostrada, maior é a tendência de se tornar cada vez mais heterogênea, pois a probabilidade estatística de encontrar a mesma concentração média do analito na fração tomada para análise torna-se cada vez menor.

Por exemplo, no caso em que massas na faixa de 100 a 500 mg são utilizadas para digestão ou solubilização, a micro-homogeneidade não é um fator limitante e, provavelmente, não deve ocasionar erros associados à falta de homogeneidade da amostra³⁹. Por outro lado, quando massas menores são tomadas para análise (*e.g.* 0,01 a 1 mg) a micro-homogeneidade torna-se um parâmetro crítico.

Neste sentido, tanto a moagem criogênica ⁴²⁻⁴⁵ quanto a moagem com bolas ^{34,46} podem ser eficientes para a redução do tamanho das partículas para posterior determinação dos analitos por técnicas microanalíticas. Além disso, tecidos foliares podem ser apropriadamente cominuídos em moinho criogênico ^{10,12} e em moinho com bolas ^{34,46}.

Em 2009, Arroyo et al. ⁴⁶ investigaram o efeito da cominuição de amostras de solos empregando moinho com bolas com movimento planetário para o preparo de pastilhas e determinação dos analitos por LA-ICP-MS. Foram obtidos tamanhos de partículas menores que 1 µm após 20 min de moagem em recipientes de carbetto de tungstênio. Segundo os autores, o procedimento de homogeneização melhorou a coesão das pastilhas sem a necessidade da adição de agentes aglutinantes. Além disso, foi observada amostragem representativa em microescala e apropriada reprodutibilidade das medidas.

Outro ponto crítico está relacionado com a etapa de calibração. A maioria dos CRMs disponíveis apresenta homogeneidade garantida para massas de amostras variando entre 100 e 500 mg ³⁹. Stoeppler et al. ⁴⁰ mencionaram faixas de massas de amostras requeridas (porção amostrada) para uma série de técnicas microanalíticas. A Tabela 2 mostra alguns CRMs de origem biológica produzidos pelo NIST (*National Institute of Standards and Technology*), a faixa de variação do tamanho de suas partículas e a massa mínima certificada recomendada. Ressalta-se que, além da diferença na estrutura da matriz, as amostras foram submetidas a diferentes procedimentos e tempos de moagem, o que explica a diferença na distribuição do tamanho das partículas.

TABELA 2 - Variação do tamanho de partículas e a massa mínima recomendada para diferentes CRMs. Valores compilados dos certificados ⁴⁷.

NIST	Material	Tamanho das partículas (µm)	Massa mínima recomendada (mg)
1515	Folhas de macieira	2,5-20	150
1549	Leite em pó desnatado	15-70	500
1547	Folhas de pessegueiro	3-20	150
1567a	Farinha de trigo	60-130	500
1568a	Farinha de arroz	40-300	400
1570a	Folhas de espinafre	3-20	150
1573a	Folhas de tomateiro	2,5-30	150
1575a	Acículas de pinheiro	1-100	250

2.4.2 - LIBS: um breve histórico, fundamentos e aplicações

A análise direta de amostras empregando lasers tem despertado o interesse da comunidade científica nos últimos anos. Isso se deve, principalmente, aos conceitos de sustentabilidade, química limpa e ao grande avanço tecnológico da indústria de componentes ópticos e eletrônicos.

O interesse pela aplicação do laser para fins analíticos, talvez remonte ao início da década de 1960, quando após o desenvolvimento do primeiro laser de rubi, não se tinha ideia do grande potencial de suas aplicações ⁴⁸.

Em 1958, Shawlow e Townes ⁴⁹ propuseram parte da teoria necessária para a construção do primeiro laser. Contudo, foi Maiman ⁵⁰, em 1960, o

responsável pelo desenvolvimento do primeiro laser de rubi. As primeiras aplicações datam de 1962, quando o laser de rubi foi utilizado para produzir vapores na superfície de materiais metálicos e não metálicos⁵¹. Basicamente, os vapores eram excitados por uma fonte de energia auxiliar para formar um microplasma com objetivo de detectar seu espectro de emissão. Esse experimento é considerado como o surgimento de uma das primeiras técnicas analíticas que utiliza um laser como fonte de energia, e que ficou conhecida pelo acrônimo LIBS (termo do inglês “*Laser Induced Breakdown Spectroscopy*”) ⁵². Dois anos depois, Runge et al. ⁵³ usaram um plasma induzido por laser, não apenas como uma ferramenta para a ablação, mas também como uma fonte de excitação dos átomos. Nesse experimento, foram construídas curvas de calibração baseadas nas linhas de emissão atômicas e/ou iônicas de Cr e Ni, detectadas diretamente no plasma induzido na superfície de amostras de aço.

LIBS é uma técnica espectroanalítica que emprega a microamostragem por ablação com laser e subsequente excitação dos átomos, íons e fragmentos moleculares presentes no microplasma durante e/ou imediatamente após a ablação. Um pulso de laser, com energia apropriada, focalizado na superfície da amostra, é capaz de promover a vaporização e excitação das espécies químicas presentes. O espectro de emissão do plasma é obtido e a intensidade de emissão dos elementos presentes na amostra é utilizada como resposta analítica ⁵⁴⁻⁵⁶.

Os primeiros equipamentos comerciais explorando LIBS foram disponibilizados na década de 1970 ⁵¹ e utilizavam a energia do pulso do laser apenas para o processo de ablação da amostra, enquanto que a excitação era realizada de outra forma (*e.g.* faísca).

Por isso, mesmo após uma fase inicial de otimismo, o interesse por LIBS entrou em declínio, principalmente pelo alto custo da instrumentação e baixo desempenho quando comparada com técnicas já consolidadas na época, como GFAAS e ICP OES ⁵².

Durante os anos de 1960 e 1980, parte das pesquisas sobre plasmas e lasers e suas aplicações tiveram origem na Rússia. Posteriormente foram abordadas em um livro clássico de Raizer, “*Laser-induced Discharge Phenomena*”, publicado em inglês em 1977⁵⁴.

Em meados da década de 1980, LIBS ressurgiu após o desenvolvimento de lasers mais modernos e com características mais atraentes (*e.g.* potência, rapidez e custo). À medida que os lasers e outros componentes se miniaturizavam, além da possibilidade e vantagens das análises *in situ*, diversas aplicações adicionais surgiram⁵⁴. O desenvolvimento dos detectores ICCD (*intensified charge-coupled device*), que possibilitam melhor resolução temporal nas medidas espectroscópicas e melhor discriminação entre o espectro de emissão dos analitos e o espectro de fundo devido à emissão do *continuum* do plasma, contribuíram significativamente para o desenvolvimento da técnica^{51,57}. A partir desse período, a capacidade de LIBS para análise multielementar rápida e direta em diversos tipos de amostras, somado à possibilidade de, em alguns casos, usar sistemas portáteis, possibilitou o surgimento de procedimentos de análises *in situ* ou à distâncias seguras da amostra (*e.g.* explosivos) para o operador⁵⁸.

Nos últimos anos, o número de publicações sobre fundamentos e aplicações de LIBS em vários tipos de amostra tem aumentado consideravelmente. Em consulta realizada na página da base científica do Scopus (<http://www.scopus.com/home.url>), utilizando o termo “laser induced breakdown spectroscopy”, é possível verificar tal crescimento, como mostra a Figura 4.

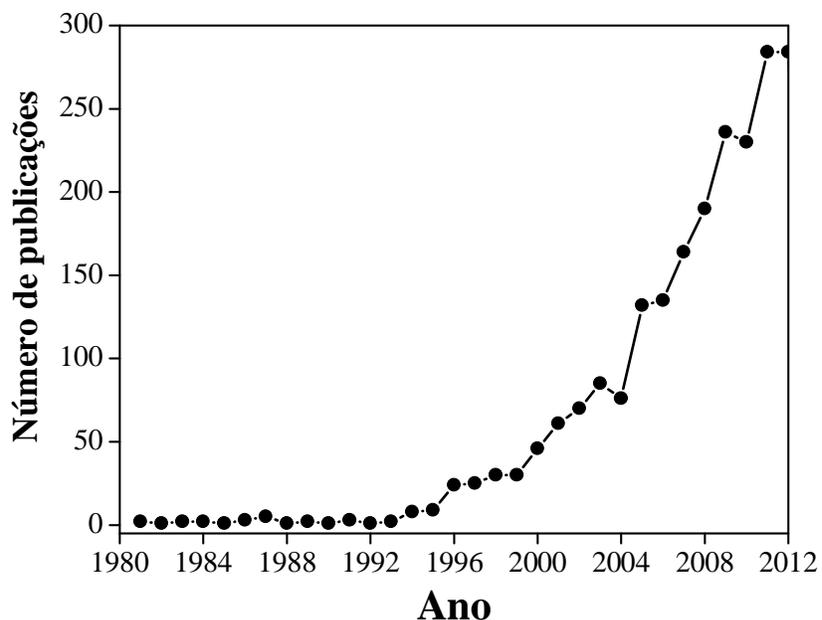


FIGURA 4 - Número de publicações por ano sobre a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser entre 1980 até 2012.

As características do plasma são dependentes da composição da amostra, das condições da sua superfície, de suas propriedades térmicas e ópticas, além dos parâmetros do laser ⁵⁹. Normalmente, LIBS utiliza um laser pulsado entre 1 e 10 ns, com taxa de repetição entre 1 e 10 Hz e energia por pulso do laser entre 10 e 200 mJ.

No momento em que uma lente convergente focaliza um pulso de laser, as moléculas componentes do material são dissociadas em seus constituintes atômicos devido à ruptura das ligações moleculares, e em íons e elétrons devido à ruptura das ligações eletrônicas. A ruptura (termo derivado do inglês *breakdown*, refere-se a um fenômeno coletivo relacionado à ruptura dielétrica das ligações moleculares do material que ocorre anteriormente à formação do plasma, e envolve propriedades da amostra, *e.g.* elasticidade e compressibilidade) é promovida pelo gradiente de campo elétrico intenso do laser que acompanha a focalização ⁶⁰.

Muitas vezes, LIBS utiliza um feixe de laser pulsado operando no comprimento de onda fundamental, 1064 nm, em regime de tempo de nanosegundos, com alta irradiância (*e.g.* da ordem de GW cm^{-2}), que é focalizado sobre a superfície da amostra, provocando a formação de um plasma de alta temperatura (*e.g.* 8000 a 20000 K) e vaporizando parte do material. Um sistema óptico captura parte da luz que foi emitida pelo plasma que é transferida para um espectrômetro que dispersa as radiações emitidas pelas espécies atômicas e iônicas excitadas no plasma. Um detector registra os sinais de emissão e os equipamentos eletrônicos são responsáveis por digitalizar e computar os resultados. Os espectros de emissão obtidos são utilizados na determinação dos elementos presentes na amostra ⁵¹. Geralmente, esse espectro é analisado nas regiões UV-VIS.

Os processos de inicialização, formação e decaimento do plasma são complexos. Quando o plasma se forma, os elétrons interagem e se recombinam com os íons para liberar energia. Durante a relaxação, os átomos, íons e fragmentos moleculares excitados presentes no plasma, emitem um espectro de emissão característico do material volatilizado na amostra ⁵⁴. Na medida em que o plasma evolui com tempo, o espectro de emissão se altera. Durante os primeiros instantes, o espectro é caracterizado pela emissão de radiação do *continuum* e de espécies iônicas excitadas. Esse *continuum* pode ser visualmente observado como uma “luz branca” intensa emitida pelo plasma, proveniente, principalmente, de reações de recombinação dos elétrons livres com os íons e de fenômenos *Bremsstrahlung*. Esse efeito é provocado por colisões de elétrons com íons e átomos e à recombinação de elétrons com íons. Ao longo do decaimento do plasma o espectro começa a ser caracterizado pela radiação emitida por átomos neutros e, eventualmente, por moléculas simples formadas pela recombinação de espécies atômicas. Na prática, durante o decaimento,

observa-se a diminuição da intensidade de emissão da radiação de fundo. A Figura 5 mostra um exemplo da evolução temporal do plasma em regime de ns.

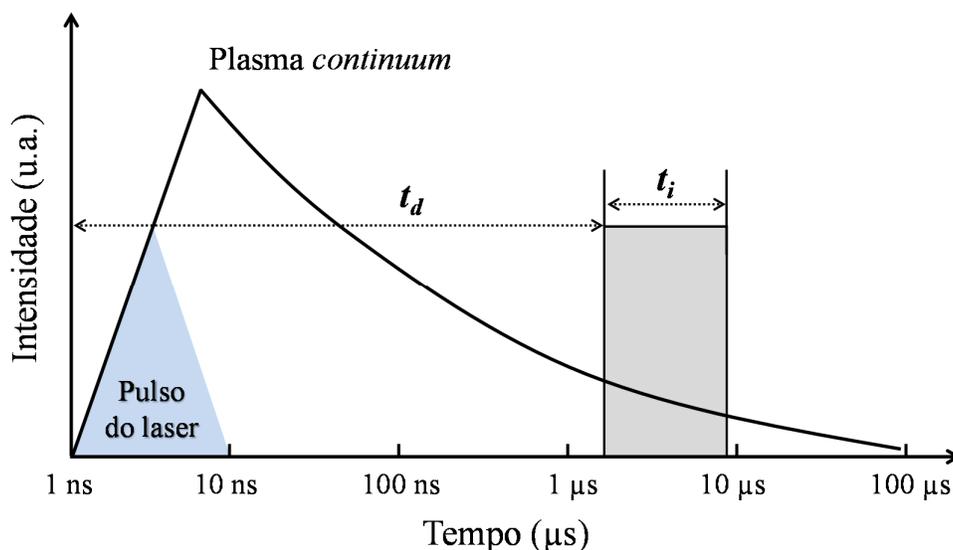


FIGURA 5 - Exemplo da evolução temporal do plasma em regime de nanossegundos.. Legenda: t_d : tempo de atraso; t_i : tempo de integração. Adaptado de Cremers & Radziemski⁵⁴.

Alguns dos fatores que afetam as determinações por LIBS são relacionados com as propriedades do laser (*e.g.* comprimento de onda, duração do pulso, número de pulsos, taxa de repetição, arranjo óptico) e da amostra (*e.g.* distribuição do tamanho das partículas, densidade e porosidade das pastilhas do material cominuído, atmosfera de ablação (*e.g.* diferente gás e pressão)), condições de medição óptica (*e.g.* coleta da radiação emitida pelo plasma, seleção das linhas de interesse atômicas ou iônicas, tempo de atraso e tempo de integração das medidas).

Mesmo com o grande número de parâmetros que podem ser ajustados em LIBS com o objetivo de melhorar sua sensibilidade analítica, diversas

características relevantes e atrativas para a abordagem dos problemas analíticos merecem ser destacadas:

- i) Pode ser utilizado diretamente em amostras sólidas, líquidas e gasosas sem ou com o mínimo de etapas de preparo das amostras;
- ii) Pode ser considerado um método semidestrutivo, uma vez que a aplicação de um único pulso de laser sobre a amostra compromete pouco sua integridade;
- iii) Apresenta características microanalíticas, permitindo a análise de superfícies em amostras sólidas com alta resolução espacial (*e.g.* μm);
- iv) Aplica-se no monitoramento ambiental e análises *in situ* e em tempo real;
- v) Aplica-se em ambientes insalubres, se com instrumentação apropriada, bem como o monitoramento à distância de amostras de elevada periculosidade (*e.g.* explosivos e rejeitos nucleares);
- vi) Possibilita a análise em tempo real, com tempo de aquisição do espectro em poucos segundos.

LIBS tem se desenvolvido e consolidado nos últimos anos. Diversos trabalhos de revisão foram publicados contendo aplicações em análises diversas^{5,61-69}.

A análise direta de plantas ainda é um desafio na química analítica. Mesmo com considerável aumento no interesse por LIBS e seu evidente desenvolvimento, apenas alguns trabalhos são referentes à análise de plantas. As principais aplicações estão relacionadas às análises de metais e ligas metálicas⁶⁴, materiais geológicos⁷⁰, materiais de interesse agrônomico^{5,71}, amostras ambientais^{10,72}, artefatos históricos⁷³, tecidos biológicos^{69,73} e tecidos

animais ^{74,75}, materiais farmacêuticos ⁷⁶, polímeros ⁷⁷⁻⁸⁰, madeiras ⁸¹⁻⁸⁶, análises forenses ⁸⁷⁻⁹⁰, explosivos ⁹¹⁻⁹⁴ e análises de joias ⁹⁵⁻⁹⁷.

A viabilidade de LIBS para a determinação de Ca, Mg, P, Fe, Cu, Mn, Zn e Al em materiais vegetais e as dificuldades encontradas em análises quantitativas foram apresentadas pioneiramente por Sun et al. ⁹⁸. As curvas de calibração foram preparadas a partir de CRMs e da mistura entre eles. As amostras de folhas cominuídas foram fixadas em uma fita adesiva dupla face, posicionadas em lâmina de vidro, e pulsos de 100 mJ (Nd:YAG a 1064 nm, aproximadamente 25 J cm⁻²) foram aplicados na superfície para formação do plasma. Melhor razão sinal/ruído (SNR) foi observada após 1 µs de atraso, 10 µs de integração e 20 pulsos do laser. Os coeficientes de variação (CV) das medidas variaram entre 8 e 15 %. Os resultados de LIBS foram validados com um CRM (NIST 1575), entretanto foram fornecidas apenas informações para Al, Cu, Fe e P. Os limites de detecção (LODs) foram 1 mg kg⁻¹ Al, 25 mg kg⁻¹ P, 200 mg kg⁻¹ Ca, 2700 mg kg⁻¹ Mg, 0,08 mg kg⁻¹ Cu, 3 mg kg⁻¹ Fe, 0,8 mg kg⁻¹ Mn e 2 mg kg⁻¹ Zn. De acordo com os autores, o método mostrou-se rápido e viável para a determinação dos elementos em materiais vegetais, agrícolas e outros materiais com matriz similar.

Em 2001, Cho et al. ⁹⁹ sugeriram um método para a determinação de K e Mg em farinhas à base de amido utilizando um laser pulsado de Nd:YAG e detector de arranjo de diodos. Amostras de farinha foram homogeneizadas com 50 % (m m⁻¹) de celulose para melhorar a coesão das partículas e melhorar a eficiência na interação laser-amostra. Os LODs para Mg e K foram 0,4 e 3,0 mg kg⁻¹, respectivamente, utilizando as linhas Mg II 279,553 e K I 766,490 nm.

Gornushkin et al. ¹⁰⁰ utilizaram um laser Nd:YAG e detector CCD (*charged coupled device*) para a determinação de Mg em materiais certificados (NIST), em folhas de plantas e em diferentes matrizes. O efeito de matriz sob os

sinais de emissão de Mg também foi investigado. Os autores sugeriram as linhas de Mg II 292,87 e Mg II 293,65 nm para amostras com concentração > 0,7 %, enquanto que as linhas de Mg II 279,806, Mg II 280,27 e Mg I 285,213 nm foram recomendadas para concentração de Mg < 0,001 %. Contudo, essas linhas podem ser afetadas pelo processo de autoabsorção em concentrações acima de 0,5 %, o que reduz a faixa linear de calibração. Neste estudo, o método proposto foi considerado apropriado para reduzir efeito de matriz, bem como para a análise de diferentes composições.

Assion et al.¹⁰¹ investigaram o desempenho de lasers com duração de pulso de *ns* e *fs* para a determinação de Ca em células do tronco de girassol (*Helianthus annuus* L.). Os autores observaram uma redução significativa da emissão do *continuum* utilizando o sistema LIBS em regime temporal de *fs*. Além disso, esse sistema também proporcionou uma ablação mais precisa (*i.e.* morfologia das crateras após os pulsos de laser) e possibilitou o monitoramento de Ca nas células com resolução de 100 nm.

LIBS tem sido uma alternativa interessante para investigar tanto o teor de nutrientes nos compartimentos de árvores (*e.g.* folhas, lenho e casca), como para investigar o efeito de alterações ambientais na qualidade da madeira. Alguns trabalhos abordam o monitoramento ambiental através da análise dos elementos presentes nos anéis de crescimento¹⁰², a determinação de elementos como Cr, Cu e As em madeiras tratadas com preservativos para o controle de insetos e fungos^{84,85} e aplicação em estudo forense⁸².

Um sistema fs-LIBS também foi utilizado por Samek et al.¹⁰³ para obter informações sobre a distribuição espacial de Fe na superfície de folhas frescas de vime vermelho (*cornus stolonifera*) e em folhas secas de milho. A nervura central também foi monitorada. Similarmente, Kaiser et al.¹⁰⁴ avaliaram a bioacumulação de elementos potencialmente tóxicos, como Cd e Pb, em diferentes partes de folhas e raízes de girassol empregando um sistema fs-LIBS

(100 μ J, 160 fs, 10 Hz) e técnicas baseadas em microscopia com raios-X. Boa correlação entre os resultados de LIBS e raios-X foi obtida. Segundo os autores, não foi possível obter resultados quantitativos para Cd e Pb em virtude da não disponibilidade de padrões de folhas. Outra dificuldade está em realizar a calibração com o material vegetal prensado na forma de pastilha, uma vez que as informações referentes à distribuição espacial dos elementos ao longo da estrutura dos tecidos se perdem.

Em outro estudo, Galiová et al.¹⁰⁵ mapearam a distribuição espacial de Pb, Mn e K em diferentes partes de folhas de girassol utilizando um sistema LIBS com laser Nd:YAG, 532 nm, 10 mJ/pulso, 5 ns, 1 μ s de atraso e 10 μ s de integração. O efeito da concentração de Pb nas concentrações dos nutrientes foram avaliadas. Um sistema LIBS semelhante¹⁰⁵ também foi utilizado para monitorar o acúmulo de Pb e Mg em folhas de alface¹⁰⁶. O desempenho de LIBS foi comparável com os resultados obtidos por LA-ICP-MS. Os autores observaram que o teor de Mg é afetado negativamente quando maiores teores de Pb estão presentes nas folhas.

Galiová et al.¹⁰⁷ utilizaram LIBS (Nd:YAG, 532 nm, 5 ns, 10 mJ/pulso, 1 μ s de atraso e 10 μ s de integração) e LA-ICP-MS (Nd:YAG, 213 nm, 3 mJ cm^{-2}) para mapear Ag e Cu em folhas de girassol tratadas com contaminantes. Foram utilizadas as linhas Ag I 328,07 e Cu I 324,75 nm. De acordo com os autores a Ag apresenta-se distribuída principalmente próxima à área da nervura central, enquanto que o Cu distribui-se pela folha. Krizkova et al.¹⁰⁸ também investigaram a acumulação de Ag nas folhas, caule e raiz de girassol (*Helianthus annuus* L.) empregando um sistema LIBS.

Os teores de macro e micronutrientes foram monitorados em folhas de tangerina (*Citrus unshiu*) e azaleia (*Rhododendron obtusum*) empregando um sistema LIBS com laser de baixa energia (< 1 mJ). As folhas foram analisadas *in natura*, sem a necessidade de aplicação de uma etapa de secagem. Entretanto,

partículas coloidais metálicas (Ag) foram aplicadas na superfície das folhas. Os autores observaram que as intensidades de emissão dos analitos foram maiores na presença da superfície com coloides ¹⁰⁹.

Pouzar et al. ¹¹⁰ utilizaram um sistema LIBS de duplo pulso para a determinação de P, K, Ca e Mg em tecidos foliares de trigo, papoula, cevada e colza e CRMs. As folhas foram moídas em moinho criogênico e as pastilhas preparadas foram analisadas (Nd:YAG, 1064 nm, 20 Hz) aplicando-se 2 pulsos colineares com 12 ns de duração e 7 μ s de intervalo entre os pulsos e com energia por pulso variando de 80 a 150 mJ. Amostras previamente analisadas por FAAS e ICP OES foram utilizadas no preparo das curvas de calibração e CRMs foram usados na validação dos métodos. Resultados concordantes com os valores certificados foram obtidos para K e P. Nesse trabalho, especial cuidado foi tomado para o controle da distribuição do tamanho das partículas das amostras e para obtenção de resultados apropriados.

A análise de tecidos vegetais por LIBS tem sido uma das principais linhas de pesquisa do grupo de espectrometria atômica do CENA. Em 2008, Trevizan et al. ¹² determinaram macronutrientes (P, K, Ca e Mg) em diversos materiais foliares e CRMs por LIBS. As amostras foram moídas em moinho criogênico e analisadas aplicando-se 8 pulsos (Nd:YAG, 1064 nm, 5 ns) consecutivos de 200 mJ ($\sim 25 \text{ J cm}^{-2}$). Os CRMs foram usados para a construção das curvas de calibração e os resultados obtidos por LIBS foram comparados com os valores obtidos por ICP OES após decomposição ácida em forno de micro-ondas fechado. Os LODs foram adequados para fins de diagnose foliar. Os autores concluíram que as principais dificuldades foram associadas à pequena porção amostrada ($\sim 360 \mu\text{g}$), que pode dificultar a amostragem de materiais onde os elementos de interesse não estão distribuídos homogeneamente na matriz. Complementando este estudo, Trevizan et al. ¹⁰ determinaram os teores de micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn) em materiais vegetais por LIBS, utilizando

os mesmos procedimentos para o preparo das amostras ¹², condições experimentais e métodos de calibração semelhantes ¹². Os resultados obtidos por LIBS foram comparados com os determinados por ICP OES após digestão ácida das amostras. Alguns resultados discrepantes foram atribuídos aos efeitos de matriz, *i.e.* a ocorrência de fenômenos relacionados à influência da composição da matriz sobre os processos de vaporização e emissão do plasma. Novamente, a pequena massa amostrada (*e.g.* 360 µg após 8 pulsos consecutivos do laser) foi relacionada à parte dos resultados discrepantes, uma vez que a massa mínima recomendada pelos fabricantes dos CRMs é 150 mg. Os CVs variaram de 4 a 30%, dependendo do analito e das medidas realizadas em 10 diferentes porções da pastilha. Os LODs obtidos foram apropriados para a determinação de micronutrientes em material foliar.

Nunes et al. ¹¹ utilizaram estratégias quimiométricas baseadas em redes neurais artificiais e algoritmos genéticos para a otimização de parâmetros operacionais visando à determinação de Ca, Mg, P, B, Cu, Fe, Mn, Zn, Al e Si em material foliar por LIBS. Neste estudo, foi utilizado um sistema comercial (Aryelle, Technique Berlin LTB, Alemanha) equipado com laser (Nd:YAG, 532 nm, 12 ns, 140 mJ) e espectrômetro com óptica Echelle com detector ICCD. Pastilhas de folhas de espinafre (NIST 1570a) foram utilizadas no estudo. As maiores intensidades de emissão dos analitos foram obtidas com 1,1 µs de atraso, 9,0 µs de integração, 70 mJ/pulso e 30 pulsos de laser acumulados.

Estratégias quimiométricas de calibração foram avaliadas para a determinação de macro e micronutrientes em pastilhas de folhas de materiais vegetais moídas com concentrações dos analitos determinadas por ICP OES e em CRMs ⁹. Neste estudo, celulose (30 % m m⁻¹) foi adicionada como agente aglutinante com o objetivo de minimizar as diferenças na porosidade das pastilhas dos materiais vegetais e CRMs. Os autores avaliaram o desempenho de métodos de calibração univariada e multivariada utilizando regressão pelos

mínimos quadrados parciais (PLSR). O desenvolvimento de modelos PLSR específicos para cada elemento e a seleção das regiões de comprimento de onda contendo somente a linha de emissão de interesse resultaram nas melhores condições analíticas para a determinação dos nutrientes. Ambos os métodos de calibração proporcionaram resultados semelhantes em termos de precisão e exatidão, mas a PLSR mostrou-se mais robusta devido à menor ocorrência de *outliers*. Devido ao método ser dependente da matriz, os autores sugerem o emprego de amostras de calibração semelhantes às amostras teste ⁹. Neste sentido, Nunes et al. ⁸ otimizaram e validaram um método para a determinação de P, K, Ca, Mg, B, Cu, Fe, Mn e Zn em folhas de cana-de-açúcar. Foram utilizados PLS por intervalos (iPLS) para a seleção das melhores regiões espectrais e determinação dos elementos, e PLSR para o desenvolvimento de estratégias de calibração e predição. Foram utilizadas 26 amostras para a calibração e 15 para a validação. As amostras foram cominuídas criogenicamente por 40 min e as pastilhas preparadas foram analisadas com 25 pulsos acumulados de laser (Nd:YAG, 1064, 5 ns, 10 Hz, 110 mJ). Com exceção do Fe, quando a estratégia multivariada apresentou melhores resultados, ambos os métodos de calibração foram semelhantes. Como conclusão dos autores, LIBS pode ser um método interessante quando as amostras de calibração e validação apresentam propriedades químicas e físicas semelhantes.

Em 2011, Gomes et al. ⁷ utilizaram um sistema LIBS previamente otimizado por Nunes et al. ⁸, para a determinação de macro e micronutrientes em pastilhas preparadas com folhas moídas de cana-de-açúcar, citros e soja. Procedimentos de cominuição da amostra com moagem criogênica e moagem com bolas com movimento planetário foram investigados. Os tamanhos das partículas obtidas em cada procedimento foram associados com as propriedades químicas da amostra, *e.g.* teores de fibras, lignina e celulose, bem como a densidade e a porosidade das pastilhas dos materiais vegetais. As pastilhas

foram analisadas em 30 crateras diferentes aplicando-se 25 pulsos de laser (Nd:YAG, 1064 nm, 5 ns, 10 Hz, 25 J cm⁻²) por cratera. Os sinais de emissão do plasma coletados por um telescópio foram direcionados através de uma fibra óptica para um espectrômetro Echelle de alta resolução equipado com um detector ICCD. Tamanhos de partículas menores que 75 µm foram obtidos com moagem com bolas após 20 min para folhas de citros e soja, e, após 60 min, para folhas de cana-de-açúcar. A moagem criogênica também resultou em tamanhos semelhantes de partículas para citros, soja e cana-de-açúcar, após tempos de 10, 20 e 30 min, respectivamente. As maiores intensidades de emissão para os elementos estudados foram alcançadas nessas condições e tempos de moagem. Os autores também observaram um aumento de até 50 % nas intensidades de emissão para a maioria dos analitos quando o tamanho das partículas foi reduzido.

Um procedimento para a classificação de folhas de laranjeira infectadas por *citrus greening* ou folhas normais baseado nos espectros de emissão obtidos por LIBS (Nd:YAG, 1064 nm, 10 Hz, 50 mJ) e no uso de ferramentas quimiométricas foi proposto por Pereira et al.¹¹¹. O modelo foi promissor para a construção de modelos de predição para identificar as plantas infectadas.

Uma extensa compilação dos trabalhos de pesquisa do grupo de espectrometria atômica do CENA e outros trabalhos, focando o desenvolvimento e as contribuições de LIBS para análise de materiais vegetais, foi publicada em 2012⁵. Várias aplicações, onde amostras sólidas são interrogadas simplesmente focalizando os pulsos de laser na superfície de folhas frescas ou secas, raízes, frutas, vegetais, madeira e pólen, foram revisadas. Para fins de análise quantitativa visando à diagnose em plantas, geralmente a amostra é apresentada na forma de pastilhas, as quais são preparadas após as folhas serem limpas, secas e apropriadamente moídas/homogeneizadas. A aplicação de estratégias de calibração univariada e multivariada também foi revisada⁵.

Recentemente Carvalho et al. ⁶ avaliaram o efeito do diâmetro de focalização e a fluência do laser nas análises de pastilhas de materiais vegetais por LIBS. Os dados foram adquiridos acumulando 20 pulsos do laser (Nd:YAG, 1064 nm, 5 ns, 10 Hz) com 2,0 μ s de atraso e 5,0 μ s de integração. Maior sensibilidade na determinação de Ca, K, Mg, P, Al, B, Cu, Fe, Mn e Zn foram observadas em maiores fluências. Os CVs de variação das medidas de 30 pulsos de laser acumulados (20 pulsos de laser / cratera) foram, geralmente, menores que 10 % para fluência de 50 J cm⁻² e diâmetro de focalização de 750 μ m. Para a maioria dos elementos existe a indicativa de que a precisão das medidas é melhorada em maiores fluências.

Diversas contribuições científicas onde LIBS é utilizado para investigar o acúmulo de nutrientes ou elementos potencialmente tóxicos nas partes da planta sem emprego de procedimentos prévios de moagem, têm sido publicadas pelo grupo de pesquisa sob supervisão de Jozef Kaiser, da Universidade de Tecnologia de Brno, República Tcheca. Recentemente, alguns trabalhos foram compilados em uma revisão sobre aplicações biológicas empregando LIBS, incluindo plantas ⁶⁹.

Em 2013, Souza et al. ¹³ sugeriram um método para a determinação de Si em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar empregando um sistema LIBS (Nd:YAG, 1064 nm, 5 ns, 10 Hz) com 2,0 μ s de atraso e 5,0 μ s de integração. Os experimentos foram realizados com 24 variedades, com concentrações variando de 2 a 10 g kg⁻¹ Si. Pastilhas preparadas a partir da moagem criogênica foram utilizadas para o desenvolvimento do método e como validação do modelo de calibração. Os melhores resultados foram observados quando as amostras foram interrogadas com a fluência do laser de 50 J cm⁻² (diâmetro de focalização de 750 μ m) e com a linha de emissão Si I 212,412 nm. Os resultados obtidos com LIBS foram comparados com os obtidos por ICP OES após decomposição por digestão alcalina. Os autores não observaram diferenças

estatísticas significativas entre os resultados. A veracidade do método proposto foi confirmada através da análise de CRM.

Mais recentemente, Gomes et al.¹¹² utilizaram procedimentos de extração ácida para preparar um material vegetal contendo baixas concentrações de macro e micronutrientes para ser utilizado como branco nas análises por LIBS. Padrões de calibração foram preparados através de misturas entre o material extraído e o material original em diferentes proporções de uma variedade de cana-de-açúcar. Essa proposta teve como objetivo minimizar as dificuldades decorrentes das diferenças de matriz comumente observadas nos resultados por LIBS. A estratégia de calibração foi avaliada para a determinação de Ca, Mg, K, P, Cu, Mn e Zn em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar de 17 variedades. Boa correlação foi obtida entre LIBS e os correspondentes digeridos ácidos por ICP OES. A proposta foi útil e apropriada para estimar os LODs baseados nas medidas dos brancos, como recomendado pela IUPAC, ou utilizando o material extraído contendo baixas concentrações dos analitos.

