UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

GABRIEL GUSTINELLI ARANTES DE CARVALHO

Análise de pastilhas de plantas por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser em regimes temporais de nano- e de femtossegundos

Piracicaba
2015

GABRIEL GUSTINELLI ARANTES DE CARVALHO

Análise de pastilhas de plantas por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser em regimes temporais de nano- e de femtossegundos

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Krug
Co-orientador: Prof. Dr. Dário Santos Júnior

Piracicaba

2015

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

De Carvalho, Gabriel Gustinelli Arantes

Análise de pastilhas de plantas por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser em regimes temporais de nano- e de femtossegundos / Gabriel Gustinelli Arantes De Carvalho; orientador Francisco José Krug; co-orientador Dário Santos Junior. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

156 p. : il.

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

1. Análise espectroscópica 2. Diagnose foliar 3. Espectrometria 4. Espectroscopia atômica 5. Laser 6. Microanálise 7. Nutrientes I. Título

CDU (543.423 + 543.062) : 633

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria Arlete e Antonio Carlos,
pelo amor e carinho e pela estrutura
familiar que permitiu que eu
chegasse até aqui.

À minha amada Priscila pelo amor, carinho,
companheirismo e paciência ao
longo desses anos

AGRADECIMENTOS

Ao meu grande amigo e Professor Francisco José Krug por acreditar no meu potencial e ter me concedido a oportunidade de realizar o doutorado sob sua orientação, pelas discussões que contribuíram com o meu crescimento, e pelos ensinamentos e valores éticos que levarei pelo resto da vida.

Ao meu grande amigo e Professor Dário Santos Jr. pelo incentivo, pelas discussões muito produtivas e pelos inúmeros momentos de descontração.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas de estudos concedidas e pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento do projeto (Processos 2010/16379-0 e 2013/09260-5).

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura pela estrutura disponibilizada para realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do CENA pelo apoio, em especial, aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação Daiane, Fábio e Neuda.

Ao meu grande amigo José Roberto Ferreira (Zé Santista) pela oportunidade de ingressar no meio científico e pela convivência muito amistosa ao longo desses anos.

Aos professores do Laboratório de Química Analítica “Henrique Bergamin Filho” do CENA-USP Boaventura F. dos Reis, Elias A. G. Zagatto, Fábio R. P. Rocha e Maria Fernanda Giné pela convivência e discussões diárias

À querida amiga Tatinha pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho e pela convivência muito amistosa ao longo desses anos.

Aos amigos Flavio Leme, Marcos da Silva Gomes, Milton Sasaki e Mário Feres pelas contribuições e momentos de descontração.

Aos amigos e companheiros de Laboratório Andressa Adame, Kennedy Aragão, Lidiane Nunes, Lidiane Peruchi, Marcelo Guerra, Paula Packer, Paulino de Souza e Quienly Godoi, pela agradável convivência e contribuições.

Aos técnicos do Laboratório de Química Analítica “Henrique Bergamin Filho” do CENA-USP Fátima Patreze, Sheila Perdigão e Valdemir Barros.

Ao Professor Javier Laserna pelas oportunidades e supervisão durante o estágio na Universidad de Málaga, e por me apresentar novos pontos de vista e novas estratégias para o desenvolvimento de pesquisas.

Ao meu grande amigo Javier Moros (Xavi) pelo apoio científico e discussões durante o estágio na Universidad de Málaga, e, principalmente, pelo apoio e convivência muito amistosa e agradável.

Aos amigos Jorge Serrano e Inma Gaona da Universidad de Málaga que transformaram nossa convivência diária em momentos especiais.

Aos amigos do Laboratório Láser da Universidad de Málaga José Miguel Vadillo, Javier Ruiz, Luisa Cabalín, Patricia Lucena, Marina López, Irene Carrasco, Fco. Javier Fortes, Salvador Guirado, Tomáz Delgado e Cármen González pela excelente recepção e convivência diária.

Ao Dr. Eduardo de Almeida (Laboratório de Instrumentação Nuclear do CENA) pelo apoio com as análises por EDXRF.