2.4.3 - LA-ICP OES

O plasma indutivamente acoplado é um dispositivo no qual ocorre a vaporização, atomização, excitação e ionização do aerossol da amostra, o qual permite a análise de soluções aquosas empregando-se nebulizadores convencionais¹¹³. A aplicação de ICP é de grande importância na Química Analítica. Os três parâmetros fundamentais mais importantes nas descargas de ICP são: a temperatura de gás (Tg), a temperatura de elétrons (Te) e a densidade numérica de elétrons (ne). Em um ICP de Ar, a vaporização e a atomização do aerossol da amostra ocorrem com alta eficiência numa atmosfera relativamente inerte, o que reduz as interferências químicas e físicas, e as espécies moleculares

estão praticamente ausentes. O ICP de Ar é um plasma robusto, pois apresenta propriedades fundamentais e características analíticas que são pouco afetadas por alterações na composição da amostra. Essa robustez permite que técnicas hífenadas como ICP OES e ICP-MS apresentem limites de detecção da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ ou ng L^{-1} , respectivamente, possibilitando a determinação de macro e micronutrientes, elementos traços e ultratraços em diferentes tipos de amostras ¹¹⁴.

Em 1980, Houk et al. ¹¹⁵ desenvolveram uma interface entre o ICP e o analisador de um espectrômetro de massas (MS), o que possibilitou o surgimento da espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado. A técnica de ICP-MS é versátil e rápida, permitindo a análise multielementar e de razões isotópicas nas ciências geológicas, ambientais e de materiais, medicina, agricultura, arqueologia, área forense, biologia e nas indústrias de alimentos, nuclear e de semicondutores ¹¹⁶.

O emprego da ablação com laser em Química Analítica surgiu com o trabalho pioneiro de Brech & Cross, em 1962 ⁵¹. A palavra ablação é derivada do latim *ablatus* e do inglês “to carry away” e significa o ato de remover ou retirar. A ablação consiste na destruição progressiva e superficial de um material por evaporação, fusão, sublimação, erosão, “sputtering” e explosão, e pode ser efetuada por arco, centelha, lâmpada de descarga incandescente (GDL) ou por laser ¹¹⁴.

A ablação permite a análise direta de amostra sólida, sem necessidade de prévia digestão. Inicialmente, o laser era utilizado na excitação e ionização dos elementos presentes nas amostras pela formação de plasma *in situ* e acoplamento com a espectrometria de emissão óptica, absorção atômica ou de massas. Do acoplamento entre a ablação com laser e a OES, se originou LIBS. Alan Gray ¹¹⁷ foi o primeiro a utilizar a ablação com laser como método de introdução de amostras combinada a um ICP-MS, cujo acrônimo é LA-ICP-MS.

Gray também demonstrou a aplicabilidade da LA-ICP-MS na análise de amostras geológicas, tanto na determinação de elementos traço, quanto nas medições de razões isotópicas.

LA-ICP OES é um método semelhante, introduzido por Thompson et al. em 1981 ¹¹⁸. A proposta inicial deste estudo foi acoplamento entre um sistema de ablação com laser e um ICP óptico. Uma amostra metálica foi posicionada no interior de uma câmara de ablação purgada com Ar. O sistema foi avaliado com uma série de padrões de aço, e curvas de calibração lineares foram obtidas para a maioria dos elementos. Os LODs foram comparáveis com os obtidos com um sistema de nebulização utilizando-se um ICP OES, e boa precisão foi alcançada em amostras homogêneas ¹¹⁸.

Apesar dos acoplamentos entre sistemas de LA e ICP OES ou ICP-MS e serem relativamente simples e disponíveis comercialmente há mais de 20 anos, são poucos os trabalhos encontrados na literatura, sendo apenas um empregando LA-ICP-MS para análise foliar na forma de pastilha ¹¹⁹, e os demais ao mapeamento de alguns elementos em folhas ¹²⁰⁻¹²⁵. Em recente procura na base de dados “Web of Science”, não foram encontradas publicações sobre a determinação de nutrientes em tecidos vegetais por LA-ICP OES, quando a procura foi feita utilizando-se as palavras “ICP OES”, “laser ablation” e “plant”.

3 - Objetivos

Este trabalho de doutorado teve como objetivo geral a determinação simultânea de macro- (P, K, Ca e Mg) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn) em pastilhas de material foliar de cana-de-açúcar, citros e soja por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser e por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente empregando ablação com laser. Os objetivos pontuais foram: i) avaliação de métodos de cominuição visando ao preparo de pastilhas para análises diretas por LIBS; ii) estratégia de calibração baseada no preparo de padrões após extração de analitos com ácidos diluídos; iii) avaliação de LA-ICP OES para determinação de macro- e micronutrientes em materiais vegetais.

4 - Materiais e métodos

4.1 - Descrição das amostras e tratamentos preliminares

A coleta das amostras foi feita com base nas recomendações para fins de diagnose foliar. As folhas de citros laranja (*Citrus sinensis*), soja (*Glycine max*) e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) foram lavadas, separadamente, em água corrente e, em seguida, lavadas duas vezes com água destilada e três vezes com água ultrapura para remoção das impurezas⁷. Nas folhas de cana-de-açúcar, a nervura central foi removida como recomendado²⁵, e para as folhas de citros e soja, toda a folha foi utilizada. Após o procedimento de lavagem as amostras foram secas a 60 °C em estufa com circulação forçada até massa constante.

4.2 - Descontaminação dos materiais

As vidrarias e os materiais plásticos foram limpos e lavados em água corrente, e em seguida, com água purificada por osmose reversa e imersão em banho 50 % v v⁻¹ HNO₃ por 24 h. Os materiais foram enxaguados com água de alta pureza (sistema Milli-Q[®]) e secos em capela de fluxo laminar horizontal (Pachane, Piracicaba, Brasil).

Alguns materiais metálicos como partes que compõem o recipiente do moinho criogênico, prensa hidráulica, foram lavados com água proveniente de osmose reversa, sonicadas em solução 10 % v v⁻¹ Extran MA02 neutro (Merck, Brasil), lavadas com água de alta pureza e, posteriormente, enxaguadas com etanol absoluto. Os demais materiais ou equipamentos e acessórios foram limpos de acordo com as orientações dos fabricantes.

4.3 - LIBS

4.3.1 - Instrumentação

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

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

Utilizou-se um espectrômetro ESA 3000 (LLA Instruments GmbH, Alemanha) equipado com óptica Echelle (distância focal de 25 cm e abertura numérica de 1:10) e detecção por um ICCD Kodak KAF 1001 de 1024 x 1024 pixels. Este sistema proporciona uma imagem plana de 24,5 x 24,5 mm². O espectrômetro possibilita a aquisição de sinais de emissão na região entre 200 e 780 nm, com resolução ($\lambda/\Delta\lambda$) entre 10000 e 20000. A dispersão linear por pixel varia de 5 pm a 200 nm e 19 pm a 780 nm.

Os sinais de imagem foram digitalizados em sistema de 16 bits e processados por computador. A corrente de fundo do detector foi automaticamente subtraída. A energia dos pulsos do laser foi monitorada com um detector de energia equipado com sensor piroelétrico (FieldMax II-P Coherent, EUA). A calibração dos comprimentos de onda foi feita com as linhas Hg I 253,652 nm e Zn I 213,855 nm emitidas por lâmpadas de descarga sem eletrodo (EDL II System, Perkin Elmer, Alemanha). Um dispositivo para saída de argônio na vazão de $2,0 \text{ L min}^{-1}$, posicionado próximo à superfície da pastilha, foi utilizado. As Figuras 6 e 7 mostram o arranjo experimental e partes do sistema LIBS proposto.

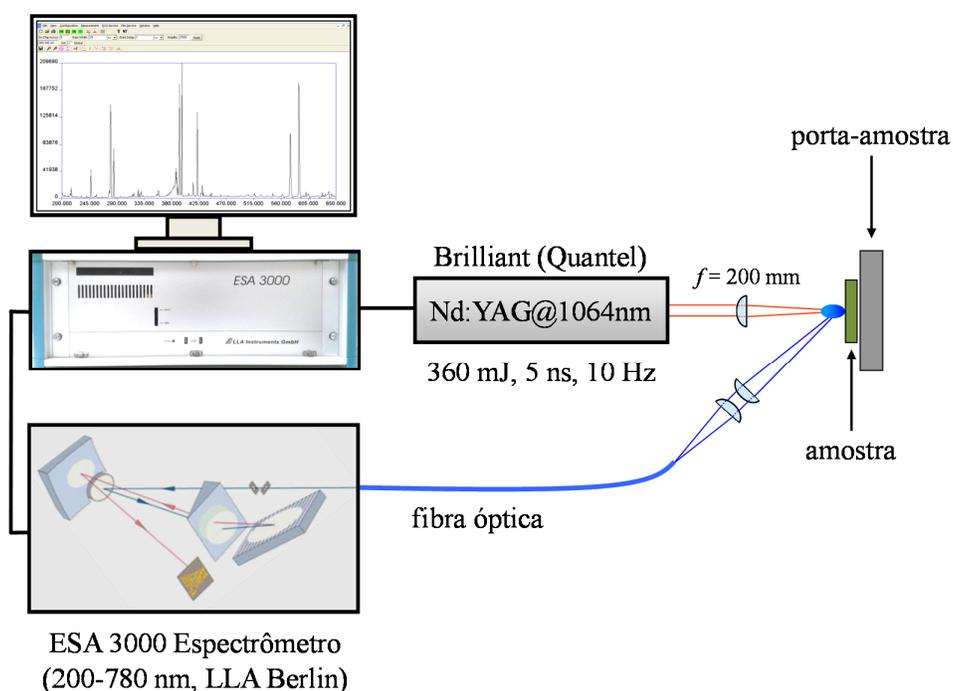
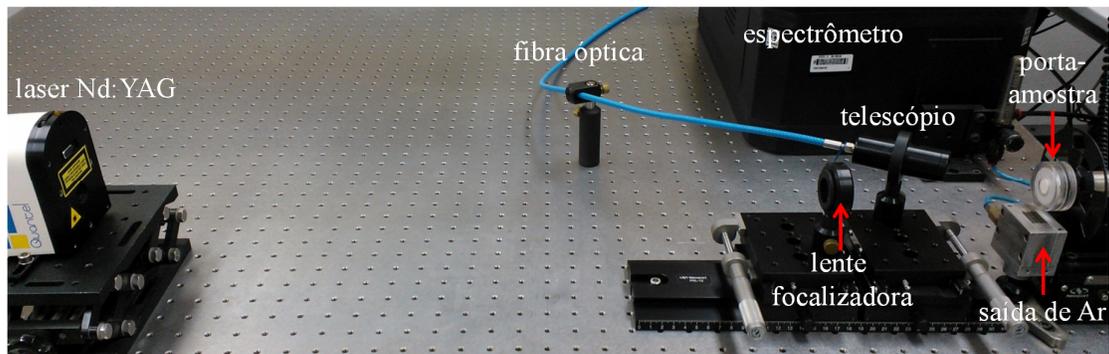
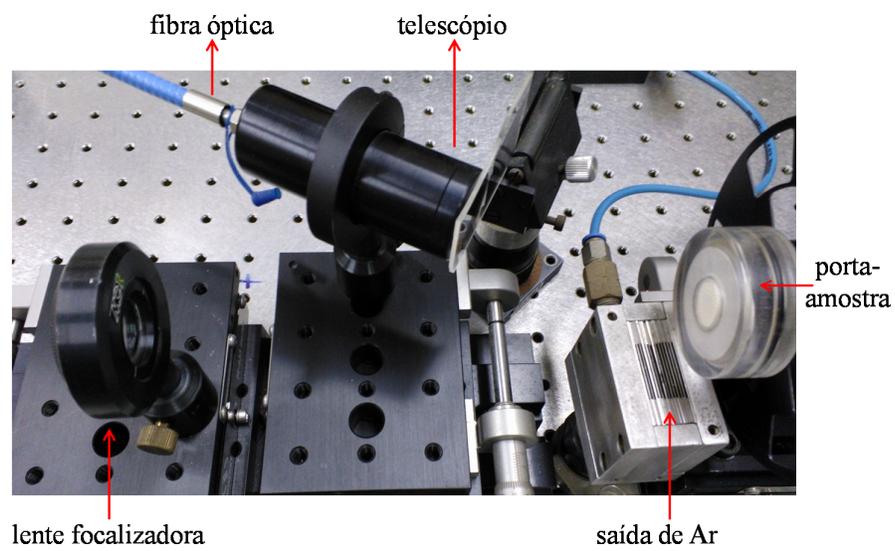


FIGURA 6 - Arranjo experimental do sistema LIBS.

(a)



(b)



(c)

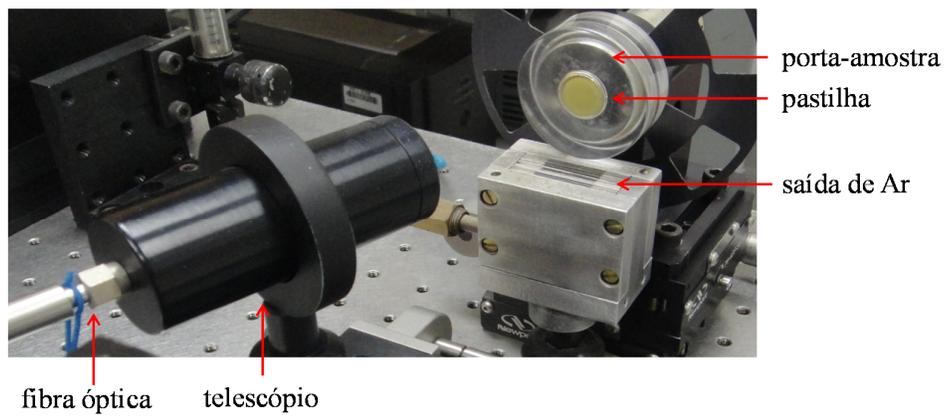


FIGURA 7 - Imagens do sistema LIBS utilizado.

4.3.2 - Cominuição dos materiais vegetais e preparo das pastilhas

A cominuição da amostra foi feita utilizando-se dois procedimentos de moagem: i) moagem criogênica (moinho Spex, modelo 6800, EUA) e ii) moagem com bolas com movimento planetário (moinho Retsch, modelo PM 400, Alemanha) com o objetivo de comparar os tamanhos de partículas obtidos em diferentes tempos de moagem e eleger o procedimento mais apropriado para cada matriz. As intensidades dos sinais de emissão dos analitos determinados por LIBS foram utilizadas como resposta analítica.

4.3.2.1 - Moagem criogênica

As folhas dos materiais vegetais foram previamente moídas em um moinho com facas (Marconi, Brasil) com peneira de 600 μm de diâmetro.

A moagem criogênica foi feita com emprego de nitrogênio líquido (-196 °C), e baseia-se no aumento da dureza do material e a inserção de microfalhas na estrutura dos tecidos. Este processo fragiliza o material facilitando sua cominuição. O conjunto de moagem utilizado foi constituído de um tubo de policarbonato, uma barra magnética e duas tampas de aço inoxidável. A barra magnética foi colocada no interior do tubo que contém a amostra e vedado nas extremidades com as tampas de aço inoxidável. Após um período de pré-congelamento da amostra no interior do tubo, o conjunto foi imerso em um recipiente com N_2 líquido no qual um campo magnético alternado foi aplicado. Isso provocou um choque entre a barra magnética e as tampas fixadas nas extremidades do tubo, promovendo a moagem. Nos experimentos desta Tese,

selecionou-se a opção de 10 impactos por segundo conforme proposto por Santos Jr. et al. ^{43,126} . No equipamento utilizado, é possível realizar simultaneamente a moagem de até quatro amostras em frascos com capacidade de até 2 g ou a moagem de apenas uma amostra em frasco com capacidade de até 100 g. A Figura 8 mostra o equipamento utilizado para moagem criogênica das amostras.

Neste estudo foram avaliados os tempos de moagem de 10, 20, 30, 40 e 50 min. Em cada tempo, utilizou-se uma etapa inicial de 5 min de pré-congelamento, seguida por ciclos de moagem de 2 min e intervalos de recongelamento de 1 min entre cada ciclo. Foram adicionados 2 g da amostra previamente moída em um recipiente de policarbonato contendo a barra magnética de impacto e as tampas de aço inoxidável. O tempo de moagem mais apropriado foi selecionado de acordo com intensidades de emissão dos elementos.

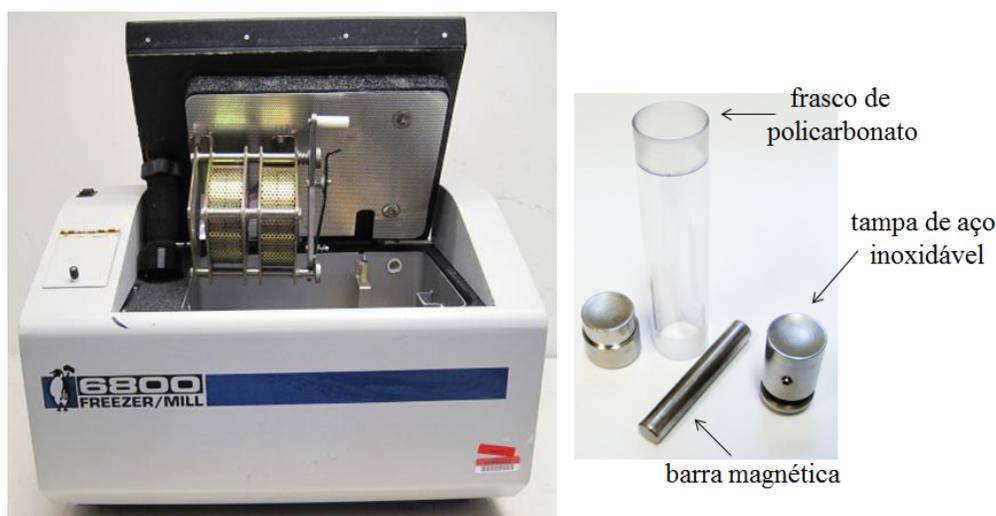


FIGURA 8 - Moinho criogênico e conjunto de moagem utilizado na cominuição de folhas de materiais vegetais.

Todas as amostras moídas foram armazenadas em dessecador contendo perclorato de magnésio anidro.

4.3.2.2 - Moagem com bolas

A moagem com bolas permite moer materiais de alta dureza e com alto teor de fibras. De acordo com o tempo de moagem, composição do material que compõe o conjunto de moagem e do tamanho do recipiente e das esferas, pode-se cominuir o material em partículas entre 0,1 e 100 μm ^{34,46}. O moinho com bolas utilizado neste estudo consistiu em quatro recipientes de ágata, cada um contendo 100 esferas de 10 mm e o material a ser moído (diâmetro inicial < 600 μm). Operou-se o equipamento a 700 W e 400 rpm, intercalando-se rotações no sentido horário (5 min) e anti-horário (5 min), com interrupções de 2 min entre cada sentido de rotação para permitir o resfriamento dos recipientes. A Figura 9 mostra o equipamento com o conjunto de moagem, um frasco de aço inoxidável revestido por ágata e esferas de ágata.



FIGURA 9 - Moinho com bolas com movimento planetário, recipiente e esferas de ágata.

Para fins de comparação, foram investigados tempos de moagem de 20 e 60 min para amostras de folhas de citros e soja, e de 60 e 120 min em folhas de cana-de-açúcar. Esses tempos foram estabelecidos após experimentos univariados considerando-se as intensidades de emissão dos analitos após a análise de pastilhas de materiais vegetais por LIBS. Tempos de moagem menores que 20 min não foram utilizados na moagem com bolas, principalmente em folhas de cana-de-açúcar, por resultar em pastilhas quebradiças e sem coesão.

4.3.3 - Determinação do tamanho final das partículas

A determinação da distribuição de tamanho de partículas após os estudos de moagem foi feita no Instituto de Pesquisa Tecnológica (IPT) no Laboratório de Processos Químicos e Tecnologia de Partículas (LPP). As análises foram feitas a seco com a técnica de espalhamento com laser de baixo ângulo, utilizando-se analisador Beckman Coulter, modelo LS 13 320 Tornado Dry Powder System, EUA. Efetuaram-se as medidas de acordo com a norma ISO 13320-1:1999(E).

4.3.4 - Preparo das pastilhas para análises por LIBS

As pastilhas dos materiais vegetais foram preparadas em uma prensa hidráulica (Spex, modelo 3624B X-Press, EUA), transferindo-se aproximadamente 0,5 g do material moído para um conjunto de prensagem e aplicando-se 8 ton cm⁻² durante 5 min. A Figura 10 mostra um diagrama das principais etapas envolvidas até a obtenção das pastilhas.

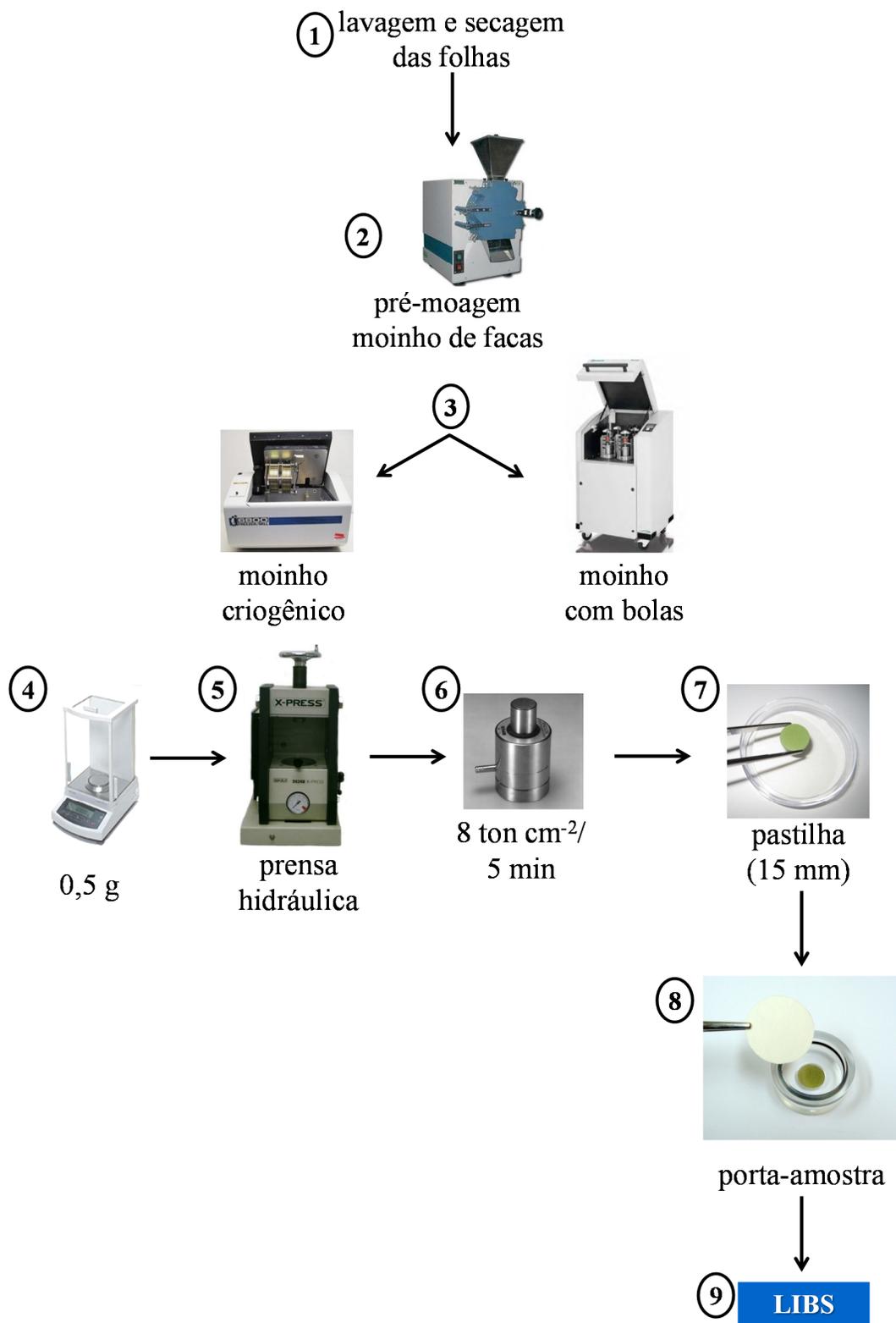


FIGURA 10 - Ilustração da sequência analítica para o preparo de pastilhas de materiais vegetais até a determinação dos nutrientes por LIBS.

4.3.5 - Microscopia eletrônica de varredura e perfilometria

As técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de perfilometria foram utilizadas para investigar a geometria das crateras formadas após incidência dos pulsos do laser na superfície da amostra.

As análises de microscopia foram feitas no Laboratório de Caracterização Tecnológica (LCT) do Departamento de Engenharia de Minas e Petróleo da Escola Politécnica da USP. As amostras foram recobertas com platina durante 80 s no metalizador modelo MED 020 (Bal-tec). As crateras foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura LEO, modelo Stereoscan 440 com detector de elétrons secundários.

A topografia das crateras foi analisada em um Perfilômetro Taylor Hobson, modelo SV C525 Talysurf Series 2 (Reino Unido), no Laboratório de Materiais Fotônicos do Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho (UNESP). Esse aparelho possui uma agulha de varredura com ponta de contato de diamante com secção transversal de 2 μm de raio, que se desloca à velocidade de 0,5 mm s^{-1} , conectada a uma unidade computadorizada com *software* específico para as leituras de perfilometria. A aquisição dos dados de perfilometria foi feita pelo software Ultra[®]. O volume, área e o perfil das crateras foram obtidos com auxílio do software TalyMap[®].

4.3.6 - Porosidade e densidade das pastilhas

A porosidade das pastilhas foi determinada em porosímetro de mercúrio (Aminco 5000 psi, EUA). A densidade real das partículas foi medida por picnometria de hélio (Accupyc 1300, Micromeritics, Austrália), considerando a dimensão da pastilha e sua massa.

4.3.7 - Teores de celulose, fibra e lignina

Os teores de celulose, fibra e lignina das folhas de cana-de-açúcar, citros e soja foram determinados de acordo com o método oficial da AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*)¹²⁷. Aproximadamente 10 g das amostras previamente moídas em moinho com facas ($\emptyset < 600 \mu\text{m}$) foram utilizadas. O teor de fibra em detergente ácido (FDA) foi determinado gravimetricamente como resíduo remanescente após digestão, empregando H_2SO_4 e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). Os resíduos das fibras são predominantemente celulose e lignina. O teor de lignina foi determinado gravimetricamente após o resíduo da FDA ser extraído com H_2SO_4 72% v v⁻¹ e secado. O teor de celulose foi determinado subtraindo-se o valor do teor de lignina a partir do valor de FDA¹²⁷.

4.3.8 - Decomposição das amostras e determinações de nutrientes por ICP OES

Para decomposição das amostras, utilizou-se um forno com micro-ondas (Milestone, modelo ETHOS 1600, Itália). As digestões foram feitas em triplicata, de acordo com o seguinte procedimento: pesou-se uma alíquota de 250 mg de cada amostra e transferiu-se para frascos de TFM[®] (politetrafluoretileno modificado). Adicionaram-se 6,0 mL de HNO₃ 20% v v⁻¹ e 2,0 mL de H₂O₂ 30% v v⁻¹. Os frascos de TFM[®] foram acondicionados individualmente em cilindros de proteção de PEEK (poliéter-éter-cetona), fechados e fixados em rotor apropriado para 10 amostras. O rotor foi devidamente instalado na cavidade do forno de micro-ondas e um programa para digestão das amostras foi utilizado e encontra-se na Tabela 3. Após a digestão, transferiram-se as amostras para frascos do tipo Falcon, completando-se o volume para 25 mL com água purificada em sistema Milli-Q.

TABELA 3 - Programa de aquecimento para decomposição assistida por radiação micro-ondas de tecidos foliares de citros, soja e cana-de-açúcar.

Etapa	Tempo (min)	Temperatura (°C)*	Potência máxima (W)
1	3	120	1000
2	2	120	0
3	4	160	1000
4	5	220	1000
5	15	220	1000

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

A determinação dos elementos nas amostras digeridas foi feita por ICP OES empregando-se espectrômetro com visão radial (Varian modelo Vista Pro-CCD, Austrália) e nebulizador concêntrico. As medidas foram feitas em condições robustas de análise, conforme recomendado por Silva et al. ¹²⁸ e Trevizan et al. ¹²⁹. Os parâmetros operacionais utilizados nas análises por ICP OES são informados na Tabela 4.

TABELA 4 - Parâmetros operacionais utilizados nas análises por ICP OES.

Parâmetros operacionais	Valores
Potência da radiofrequência (kW)	1,3
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,5
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,7
Vazão da amostra (mL min ⁻¹)	0,8
Linhas de emissão (nm)	B I 249,772
	Ca II 393,366
	Cu I 327,395
	Fe II 238,204
	K I 769,897
	Mg II 279,553
	P I 177,434
Mn II 259,372	
Zn I 213,856	

4.3.9 - Estratégia de calibração para a determinação de macro- e micronutrientes em materiais vegetais por LIBS

As amostras de folhas de cana-de-açúcar utilizadas nesta etapa, o procedimento de coleta, preparo da amostra e de moagem com facas foram idênticos aos descritos no item 4.1. Aproximadamente 10 g de folhas de cana-

de-açúcar (variedade 6 CTC, Centro de Tecnologia Canavieira) foram cominuídas em moinho criogênico por 40 min. A etapa de pré-congelamento foi de 5 min e os intervalos de recongelamento de 1 min. Foram utilizados 2 ciclos de moagem de 20 min. Após o procedimento de moagem, as folhas moídas foram transferidas para um balão volumétrico de 500 mL contendo 200 mL de solução de HNO₃ ou HCl. As concentrações ácidas investigadas foram 0,2 e 2,0 mol L⁻¹. A mistura foi agitada por 5 min por efeito vórtex. Em seguida, a solução foi filtrada através de papel de filtro (Whatman[®], Maidstone, Reino Unido) de 3 µm de diâmetro do poro. A fração sólida retida no filtro foi transferida para outro balão contendo nova solução ácida. Este procedimento de extração foi repetido por 5 vezes até o tempo de extração total de 25 min. O resíduo final foi seco em estufa com circulação forçada a 60 °C por 48 h e, em seguida, homogeneizado manualmente em almofariz e pistilo. A Figura 11 mostra uma ilustração resumida das etapas do procedimento de extração ácida utilizado no preparo de um material contendo baixas concentrações dos analitos e no preparo dos padrões de calibração.

O material obtido foi analisado por ICP OES após decomposição ácida em forno de micro-ondas fechado e utilizado como branco, ou como material contendo baixa concentração dos analitos, de acordo com a eficiência de extração.

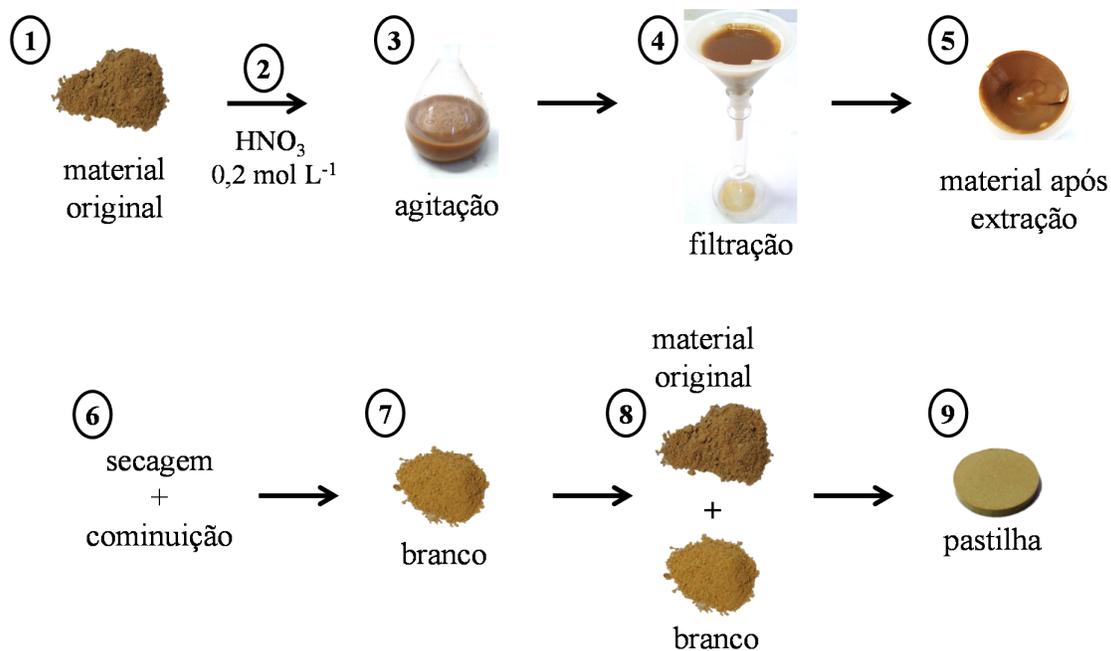


FIGURA 11 - Sequência ilustrando o procedimento de extração ácida e preparo de pastilhas de padrões de calibração sólidos.

4.3.10 - Preparo das curvas de calibração a partir do material vegetal extraído

A curva de calibração foi preparada a partir dos materiais extraído e original, e de misturas apropriadas entre estes materiais nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75, respectivamente. Essas misturas foram homogeneizadas individualmente em moinho criogênico por 2 min (1 ciclo de 2 min), e os teores de Ca, K, Mg, P, B, Cu, Mn e Zn foram determinados por ICP OES e utilizados como valores de referência dos padrões de calibração. Os procedimentos de digestão ácida e o uso do ICP OES foram anteriormente descritos no item 4.3.8.

A exatidão dos resultados obtidos por ICP OES foi avaliada a partir da análise de CRMs: folhas de espinafre (NIST 1570a), folhas de macieira (NIST

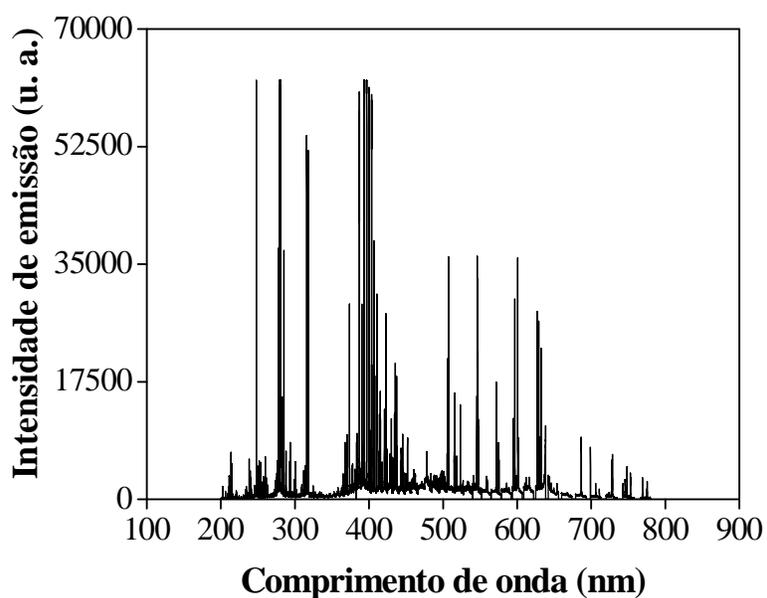
1515), folhas de pessegueiro (NIST 1547), folhas de tomateiro (NIST 1573a) e acícula de pinheiro (1575a).

4.3.11 - Tratamento dos dados obtidos a partir da análise de pastilha de material vegetal por LIBS

Os dados utilizados nesta tese basearam-se em medidas da área dos picos das linhas de emissão. Com o objetivo de minimizar possíveis variações entre as medidas experimentais decorrentes da micro-heterogeneidade da amostra, trabalhou-se com espectros médios. Cada espectro médio foi resultante da média de 10 espectros individuais, e cada espectro individual foi obtido em função do número de pulsos acumulados. Dessa forma, para uma situação em que 25 pulsos acumulados do laser são aplicados em cada ponto de amostragem, cada espectro médio corresponde à média de 10 pontos de amostragem, ou seja, cada espectro médio é resultante de 250 pulsos. Os coeficientes de variação apresentados são relativos a 10 observações.

Os espectros obtidos no sistema LIBS utilizado neste projeto apresentam sinais de emissão na região entre 200 e 780 nm. A Figura 12 mostra, respectivamente, espectros de emissão abrangendo esta região do espectro (Figura 12 a) e em uma região selecionada entre 250 e 262 nm (Figura 12 b), obtidos a partir da análise de pastilhas de folha de citros.

(a)



(b)

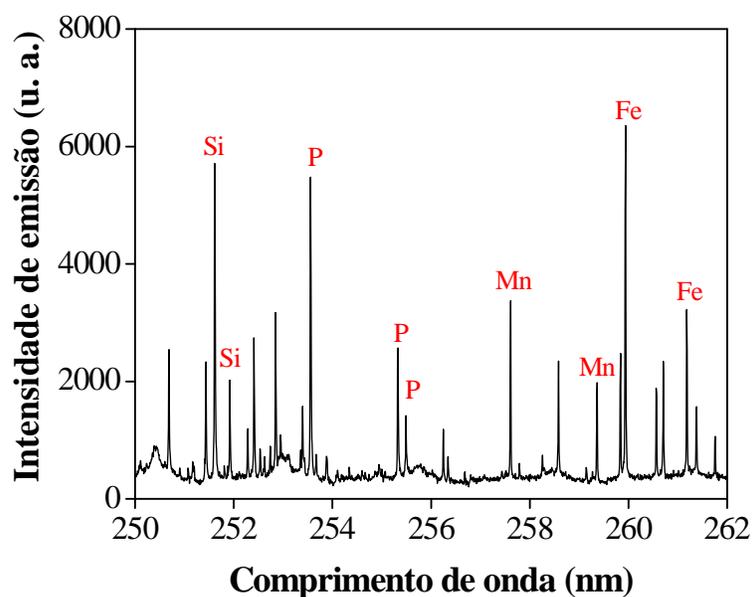


FIGURA 12 - Espectros de emissão de pastilha de folhas de citros (a) entre 200 e 780 nm e (b) fragmento de 250 a 262 nm. Condições: 25 J cm^{-2} ; $2,0 \mu\text{s}$ de atraso; $4,5 \mu\text{s}$ de integração e 25 pulsos acumulados.

Para a correção dos sinais de emissão do fundo (*background*), os sinais médios de emissão obtidos em regiões espectrais independentes localizadas nas vizinhanças das linhas de emissão dos analitos (BG_1 e BG_2 , Figura 13) foram

subtraídos da intensidade máxima de cada linha de emissão (IE), conforme recomendado ⁸ e ilustrado para medidas de Mg I 277,983 nm em pastilha de citros.

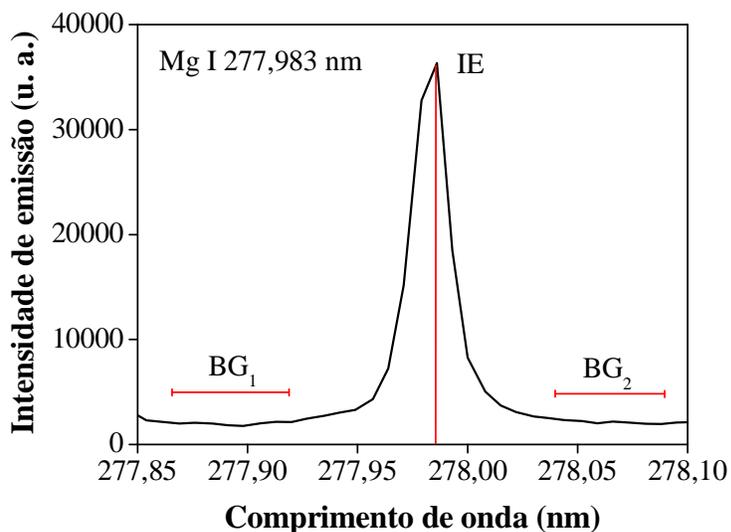


FIGURA 13 - Fragmento do espectro de emissão em pastilhas de citros ilustrando a máxima intensidade de emissão e as regiões BGs vizinhas ao pico. Condições: 25 J cm⁻²; 2,0 μs de atraso; 4,5 μs de integração e 25 pulsos acumulados.

Os valores de intensidade corrigida foram determinados a partir da subtração da intensidade máxima do pico (IE) pela média dos sinais do fundo (BG₁ e BG₂) ^{6,8}, como descrito na equação (1):

$$I_t = IE - \frac{(BG_1 + BG_2)}{2} \quad (1)$$

onde: I_t é o sinal de emissão corrigido;

IE é o sinal de emissão do analito sem correção.

A SNR foi obtida dividindo-se o sinal corrigido pelo desvio padrão médio da flutuação das intensidades dos sinais de emissão nos dois intervalos (BG_1 e BG_2) que foram considerados para estimativa do sinal do fundo. A área de pico foi obtida pelo método de integração por trapézios. Identificaram-se os sinais de emissão de interesse de acordo com as bases de dados do NIST¹³⁰ e do software do espectrômetro.

É importante lembrar que nos experimentos envolvendo o preparo de brancos analíticos, as regiões BG_1 e BG_2 e a região onde estaria localizado o pico de emissão, foram obtidas a partir da análise do material extraído.

Com auxílio do programa Matlab[®], foram obtidos os parâmetros de intensidade dos sinais de emissão corrigida, área de pico e razão sinal-ruído de uma linha de interesse.

4.4 - LA-ICP OES

4.4.1 - Cominuição dos materiais vegetais e preparo das pastilhas visando à determinação de macro- e micronutrientes por LA-ICP OES

As amostras foram previamente moídas em moinho com facas (Marconi, Brasil) com peneira de aço inoxidável com abertura de 600 μm . Em seguida, as amostras foram cominuídas em moinho vibratório com bola (High Speed Mixer Mill MM 200, Retsch, Alemanha). Aproximadamente 0,5 g de amostra foi transferida para um recipiente de carbeto de tungstênio (WC) contendo uma esfera de WC de 9 mm. O moinho possui capacidade para moagem de dois recipientes simultaneamente (Figura 14). Para investigar o tempo de moagem

mais apropriado no preparo das pastilhas, as amostras foram homogeneizadas com tempos de moagem variando de 5 a 120 min, com frequência de 25 Hz (1500 rotações por minuto).



FIGURA 14 - Moinho vibratório com bolas Retsch modelo MM200 e imagens do frasco e tampa de carbeto de tungstênio.

As pastilhas dos materiais vegetais foram preparadas em uma prensa hidráulica (Carver pellet press, Indiana, EUA), transferindo-se aproximadamente 0,40 g do material moído para um conjunto de prensagem sob vácuo e aplicando-se 4500 psi ($0,35 \text{ ton cm}^{-2}$) por 5 min ⁸⁹.

4.4.2 - Uso de padrão interno nas análises por LA-ICP OES

Para as análises dos materiais vegetais por LA-ICP OES, solução de $400 \text{ mg L}^{-1} \text{ Sc}$ ($2 \% \text{ HNO}_3 \text{ v v}^{-1}$, Ricca Chemical Company, EUA) foi utilizada como padrão interno. O escândio foi escolhido como padrão interno porque suas linhas de emissão não interferem nas linhas de emissão dos analitos de interesse e por não fazer parte da composição de folhas de plantas. Além disso, quando as linhas de emissão são escolhidas, é necessário considerar a proximidade de seus

potenciais de ionização, energia de excitação e similaridades nas propriedades térmicas. Entretanto, estas condições de homogeneidade são muitas vezes insuficientes¹³¹.

Soluções de referência foram adicionadas sobre 0,4 g do material cominuído por pipetagem. Escândio foi adicionado em todos os padrões de calibração e nas amostras dos materiais vegetais. Em seguida, as amostras foram secas a 55 °C até massa constante. Todas as amostras foram novamente homogeneizadas em moinho com bolas por 2,5 min.

4.4.3 - Instrumentação do sistema LA-ICP OES

Utilizou-se um ICP OES modelo Optima 7300 DV (Perkin Elmer, Waltham, EUA) com visão axial e radial e equipado com óptica Echelle com detector de duas matrizes segmentadas SCD (*segmented-array charge-coupled device*) para a cobertura das regiões UV e VIS no intervalo de 163 a 782 nm.

Utilizou-se um sistema comercial de ablação com laser modelo LSX-500 (CETAC, EUA) composto por um laser de Nd:YAG operando no quarto harmônico (266 nm) e gerando pulsos de 6 ns e energia máxima de 9 mJ. Esse arranjo óptico proporciona diâmetros de focalização variando de 10 a 230 µm. O laser pode ser operado em taxas de repetição de 1 a 20 Hz. Cabe destacar que este parâmetro influencia a eficiência de amostragem e a sensibilidade dos resultados. A cela de amostragem é montada sobre uma plataforma com controle de movimento X-Y-Z de 0,25 µm. O eixo Z é utilizado para focalizar o laser através do sistema de visualização de uma câmera CCD (680 x 484 pixels), com sistema de ampliação da imagem e medida da energia do laser em tempo real. A imagem da amostra é observada diretamente pelo programa DigiLazTM-II. O sistema de microscópio CCD da câmera permite identificar visualmente a

amostra e focalizar o laser sobre a mesma. Além disso, a câmera dispõe de um alvo digital que pode ser ajustado em função do aspecto visual das amostras e facilitar o posicionamento da amostra no ponto de incidência do laser.

Para purgar a cela de amostragem e evitar o colapso do plasma, o sistema é equipado com três vias acionadas por válvulas para direcionar o gás carregador para o ICP, para a posição de purga ou posição de contorno.

A Figura 15 mostra (a) parte da montagem usada nas análises por LA-ICP OES e (b) do sistema LSX-500 utilizado na ablação das pastilhas.



FIGURA 15 - (a) Imagem do sistema LA-ICP OES e (b) visão da cela de ablação.

O tempo das medidas de ablação, as vazões dos gases carregador e de nebulização, o tempo de residência dos átomos e o modo de aquisição do sinal de integração foram ajustados com base nos trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa do Prof. Almirall para análise elementar de algodão e amostras de vidros utilizando LA-ICP OES. Os dados foram coletados por 100 s no modo transiente¹³², sendo os 20 s iniciais utilizando Ar como branco, seguidos de 50 s de ablação da amostra. Como o acoplamento inicial do laser pode causar instabilidade⁸⁸, os primeiros 20 s da ablação da amostra foram ignorados. A cela de ablação foi varrida por mais 30 s para remoção dos materiais particulados da cela e do caminho até o plasma para evitar efeito de memória nas medidas seguintes.

Argônio foi utilizado na vazão de 0,5 L min⁻¹ para o transporte das partículas ablatadas pelo laser¹³². As análises foram conduzidas com dez replicatas por pastilha e com distância de pelo menos 1,5 mm entre as crateras. Os experimentos foram realizados com fluência do laser de aproximadamente 9 J cm⁻².

O laser foi focalizado sobre a superfície da pastilha utilizando perfil de profundidade (formação de cratera) como modo de ablação e 200 µm de diâmetro de focalização.

4.4.4 - Materiais de referência certificados

As curvas de calibração foram preparadas usando materiais de referência certificados de diferentes materiais vegetais. Os seguintes CRMs foram utilizados: folhas de macieira (SRM NIST 1515), folhas de pessegueiro (SRM NIST 1547), folhas de espinafre (SRM NIST 1570a), folhas de tomateiro (SRM NIST 1573a) e acículas de pinus (SRM NIST 1575a).

4.4.5 - Caracterização das amostras

Utilizou-se microscópio digital (Keyence VHX-100, Japão) para inspeção do tamanho das partículas e para a determinação do volume das crateras. A Figura 16 mostra parte do equipamento utilizado. Pequenas porções das amostras cominuídas em diferentes tempos de moagem foram espalhadas, fixadas sobre uma fita de carbono adesiva e observadas com ampliação de 100 X.

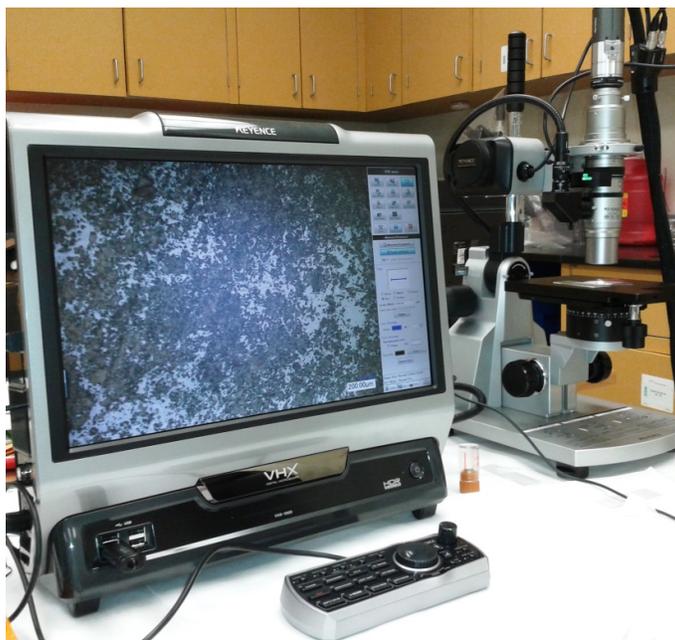


FIGURA 16 - Visão do microscópio Keyence com imagem de material cominuído de citros espalhado em fita de carbono (ampliação: 100X).

As densidades das pastilhas de cana-de-açúcar, citros e soja foram determinadas considerando-se a massa e as dimensões das pastilhas.

4.4.6 - Limites de detecção para LA-ICP OES

Os limites de detecção para LA-ICP OES foram estimados empregando-se CRMs com a menor fração de massa dos analitos em cada curva de calibração¹². Os desvios-padrão dos sinais de fundo (s) foram medidos durante os primeiros 20 s dos sinais transientes (somente na presença de argônio). Os limites de detecção foram calculados como $3,3 s/b$, onde b é o coeficiente angular da curva de calibração^{9,133}.

5 - Resultados e discussão

5.1 - LIBS

5.1.1 - Condições instrumentais do sistema LIBS

Desde o início dos trabalhos com LIBS, o Grupo de Espectrometria Atômica do CENA tem realizado esforços na tentativa de investigar os efeitos das variáveis instrumentais nas intensidades dos sinais de emissão em diferentes amostras, principalmente tecidos vegetais. Em 2010, Nunes et al. ⁸ otimizaram e validaram um método para a determinação de P, K, Ca, Mg e B, Cu, Fe, Mn e Zn em folhas de cana-de-açúcar. Os melhores resultados foram obtidos usando as seguintes condições experimentais: 110 mJ/pulso; 17,5 cm de distância lente-amostra; 2,0 μ s de atraso; 5,0 μ s de integração e 25 pulsos acumulados. Nesta tese, optou-se por utilizar condições experimentais semelhantes às estudadas por Nunes et al. ⁸.

As Figuras 17 e 18 e 19 e 20 mostram, respectivamente, a influência do número de pulsos do laser acumulados incididos em pastilhas de citros e o tempo de atraso para aquisição dos espectros de emissão característicos, sobre as intensidades de emissão de P, Mg, B e Fe. Nessas condições avaliadas fixou-se a energia/pulso do laser em 110 mJ e a distância lente-amostra em 17,5 cm.

Observa-se que, à medida que o número de pulsos acumulados aumenta de 5 para 50, há um aumento nos valores das intensidades de emissão para a maioria dos analitos, bem como o aumento no sinal de fundo. Uma das explicações se baseia no fato de que o aumento do número de pulsos faz com que ocorra aumento da massa amostrada e, conseqüentemente, aumento dos

sinais de emissão. Entretanto, quando algumas linhas de emissão mais intensas são selecionadas, principalmente de macronutrientes (*e.g.* Ca e Mg), ocorre a saturação do detector. Acima de 50 pulsos do laser, ocorrem alterações na geometria da superfície da amostra, e isso faz com que o sinal não aumente proporcionalmente ao número de pulsos.

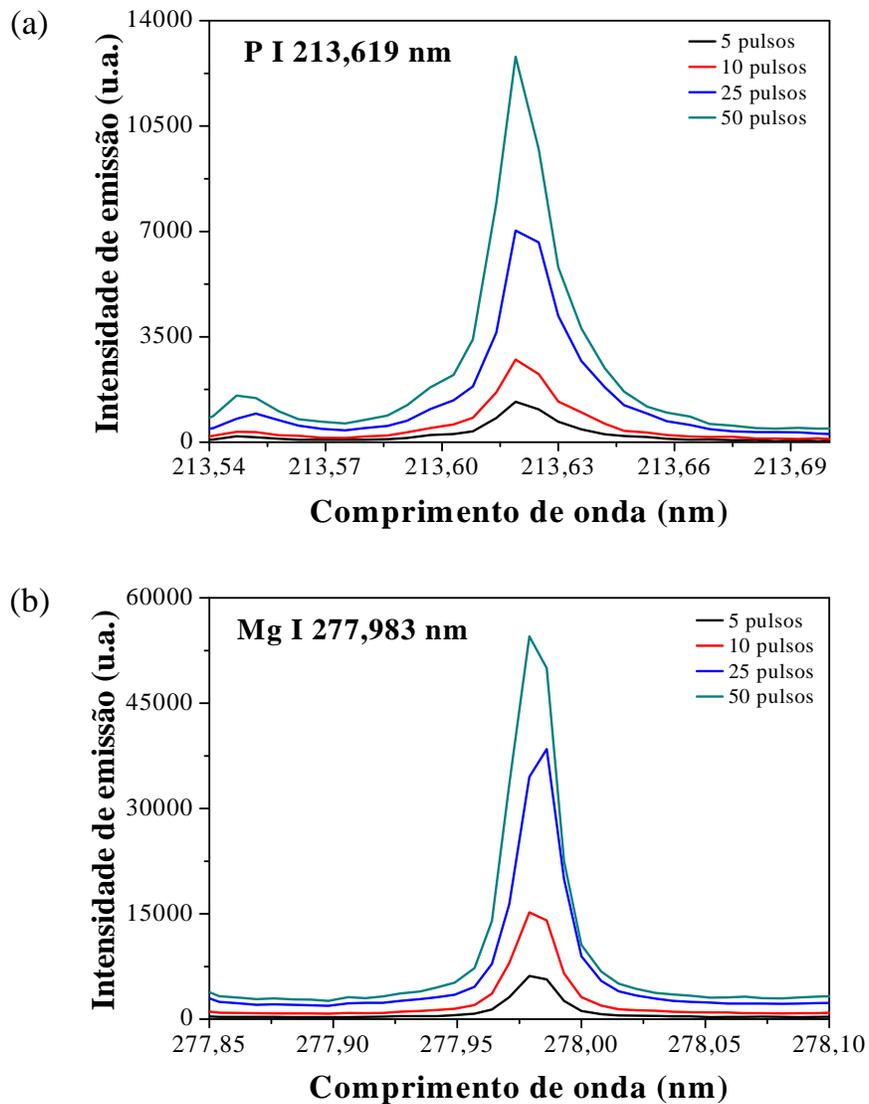


FIGURA 17 - Intensidade dos sinais de (a) P I 213,619 nm e (b) Mg I 277,983 nm em função do número de pulsos acumulados em pastilhas de folhas de citros. Condições: 25 J cm^{-2} ; $2,0 \mu\text{s}$ de atraso e $5,0 \mu\text{s}$ de integração.

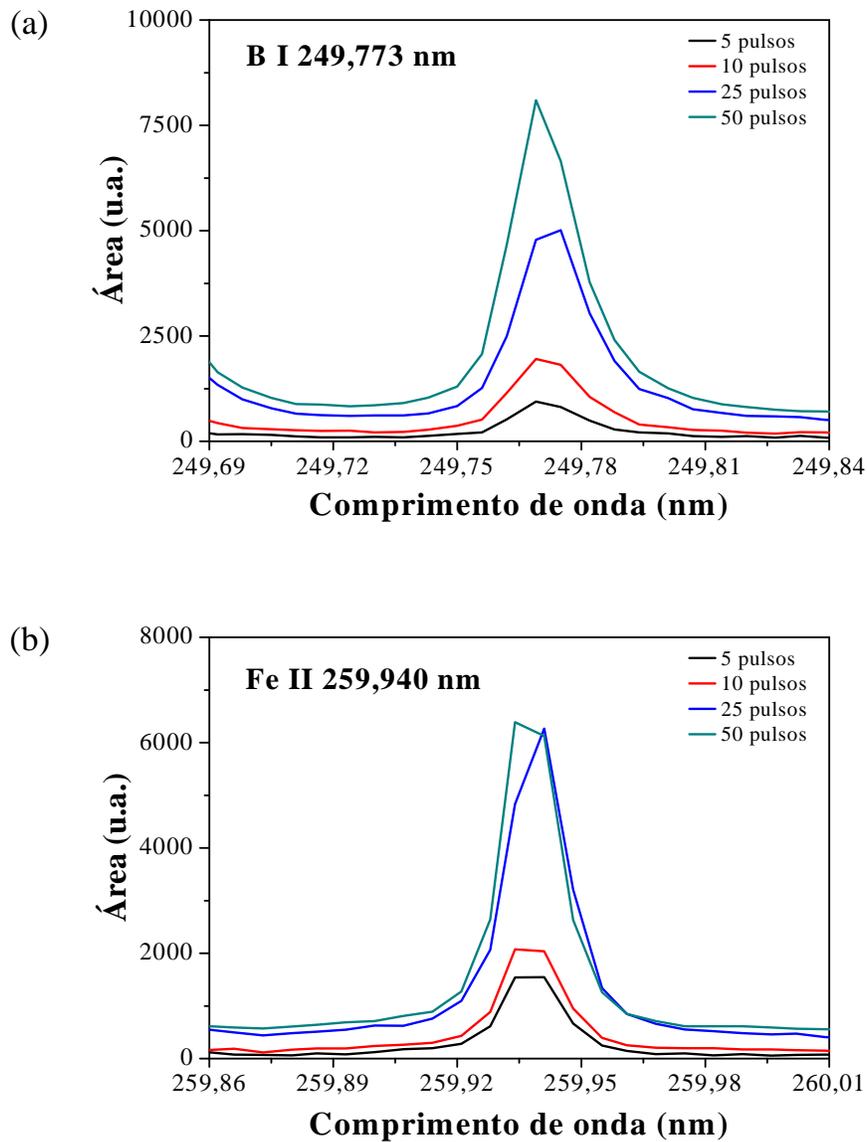


FIGURA 18 - Intensidade dos sinais de (a) B I 249,773 nm e (b) Fe II 259,940 nm em função do número de pulsos acumulados em pastilhas de folhas de citros. Condições: 25 J cm^{-2} ; $2,0 \mu\text{s}$ de atraso e $5,0 \mu\text{s}$ de integração.

O tempo de atraso é o tempo decorrido entre o instante de aplicação do pulso do laser e o início da leitura dos sinais de emissão; o tempo de abertura da janela do espectrômetro durante a aquisição dos sinais é definido como tempo de

integração. Como já mostrado ⁵⁴ (ver Figura 5), logo após o pulso do laser, uma intensa contribuição da emissão do *continuum* ocorre, principalmente, em tempos de atraso menores que 0,1 μ s. Esse efeito é devido, principalmente, ao efeito *Bremsstrahlung*, que é ocasionado por colisões de elétrons com íons e átomos, e à recombinação de elétrons com íons. Essa recombinação ocorre quando elétrons livres são capturados por átomos ou íons, liberando energia na forma de fótons ¹³⁴.

Na escolha do tempo de atraso mais apropriado, deve-se considerar a discriminação do sinal de emissão do contínuo com o objetivo de aumentar a razão do sinal de emissão do analito e do sinal de fundo, e da razão sinal/ruído. Como o plasma, no caso de LIBS, é um evento de curta duração, o uso de tempos de atraso maiores tende a diminuir o sinal de emissão dos analitos. As Figuras 19 e 20 mostram que, quando a aquisição dos sinais de emissão é feita com tempo de atraso de 1 μ s, os valores de área de pico são maiores, porém há ainda uma grande contribuição do sinal de fundo. Além disso, para alguns elementos ocorre a saturação do detector. Para tempos de atraso menores que 1 μ s, é bastante difícil discriminar o sinal de emissão do sinal do *continuum*. Por isso, é conveniente realizar a aquisição dos sinais de emissão em tempos de atraso maiores (*e.g.* 1,5 μ s), onde a razão sinal/ruído é maior e há menor contribuição do sinal de fundo. A aquisição dos espectros de emissão em tempos de atraso maiores (*e.g.* 3 e 4 μ s após o pulso do laser) torna o sinal de fundo praticamente desprezível, porém, as intensidades dos sinais de emissão dos elementos também são baixas. Comportamentos semelhantes foram observados para Ca, K, Cu, Zn e Mn.

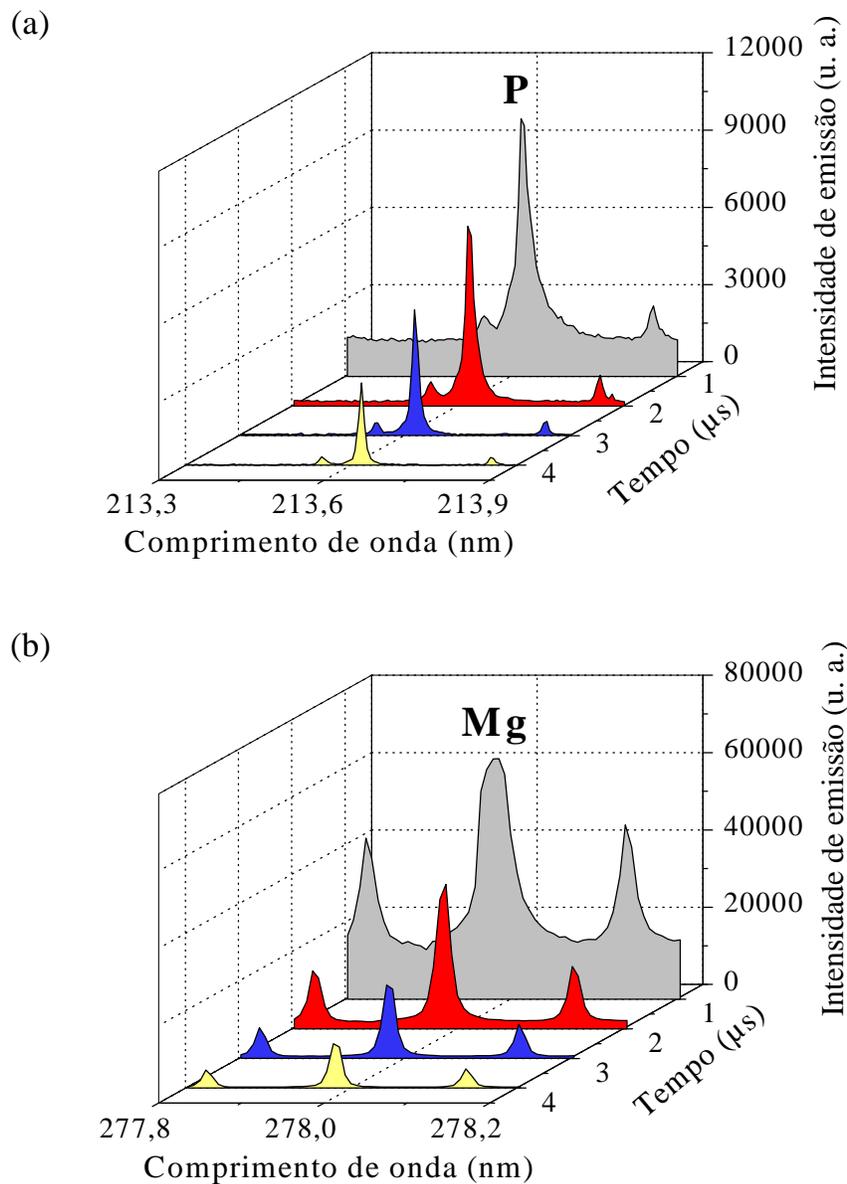


FIGURA 19 - Fragmentos dos espectros de emissão de pastilhas de folhas de citros mostrando as linhas de (a) P I 213,619 nm e (b) Mg I 277,983 nm em função do aumento do tempo de atraso. Condições: 25 J cm^{-2} ; 25 pulsos acumulados e $4,5 \mu\text{s}$ de integração.

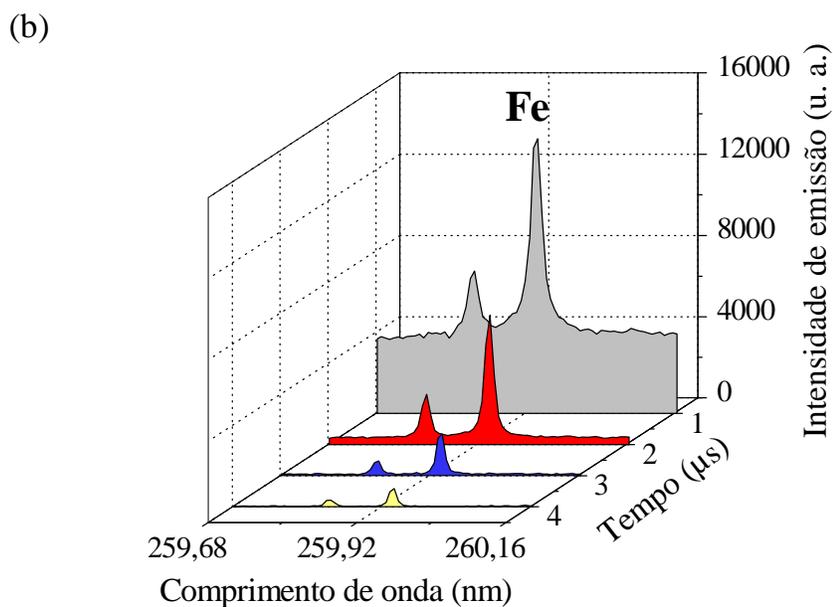
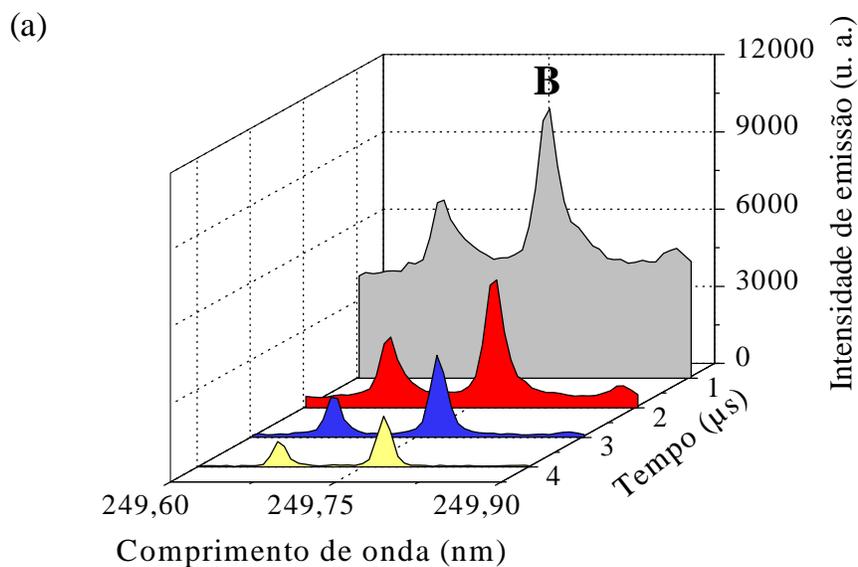


FIGURA 20 - Fragmentos dos espectros de emissão de pastilhas de folhas de citros mostrando as linhas de (a) B I 249,773 nm e (b) Fe II 259,940 nm em função do aumento do tempo de atraso. Condições: 25 J cm^{-2} ; 25 pulsos acumulados e $4,5 \mu\text{s}$ de integração.