Ao Dr. Márcio Bacchi (Laboratório de Radioisótopos do CENA) pelo apoio com as análises de tamanho de partículas.

À Dra. Ana Rita Nogueira (Embrapa Pecuária Sudeste) pelo apoio com as análises por ICP OES.

Ao João Geraldo Brancalion pelo apoio na edição de imagens.

À Marília Henyei pela editoração desta tese.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;
não fosse por elas, eu não teria
saído do lugar”

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

CARVALHO, G. G. A. **Análise de pastilhas de plantas por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser em regimes temporais de nano- e de femtossegundos**. 2015. 156 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

A influência das variáveis associadas ao laser como a fluência, o comprimento de onda, e a duração do pulso, assim como as relacionadas às propriedades das amostras, como a distribuição do tamanho das partículas e as características químicas da matriz, foram avaliadas visando à determinação quantitativa de macro- (P, K, Ca, Mg) e micronutrientes (Cu, Fe, Mn, Zn, B) em pastilhas de materiais vegetais por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS). Os efeitos da distribuição do tamanho das partículas e da fluência do laser foram investigados a partir da análise de amostras peneiradas (150-20 µm) empregando-se um sistema LIBS, em regime temporal de nanossegundos (ns-LIBS), montado com um laser de Nd:YAG a 1064 nm (pulsos de 5 ns e 360 mJ)e um espectrômetro com óptica *Echelle* e detector *ICCD*. Observou-se um aumento na sensibilidade e na precisão das medições com a diminuição do tamanho das partículas usadas no preparo das pastilhas, e uma diminuição dos efeitos de matriz causados por diferenças no tamanho das partículas, quando pastilhas preparadas com partículas < 75 µm foram analisadas com pulsos de 50 J cm^{-2}. Verificou-se uma melhora significativa na exatidão das medições de Mg, Fe, Mn e Zn feitas em um conjunto de pastilhas de folhas de cana-de-açúcar (partículas < 75 µm) empregando-se esta fluência. Em uma segunda etapa, observou-se que variações no comprimento de onda do laser de Nd:YAG (1064, 532, 355 e 266 nm) não influenciaram de maneira significativa a precisão e exatidão das medições em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar, obtendo-se correlações lineares entre as intensidades dos sinais de emissão e as correspondentes frações de massa dos analitos. Variações no comprimento de onda do laser de Nd:YAG não afetaram a análise de um conjunto heterogêneo de amostras, composto por pastilhas de folhas de plantas de diferentes espécies, como soja, cana-de-açúcar, milho, citros, café, por exemplo, por ns-LIBS. No entanto, diferentemente do observado para o conjunto de pastilhas de folhas de cana-de-açúcar, observou-se, uma baixa correlação (r_{cal} < 0,90) entre as frações de massa de Ca, Mg, P, Cu, Fe, Mn e Zn determinadas por ns-LIBS e os valores de referência, o que demonstra a baixa robustez de ns-LIBS frente às variações na composição química das matrizes. Posteriormente, analisou-se este conjunto heterogêneo de amostras com sistema LIBS, em regime temporal de femtossegundos (fs-LIBS), montado com laser de Ti:Safira (pulsos de 60 fs e 1,65 mJ) e espectrômetro com óptica *Czerny-Turner* e *ICCD*. Demonstrou-se que o uso de pulsos em regime de fs proporcionou calibrações e validação menos dependentes da composição química das matrizes. As frações de massa de Ca, Mg, P, Fe e Mn previstas por fs-LIBS foram estatisticamente concordantes com os valores de referência, independentemente do modelo de calibração usado. Além disso, o uso de calibração multivariada melhorou a capacidade preditiva de ns-LIBS, assemelhando-se à de fs-LIBS. Concluiu-se que o emprego de fs-LIBS foi a estratégia mais robusta e que ofereceu maior flexibilidade à variabilidade matricial.

Palavras-chave: LIBS. Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser. Laser de femtossegundos. Laser de nanossegundos. Determinação de macro- e micronutrientes. Plantas. Preparo de amostras. Calibração.