5.1.2 - Procedimentos de moagem

LIBS tem sido frequentemente apontada como uma técnica espectroanalítica que necessita de mínimo ou nenhum procedimento de preparo da amostra ⁵⁵. Entretanto, considerando-se as características não homogêneas dos materiais vegetais, várias dificuldades podem ser esperadas em análises quantitativas ¹⁰. Em muitos casos, são necessários procedimentos de homogeneização ¹³⁵ para evitar elevados coeficientes de variação das medidas nas porções amostradas devido à distribuição não homogênea dos elementos na amostra teste (pastilha).

Duas estratégias podem ser utilizadas empregando LIBS para análise dos elementos no material moído. A primeira é a análise direta, na qual o material cominuído é espalhado sobre uma superfície adesiva plana ^{5,98} e, a segunda, a qual tem sido utilizada nas análises de materiais vegetais é o preparo de pastilhas ¹².

Métodos microanalíticos baseados na análise direta requerem procedimentos de moagem para a homogeneização da amostra. Pequenas partículas podem aumentar a força de coesão do material na pastilha, alterando a porosidade e aumentando a reprodutibilidade das medidas ²⁹. A coesão das partículas agregadas desempenha um importante papel na precisão, porque quanto mais compactas e resistentes são as pastilhas, maior a reprodutibilidade da interação laser-amostra ⁴⁶. Dessa forma, a distribuição do tamanho das partículas tem sido apontada como um dos principais fatores que afetam a eficiência de ablação por laser e a precisão das medidas.

Neste trabalho, utilizaram-se amostras de materiais vegetais na forma de pastilhas, as quais foram preparadas após a cominuição de materiais,

previamente moídos em moinho de faca, utilizando-se moagem criogênica e com bolas.

5.1.3 - Moagem criogênica

A moagem criogênica é considerada como um dos métodos mais apropriados para a cominuição de materiais biológicos^{42,43,45,126}. Pastilhas de folhas de citros, soja e cana-de-açúcar foram analisadas por LIBS após moagem criogênica nos tempos de 10, 20, 30, 40 e 50 min. Realizou-se um teste-*t* não pareado ao nível de confiança de 95%, para verificar possíveis diferenças nas intensidades dos sinais de emissão dos elementos determinados nas pastilhas preparadas nos diferentes tempos de moagem. A Figura 21 mostra que 10 min de moagem são necessários para atingir o máximo sinal de intensidade de emissão para B, Mn, P e Mg nas pastilhas de folhas de citros (tamanho médio - 20 μm). Em geral, Cu, Zn, Fe, Ca e K também não apresentaram diferenças estatísticas significativas nas intensidades dos sinais de emissão com o aumento do tempo de moagem. Entretanto, foram observadas diferenças estatísticas nos sinais de emissão em folhas de soja e cana-de-açúcar após 10 min de moagem. Foram necessários 20 e 30 min de moagem para atingir a máxima intensidade dos sinais de emissão dos elementos nas pastilhas de folhas de soja (tamanho médio das partículas 15 μm) e folhas de cana-de-açúcar (tamanho médio 18 μm), respectivamente.

Cabe ressaltar que, nesta etapa, as medidas de emissão foram feitas acumulando-se 25 pulsos consecutivos do laser ($n = 30$ crateras). Dessa forma, não foram observadas diferenças significativas nos coeficientes de variação mesmo com a diminuição do tamanho das partículas em maiores tempos de moagem.

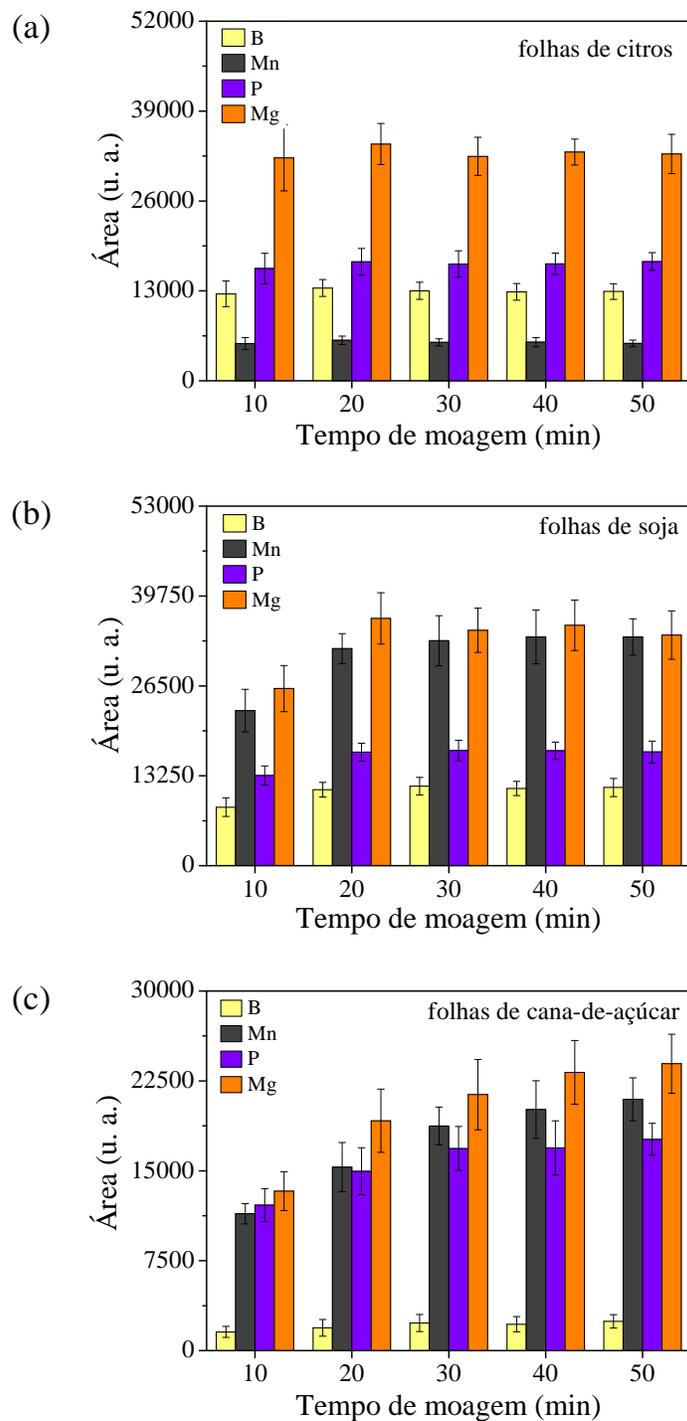


FIGURA 21 - Intensidades dos sinais emissão (área de pico) de B I 249,773, Mn II 257,610, P I 213,619 e Mg I 277,669 nm a partir das análises de pastilhas de folhas de (a) citros, (b) soja e (c) cana-de-açúcar, após 10, 20, 30, 40 e 50 min de moagem criogênica. As barras de erros correspondem a ± 1 desvio-padrão ($n = 30$). Condições: 25 J cm^{-2} ; 25 pulsos acumulados e $4,5 \mu\text{s}$ de integração.

A Tabela 5 mostra os teores de fibra, celulose e lignina nas folhas de plantas que foram determinados para investigar possível correlação entre a composição do material e o tempo de moagem. Os valores obtidos indicam uma razoável concordância entre os teores de fibra e celulose das amostras com o tempo de moagem necessário para atingir os maiores valores dos sinais de emissão dos elementos na análise das pastilhas por LIBS. É importante ressaltar que a celulose é o material mais comum da parede celular, sendo composto por longas cadeias de moléculas de glicose que assumem propriedades cristalinas na parede celular. Durante a formação da parede, moléculas adjacentes de celulose ligam-se umas às outras para a formação das microfibrilas, que por sua vez, se enovelam para formar resistentes fios, as macrofibrilas ¹³⁶. Dessa forma, é possível correlacionar os maiores tempos de moagem criogênica das folhas de soja e cana-de-açúcar com os maiores teores de celulose e fibra, em comparação ao tempo de moagem para folhas de citros.

Entretanto, não foi possível estabelecer correlação entre o teor de lignina das folhas com o tempo de moagem em virtude da pequena variação nas folhas de cana-de-açúcar, citros e soja (*e.g.* 5 - 11%). Porém, de acordo com Van Soest ¹³⁷, tecidos com menor razão lignina/celulose tendem a se enrolar ao invés de se romper, enquanto os tecidos com maior razão lignina/celulose tendem a se quebrar e não dobrar. Consequentemente, os tecidos menos lignificados fragmentam-se em partículas maiores, enquanto que os tecidos mais lignificados em partículas menores. Durante um procedimento de moagem a lignina torna-se seletivamente distribuída entre as partículas de maiores dimensões ¹³⁷. As proporções lignina/celulose e os teores de fibra, lignina e celulose são mostrados na Tabela 5. Os valores obtidos confirmam que as folhas de cana-de-açúcar são mais difíceis de moer do que as folhas de citros e soja.

TABELA 5 - Teores de fibra, lignina e celulose e a razão lignina/celulose em folhas de citros, soja e cana-de-açúcar. As incertezas são representadas por ± 1 desvio-padrão (n = 3).

Folhas	Fibra (%)	Lignina (%)	Celulose (%)	Lignina / Celulose
Citros	26 \pm 0,3	7 \pm 0,2	19 \pm 0,1	0,37
Cana-de-açúcar	41 \pm 0,5	5 \pm 0,3	35 \pm 0,7	0,14
Soja	51 \pm 0,9	11 \pm 0,4	37 \pm 0,5	0,30

5.1.4 - Moagem com bolas

Inicialmente, os experimentos de moagem com bolas foram realizados de acordo com as condições estabelecidas pelo fabricante, ou seja, recipiente de ágata de 250 mL contendo 50 esferas de ágata de 10 mm. Nessas condições, observou-se, por inspeção visual, que a cominuição foi efetiva apenas para as folhas de citros e soja. Nas amostras de cana-de-açúcar, pelo menos 100 esferas foram necessárias. Dessa forma, 100 esferas de moagem foram selecionadas para a cominuição de todas as amostras no decorrer deste estudo.

Observaram-se diferenças estatísticas significativas nos perfis de distribuição do tamanho das partículas de folhas de cana-de-açúcar de acordo com o tempo de moagem do moinho com bolas com movimento planetário. Cabe destacar que, tempos de moagem menores que 20 min, resultaram em pastilhas semelhantes às obtidas após a moagem com facas ($\emptyset < 600 \mu\text{m}$),

resultando em pastilhas quebradiças e/ou com fissuras após a incidência do laser nas amostras de folhas de cana-de-açúcar.

A Figura 22 mostra que pelo menos 20 min de moagem com bolas foram necessários para obter as máximas intensidades de emissão dos elementos nas pastilhas de folhas de citros (tamanho médio das partículas de 15 μm). Para pastilhas de folhas de soja (tamanho médio das partículas de 20 μm), nenhuma diferença estatística significativa foi observada aumentando-se o tempo de moagem de 20 para 60 min (Figura 22b). Em geral, os elementos não apresentaram diferenças estatísticas significativas, ao nível de confiança de 95%, nas intensidades dos sinais de emissão como o aumento do tempo de moagem a partir de 20 min. Diferenças significativas na distribuição do tamanho das partículas foram observadas apenas em folhas de cana-de-açúcar após os procedimentos de moagem com bolas em diferentes tempos. Como mencionado anteriormente, o uso de 20 min de moagem para o preparo das pastilhas de cana-de-açúcar resultou em pastilhas quebradiças e com baixa coesão. Os resultados indicam que 60 min de moagem foram apropriados na cominuição das folhas de cana-de-açúcar (tamanho de partícula médio de 15 μm). Ressalta-se que, apesar do aumento do tempo de moagem de 60 para 120 min ter reduzido o tamanho médio das partículas de 15 para 8 μm , não foram observadas diferenças significativas nas intensidades dos sinais de emissão de LIBS (Figura 22c).

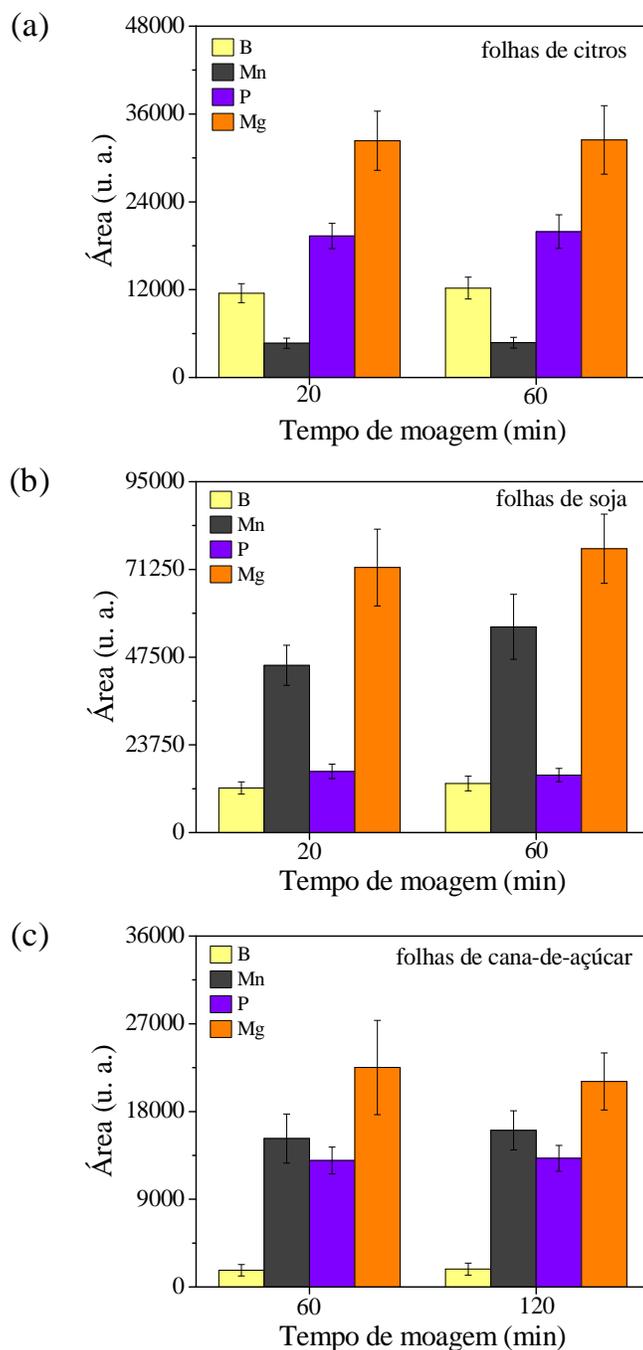


FIGURA 22 - Intensidades dos sinais de emissão de B I 249,773, Mn II 257,610, P I 213,619 e Mg I 277,669 nm de pastilhas de folhas de (a) citros, (b) soja e (c) cana-de-açúcar, após moagem com bolas. As barras de erros correspondem a ± 1 desvio padrão. ($n = 30$). Condições: 25 J cm^{-2} ; 25 pulsos acumulados e $4,5 \mu\text{s}$ de integração.

A repetibilidade da interação laser-amostra e, conseqüentemente, a repetibilidade das medidas depende do tamanho das partículas usadas no preparo das pastilhas. A Tabela 6 mostra que a média do diâmetro das partículas foi menor que 20 μm e que 95% do volume acumulado das partículas (d_{95}) foi menor que 75 μm , após os procedimentos de cominuição empregando moagem com bolas e moagem criogênica. A análise das pastilhas preparadas com essa distribuição de partículas resultou em coeficientes de variação das medidas entre 5 e 20% ($n = 10$ crateras). Apesar do tamanho médio das partículas serem menores do que 10 μm aumentando-se o tempo de moagem com bolas até 120 min (*e.g.* pastilhas de folhas de cana-de-açúcar), não foram observados melhores intensidades nos sinais de emissão dos elementos investigados, assim como na precisão das medidas.

TABELA 6 - Tamanho das partículas obtido após a cominuição de folhas de citros, soja e cana-de-açúcar por moagem com bolas e criogênica.

Amostra (folha)	Moinho com bolas			Moinho criogênico		
	Tempo de moagem (min)	Tamanho médio das partículas (μm)	d ₉₅ (μm)	Tempo de moagem (min)	Tamanho médio das partículas (μm)	d ₉₅ (μm)
Citros	20	15	38	10	20	64
Soja	20	20	75	20	15	57
Cana-de-açúcar	60	15	54	30	18	62

d₉₅ = 95% do volume acumulado das partículas menores que 75 μm.

É importante que os tempos de moagem sejam apropriados para cada tipo de amostra para obter semelhantes perfis de distribuição do tamanho das partículas (*e.g.* $< 75 \mu\text{m}$). Alguns experimentos foram realizados com tempos de moagem relativamente menores (*e.g.* 5 ou 10 min de moagem com bolas, e 2 ou 5 min de moagem criogênica). Nesses casos, as intensidades dos sinais de emissão dos elementos avaliados foram menores que os obtidos nas condições descritas anteriormente, ou não foi possível obter pastilhas coesas devido aos tamanhos maiores das partículas.

5.1.5 - Caracterização das pastilhas e das crateras

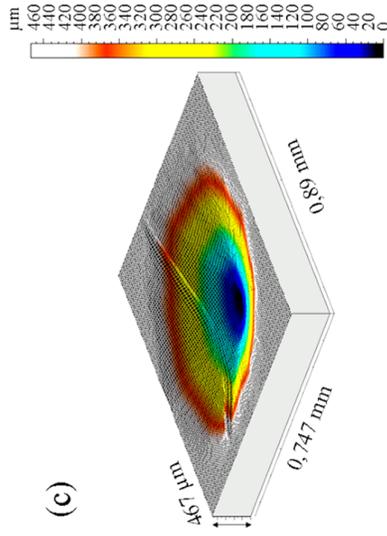
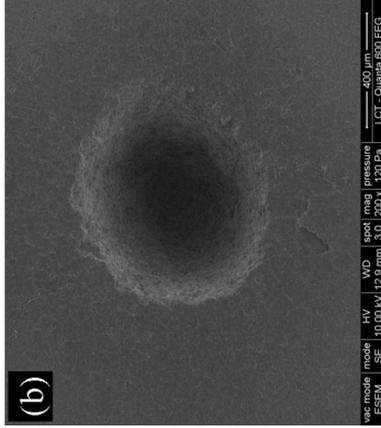
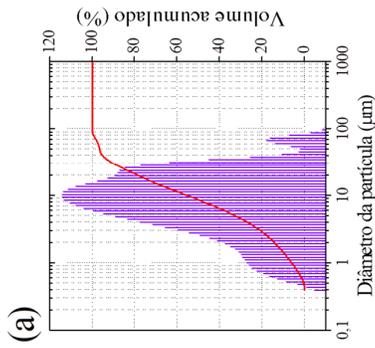
O diâmetro da cratera e a profundidade de ablação por pulso dependem da irradiância do laser e da característica de transferência ¹³⁸. A ablação por laser em amostras biológicas, como os tecidos foliares, resulta em uma quantidade maior de material removido do que a ablação de metais ou de outros materiais densos e opacos como os polímeros ¹³⁹. Materiais condutores exibem grandes crateras, enquanto que os isolantes, por possuírem menor aquecimento nas bordas, possuem crateras mais profundas ¹³⁸. Tal comportamento tem sido observado pelo Grupo de Pesquisa de Espectrometria Atômica do CENA, em amostras de polímeros de brinquedos e de materiais foliares de interesse agrônômico. Geralmente, a radiação do laser penetra mais nos materiais foliares, causando uma distribuição da energia do laser em grandes volumes. Além disso, a onda de choque que acompanha a ablação por laser pode carregar partículas do material ao redor da região vaporizada, contribuindo assim para aumentar a quantidade de material removido ¹³⁹.

Neste trabalho, as imagens de MEV e perfilometria mostraram que as pastilhas preparadas com partículas obtidas por ambos os procedimentos de

moagem apresentaram crateras com morfologia semelhantes, apesar das pequenas diferenças encontradas entre as diferentes espécies de plantas. Foi observado que as pastilhas de folhas que contém menor teor de fibra (*e.g.* citros (Tabela 4)) apresentaram crateras bastante homogêneas com baixa deformidade das bordas (Fig. 23). Como já mencionado, o diâmetro da cratera e a taxa de ablação por pulso do laser depende, primariamente, da irradiância do laser ¹³⁸, mas este parâmetro foi mantido constante ao longo deste trabalho. Em geral, as pastilhas preparadas com tamanhos de partículas menores que 75 µm não apresentaram sinais de fratura após a ablação por laser, não havendo a necessidade do uso de agentes aglutinantes. A massa ablada em cada ponto de amostragem foi estimada com base na densidade da pastilha e no volume da cratera obtido por análise perfilométrica. Em geral, massas de 99 ± 17 µg foram ablatadas em cada ponto de amostragem (25 pulsos por cratera, n = 30).

O gráfico da distribuição do tamanho das partículas, as imagens das crateras obtidas por microscopia eletrônica de varredura e perfilometria em folhas de citros, cana-de-açúcar e soja são mostradas, respectivamente, nas Figuras 23, 24 e 25. Ressalta-se que as imagens das crateras obtidas por perfilometria não correspondem às mesmas imagens obtidas por MEV, porém, são crateras obtidas nas mesmas condições de análise por LIBS.

Moagem com bolas: 20 min



Moagem criogênica: 10 min

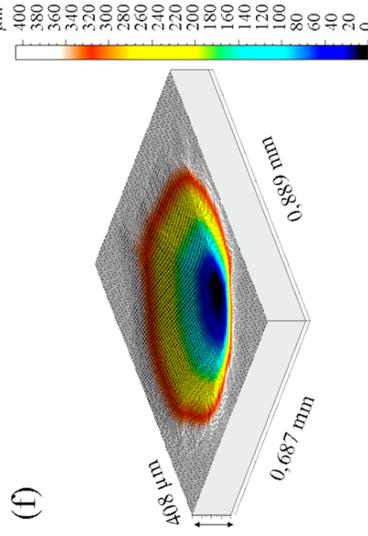
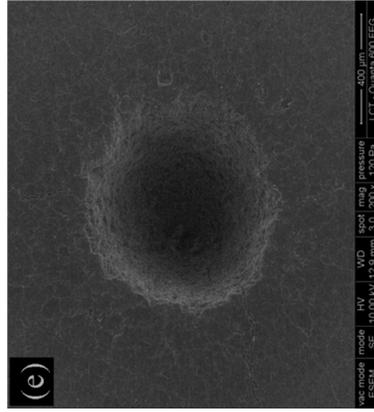
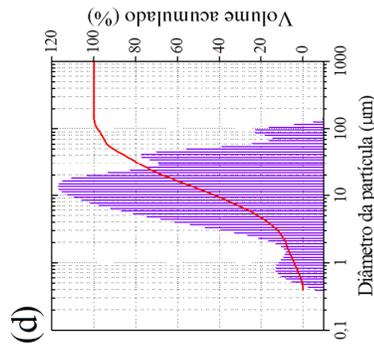
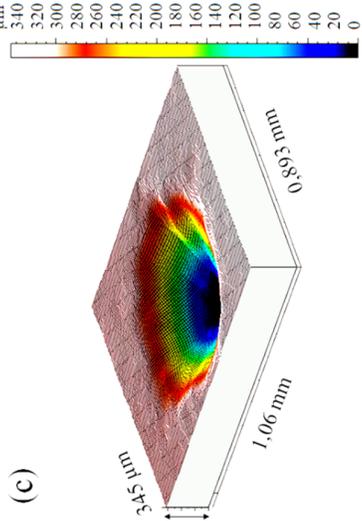
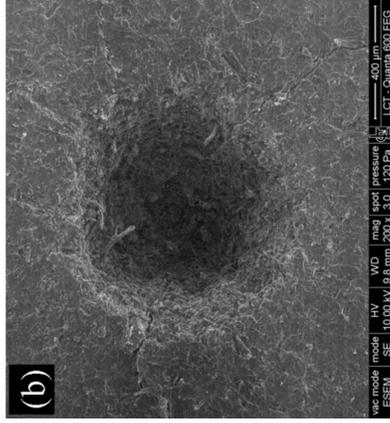
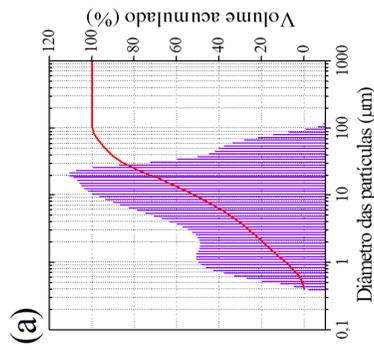


FIGURA 23 - Distribuição do tamanho das partículas (Figuras (a) e (d)), MEV (Figuras (b) e (e)) e perfilometria (Figuras (c) e (f)) das crateras formadas em pastilhas de folhas de citros após moagem com bolas e moagem criogênica. Condição experimental: 25 J cm^{-2} ; $2,0 \mu\text{s}$ de atraso; $4,5 \mu\text{s}$ de integração e 25 pulsos acumulados.

Moagem com bolas: 60 min



Moagem criogênica: 30 min

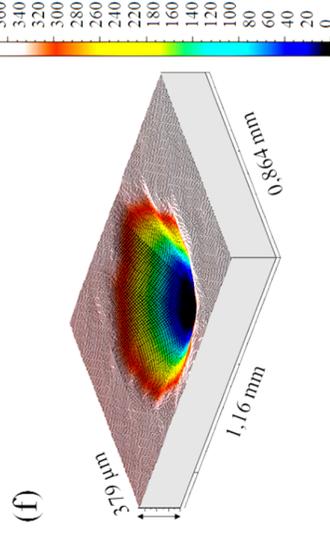
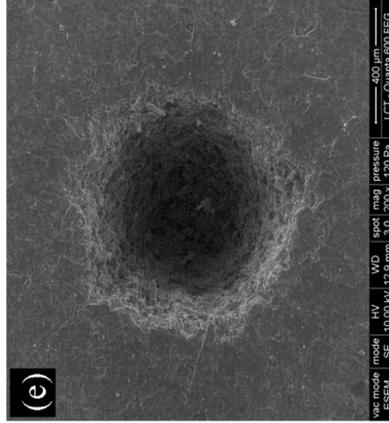
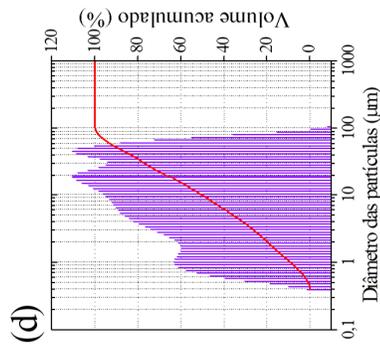
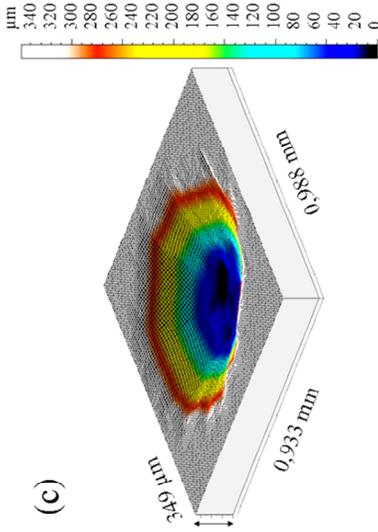
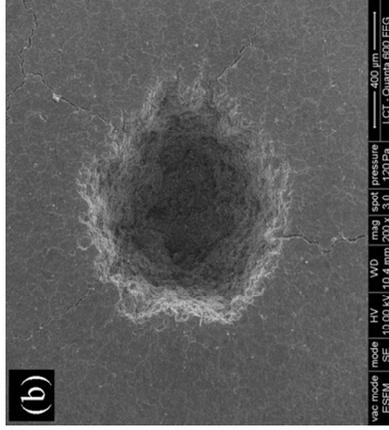
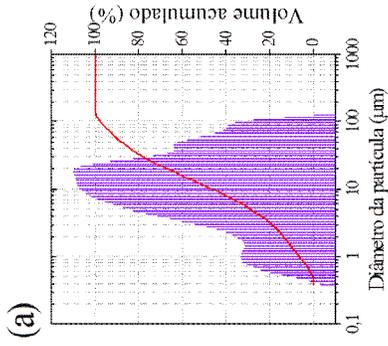


FIGURA 24 - Distribuição do tamanho das partículas (Figuras (a) e (d)), MEV (Figuras (b) e (e)) e perfilometria (Figuras (c) e (f)) das crateras formadas em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar após moagem com bolas e moagem criogênica. Condição experimental: 25 J cm⁻²; 2,0 µs de atraso; 4,5 µs de integração e 25 pulsos acumulados.

Moagem com bolas: 20 min



Moagem criogênica: 20 min

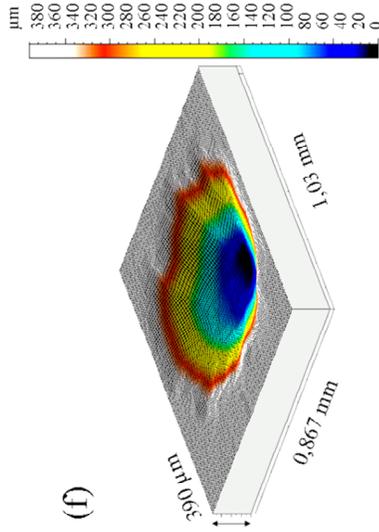
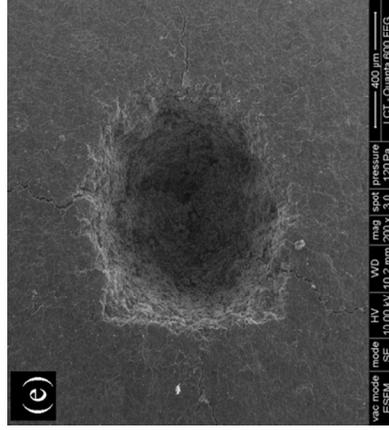
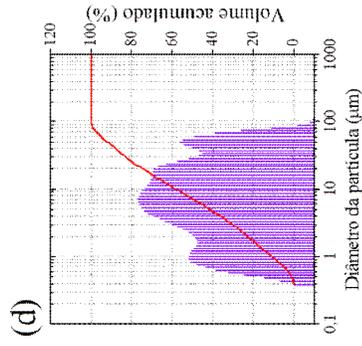


FIGURA 25 - Distribuição do tamanho das partículas (Figuras (a) e (d)), MEV (Figuras (b) e (e)) e perfilometria (Figuras (c) e (f)) das crateras formadas em pastilhas de folhas de soja após moagem com bolas e moagem criogênica. Condição experimental: 25 J cm⁻²; 2,0 µs de atraso; 4,5 µs de integração e 25 pulsos acumulados.

A porosidade das pastilhas, definida como a porcentagem de ar em massa entre as partículas, também foi determinada. Como esperado, quanto mais eficiente for o procedimento de moagem, menor o tamanho das partículas obtido e menor os espaços vazios entre uma partícula e outra quando o material é prensado. Dessa forma, isso contribui para uma melhor interação laser-amostra, e, conseqüentemente, melhor uniformidade das crateras formadas após os pulsos de laser.

Neste trabalho, observou-se que a porosidade varia entre as espécies, e varia de acordo com o procedimento de moagem.

Apesar dos perfis semelhantes de distribuição das partículas em folhas de cana-de-açúcar, citros e soja, após os procedimentos de moagem com bolas e moagem criogênica, apenas a porosidade das pastilhas de folhas de soja foi semelhante (*e.g.* 17%). Nas pastilhas de folhas de cana-de-açúcar, a porosidade após moagem com bolas por 60 min foi de 17 %, enquanto que 30 min de moagem criogênica resultaram na porosidade da pastilha de 31%. Estes valores estão em concordância com os tamanhos de partículas obtidos. Já as pastilhas de folhas de citros apresentaram porosidades de 23 e 31% após moagem com bolas (20 min) e moagem criogênica (10 min), respectivamente.

Esses resultados mostram claramente a necessidade de precaução nos procedimentos para a calibração em LIBS quando são utilizados conjuntos de amostras de diferentes espécies de plantas.

5.1.6 - Determinação dos macronutrientes (P, K, Ca e Mg) e micronutrientes (Fe, Cu, Mn, Zn e B) por ICP OES

Realizou-se um experimento para investigar a possibilidade de erros sistemáticos devidos à contaminação, considerando-se a presença de alguns analitos de interesse (*e.g.* macro ou micronutrientes) nos componentes dos moinhos. A ágata, material dos frascos e esferas do moinho com bolas, é composta, principalmente, por Si (99,9%) e, de acordo com o fabricante, Al, Na, Fe, K, Mn, Mg e Ca também podem estar presentes em baixas concentrações ($\leq 0,02\% \text{ m m}^{-1}$). No caso da moagem criogênica, a barra magnética e as tampas são compostas de aço inoxidável 440 C (componentes majoritários: 58-60% Fe, 16-18% Cr; componentes minoritários: C, P, S, Mo, Mn e Si). Antes de realizar os procedimentos de moagem, as amostras foram decompostas em meio ácido, assistidas por radiação micro-ondas, e as soluções obtidas foram analisadas por ICP OES. Após cada etapa de moagem (*e.g.* diferentes tempos de moagem) uma porção do material cominuído foi digerida, e a solução resultante analisada por ICP OES. Os resultados indicaram que não houve contaminação perceptível da amostra durante as etapas de moagem. A possibilidade de contaminação da amostra pelos discos de aço inoxidável (suporte da prensa hidráulica) no preparo das pastilhas também foi investigada, mas análises de pastilhas preparadas com celulose de alta pureza não indicaram contaminação perceptível.

As Figuras 26 e 27 mostram, respectivamente, os teores de Ca e Mg, e Fe e Zn determinadas por ICP OES em folhas de citros, soja e cana-de-açúcar previamente moídas em moinho com facas, antes e após a cominuição em moinho criogênico ou moinho com bolas, conforme os tratamentos mostrados na Tabela 7.

TABELA 7 - Condições experimentais das amostras digeridas por ICP OES.

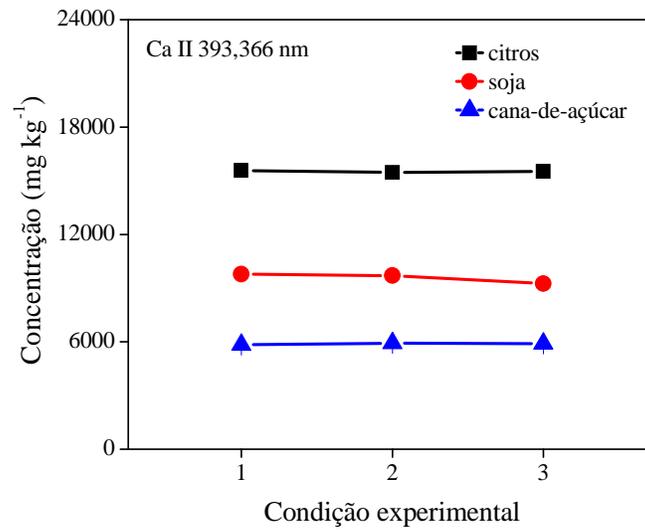
Moagem	Massa cominuída (g)	Tempo de cominuição		
		Citros	Soja	Cana-de-açúcar
1*	10	0	0	0
2**	10	60	60	60
3***	3	10	20	30

* moinho com facas

**moinho com bolas;

*** moinho criogênico.

(a)



(b)

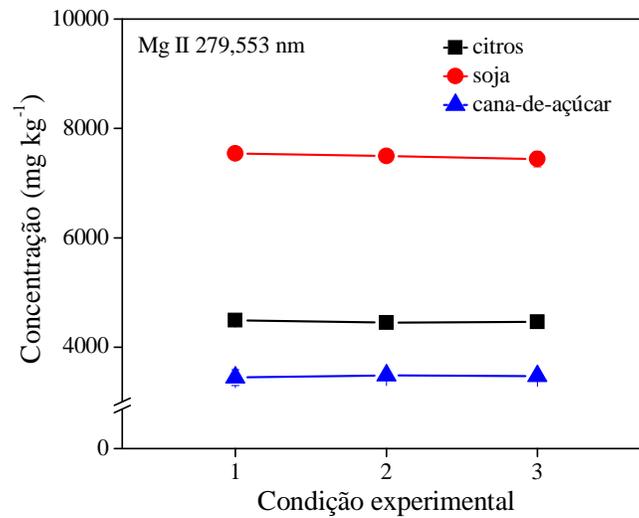
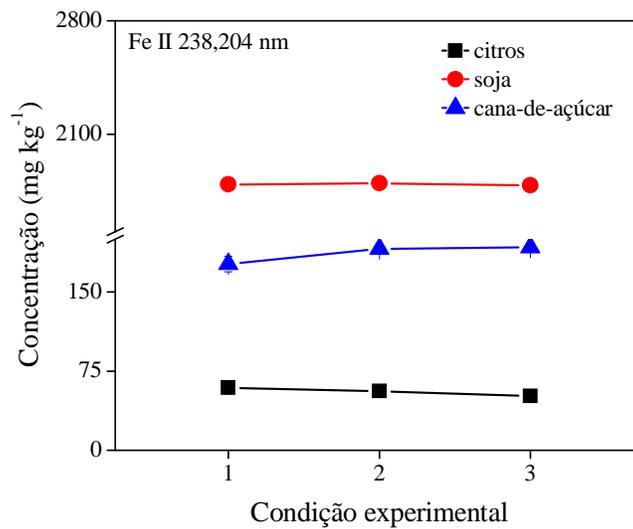


FIGURA 26 - Concentração de (a) Ca e (b) Mg em folhas de citros, soja e cana-de-açúcar em diferentes condições experimentais (Tabela 7).

(a)



(b)

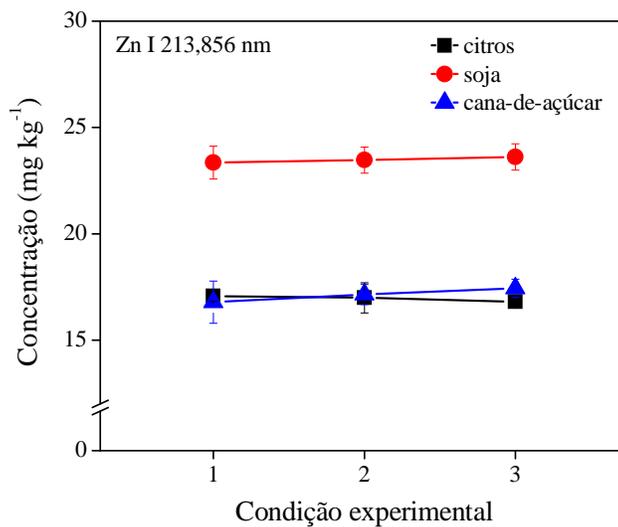


FIGURA 27 - Concentração de (a) Fe e (b) Zn em folhas de citros, soja e cana-de-açúcar em diferentes condições experimentais (Tabela 7).

5.1.7 - Preparo de branco ou material contendo baixa concentração de analitos a partir de folhas de cana-de-açúcar

A calibração ainda é um dos grandes desafios em análise direta de sólidos. Isso é particularmente evidenciado nos casos dos métodos assistidos por ablação por laser como LIBS, LA-ICP OES, LA-ICP-MS, quando a calibração é dependente da matriz, ou materiais de referência certificados não estão disponíveis.

Para preparar brancos analíticos do material vegetal, a estratégia de extração em meio ácido foi inicialmente investigada em amostra de folhas de cana-de-açúcar utilizando soluções 0,2 ou 2,0 mol L⁻¹ HNO₃ ou HCl. Essas concentrações foram investigadas, baseando-se em resultados obtidos por Miyazawa et. al ¹⁴⁰⁻¹⁴². Nesta etapa, como não foram observadas diferenças significativas na eficiência de extração em maiores concentrações ácidas ou com o tipo de ácido empregado, 0,2 mol L⁻¹ HNO₃ foi utilizado. A eficiência dos procedimentos de extração foi inicialmente avaliada comparando-se as intensidades dos sinais de emissão de diversos analitos por LIBS. Com a exceção do Fe, pelo menos 95% de eficiência de extração foram obtidos para Ca, K, Mg, P, Mn e Zn. De acordo com Sucharová e Suchara ¹⁴³, os elementos que fazem parte de silicatos primários como Fe, Al, Cr e Ti podem não ser completamente separados de materiais de vegetais (e. g. folhas de tomateiro, folhas de pessegueiro, folhas de espinafre, entre outros) contendo teores > 2 g kg⁻¹ Si, com HCl ou HNO₃. A variedade de cana-de-açúcar selecionada neste experimento apresentava (5,7 ± 0,3) g kg⁻¹ Si.

A Figura 28 mostra fragmentos do espectro LIBS para Mn e Mg obtidos a partir da análise de pastilhas de folhas de cana-de-açúcar preparadas antes e após extração com 0,2 mol L⁻¹ HNO₃ ou HCl.

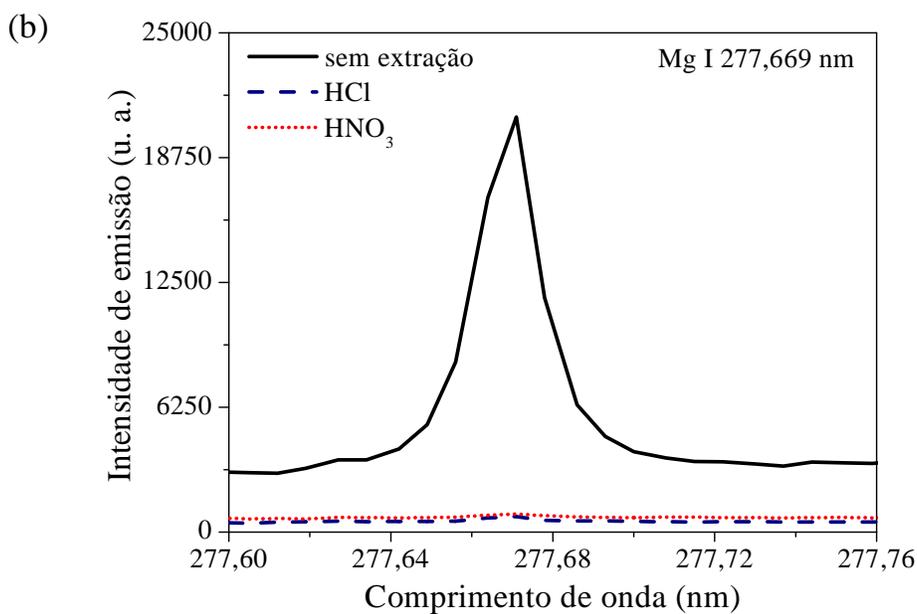
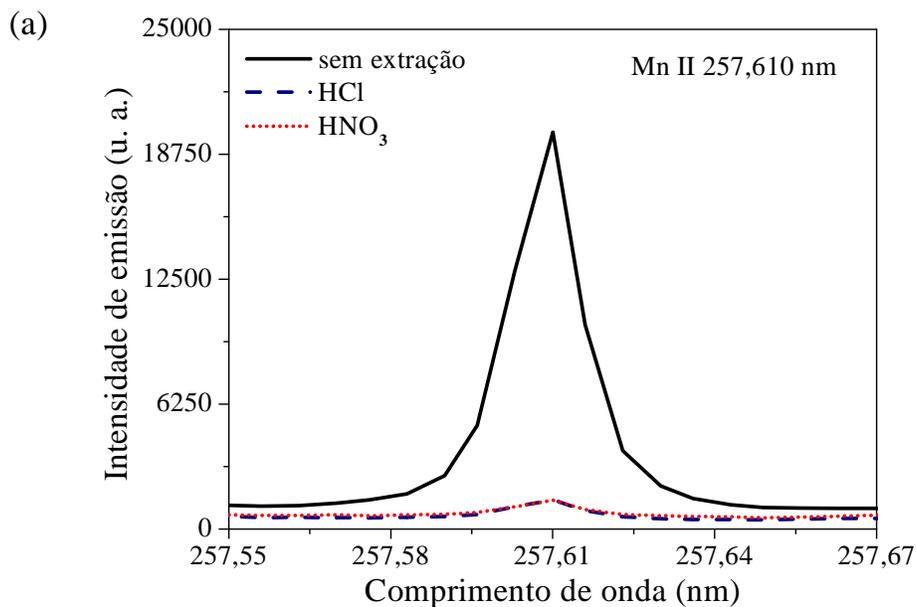


FIGURA 28 - Fragmentos de espectros obtidos em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar mostrando os sinais de emissão de (a) Mn II 257,610 e (b) Mg I 277,669 nm antes e após extração com 0,2 mol L⁻¹ HCl ou HNO₃. Condições experimentais: 25 J cm⁻²; 25 pulsos acumulados; 2,0 μs de atraso e 5,0 μs de integração.

A Figura 29 mostra o espectro LIBS, abrangendo a faixa de comprimento de onda entre 200 e 780 nm, obtido em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar antes e após a extração com $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$. É importante mencionar que, mesmo quando um branco não foi obtido para alguns analitos (*e.g.* P, Mn e Zn), o material resultante foi útil para simular um padrão contendo fração de massa pequena e próxima aos seus limites de detecção. De fato, quando as pastilhas do material vegetal extraído foram interrogadas por LIBS, a maioria das linhas de emissão dos analitos não foram observadas ou foram bem menos intensas que as observadas no material sem extração. Isto pode ser uma indicação de que esse material pode ser utilizado como branco analítico.

Inspecionando o espectro mais detalhadamente, observa-se na Figura 29b, e com auxílio do programa Esawin, que, mesmo após a extração, o espectro entre 200 e 300 nm é caracterizado, principalmente, por linhas atômicas e iônicas de ferro e carbono (C I 247,856 nm).

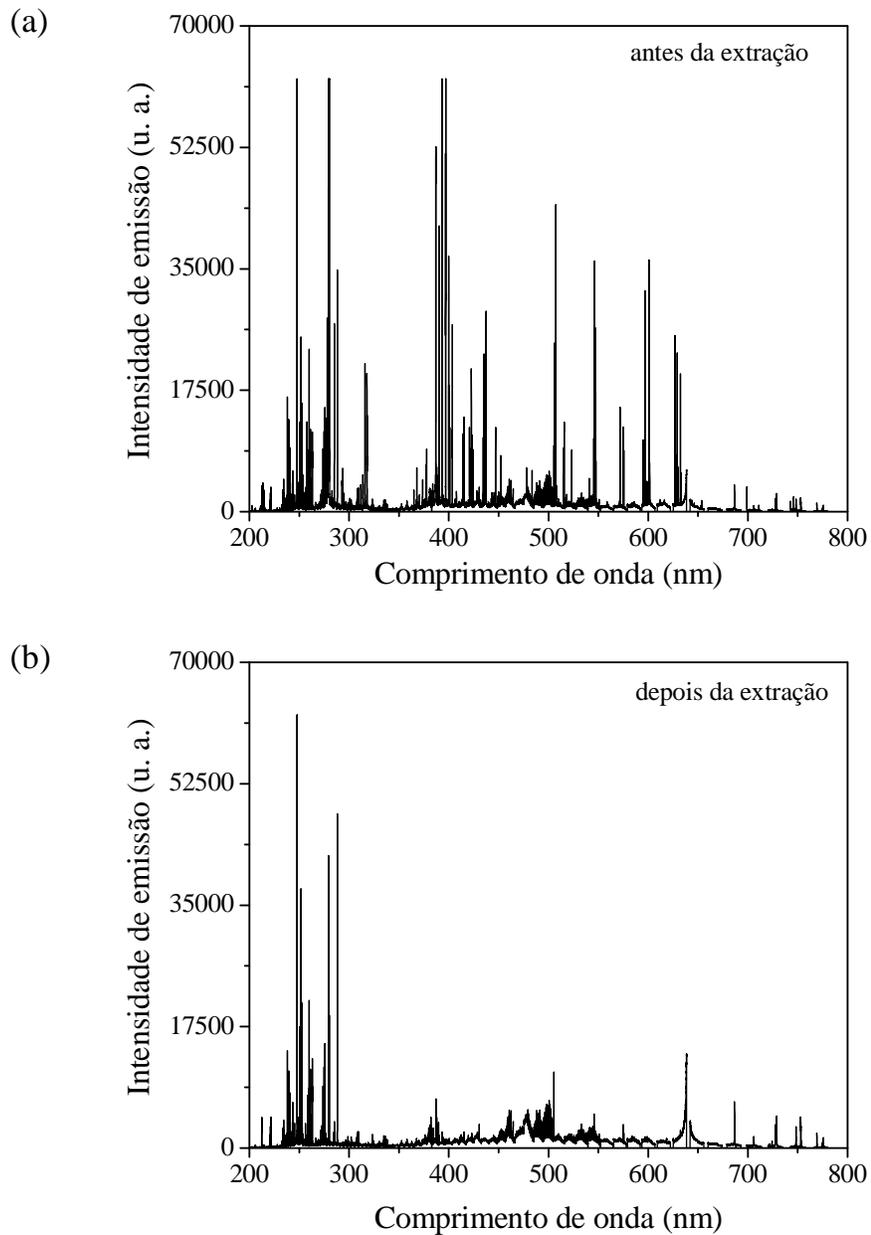


FIGURA 29 - Espectro LIBS entre 200 e 780 nm em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar preparada (a) antes e (b) após a extração com $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$. Condições experimentais: 25 J cm^{-2} ; 25 pulsos acumulados; $2,0 \mu\text{s}$ de atraso e $5,0 \mu\text{s}$ de integração.

As Figuras 30 e 31 mostram, respectivamente, fragmentos do espectro

LIBS contendo as linhas de emissão de Ca, Mg, K, P e Cu, Fe, Mn e Zn em pastilhas preparadas com os materiais antes e após a extração com HNO_3 . Na maioria dos casos, as linhas de emissão ficaram próximas à linha de base. Além disso, pode-se observar que os materiais submetidos à extração apresentaram menor sinal de fundo em comparação ao espectro do material original, o que pode ser atribuído ao menor número de elementos químicos e de elementos facilmente ionizáveis no plasma induzido por laser.

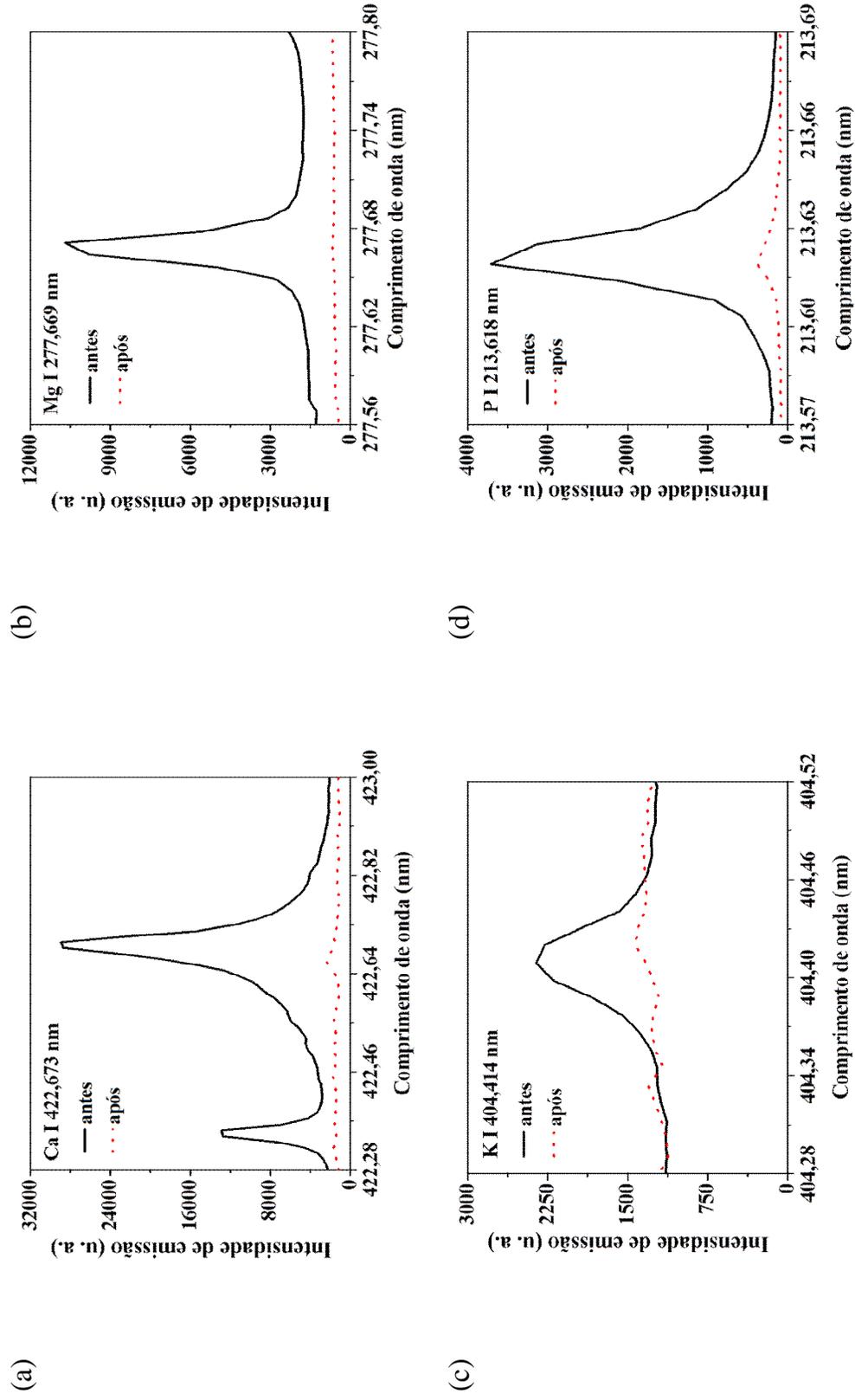


FIGURA 30 - Espectros das linhas de emissão de (a) Ca, (b) Mg, (c) P e (d) K antes e após extrações com $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$. Condições experimentais: 25 J cm^{-2} ; 25 pulsos acumulados; $2,0 \mu\text{s}$ de atraso e $5,0 \mu\text{s}$ de integração.

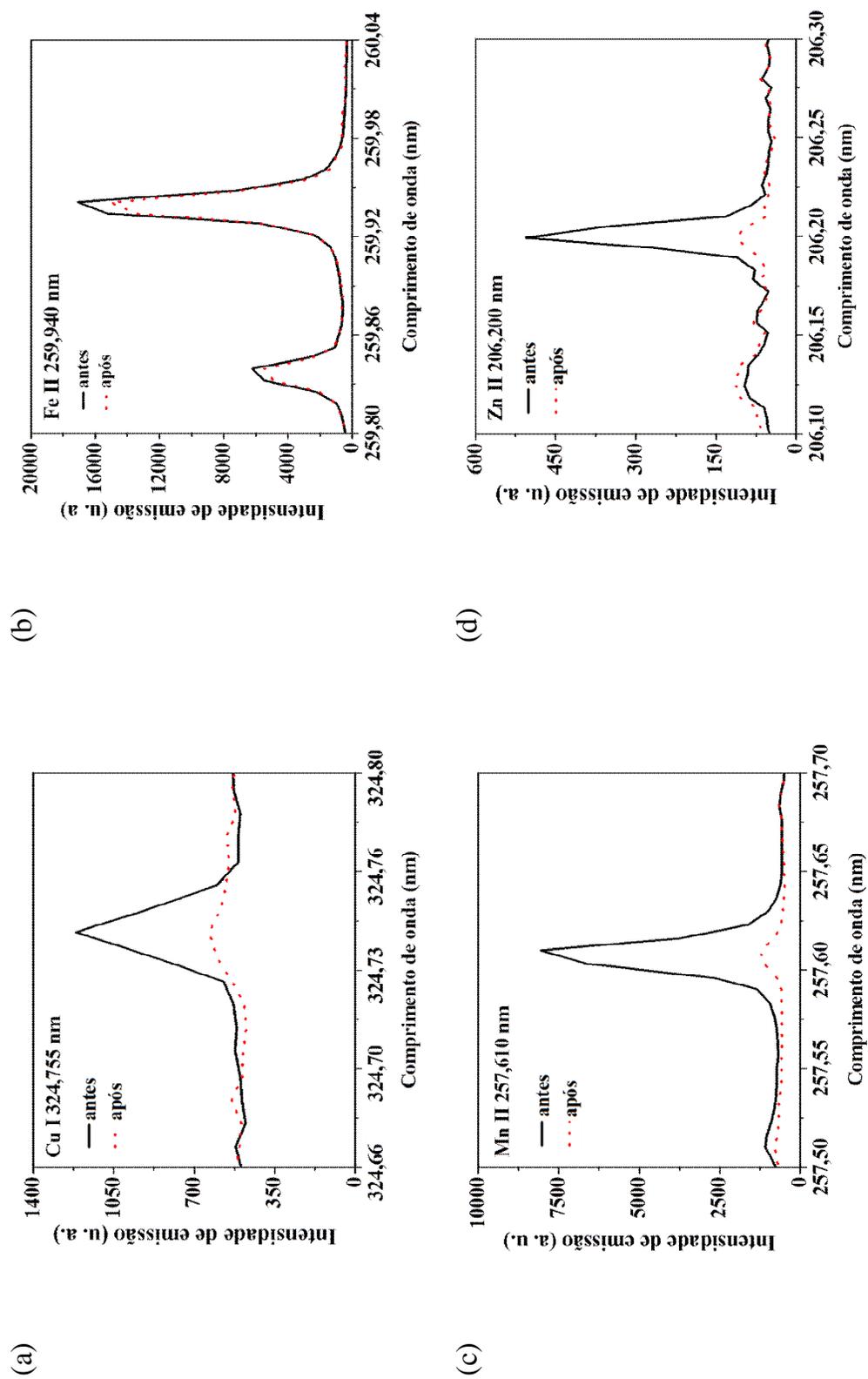


FIGURA 31 - Espectros das linhas de emissão de (a) Cu, (b) Fe, (c) Mn e (d) Zn antes e após extrações com 0,2 mol L⁻¹ HNO₃. Condições experimentais: 25 J cm⁻²; 25 pulsos acumulados; 2,0 μs de atraso e 5,0 μs de integração.

Não foi possível preparar curvas de calibração para B e Cu, principalmente devido às baixas concentrações desses elementos em folhas de cana-de-açúcar ($3,22 \pm 0,02 \text{ mg kg}^{-1}$ B e $4,67 \pm 0,12 \text{ mg kg}^{-1}$ Cu), resultando em frações de massa estreita entre o material contendo baixas concentrações dos analitos e o material original. Folhas de espécies de plantas que apresentam maiores teores de B e Cu, provavelmente resultariam em maiores faixas de calibração, permitindo a determinação quantitativa desses elementos.

O critério para selecionar a variedade de cana-de-açúcar (CTC 6) a qual foi submetida aos procedimentos de extração e preparo das pastilhas, baseou-se em sua composição química (*e.g.* concentração dos analitos, teores de fibra, lignina e celulose), que era próxima das outras variedades, e também nos resultados obtidos em uma contribuição do grupo de pesquisa do CENA, onde um conjunto de 26 e 15 amostras (total de 6 variedades) de cana-de-açúcar foi utilizado para calibração e validação⁸. É importante mencionar que as extrações ácidas alteraram as características da matriz em termos de composição química e propriedades físicas como cor e tamanho das partículas. Apesar disso, a função linear observada nas Figuras 32 e 33 indicam que a mistura do material original (composto por 95 % das partículas $< 75 \mu\text{m}$) com diferentes proporções do material extraído, provavelmente não alterou a interação laser-amostra.

As Figuras 32 e 33 mostram, respectivamente, as curvas de calibração para Ca, K, Mg e P e Mn e Zn. De maneira geral, as curvas de calibração empregando misturas contendo baixas concentrações dos analitos e o material original apresentaram correlações satisfatórias entre os sinais de emissão e as frações de massa certificadas.

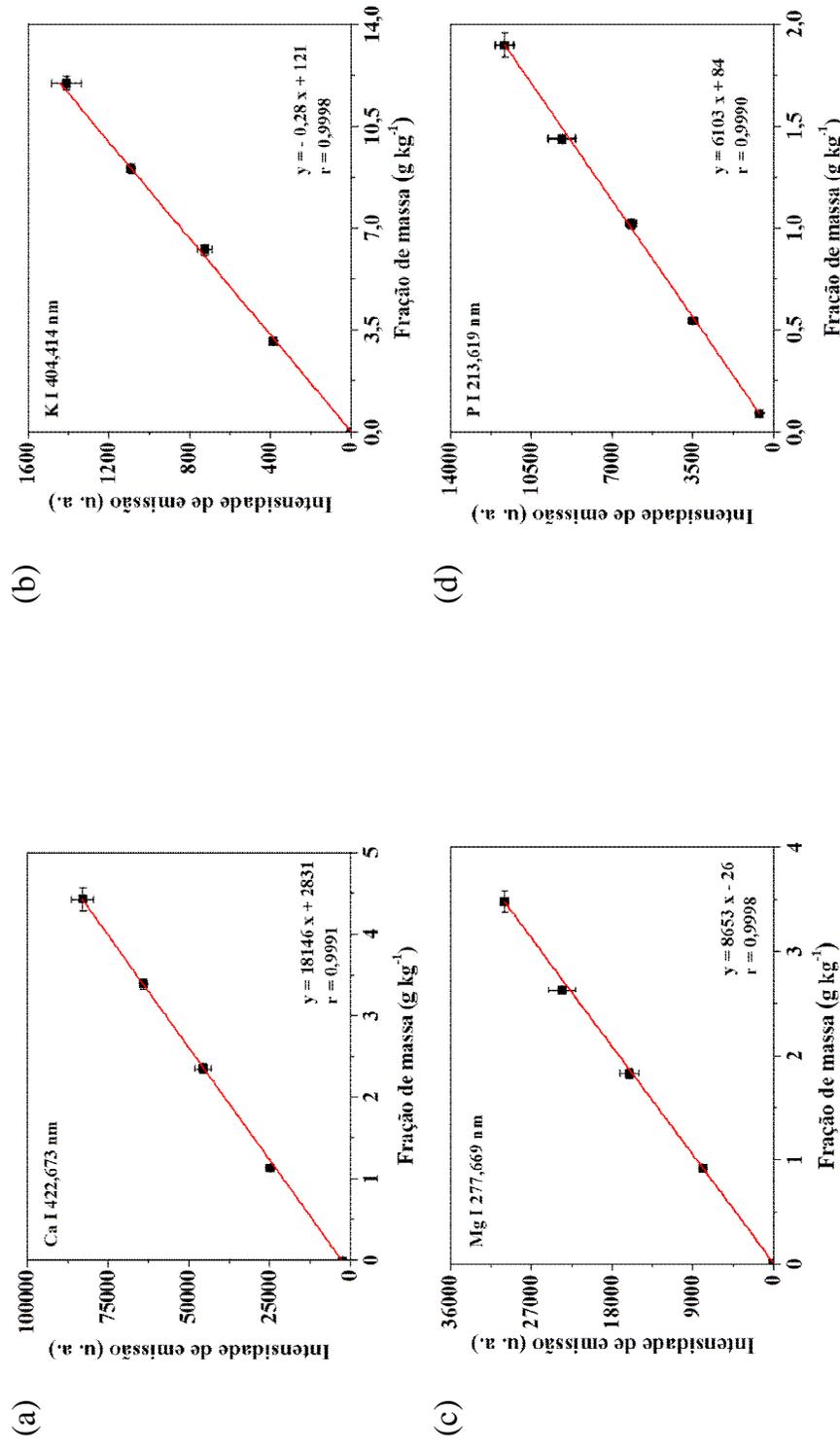


FIGURA 32 - Curvas de calibração obtidas para (a) Ca, (b) K, (c) Mg e (d) P em pastilhas preparadas a partir da mistura entre o material extraído com o material original. Barras de erro verticais correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 30). Condições experimentais: 25 J cm⁻²; 25 pulsos acumulados; 2,0 μ s de atraso e 5,0 μ s de integração. Barras de erro horizontais correspondem a ± 2 desvios-padrão a partir das determinações por ICP OES (n = 3).

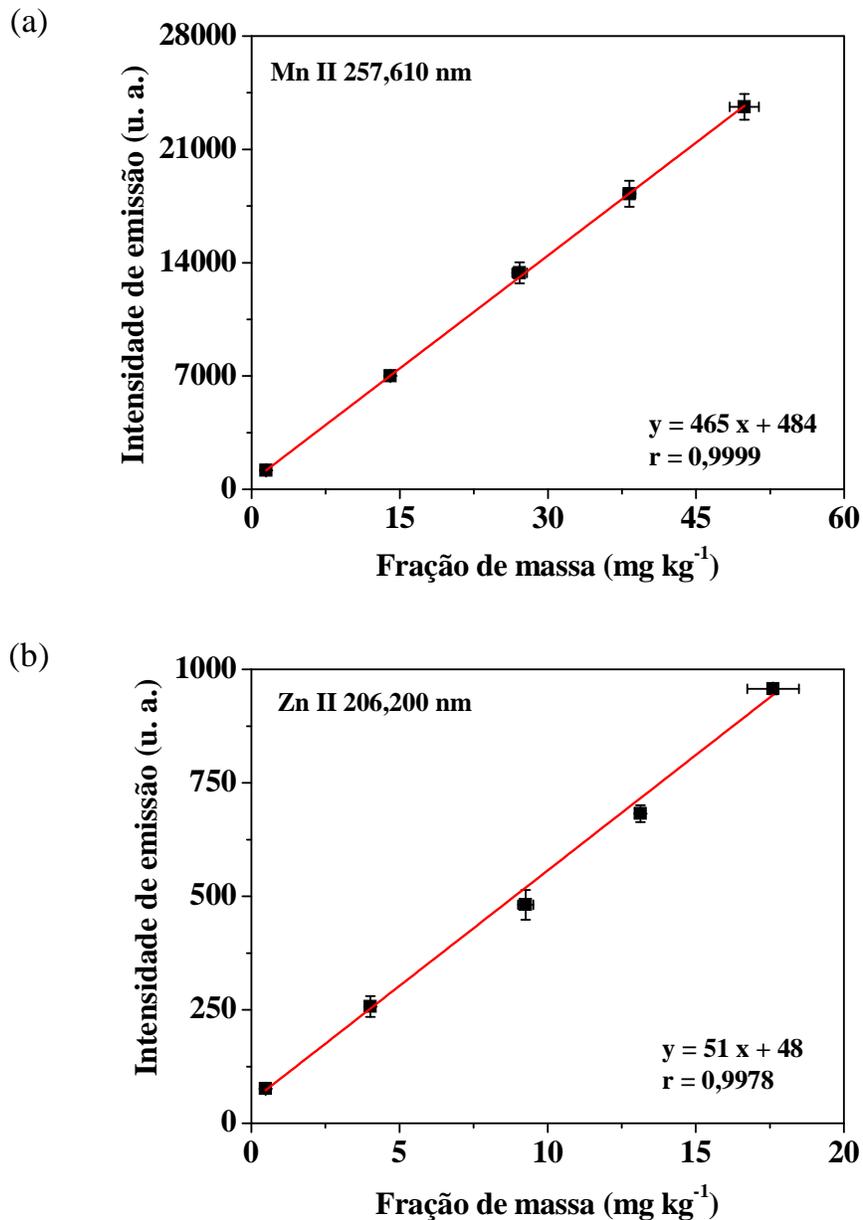


FIGURA 33 - Curvas de calibração de Mn e Zn em pastilhas preparadas a partir de misturas com o material extraído e o material original. Barras de erro verticais correspondem a ± 1 desvio-padrão ($n = 30$). Condições experimentais: 25 J cm^{-2} ; 25 pulsos acumulados; $2,0 \mu\text{s}$ de atraso e $5,0 \mu\text{s}$ de integração. Barras de erro horizontais correspondem a ± 2 desvios-padrão a partir das determinações por ICP OES ($n = 3$).

A Tabela 8 mostra os limites de detecção calculados a partir das linhas de emissão mais sensíveis empregando-se 25 J cm^{-2} e utilizando-se as linhas de emissão do material vegetal extraído. Os LODs foram calculados com base nas recomendações da IUPAC ¹⁴⁴, de acordo com a equação (2):

$$LOD = 3,3 \frac{s}{b} \quad (2)$$

onde (s) é o desvio-padrão estimado das medidas do branco (ou material contendo baixas concentrações dos analitos) na mesma região do espectro das linhas de emissão selecionadas, e b é coeficiente angular da curva de calibração. Os LODs calculados nesta etapa do trabalho e os LODs estimados a partir do desvio-padrão medidos nas vizinhanças das linhas de emissão selecionadas a partir de CRMs foram semelhantes ^{8,10,12}, o que é uma indicação de que os pixels do detector ICCD apresentaram comportamentos semelhantes em ambos os casos. No entanto, cabe destacar que os LODs estimados por este novo método de calibração atendem à recomendação da IUPAC ^{133,144}.

TABELA 8 - Limites de detecção de Ca, Mg, P, Mn e Zn. Dados obtidos nas condições de análise: 25 J cm⁻²; 25 pulsos acumulados; 2,0 μs de atraso e 5,0 μs de integração.

Linha de emissão (nm)	LOD	Unidade
Ca I 422,673	0,01	g kg ⁻¹
Mg I 277,669	0,01	g kg ⁻¹
K I 404,414	1,4	g kg ⁻¹
P I 213,618	0,03	g kg ⁻¹
Mn II 257,610	0,08	mg kg ⁻¹
Zn II 206,200	1,0	mg kg ⁻¹

A estratégia de calibração proposta foi aplicada para análises quantitativas de pastilhas de 17 variedades de folhas de cana-de-açúcar. A variedade 18 foi removida do conjunto por apresentar características anômalas das demais. Os resultados obtidos para Ca, Mg, P, Mn e Zn foram comparados com os dados obtidos dos materiais digeridos e determinados por ICP OES. Foram obtidos coeficientes de variação abaixo de 13 % e 4 % nas determinações por LIBS e ICP OES, respectivamente. Com exceção do K, os resultados das frações de massa determinadas por LIBS apresentaram boa concordância com as obtidas por ICP OES (Figuras 34, 35 e 36) aplicando-se um teste-*t* não pareado ao nível de confiança de 95%. Segundo Carvalho et al. ⁶, o uso de maiores fluências (e.g. 50 J cm⁻²) pode melhorar a correlação entre as intensidade dos sinais de emissão de alguns analitos e as respectivas frações de massa.

Cabe destacar que os bons resultados aqui relatados foram possíveis uma

vez que os padrões apresentavam composição química semelhante à das amostras. Também é oportuno mencionar que a variedade de cana-de-açúcar selecionada para o preparo dos padrões possuía teores intermediários de fibra e celulose com relação às outras variedades (Gomes et al. ⁷).

Outra estratégia interessante seria utilizar misturas de folhas de diversas variedades de cana-de-açúcar para preparar as curvas de calibração.

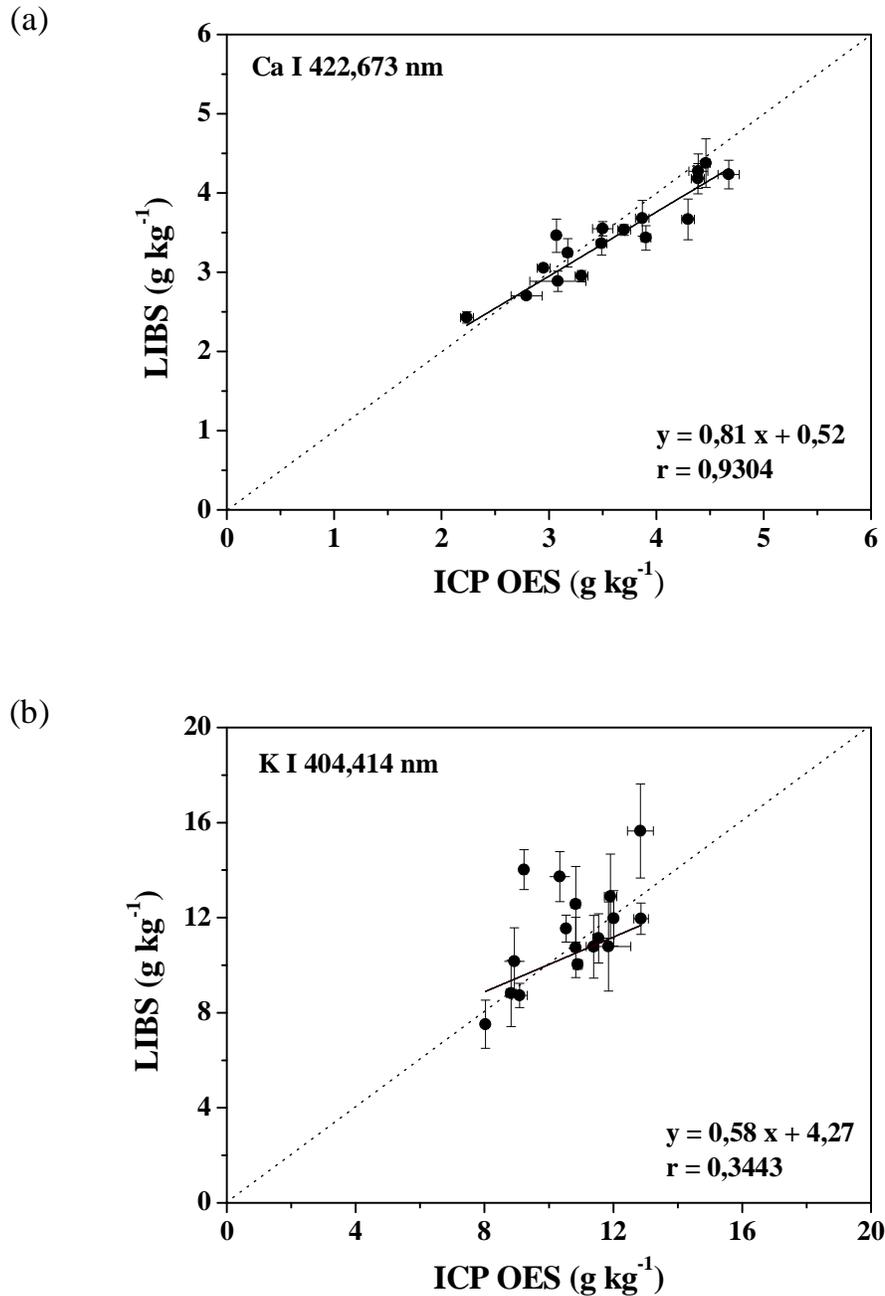


FIGURA 34 – Correlação entre os resultados obtidos para (a) Ca e (b) K em pastilhas de cana-de-açúcar por LIBS em comparação às análises dos correspondentes digeridos por ICP OES. As barras de erros correspondem a ± 1 desvio-padrão (LIBS: 25 J cm⁻²; 25 pulsos acumulados; 2,0 μ s de atraso e 5,0 μ s de integração, n = 30 crateras; ICP OES: n = 3 digeridos).

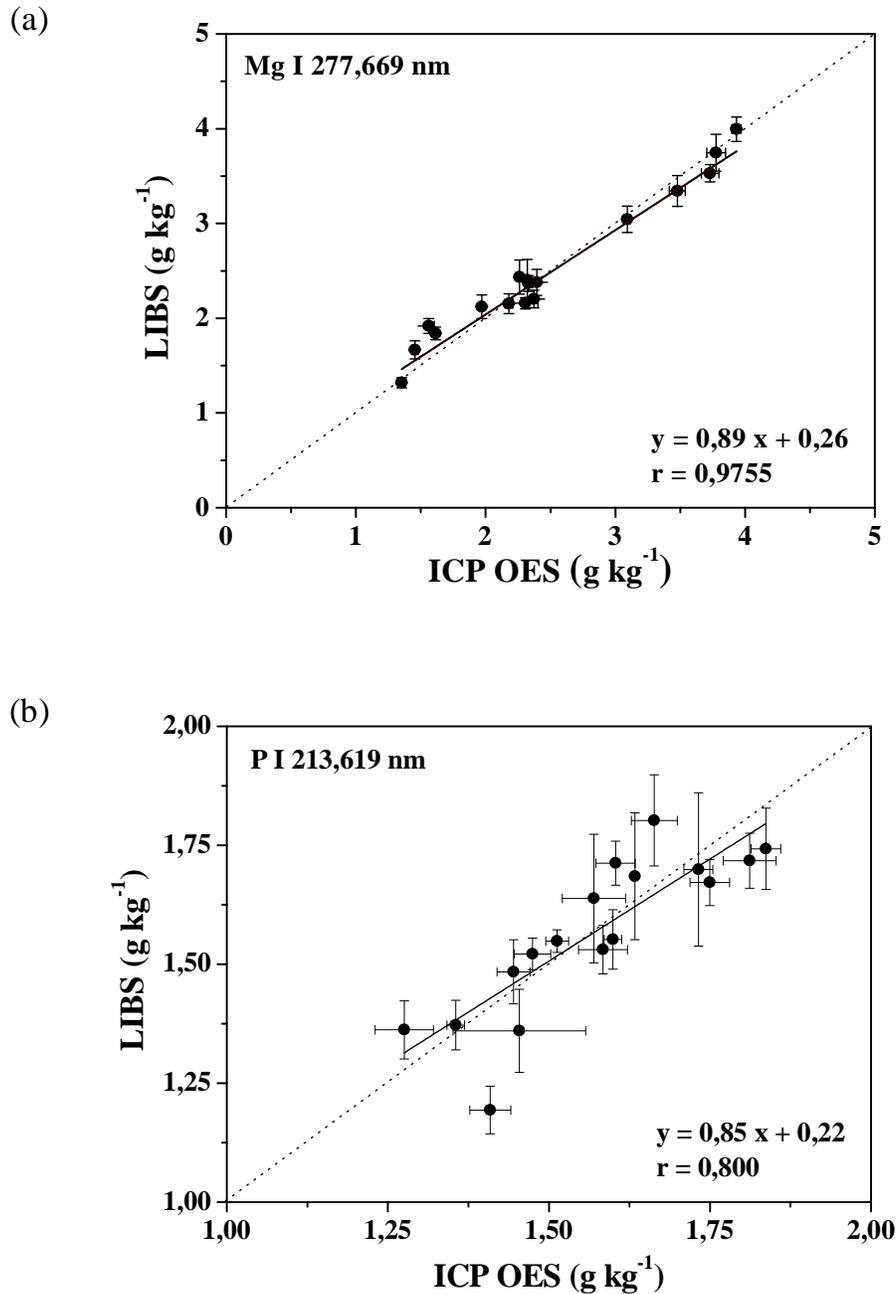


FIGURA 35 – Correlação entre os resultados obtidos para (a) Mg e (P) em pastilhas de cana-de-açúcar por LIBS em comparação às análises dos correspondentes digeridos por ICP OES. As barras de erros correspondem a ± 1 desvio-padrão (LIBS: 25 J cm⁻²; 25 pulsos acumulados; 2,0 μ s de atraso e 5,0 μ s de integração, n = 30 crateras; ICP OES: n = 3 digeridos).

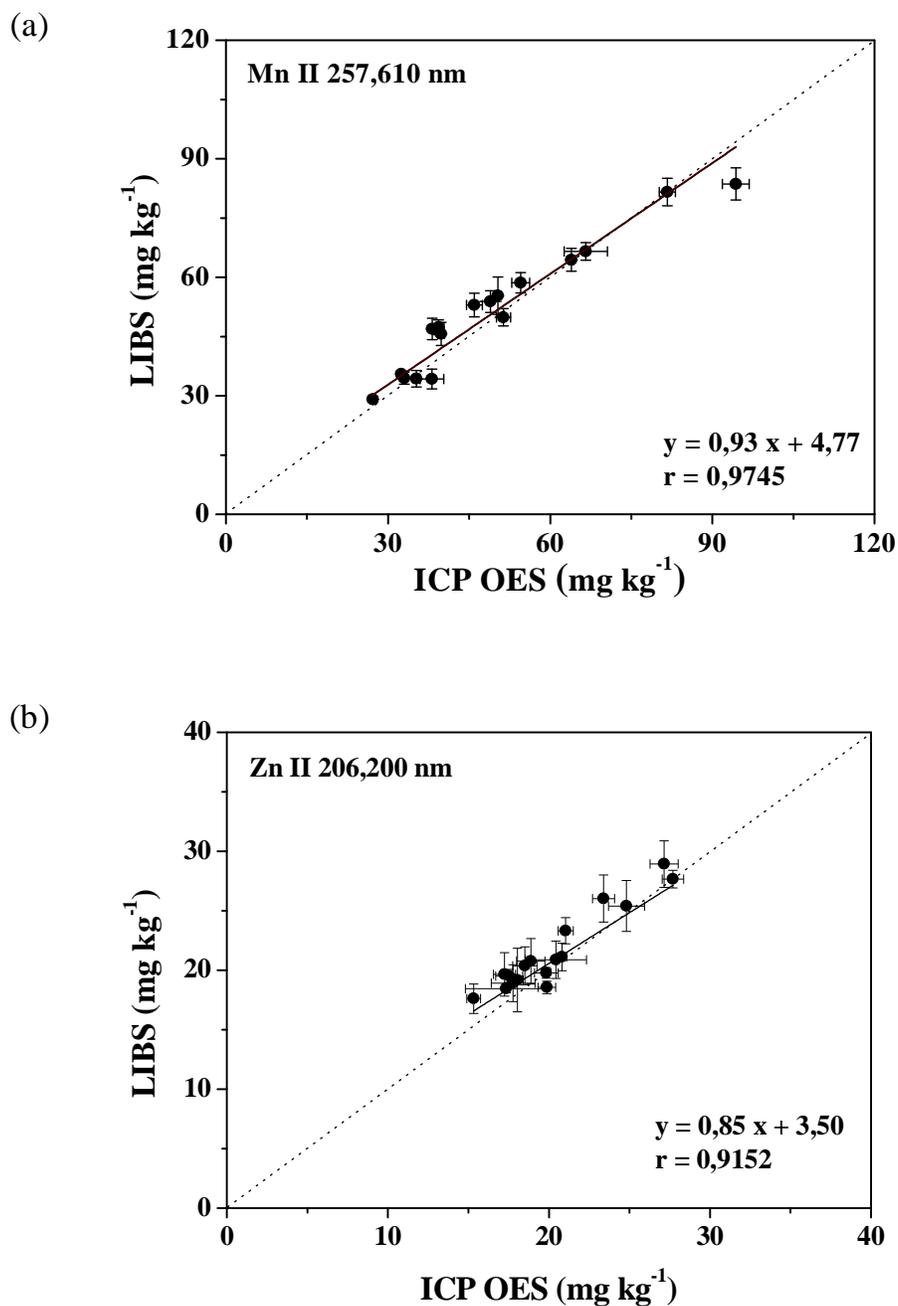


FIGURA 36 – Correlação entre os resultados obtidos para (a) Mn e (b) Zn em pastilhas de cana-de-açúcar por LIBS em comparação às análises dos correspondentes digeridos por ICP OES. As barras de erros correspondem a ± 1 desvio-padrão (LIBS: 25 J cm⁻²; 25 pulsos acumulados; 2,0 μ s de atraso e 5,0 μ s de integração, n = 30 crateras; ICP OES: n = 3 digeridos).

5.2 - LA-ICP OES

Uma estratégia interessante e pouco abordada na literatura para análise direta de sólidos, principalmente tendo como objetivo a determinação de macro e micronutrientes em materiais vegetais, é a utilização da LA-ICP OES para a análise de pastilhas. Isso ficou demonstrado nesta etapa da tese, utilizando-se, também, folhas de cana-de-açúcar, de citros laranja e de soja.

A Tabela 9 mostra os parâmetros utilizados em LA-ICP OES para a análise das pastilhas de materiais vegetais. As linhas de emissão foram selecionadas de acordo com a base de dados do programa WinLab 32TM (Perkin Elmer, Alemanha) e das concentrações dos elementos nas amostras.

Em LA-ICP OES fixaram-se a taxa de repetição do laser em 10 Hz e a fluência do laser em $9,0 \text{ J cm}^{-2}$ por proporcionarem maior SNR para os analitos. Exemplos de sinais transientes de Ca e P nas condições estabelecidas para a análise de pastilhas de folhas de citros por LA-ICP OES e a SNR são mostrados na Figura 37.

TABELA 9 - Parâmetros instrumentais utilizados para a análise de materiais vegetais por LA-ICP OES.

Parâmetros	LA-ICP OES
ICP OES	Optima 7300 DV
Potência	1,5 kW
Vazão de Ar	15 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	0,5 L min ⁻¹
Vazão do gás de nebulização	0,5 L min ⁻¹
Lasers	Nd:YAG, 266 nm (2,89 mJ)
Fluência (J cm ⁻²)	9
Duração do pulso (ns)	6
Diâmetro de focalização (µm)	200
Modo de ablação	perfil da cratera
Volume da cela de ablação (cm ³)	56
Número de pulsos	500
Taxa de repetição (Hz)	10
Linhas de emissão (nm)	Ca II 315,887 / Fe I 259,939 K I 404,721 / Mn II 257,610 Mg I 285,213 / Zn I 213,857 P I 213,617 / Sc II 361,383 B I 249,772

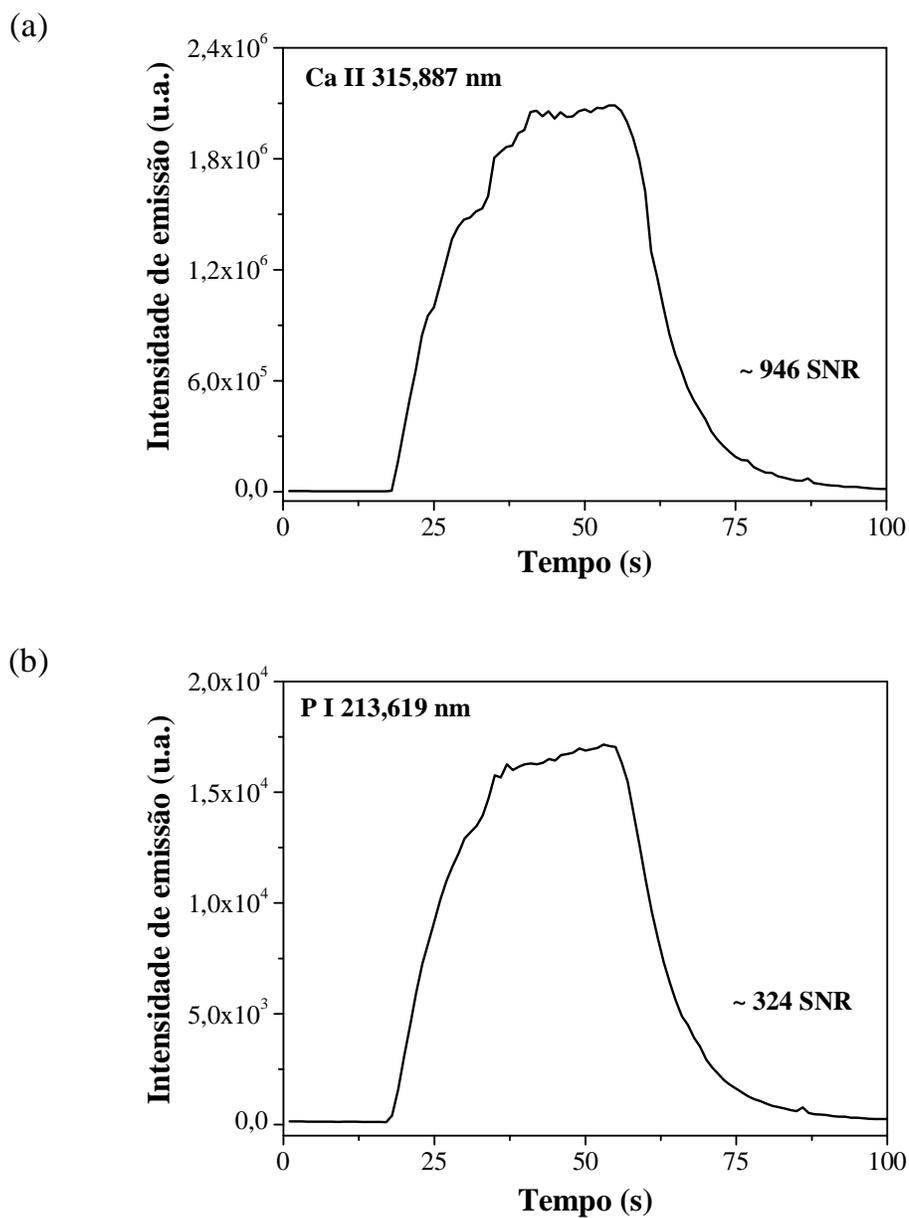


FIGURA 37 - Exemplos de sinais característicos de emissão de (a) Ca e (b) P em pastilhas de folhas de citros (20 min de moagem) obtidos por LA-ICP OES. (n = 10 crateras, 500 pulsos/cratera).

5.2.1 - Procedimentos de moagem e influência da distribuição do tamanho das partículas nas análises por LA-ICP OES

Como já mencionado, as folhas de plantas são matrizes complexas em que a composição mineral dos nutrientes varia entre as amostras. Dependendo do tipo de moagem ou amostra, o que inclui suas características físicas e químicas ⁷, maiores tempos de moagem podem ser necessários para melhorar a interação laser-amostra no processo de ablação, melhorar o transporte das partículas para o ICP e, conseqüentemente, melhorar a qualidade dos sinais analíticos. Diversas publicações sobre a influência do tamanho de partículas em diferentes técnicas microanalíticas já foram relatadas ^{42,145-147}.

Outra estratégia que foi avaliada neste trabalho foi o uso de Sc como padrão interno. Cabe ressaltar que o uso de padrão interno é uma importante prática entre usuários que utilizam ablação por laser para melhorar o desempenho do método e corrigir eventuais diferenças entre os sinais analíticos decorrentes de diferenças nas massas abladadas entre replicatas ⁹⁰. No presente trabalho, o emprego de Sc mostrou-se útil para análise de pastilhas de folhas de cana-de-açúcar, mas não foi imprescindível para as análises de folhas de citros, soja e CRMs. As diferenças entre os resultados foram atribuídas à qualidade das pastilhas diretamente associada à distribuição de tamanho de partículas que variou em função da etapa de cominuição.

A Figura 38 mostra as intensidades de emissão de B I 249,772 nm e Ca II 315,887 nm, empregando Sc II 361,383 nm como padrão interno para a análise de pastilhas de cana-de-açúcar por LA-ICP OES (a e b).

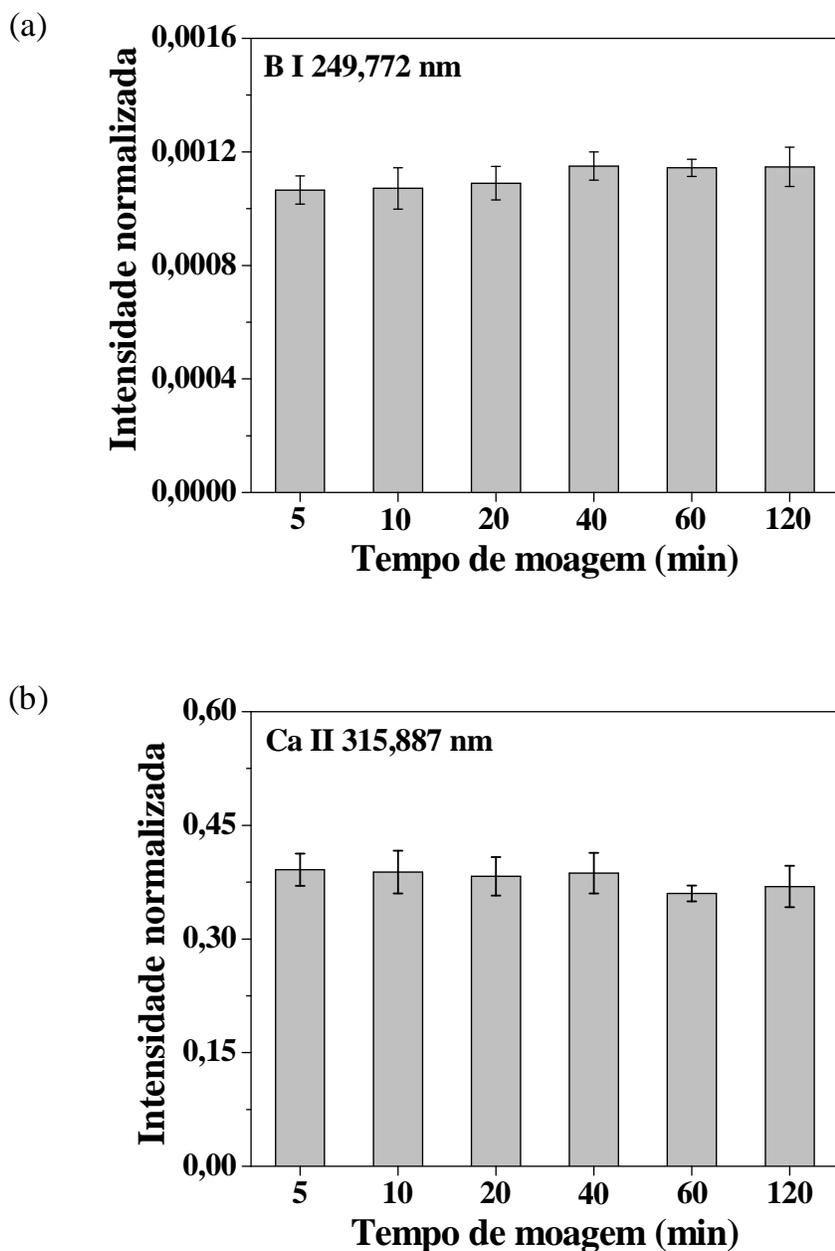


FIGURA 38 - Intensidade de emissão de (a) B I 249,772 nm e (b) Ca II 315,887 nm normalizada com Sc II 361,382 nm em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar preparadas com tempos de moagem de 5 a 120 min para análises por LA-ICP OES. As barras de erros correspondem a ± 1 desvio-padrão ($n = 10$ replicatas, 500 pulsos/replicata).

Para efeito de comparação a Figura 39 mostra as intensidade de emissão de P e Mn na análise de pastilhas de folhas de cana-de-açúcar, de citros e de soja sem Sc. Particularmente, para as amostras de folhas de cana-de-açúcar, tal comportamento foi atribuído às diferenças entre as distribuições de tamanho de partículas (vide imagens das Figs. 40, 41 e 42), e, conseqüentemente, às maiores massas removidas quando as pastilhas eram constituídas por tamanhos de partículas maiores. Para as amostras de folhas de citros e soja, como as partículas das pastilhas possuíam tamanhos semelhantes, as massas removidas foram semelhantes, resultando em intensidades de emissão semelhantes.

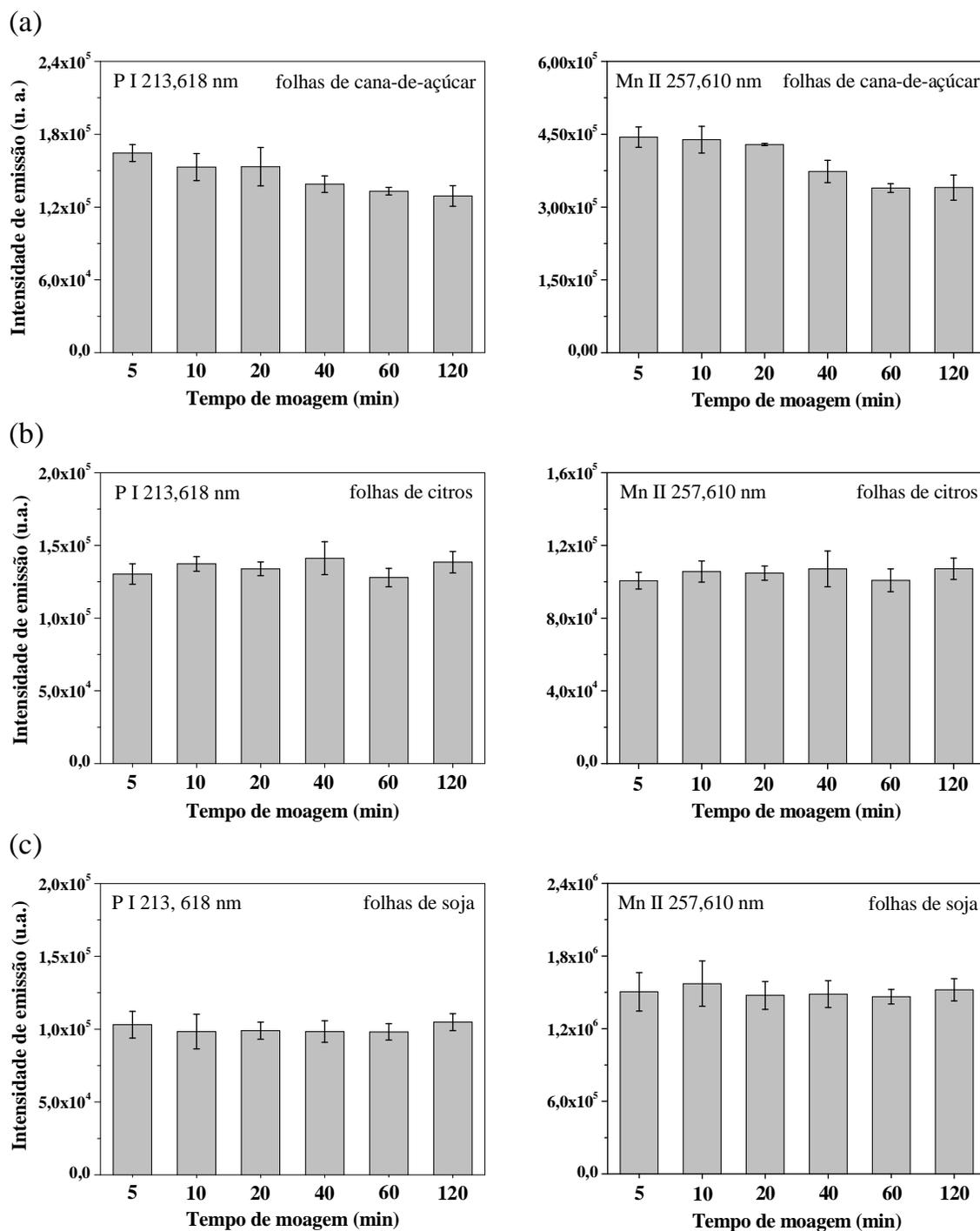


FIGURA 39 - Intensidades de emissão de P I 213,618 e Mn II 257,610 nm na análise de pastilhas de (a) folhas de cana-de-açúcar, (b) citros e (c) soja por LA-ICP OES na ausência de Sc como padrão interno. Dados para tempos de moagem de 5 a 120 min. As barras de erros correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 10 replicatas, 500 pulsos/replicata).

As pastilhas de folhas de citros e soja proporcionaram comportamentos semelhantes após 10 min de moagem, uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre as intensidades das linhas de emissão selecionadas. Entretanto, para folhas de cana-de-açúcar, foram necessários, no mínimo, 20 min de moagem para obtenção de pastilhas com comportamentos semelhantes. As dificuldades para a cominuição de folhas de cana-de-açúcar foram atribuídas aos elevados teores de fibra, lignina e celulose, como discutidos por Gomes et al. ⁷. Além disso, nenhuma melhora significativa nos sinais de emissão obtidos por LA-ICP OES foi observada nas pastilhas dos materiais vegetais preparados após 5 min de moagem quando o padrão interno foi usado. O uso de baixas vazões de argônio (0,5 L min⁻¹) para o transporte das partículas em LA-ICP OES tem sido associado com a melhora do desempenho analítico, e este valor foi mantido para a realização das análises. Cabe comentar que o uso de vazões mais baixas do gás de transporte pode reduzir a influência do tamanho das partículas quando diferentes tempos de moagem são utilizados, bem como a capacidade de ionizar e excitar eficientemente as espécies nessas condições. Isto foi particularmente válido para as folhas de citros e soja, que apresentaram diferenças desprezíveis nas dimensões das crateras, devido à semelhança nos tamanhos de partículas, independentemente dos tempos de moagem utilizados.

Em folhas de plantas mais resistentes aos procedimentos de moagem (*e.g.* folhas de cana-de-açúcar) o uso de maiores tempos de moagem permite obter pastilhas mais coesas, o que resulta em menor quantidade de material removido na forma de pequenas partículas. Partículas menores têm maior probabilidade de sofrer facilmente os processos de ionização em ICP e LIBS. Apesar da morfologia das crateras em folhas de cana-de-açúcar variar com os procedimentos de moagem, levando a diferentes massas ablatadas, as diferenças

nas intensidades de emissão dos analitos normalizadas com Sc também podem ser desprezadas. O uso de baixa vazão do gás de transporte favorece um bom desempenho analítico e melhora a sensibilidade das medidas com o aumento do tempo de residência das espécies no plasma. O maior tempo de exposição das partículas do material ablado no plasma permite, mesmo para as partículas maiores, (*e.g.* 5 min de moagem), que os elementos presentes sejam atomizados e ionizados. Isso explicaria, por exemplo, a menor influência do tempo de moagem nos resultados de intensidade normalizada em LA-ICP-OES, quando comparado com os resultados de LIBS, por exemplo.

Cabe também lembrar que os sistemas que empregam laser no UV podem fornecer melhor acoplamento laser-amostra que no IR, resultando em aumentos da massa removida, melhor morfologia da cratera e melhor reprodutibilidade dos sinais. Além disso, há trabalhos demonstrando que em menores comprimentos de onda do laser é possível obter taxa de ablação mais controlada e menor fracionamento^{56,132}.

Baseando-se na densidade da amostra e no volume das crateras, a massa removida após a ablação foi estimada. As maiores diferenças entre as massas removidas ($n = 10$ crateras por pastilha) foram observadas em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar, especialmente após 5 min de moagem. As diferenças entre as massas removidas podem ser atribuídas à menor coesão e maior porosidade dessas pastilhas. Além disso, o uso do padrão interno foi importante para corrigir as diferenças na intensidade de emissão dos elementos como resultado da variação das massas abladas. A média das massas removidas nas pastilhas dos materiais vegetais ($n = 10$ crateras por pastilha) após análises por LA-ICP OES é mostrada na Tabela 10.

TABELA 10 - Massa removida em pastilhas de materiais vegetais preparados com diferentes tempos de moagem e após análise por LA-ICP OES.

Massa removida (μg) *			
LA-ICP-OES ^a			
Tempo de moagem (min)	Folhas de citros	Folhas de soja	Folhas de cana-de-açúcar
5	20 \pm 2	27 \pm 3	75 \pm 6
10	21 \pm 1	26 \pm 2	43 \pm 2
20	22 \pm 2	30 \pm 2	43 \pm 2
40	22 \pm 2	28 \pm 3	37 \pm 2
60	23 \pm 2	29 \pm 2	36 \pm 1
120	22 \pm 2	30 \pm 2	25 \pm 1

* n = 10 crateras por pastilha

500 pulsos por replicata / 9,0 J cm⁻²

As Figuras 40, 41 e 42 mostram, respectivamente, os materiais cominuídos de folhas de cana-de-açúcar, citros e soja com magnificação de 200x.

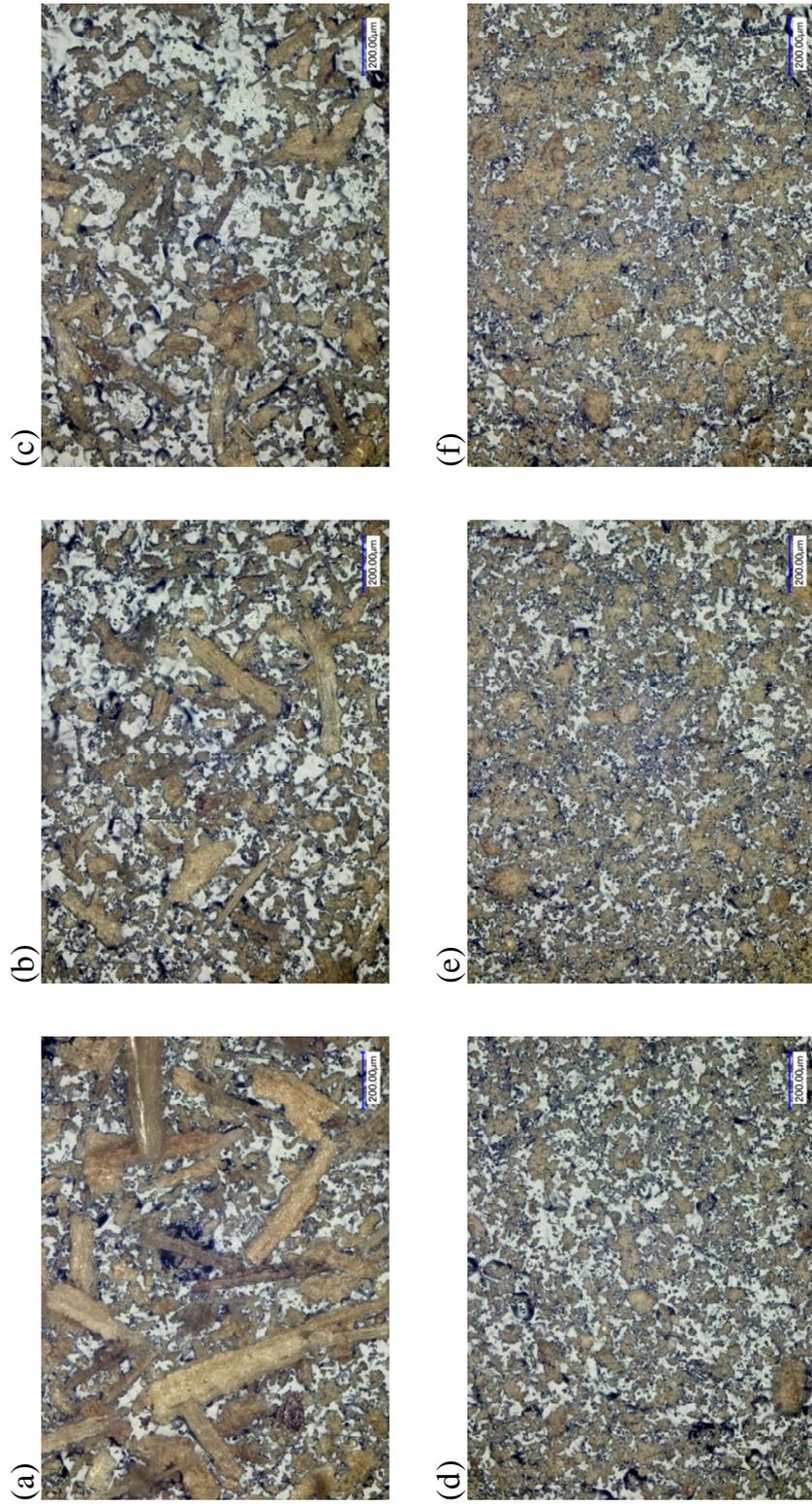


FIGURA 40 - Imagens de folhas de cana-de-açúcar cominuídas por moinho com bolas nos tempos de moagem de (a) 5, (b) 10, (c) 20, (d) 40, (e) 60 e (f) 120 min, capturadas com microscópio óptico com ampliação de 200x.

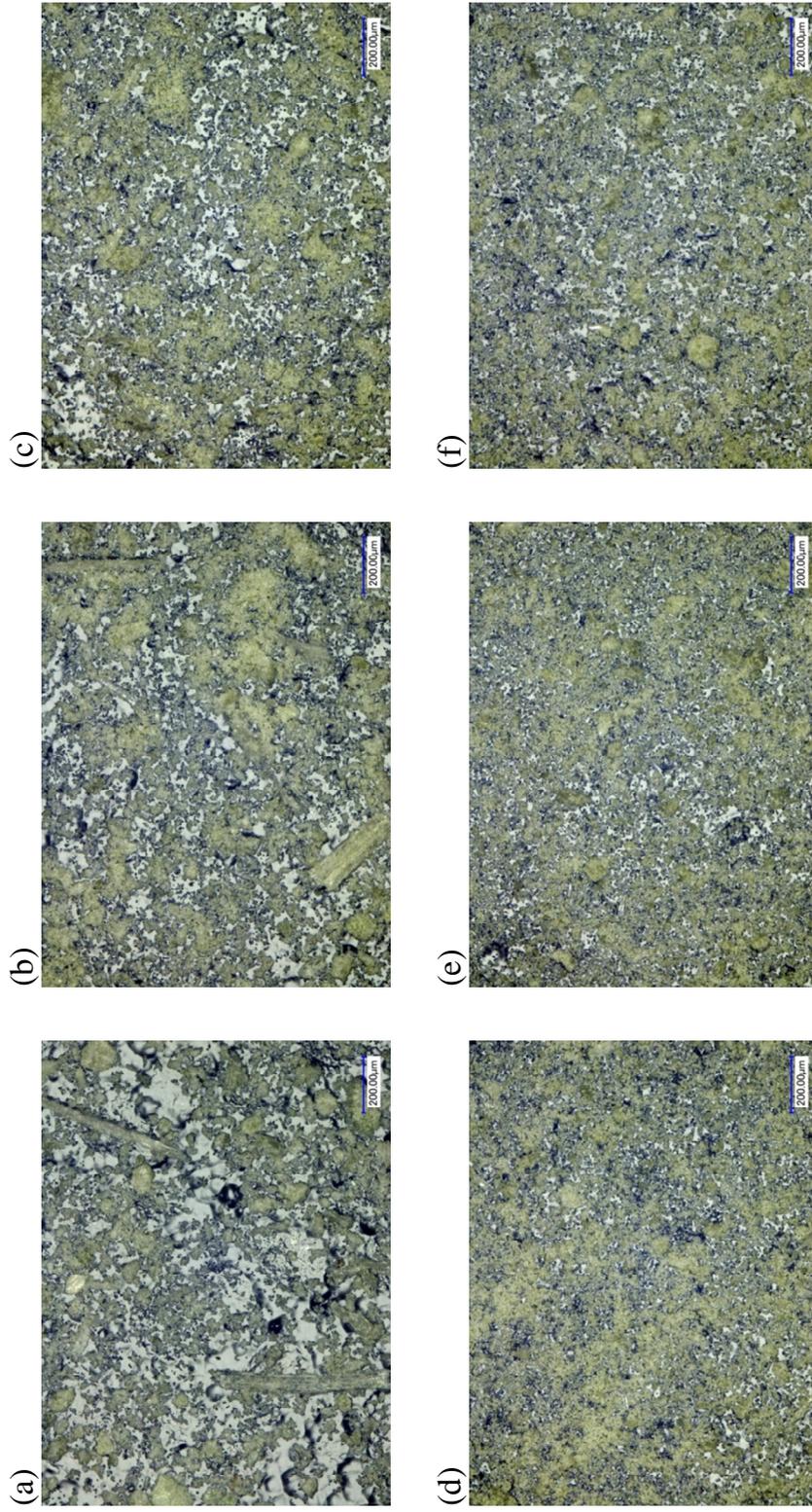


FIGURA 41 - Imagens de folhas de citros cominuídas por moinho com bolas nos tempos de moagem de (a) 5, (b) 10, (c) 20, (d) 40, (e) 60 e (f) 120 min, capturadas com microscópio óptico com ampliação de 200x.

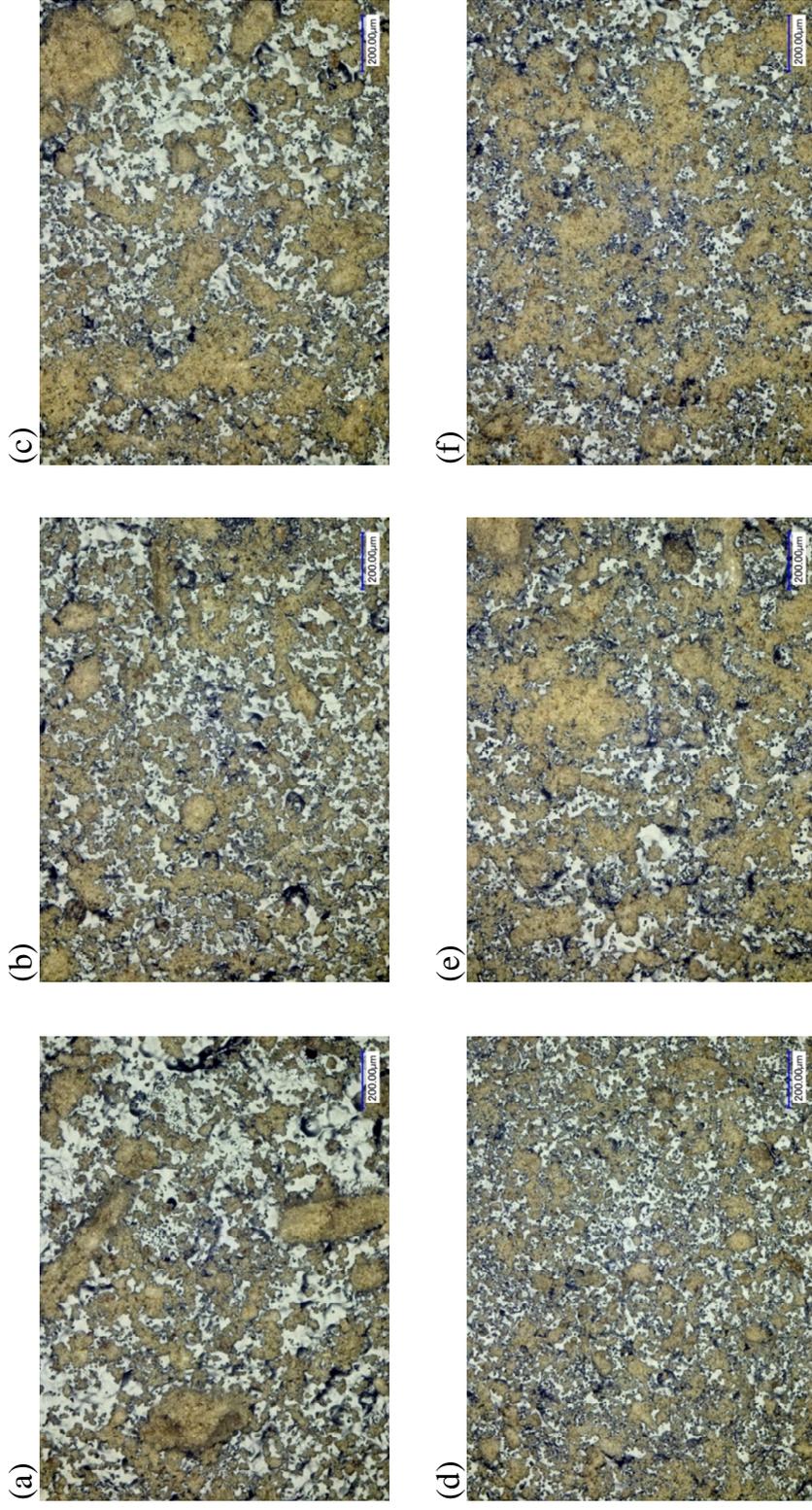


FIGURA 42 - Imagens de folhas de soja cominuídas por moinho com bolas nos tempos de moagem de (a) 5, (b) 10, (c) 20, (d) 40, (e) 60 e (f) 120 min, capturadas com microscópio óptico com ampliação de 200x.

As imagens das crateras formadas nas pastilhas de folhas de cana, citros e soja, preparadas a partir de materiais cominuídos com tempos de moagem de 5 e 120 min são mostradas na Figura 43.

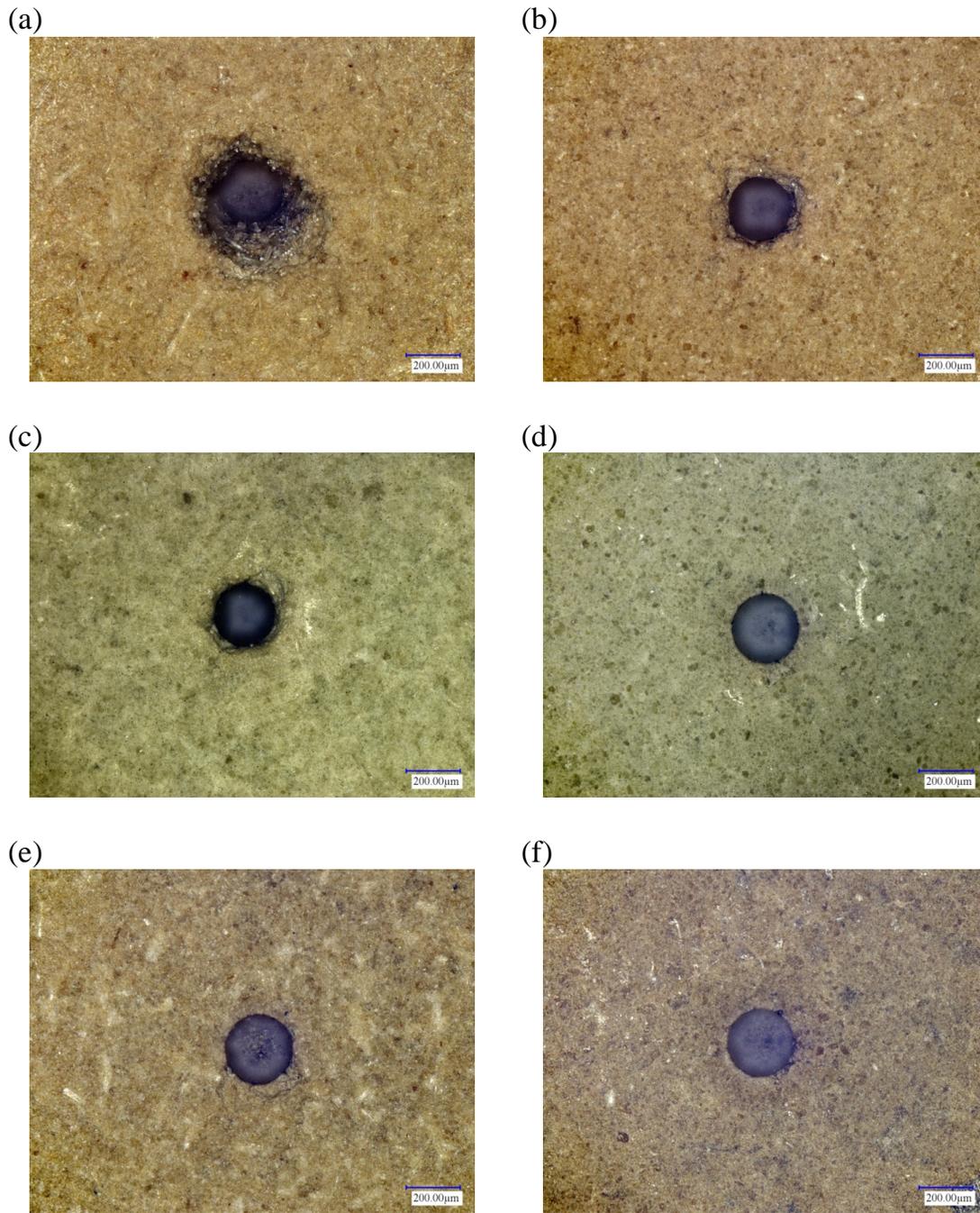


FIGURA 43 - Imagens das crateras formadas após a ablação empregando LA-ICP OES em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar (a e b), citros (c e d) e soja (e e f). Figuras a, c, e, e Figuras b, d, f, representam pastilhas preparadas após 5 e 120 min de moagem com bolas, respectivamente. Condições experimentais: 500 pulsos; 9 J cm^{-2} ; taxa de repetição do laser de 10 Hz e diâmetro de focalização de $200 \mu\text{m}$.

A Figura 44 mostra os perfis de uma cratera formada por ablação com laser de Nd:YAG a 266 nm em pastilhas de folha de citros, de soja e de cana-de-açúcar preparadas após 5, 20 e 40 min de cominuição. Em geral, perfis semelhantes foram obtidos em pastilhas de folhas de citros e soja, independentemente do tempo de moagem.

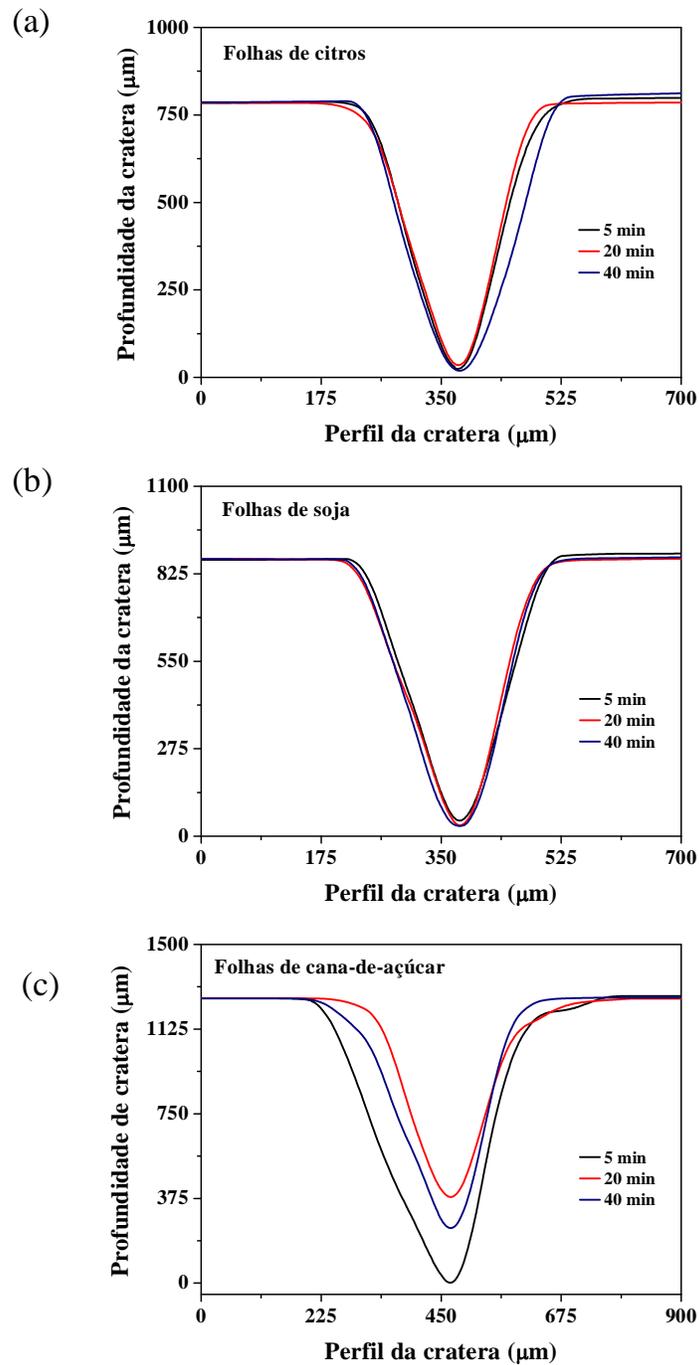


FIGURA 44 - Perfis das crateras formadas por 500 pulsos do laser em pastilhas de (a) citros, (b) soja e (c) cana-de-açúcar após 5, 20 e 40 min de cominuição. Ablação com laser de Nd:YAG a 266 nm, 9,0 J. cm⁻², 10 Hz.

5.2.2 - Estratégia de calibração e figuras de mérito

As Figuras 45 e 46 mostram, respectivamente, as curvas de calibração para Ca, K, Mg e P e B, Fe, Mn e Zn, obtidas a partir das análises de pastilhas de CRMs por LA-ICP OES. As barras horizontais indicam as incertezas das frações de massa certificadas no intervalo de confiança de 95%. As barras de erros verticais referem-se às medidas por LA-ICP OES e correspondem a ± 1 desvio-padrão ($n = 10$ replicatas por pastilha). As figuras de mérito, como precisão, exatidão, limite de detecção e razão sinal/ruído obtidos após a análise de pastilhas de folhas de pessegueiro (NIST 1547), são mostradas na Tabela 11.

TABELA 11 - Figuras de mérito obtidas por LA-ICP OES.

Linha de emissão (nm)	NIST 1547 conc. certificada		LA-ICP OES			
	(mg kg ⁻¹)	(RSD %)	Conc. medida (mg kg ⁻¹)	Exatidão* (%)	LOD (mg kg ⁻¹)	SNR
Ca II 315,887	15600 ± 200	5,6	14600 ± 800	-6,1	14	226
K I 404,721	24300 ± 300	6,0	25600 ± 1500	5,2	94	330
Mg I 285,213	4320 ± 80	4,3	4700 ± 200	8,3	5	275
P I 213,618	1370 ± 70	5,2	1430 ± 70	4,3	10	443
B I 249,772	29 ± 2	4,2	30 ± 1	2,2	0,2	319
Fe I 259,939	218 ± 14	5,2	240 ± 10	11,5	0,8	228
Mn II 257,610	98 ± 3	4,1	100 ± 4	2,4	2	257
Zn I 213,857	17,9 ± 0,4	17,5	18 ± 3	0,6	0,1	69

* a exatidão foi calculada em relação à porcentagem de erro entre as concentrações medidas e certificadas de NIST 1547

Boa precisão foi observada nas medidas por LA-ICP OES, com CVs menores que 6%, exceto para Zn. Os valores de exatidão, calculados como a diferença percentual entre os valores de concentração medidos com os valores certificados de NIST 1547 variou de -7,3 % a 11,5%. Resultados semelhantes foram obtidos para os outros CRMs.

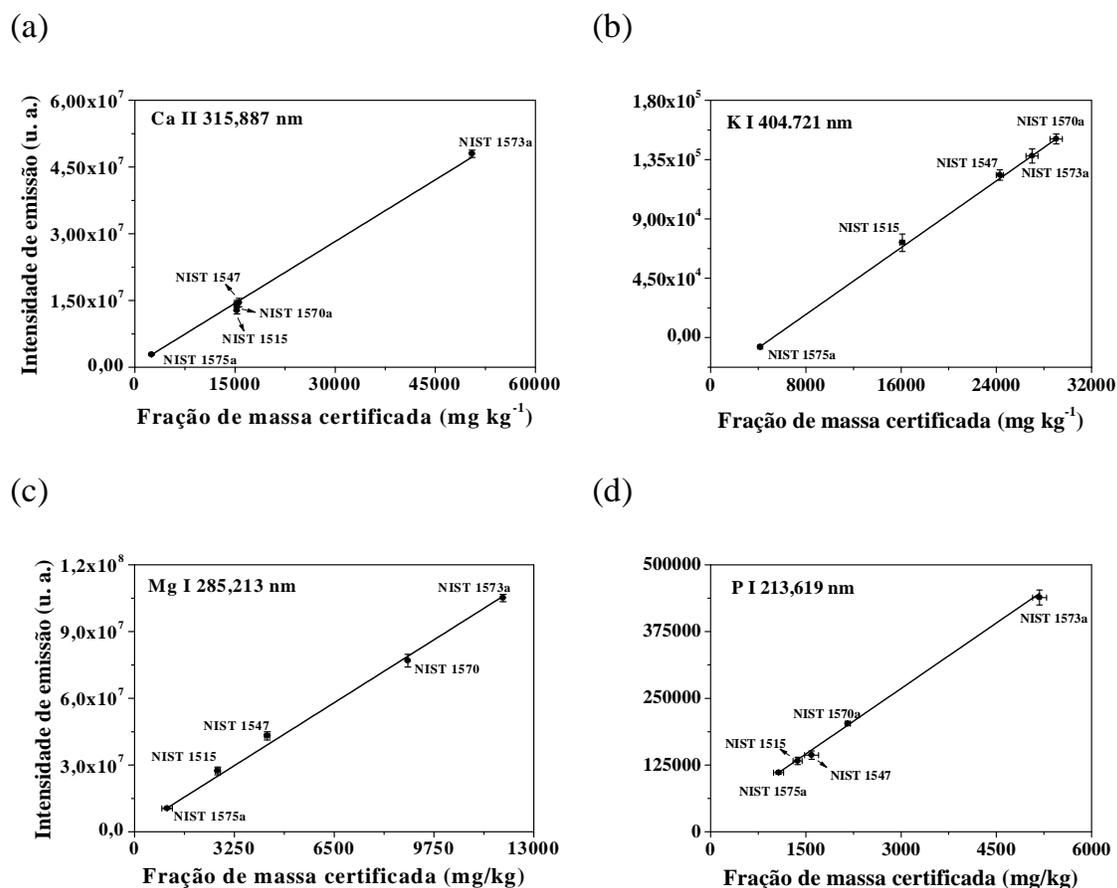


FIGURA 45 - Curvas de calibração de (a) Ca II 315,887, (b) K I 404,721, (c) Mg I 285,213 e (d) P I 213,619 obtidas a partir da análise de CRMs por LA-ICP OES com 9,0 J cm⁻². As barras de erros verticais correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 10 replicatas; 500 pulsos/replicata). As barras de erros horizontais correspondem às incertezas das frações de massa no intervalo de confiança de 95%.

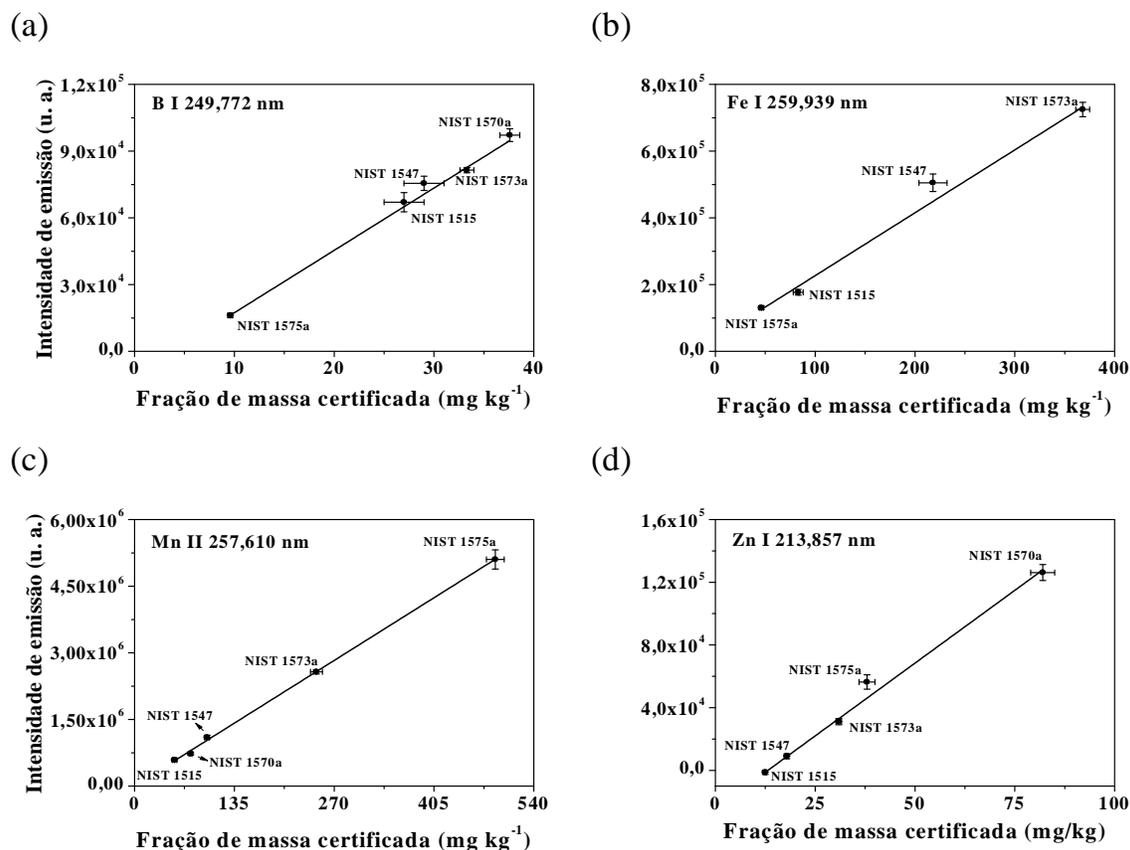


FIGURA 46 - Curvas de calibração de (a) B I 249,772, (b) Fe I 259,939, (c) Mn II 257,610 e (d) Zn I 213,617 obtidas a partir da análise de CRMs por LA-ICP OES com 9,0 J cm⁻². As barras de erros verticais correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 10 replicatas; 500 pulsos/replicata). As barras de erros horizontais correspondem às incertezas das frações de massa no intervalo de confiança de 95%.

A SNR foi calculada com base nas médias (n = 10) das intensidades de emissão dos elementos e no desvio-padrão do sinal do ruído.

As faixas de concentração dos elementos aqui estudados e os respectivos LODs são uma excelente indicação de que LA-ICP OES tem potencial para ser utilizada para análise de plantas com fins de diagnose foliar.

6 - Conclusão

De um modo geral, os resultados apresentados nesta tese mostram avanços tanto no preparo de amostras, como na calibração, para a determinação quantitativa de macro e micronutrientes em pastilhas de plantas, por LIBS como por LA-ICP OES.

O tamanho das partículas é um parâmetro intrínseco que influencia as intensidades dos sinais de emissão em LIBS. Partículas menores reduzem a porosidade das pastilhas afetando os processos de ablação. Alguns resultados apontam até 50% de aumento nos sinais de emissão para a maioria dos macro e micronutrientes. Tanto a moagem criogênica quanto a moagem com bolas foram eficientes na cominuição de folhas de plantas e podem ser recomendadas para o preparo de pastilhas visando às análises por LIBS. O tempo de cominuição necessário para a obtenção de distribuição de tamanho de partículas apropriado depende do processo de moagem, da espécie da planta e de algumas propriedades da amostra (*e.g.* teores de fibra, lignina e celulose). Os efeitos de matriz podem ser minimizados quando as pastilhas são preparadas com partículas menores que 75 μm .

Também, demonstrou-se, com amostras de folhas de cana-de-açúcar, que é possível preparar padrões com compatibilidade de matriz a partir de material cominuído submetido a procedimentos de extração em meio ácido, para a determinação de P, K, Ca, Mg, Cu, Mn e Zn por LIBS. Essa simples estratégia foi útil para aumentar a faixa de calibração utilizando-se padrões sólidos em baixas concentrações. Além disso, foi possível estimar os limites de detecção de alguns elementos com base nas medidas do branco (obtido pelo procedimento de extração) seguindo as recomendações da IUPAC. A boa exatidão dos resultados da análise de pastilhas de cana-de-açúcar comprovou a qualidade dos padrões de calibração e a possibilidade de estender este método para análises de outras

variedades de plantas, e mesmo de outros materiais, tais como solos e sedimentos, pode ser prevista em aplicações futuras.

A amostragem direta de sólidos utilizando LA-ICP OES também foi demonstrada pela primeira vez como um método promissor e alternativo a outras técnicas de análise elementar visando à determinação de macro e micronutrientes em pastilhas de materiais vegetais, podendo ser igualmente apropriada para fins de diagnose foliar. Escândio foi utilizado como padrão interno para corrigir as variações nos sinais de emissão dos analitos devido às diferenças na ablação, bem como na eficiência das partículas até o ICP OES, particularmente em pastilhas preparadas com ampla faixa de distribuição de tamanhos de partículas, como no caso de alguns materiais de folhas de cana-de-açúcar. Em geral, não foram observadas diferenças significativas nos sinais de emissão quando as pastilhas foram preparadas após 5 min de moagem na presença de Sc como padrão interno. A estratégia de calibração utilizando diferentes materiais de referência certificados de materiais vegetais é uma estratégia interessante para análises quantitativas em folhas de citros, soja e cana-de-açúcar, porém necessita de futura investigação.

7 - Referências

1. KRUG, F. J. Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. 1 Ed. Piracicaba: copiadora Luiz de Queiroz, 2008. 340 p.
2. OLIVEIRA, E. Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends. J. Brazil. Chem. Soc., **14**: 174, 2003.
3. NÓBREGA, J. A., PIROLA, C., FIALHO, L. L., ROTA, G., DE CAMPOS JORDÃO, C. E. K. M. A., POLLO, F. Microwave-assisted digestion of organic samples: How simple can it become? Talanta, **98**: 272, 2012.

4. LOMBI, E., SCHECKEL, K. G., KEMPSON, I. M. In situ analysis of metal(loid)s in plants: State of the art and artefacts. *Environ. Exp. Bot.*, **72** (1): 3, 2011.
5. SANTOS JR, D., NUNES, L. C., CARVALHO, G. G. A., GOMES, M. S., SOUZA, P. F., LEME, F. O., SANTOS, L. G. C., KRUG, F. J. Laser-induced breakdown spectroscopy for analysis of plant materials: A review. *Spectrochim. Acta B.*, **71–72**: 3, 2012.
6. CARVALHO, G. G. A., SANTOS JR, D., NUNES, L. C., GOMES, M. S., LEME, F. O., KRUG, F. J. Effect of laser focusing and fluence on the analysis of pellets of plant materials by laser induced breakdown spectrometry. *Spectrochim. Acta B.*, **74-75**: 162, 2012.
7. GOMES, M. S., SANTOS JR, D., NUNES, L. C., CARVALHO, G. G. A., LEME, F. O., KRUG, F. J. Evaluation of grinding methods for pellets preparation aiming at the analysis of plant materials by laser induced breakdown spectrometry. *Talanta*, **85**: 1744, 2011.
8. NUNES, L. C., BRAGA, J. W. B., TREVIZAN, L. C., SOUZA, P. F., CARVALHO, G. G. A., SANTOS JR, D., POPPI, R. J., KRUG, F. J. Optimization and validation of a LIBS method for the determination of macro and micronutrients in sugar cane leaves. *J. Anal. At. Spectrom.*, **25** (9): 1453, 2010.
9. BRAGA, J. W. B., TREVIZAN, L. C., NUNES, L. C., RUFINI, I. A., SANTOS JR, D., KRUG, F. J. Comparison of univariate and multivariate calibration for the determination of micronutrients in pellets of plant materials by laser induced breakdown spectrometry. *Spectrochim. Acta B.*, **65** (1): 66, 2010.
10. SANTOS JR, D., NUNES, L. C., TREVIZAN, L. C., GODOI, Q., LEME, F. O., BRAGA, J. W. B., KRUG, F. J. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for cadmium determination in soils. *Spectrochim. Acta B.*, **64** (10): 1073, 2009.
11. NUNES, L. C., SILVA, G. A., TREVIZAN, L. C., SANTOS JR, D., POPPI, R. J., KRUG, F. J. Simultaneous optimization by neuro-genetic approach for analysis of plant materials by laser induced breakdown spectroscopy. *Spectrochim. Acta B.*, **64** (6): 565, 2009.
12. TREVIZAN, L. C., SANTOS JR, D., SAMAD, R. E., VIEIRA JR, N. D., NOMURA, C. S., NUNES, L. C., RUFINI, I. A., KRUG, F. J. Evaluation of

laser induced breakdown spectroscopy for the determination of macronutrients in plant materials. *Spectrochim. Acta B.*, **63** (10): 1151, 2008.

13. SOUZA, P. F., SANTOS JR, D., CARVALHO, G. G. A., NUNES, L. C., GOMES, M. S., GUERRA, M. B. B., KRUG, F. J. Determination of silicon in plant materials by laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochim. Acta B.*, **83-84**: 61, 2013.

14. PORTO, S. I., OLIVEIRA NETO, A. A., SOUSA, F. O. B. (2012) Acompanhamento de safra brasileira : cana-de-açúcar, Segundo levantamento, Agosto/2012 Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB.

15. ADAMI, M., RUDORFF, B. F. T., FREITAS, R. M., AGUIAR, D. A., SUGAWARA, L. M., MELLO, M. P. Remote Sensing Time Series to Evaluate Direct Land Use Change of Recent Expanded Sugarcane Crop in Brazil. *Sustainability*, **4** (4): 574, 2012.

16. WWW.AGRICULTURA.GOV.BR/VEGETAL/CULTURAS/CANA-DE-ACUCAR/ (2013) Cana-de-açúcar. Acesso 15 de abril 2013.

17. Normas de Classificação de Citros de Mesa (2011). Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo - CEAGESP, São Paulo.

18. NEVES, M. F. O retrato da citricultura brasileira. Ed. CitrusBR, 2010. 139 p.

19. WWW.AGRICULTURA.GOV.BR/VEGETAL/CULTURAS/CITRUS (2013) Citros. Acesso 15 de abril 2013.

20. HIRAKURI, M. H., LAZZAROTTO, J. J. (2011) Evolução e perspectiva de desempenho econômico associados com a produção de soja nos contextos mundial e brasileiro., 3 Ed. Embrapa Soja, Londrina.

21. PORTO, S. I., OLIVEIRA NETO, A. A., SOUSA, F. O. B. (2013) Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2012/13 - Quarto Levantamento – Janeiro/2013. Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB.

22. WWW.AGRICULTURA.GOV.BR/VEGETAL/CULTURAS/SOJA/ (2013) Soja. Acesso 15 de abril 2013.

23. FAQUIN, V. Nutrição Mineral de Plantas. Ed. Lavras: Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão - FAEPE, 2005. 186 p.

24. MALAVOLTA, E. Manual de nutrição mineral de plantas. 1 Ed. São Paulo: Ceres, 2006. 631 p.

25. MALAVOLTA, E., VITTI, G. C., OLIVEIRA, S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas. 2 Ed. Piracicaba: Potafos, 1997. 319 p.
26. KALRA, Y. P. Handbook of Reference Methods for Plant Analysis. 1 Ed. CRC Press, 1998. 287 p.
27. MENGEL, K., KIRKBY, E. A. Principles of plant nutrition. 5 ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. 829 p.
28. VELOSO, C. A. C., VIÉGAS, I. J. M., OLIVEIRA, R. F., BOTELHO, S. M. Amostragem de solo e planta para análise química. 1 Ed. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2006. 40 p.
29. CARVALHO, G. G. A. Efeito da fluência na análise de pastilhas de materiais vegetais por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser. Piracicaba, Centro de Energia Nuclear na Agricultura - Universidade de São Paulo, 2011. Dissertação de Mestrado, 116 p.
30. MEYERS, R. A. Encyclopedia of Analytical Chemistry. Ed. Chichester: Wiley, 2011. 2188 p.
31. ARRUDA, M. A. Z. Trends in Sample Preparation. ed. Nova Iorque: Nova Science Pub Inc, 2007. 304 p.
32. ARAUJO, G. C. L., GONZALEZ, M. H., FERREIRA, A. G., NOGUEIRA, A. R. A., NOBREGA, J. A. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. Spectrochim. Acta B., **57** (12): 2121, 2002.
33. GONZALEZ, M. H., SOUZA, G. B., OLIVEIRA, R. V., FORATO, L. A., NOBREGA, J. A., NOGUEIRA, A. R. A. Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products. Talanta, **79** (2): 396, 2009.
34. MARKERT, B. Sample preparation (cleaning, drying, homogenization) for trace element analysis in plant matrices. Sci. Total Environ., **176** (1-3): 45, 1995.
35. NOMURA, C. S., SILVA, C. S., OLIVEIRA, P. V. Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite: uma revisão. Quim. Nova, **31** (1): 104, 2008.
36. KRATOCHVIL, B., WALLACE, D., TAYLOR, J. K. Sampling for chemical analysis. Anal. Chem., **56** (5): 113R, 1984.

37. ROSSBACH, M., ZEILLER, E. Assessment of element-specific homogeneity in reference materials using microanalytical techniques. *Anal. Bioanal. Chem.*, **377** (2): 334, 2003.
38. KURFÜRST, U. *Solid Sample Analysis: Direct and Slurry Sampling using GF-AAS and ETV-ICP*. Ed. Berlin: Springer, 1998. 443 p.
39. ZEISLER, R. Reference materials for small-sample analysis. *Fresen. J. Anal. Chem.*, **360** (3-4): 376, 1998.
40. STOEPLER, M., WOLF, W. R., JENKS, P. J. *Reference Materials for Chemical Analysis: Certification, Availability and Proper Usage*. Ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2001. 297 p.
41. PAUWELS, J., HOFMANN, C., VANDECASTEELE, C. On the usefulness of SS-ZAAS for the microhomogeneity control of CRM's. *Fresen. J. Anal. Chem.*, **348** (7): 418, 1994.
42. ENGELSEN, C., WIBETOE, G. Determination of Al, Cu, Li and Mn in spruce seeds and plant reference materials by slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Fresen. J. Anal. Chem.*, **366** (5): 494, 2000.
43. SANTOS JR, D., BARBOSA, F., TOMAZELLI, A. C., KRUG, F. J., NOBREGA, J. A., ARRUDA, M. A. Z. Determination of Cd and Pb in food slurries by GFAAS using cryogenic grinding for sample preparation. *Anal. Bioanal. Chem.*, **373** (3): 183, 2002.
44. SANTOS, W. P. C., HATJE, V., LIMA, L. N., TRIGNANO, S. V., BARROS, F., CASTRO, J. T., KORN, M. G. A. Evaluation of sample preparation (grinding and sieving) of bivalves, coffee and cowpea beans for multi-element analysis. *Microchem J.*, **89** (2): 123, 2008.
45. KOGLIN, D., BACKHAUS, F., SCHLADOT, J. D. Particle size distribution in ground biological samples. *Chemosphere*, **34** (9-10): 2041, 1997.
46. ARROYO, L., TREJOS, T., GARDINALI, P. R., ALMIRALL, J. R. Optimization and validation of a Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry method for the routine analysis of soils and sediments. *Spectrochim. Acta B.*, **64** (1): 16, 2009.
47. WWW.NIST.GOV/SRM/ (2013). Acesso 16 de abril 2013.
48. BAUDELET, M., SMITH, B. W. The first years of laser-induced breakdown spectroscopy. *J. Anal. At. Spectrom.*, **28**: 624, 2013.

49. SCHAWLOW, A. L., TOWNES, C. H. Infrared and Optical Masers. *Phys. Rev.*, **112** (6): 1940, 1958.
50. MAIMAN, T. H. Stimulated Optical Radiation in Ruby. *Nature*, **187** (4736): 493, 1960.
51. SANTOS JR, D., TARELHO, L. V. G., KRUG, F. J., MILOR, D. M. B. P., NETO, L. M., JUNIOR, N. D. V. Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) - Fundamentos, aplicações e perspectivas. *Analytica*, **24**: 72, 2006.
52. WINEFORDNER, J. D., GORNUSHKIN, I. B., CORRELL, T., GIBB, E., SMITH, B. W., OMENETTO, N. Comparing several atomic spectrometric methods to the super stars: special emphasis on laser induced breakdown spectrometry, LIBS, a future super star. *J. Anal. At. Spectrom.*, **19** (9): 1061, 2004.
53. RUNGE, E. F., MINCK, R. W., BRYAN, F. R. Spectrochemical analysis using a pulsed laser source. *Spectrochim. Acta B.*, **20** (4): 733, 1964.
54. CREMERS, D. A., RADZIEMSKI, L. J. Handbook of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. Ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2006. 302 p.
55. MIZIOLEK, A. W., PALLESCHI, V., SCHECHTER, I. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS): Fundamentals and Applications. Ed. New York: Cambridge University Press, 2006. 620 p.
56. SINGH, J. P., THAKUR, S. N. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. 1 Ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2007. 454 p.
57. PASQUINI, C., CORTEZ, J., SILVA, L. M. C., GONZAGA, F. B. Laser Induced Breakdown Spectroscopy. *J. Brazil. Chem. Soc.*, **18** (3): 463, 2007.
58. NOLL, R. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy - Fundamentals and Applications. Ed. Berlin: Springer, 2012. 543 p.
59. SABSABI, M., CIELO, P. Quantitative Analysis of Aluminum Alloys by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy and Plasma Characterization. *Appl. Spectrosc.*, **49** (4): 499, 1995.
60. RADZIEMSKI, L. J. From LASER to LIBS, the path of technology development. *Spectrochim. Acta B.*, **57** (7): 1109, 2002.
61. HAHN, D. W., OMENETTO, N. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), Part I: Review of Basic Diagnostics and Plasma-Particle Interactions:

- Still-Challenging Issues Within the Analytical Plasma Community. *Appl. Spectrosc.*, **64** (12): 335a, 2010.
62. HAHN, D. W., OMENETTO, N. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), Part II: Review of Instrumental and Methodological Approaches to Material Analysis and Applications to Different Fields. *Appl. Spectrosc.*, **66** (4): 347, 2012.
63. LEE, W. B., WU, J. Y., LEE, Y. I., SNEDDON, J. Recent applications of laser-induced breakdown spectrometry: A review of material approaches. *Appl. Spectrosc. Rev.*, **39** (1): 27, 2004.
64. FANTONI, R., CANEVE, L., COLAO, F., FORNARINI, L., LAZIC, V., SPIZZICHINO, V. Methodologies for laboratory Laser Induced Breakdown Spectroscopy semi-quantitative and quantitative analysis-A review. *Spectrochim. Acta B.*, **63** (10): 1097, 2008.
65. PATHAK, A. K., KUMAR, R., SINGH, V. K., AGRAWAL, R., RAI, S., RAI, A. K. Assessment of LIBS for Spectrochemical Analysis: A Review. *Appl. Spectrosc. Rev.*, **47** (1): 14, 2012.
66. SINGH, V. K., RAI, A. K. Prospects for laser-induced breakdown spectroscopy for biomedical applications: a review. *Laser Med. Sci.*, **26** (5): 673, 2011.
67. FORTES, F. J., LASERNA, J. J. The development of fieldable laser-induced breakdown spectrometer: No limits on the horizon. *Spectrochim. Acta B.*, **65** (12): 975, 2010.
68. GAUDIUSO, R., DELL'AGLIO, M., DE PASCALE, O., SENESI, G. S., DE GIACOMO, A. Laser Induced Breakdown Spectroscopy for Elemental Analysis in Environmental, Cultural Heritage and Space Applications: A Review of Methods and Results. *Sensors*, **10** (8): 7434, 2010.
69. KAISER, J., NOVOTNÝ, K., MARTIN, M. Z., HRDLIČKA, A., MALINA, R., HARTL, M., ADAM, V., KIZEK, R. Trace elemental analysis by laser-induced breakdown spectroscopy - Biological applications. *Surf. Sci. Rep.*, **67** (11–12): 233, 2012.
70. EVANS, E. H., DAY, J. A., PALMER, C. D., SMITH, C. M. M. Atomic Spectrometry Update. Advances in atomic spectrometry and related techniques. *J. Anal. At. Spectrom.*, **24** (6): 711, 2009.

71. YAO, S., LU, J., LI, J., CHEN, K., LI, J., DONG, M. Multi-elemental analysis of fertilizer using laser-induced breakdown spectroscopy coupled with partial least squares regression. *J. Anal. At. Spectrom.*, **25** (11): 1733, 2010.
72. BURAKOV, V. S., TARASENKO, N. V., NEDELKO, M. I., KONONOV, V. A., VASILEV, N. N., ISAKOV, S. N. Analysis of lead and sulfur in environmental samples by double pulse laser induced breakdown spectroscopy. *Spectrochim. Acta B.*, **64** (2): 141, 2009.
73. EVANS, E. H., DAY, J. A., PALMER, C. D., SMITH, C. M. M. Advances in atomic spectrometry and related techniques. *J. Anal. At. Spectrom.*, **26** (6): 1115, 2011.
74. KUMAR, A., YUEH, F.-Y., SINGH, J. P., BURGESS, S. Characterization of Malignant Tissue Cells by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Appl. Optics*, **43** (28): 5399, 2004.
75. SANTOS JR, D., SAMAD, R. E., TREVIZAN, L. C., FREITAS, A. Z., VIEIRA, N. D., KRUG, F. J. Evaluation of Femtosecond Laser-Induced Breakdown Spectroscopy for Analysis of Animal Tissues. *Appl. Spectrosc.*, **62** (10): 1137, 2008.
76. CARVALHO, G. G. A., NUNES, L. C., SOUZA, P. F., KRUG, F. J., ALEGRE, T. C., SANTOS JR, D. Evaluation of laser induced breakdown spectrometry for the determination of macro and micronutrients in pharmaceutical tablets. *J. Anal. At. Spectrom.*, **25**: 803, 2010.
77. FINK, H., PANNE, U., NIESSNER, R. Process analysis of recycled thermoplasts from consumer electronics by laser-induced plasma spectroscopy. *Anal. Chem.*, **74** (17): 4334, 2002.
78. GODOI, Q., LEME, F. O., TREVIZAN, L. C., PEREIRA, E. R., RUFINI, I. A., SANTOS JR, D., KRUG, F. J. Laser-induced breakdown spectroscopy and chemometrics for classification of toys relying on toxic elements. *Spectrochim. Acta B.*, **66** (2): 138, 2011.
79. GODOI, Q., SANTOS JR, D., NUNES, L. C., LEME, F. O., RUFINI, I. A., AGNELLI, J. A. M., TREVIZAN, L. C., KRUG, F. J. Preliminary studies of laser-induced breakdown spectrometry for the determination of Ba, Cd, Cr and Pb in toys. *Spectrochim. Acta B.*, **64** (6): 573, 2009.
80. LEME, F. O., GODOI, Q., KIYATAKA, P. H. M., SANTOS JR, D., AGNELLI, J. A. M., KRUG, F. J. Effect of pulse repetition rate and number of pulses in the analysis of polypropylene and high density polyethylene by

nanosecond infrared laser induced breakdown spectroscopy. *Appl. Surf. Sci.*, **258** (8): 3598, 2012.

81. GETHING, B. A., JANOWIAK, J. J., FALK, R. H. Assessment of laser induced breakdown spectroscopy (LIBS) for classification of preservative in CCA-treated lumber. *Forest Prod. J.*, **59** (3): 67, 2009.

82. MARTIN, M. Z., LABBÉ, N., ANDRÉ, N., HARRIS, R., EBINGER, M., WULLSCHLEGER, S. D., VASS, A. A. High resolution applications of laser-induced breakdown spectroscopy for environmental and forensic applications. *Spectrochim. Acta B.*, **62** (12): 1426, 2007.

83. MARTIN, M. Z., LABBÉ, N., RIALS, T. G., WULLSCHLEGER, S. D. Analysis of preservative-treated wood by multivariate analysis of laser-induced breakdown spectroscopy spectra. *Spectrochim. Acta B.*, **60** (7-8): 1179, 2005.

84. MOSKAL, T. M., HAHN, D. W. On-line sorting of wood treated with chromated copper arsenate using laser-induced breakdown spectroscopy. *Appl. Spectrosc.*, **56** (10): 1337, 2002.

85. SOLO-GABRIELE, H. M., TOWNSEND, T. G., HAHN, D. W., MOSKAL, T. M., HOSEIN, N., JAMBECK, J., JACOBI, G. Evaluation of XRF and LIBS technologies for on-line sorting of CCA-treated wood waste. *Waste Manage.*, **24** (4): 413, 2004.

86. UHL, A., LOEBE, K., KREUCHWIG, L. Fast analysis of wood preservers using laser induced breakdown spectroscopy. *Spectrochim. Acta B.*, **56** (6): 795, 2001.

87. CAHOON, E. M., ALMIRALL, J. R. Wavelength dependence on the forensic analysis of glass by nanosecond 266 nm and 1064 nm laser induced breakdown spectroscopy. *Appl. Optics*, **49** (13): C49, 2010.

88. JANTZI, S. C., ALMIRALL, J. R. Characterization and forensic analysis of soil samples using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). *Anal. Bioanal. Chem.*, **400** (10): 3341, 2011.

89. SCHENK, E. R., ALMIRALL, J. R. Elemental analysis of cotton by laser-induced breakdown spectroscopy. *Appl. Opt.*, **49** (13): C153, 2010.

90. TREJOS, T., FLORES, A., ALMIRALL, J. R. Micro-spectrochemical analysis of document paper and gel inks by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry and laser induced breakdown spectroscopy. *Spectrochim. Acta B.*, **65** (11): 884, 2010.

91. GOTTFRIED, J. L., DE LUCIA, F. C., MUNSON, C. A., MIZIOLEK, A. W. Laser-induced breakdown spectroscopy for detection of explosives residues: a review of recent advances, challenges, and future prospects. *Anal. Bioanal. Chem.*, **395** (2): 283, 2009.
92. DE LUCIA, F. C., GOTTFRIED, J. L., MUNSON, C. A., MIZIOLEK, A. W. Current Status of Standoff LIBS Security Applications at the United States Army Research Laboratory. *Spectroscopy-U.S.*, **24** (6): 29, 2009.
93. DE LUCIA, F. C., GOTTFRIED, J. L., MIZIOLEK, A. W. Evaluation of femtosecond laser-induced breakdown spectroscopy for explosive residue detection. *Opt. Express*, **17** (2): 419, 2009.
94. GOTTFRIED, J. L., DE LUCIA, F. C., MIZIOLEK, A. W. Discrimination of explosive residues on organic and inorganic substrates using laser-induced breakdown spectroscopy. *J. Anal. At. Spectrom.*, **24** (3): 288, 2009.
95. JURADO-LOPEZ, A., DE CASTRO, M. D. L. Chemometric approach to laser-induced breakdown analysis of gold alloys. *Appl. Spectrosc.*, **57** (3): 349, 2003.
96. JURADO-LOPEZ, A., DE CASTRO, M. D. L. Laser-induced breakdown spectrometry in jewellery industry. Part II: quantitative characterisation of goldfilled interface. *Talanta*, **59** (2): 409, 2003.
97. JURADO-LOPEZ, A., DE CASTRO, M. D. L. Laser-induced breakdown spectrometry in the jewellery industry. Part I. Determination of the layer thickness and composition of gold-plated pieces. *J. Anal. At. Spectrom.*, **17** (5): 544, 2002.
98. SUN, Q., TRAN, M., SMITH, B. W., WINEFORDNER, J. D. Direct determination of P, Al, Ca, Cu, Mn, Zn, Mg and Fe in plant materials by laser-induced plasma spectroscopy. *Can. J. Anal. Sci. Spectros.*, **44** (6): 164, 1999.
99. CHO, H. H., KIM, Y. J., JO, Y. S., KITAGAWA, K., ARAI, N., LEE, Y. I. Application of laser-induced breakdown spectrometry for direct determination of trace elements in starch-based flours. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **16** (6): 622, 2001.
100. GORNUSHKIN, S. I., GORNUSHKIN, I. B., ANZANO, J. M., SMITH, B. W., WINEFORDNER, J. D. Effective normalization technique for correction of matrix effects in laser-induced breakdown spectroscopy detection of magnesium in powdered samples. *Appl. Spectrosc.*, **56** (4): 433, 2002.

101. ASSION, A., WOLLENHAUPT, M., HAAG, L., MAYOROV, F., SARPE-TUDORAN, C., WINTER, M., KUTSCHERA, U., BAUMERT, T. Femtosecond laser-induced-breakdown spectrometry for Ca^{2+} analysis of biological samples with high spatial resolution. *Appl. Phys. B-Lasers O*, **77** (4): 391, 2003.
102. WAGNER, R. J., KAYE, M. W., ABRAMS, M. D., HANSON, P. J., MARTIN, M. Tree-Ring Growth and Wood Chemistry Response to Manipulated Precipitation Variation for Two Temperate Quercus Species. *Tree-Ring Res.*, **68** (1): 17, 2012.
103. SAMEK, O., LAMBERT, J., HERGENRODER, R., LISKA, M., KAISER, J., NOVOTNY, K., KUKHLEVSKY, S. Femtosecond laser spectrochemical analysis of plant samples. *Laser Phys. Lett.*, **3** (1): 21, 2006.
104. KAISER, J., SAMEK, O., REALE, L., LISKA, M., MALINA, R., RITUCCI, A., POMA, A., TUCCI, A., FLORA, F., LAI, A., MANCINI, L., TROMBA, G., ZANINI, F., FAENOV, A., PIKUZ, T., CINQUE, G. Monitoring of the heavy-metal hyperaccumulation in vegetal tissues by X-ray radiography and by femto-second laser induced breakdown spectroscopy. *Microsc. Res. Tech.*, **70** (2): 147, 2007.
105. GALIOVÁ, M., KAISER, J., NOVOTNÝ, K., SAMEK, O., REALE, L., MALINA, R., PÁLENÍKOVÁ, K., LISKA, M., CUDEK, V., KANICKÝ, V., OTRUBA, V., POMA, A., TUCCI, A. Utilization of laser induced breakdown spectroscopy for investigation of the metal accumulation in vegetal tissues. *Spectrochim. Acta B.*, **62** (12): 1597, 2007.
106. KAISER, J., GALIOVÁ, M., NOVOTNY, K., REALE, L., STEJSKA, K., SAMEK, O., MALINA, R., PÁLENÍKOVÁ, K., ADAM, V., KIZEK, R. Utilization of the Laser Induced Plasma Spectroscopy for monitoring of the metal accumulation in plant tissues with high spatial resolution. *Mod. Res. Educ. Top. Microsc.*, **1**: 434, 2007.
107. GALIOVA, M., KAISER, J., NOVOTNY, K., NOVOTNY, J., VACULOVIC, T., LISKA, M., MALINA, R., STEJSKAL, K., ADAM, V., KIZEK, R. Investigation of heavy-metal accumulation in selected plant samples using laser induced breakdown spectroscopy and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Appl. Phys. A-Mater.*, **93** (4): 917, 2008.
108. KRIZKOVA, S., RYANT, P., KRYSOFOVA, O., ADAM, V., GALIOVA, M., BEKLOVA, M., BABULA, P., KAISER, J., NOVOTNY, K., NOVOTNY, J., LISKA, M., MALINA, R., ZEHNÁLEK, J., HUBÁLEK, J., HAVEL, L., KIZEK, R. Multi-instrumental analysis of tissues of sunflower

- plants treated with silver (I) ions - Plants as bioindicators of environmental pollution. *Sensors*, **8** (1): 445, 2008.
109. OHTA, T., ITO, M., KOTANI, T., HATTORI, T. Emission Enhancement of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy by Localized Surface Plasmon Resonance for Analyzing Plant Nutrients. *Appl. Spectrosc.*, **63** (5): 555, 2009.
110. POUZAR, M., CERNOHORSKY, T., PRUSOVA, M., PROKOPCAKOVA, P., KREJCOVA, A. LIBS analysis of crop plants. *J. Anal. At. Spectrom.*, **24** (7): 953, 2009.
111. VERBI PEREIRA, F. M., BASTOS PEREIRA MILORI, D. M., VENANCIO, A. L., TAVARES RUSSO, M. D. S., MARTINS, P. K., FREITAS-ASTUA, J. Evaluation of the effects of *Candidatus Liberibacter asiaticus* on inoculated citrus plants using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) and chemometrics tools. *Talanta*, **83** (2): 351, 2010.
112. GOMES, M. S., CARVALHO, G. G. A., SANTOS JR, D., KRUG, F. J. A novel strategy for preparing calibration standards for the analysis of plant materials by laser-induced breakdown spectroscopy: A case study with pellets of sugar cane leaves. *Spectrochim. Acta B.*, **86**: 137, 2013.
113. GINÉ, M. F. Espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS). Ed. Piracicaba: CENA, 1999. 118 p.
114. MONTASER, A. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Ed. Nova Iorque: Wiley-VCH, 1998. 1004 p.
115. HOUK, R. S., FASSEL, V. A., FLESCHE, G. D., SVEC, H. J., GRAY, A. L., TAYLOR, C. E. Inductively coupled argon plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements. *Anal. Chem.*, **52** (14): 2283, 1980.
116. MONTASER, A., GOLIGHTLY, D. W. Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry. 2 Ed. Nova Iorque: Wiley-VCH, 1992. 1040 p.
117. GRAY, A. L. Solid sample introduction by laser ablation for inductively coupled plasma source mass spectrometry. *Analyst*, **110** (5): 551, 1985.
118. THOMPSON, M., GOULTER, J. E., SIEPER, F. Laser ablation for the introduction of solid samples into an inductively coupled plasma for atomic-emission spectrometry. *Analyst*, **106** (1258): 32, 1981.

119. WARD, N. I., DURRANT, S. F., GRAY, A. L. Analysis of Biological Standard Reference Materials by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass-Spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, **7** (7): 1139, 1992.
120. BECKER, J. S., DIETRICH, R. C., MATUSCH, A., POZEBON, D., DRESSLER, V. L. Quantitative images of metals in plant tissues measured by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochim. Acta B.*, **63** (11): 1248, 2008.
121. KAISER, J., GALIOVÁ, M., NOVOTNÝ, K., CERVENKA, R., REALE, L., NOVOTNÝ, J., LISKA, M., SAMEK, O., KANICKÝ, V., HRDLICKA, A., STEJSKAL, K., ADAM, V., KIZEK, R. Mapping of lead, magnesium and copper accumulation in plant tissues by laser-induced breakdown spectroscopy and laser-ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochim. Acta B.*, **64** (1): 67, 2009.
122. MORADI, A. B., SWOBODA, S., ROBINSON, B., PROHASKA, T., KAESTNER, A., OSWALD, S. E., WENZEL, W. W., SCHULIN, R. Mapping of nickel in root cross-sections of the hyperaccumulator plant *Berkheya coddii* using laser ablation ICP-MS. *Environ. Exp. Bot.*, **69** (1): 24, 2010.
123. PUNSHON, T., JACKSON, B. P., BERTSCH, P. M., BURGER, J. Mass loading of nickel and uranium on plant surfaces: application of laser ablation-ICP-MS. *J. Environ. Monit.*, **6** (2): 153, 2004.
124. WU, B., CHEN, Y., BECKER, J. S. Study of essential element accumulation in the leaves of a Cu-tolerant plant *Elsholtzia splendens* after Cu treatment by imaging laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Anal. Chim. Acta*, **633** (2): 165, 2009.
125. WU, B., ZORIY, M., CHEN, Y., BECKER, J. S. Imaging of nutrient elements in the leaves of *Elsholtzia splendens* by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Talanta*, **78** (1): 132, 2009.
126. SANTOS JR, D., BARBOSA, F., SOUZA, S. S., KRUG, F. J. Cryogenic sample grinding for copper, lead and manganese determination in human teeth by slurry sampling GFAAS. *J. Anal. At. Spectrom.*, **18** (8): 939, 2003.
127. CUNNIFF, P. Official methods of analysis of AOAC International. 16 Ed. Arlington: 1995.
128. SILVA, F. V., TREVIZAN, L. C., SILVA, C. S., NOGUEIRA, A. R. A., NÓBREGA, J. A. Evaluation of inductively coupled plasma optical emission spectrometers with axially and radially viewed configurations. *Spectrochim. Acta B.*, **57** (12): 1905, 2002.

129. TREVIZAN, L. C., VIEIRA, E. C., NOGUEIRA, A. R. A., NÓBREGA, J. A. Use of factorial design for evaluation of plasma conditions and comparison of two liquid sample introduction systems for an axially viewed inductively coupled plasma optical emission spectrometer. *Spectrochim. Acta B.*, **60** (5): 575, 2005.
130. KRAMIDA, A. E., RALCHENKO, Y., READER, J., (2012)., N. A. T. (2012) NIST Atomic Spectra Database (ver. 5.0), [Online]. National Institute of Standards and Technology. <http://physics.nist.gov/asd> [7 de Fevereiro de 2011]. 2013.
131. KUZNETSOVA, A. I., MORGULIS, T. E. Investigation of Internal Standardization for Atomic Emission Spectrometric Analysis with Direct-Current Arc Excitation. *J. Anal. At. Spectrom.*, **3** (7): 973, 1988.
132. SCHENK, E. R., ALMIRALL, J. R. Elemental analysis of glass by laser ablation inductively coupled plasma optical emission spectrometry (LA-ICP-OES). *Forensic Sci. Int.*, **217** (1-3): 222, 2012.
133. CURRIE, L. A. Detection and quantification limits: origins and historical overview. *Anal. Chim. Acta*, **391** (2): 127, 1999.
134. ARAGÓN, C., PEÑALBA, F., AGUILERA, J. A. Curves of growth of neutral atom and ion lines emitted by a laser induced plasma. *Spectrochim. Acta B.*, **60** (7-8): 879, 2005.
135. GY, P. M. Sampling of heterogeneous and dynamic material systems : theories of heterogeneity, sampling, and homogenizing. Ed. Amsterdam: Elsevier Science Publisher B. V., 1992. 684 p.
136. RANDY, P. J. Plant Biology. Ed. New York: IDG Books Worldwide, Inc., 2001. 245 p.
137. VAN SOEST, P. J. Nutritional ecology of the ruminant. 2 Ed. Nova Iorque: Cornell University Press, 1994. 476 p.
138. M. D. LUQUE-DE-CASTRO, J. L. L. GARCÍA. Acceleration and automation of solid sample treatment. Ed. Amsterdam: Elsevier, 2002. 540 p.
139. LAL, B., ST-ONGE, L., YUEH, F.-Y., SINGH, J. P. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. Ed. Amsterdam: Elsevier, 2007. 287 p.
140. MIYAZAWA, M., PAVAN, M. A., BLOCH, M. F. M. Avaliação de métodos com e sem digestão para extração de elementos em tecidos de plantas. *Cien. Cult.*, **36** (11): 1953, 1984.

141. MIYAZAWA, M., PAVAN, M. A., BLOCH, M. F. M. Determination of Ca, Mg, K, Mn, Cu, Zn, Fe, and P in coffee, soybean, corn, sunflower, and pasture grass leaf tissues by a HCl extraction method. *Commun. Soil Sci. Plan.*, **15** (2): 141, 1984.
142. MIYAZAWA, M., PAVAN, M. A., BLOCH, M. F. M., ARISTIDES, P. S. A., SOUZA, G. B., ESTEVES, S. N. Determinação de Co em fezes de bovinos pelo método de extração HCl 1M. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **27** (10): 1415, 1992.
143. SUCHAROVÁ, J., SUCHARA, I. Determination of 36 elements in plant reference materials with different Si contents by inductively coupled plasma mass spectrometry: Comparison of microwave digestions assisted by three types of digestion mixtures. *Anal. Chim. Acta*, **576** (2): 163, 2006.
144. CURRIE, L. A. Nomenclature in Evaluation of Analytical Methods Including Detection and Quantification Capabilities (Iupac Recommendations 1995). *Pure Appl. Chem.*, **67** (10): 1699, 1995.
145. EBDON, L., FOULKES, M., SUTTON, K. Slurry nebulization in plasmas. *J. Anal. At. Spectrom.*, **12** (2): 213, 1997.
146. ROSSBACH, M., OSTAPCZUK, P., EMONS, H. Microhomogeneity of candidate reference materials: Comparison of solid sampling Zeeman-AAS with INAA. *Fresen. J. Anal. Chem.*, **360** (3-4): 380, 1998.
147. MOTELICA-HEINO, M., DONARD, O. F. X., MERMET, J. M. Laser ablation of synthetic geological powders using ICP-AES detection: effects of the matrix, chemical form of the analyte and laser wavelength. *J. Anal. At. Spectrom.*, **14** (4): 675, 1999.