ABSTRACT

CARVALHO, G. G. A. **Nanosecond and femtosecond laser-induced breakdown spectroscopy for the analysis of pellets of plant materials.** 2015. 156 p. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

The influence of laser properties, such as fluence, wavelength and pulse duration, as well as sample characteristics, such as particle size distribution and chemical matrix composition, was evaluated aiming at the quantitative determination of macro- (P, K, Ca, Mg) and micronutrients (Cu, Fe, Mn, Zn, B) in pellets of plant materials by laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). Firstly, the effects of particle size distribution and laser fluence on the analysis of pellets (test samples) prepared with sieved samples (from 150 to 20 µm apertures) were investigated. Experiments were carried out with a nanosecond LIBS (ns-LIBS) system by using a Q-switched Nd:YAG laser at 1064 nm (5 ns; 360 mJ) and a spectrometer with Echelle optics and intensified charge-coupled device (ICCD) detector. Results indicated that smaller particles yielded to sensitivities' enhancement and attained better measurements' precision. Moreover, matrix effects were reduced by analyzing pellets prepared from < 75 µm sieved fractions and pulses of 50 J cm^{-2}. In addition, there was a significant improvement on accuracy of Mg, Fe, Mn and Zn measurements in a set of test samples of sugarcane leaves by using this fluence. In a second experiment, variations in the Nd:YAG laser wavelength (1064, 532, 355 and 266 nm) did not affect the analysis of test samples of sugarcane leaves, and provided linear correlations between emission signal intensities and corresponding analytes mass fractions. In addition, variations within Nd:YAG laser wavelength did not affect the analysis of a heterogeneous sample set composed by pellets of leaves from different crops, such as soy, sugarcane, maize, citrus and coffee by ns-LIBS. However, in contrast to previous findings, the univariate calibration models for ns-LIBS presented lower linearity ($r_{cal} < 0.90$) for Ca, Mg, P, Cu, Fe, Mn and Zn, no matter the laser wavelength used for the analysis. These circumstances reflect the low robustness of ns-LIBS to variations within matrix chemical composition among test samples. Afterwards, test samples from different crops were analyzed by a femtosecond LIBS (fs-LIBS) by using a Ti:Sapphire laser, including a mode-locked oscillator and an ultrafast amplifier (60 fs; 1.65 mJ per pulse), and a spectrometer with Czerny-Turner optics and ICCD. Findings indicated that the pulse duration was a decisive variable for providing accurate quantification of nutrients in different plant species, which present substantial differences in terms of matrix chemical composition. Close agreement between Ca, Mg, P, Fe and Mn mass fractions predicted by fs-LIBS and those determined by ICP OES was evidenced, whatever the modeling approach used. Contrarily, for ns-LIBS analysis of test samples from different crops, only the use of multivariate partial least squares (PLS) regression appears capable for resolving the non-linear transformations of the emission intensities according to the physical mechanisms governing this temporal regime of ablation. Thus, when using multivariate modeling, the figures-of merit reflecting the predictive capabilities of ns-LIBS resemble to those achieved by fs-LIBS. Either way, fs-LIBS is a more robust approach that better offers larger flexibility to the matrix variability.

Keywords: LIBS. Laser-induced breakdown spectroscopy. Femtosecond laser. Nanosecond laser. Determination of macro- and micronutrients. Plant materials. Sample preparation. Calibration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Número de publicações científicas sobre espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser entre 1972 e 2014 28
Figura 1.2 – Sistema LIBS 32
Figura 2.1 – (a) Montagem do sistema LIBS com laser de nanossegundos *Brilliant* operando a 266 nm; e (b) arranjo óptico com o suporte giratório da amostra 52
Figura 2.2 - Montagem do sistema LIBS com laser de nanossegundos *Brilliant B* operando a 1064, 532 e 266 nm 54
Figura 2.3 - Montagem óptica usada para aquisição de imagens do plasma..... 55
Figura 2.4 – Montagem do sistema LIBS com laser de femtossegundos operando a 800 nm 56
Figura 3.1 – Distribuição do tamanho das partículas das frações peneiradas em malhas com aberturas de 150, 106, 75, 53 e 20 µm..... 66
Figura 3.2- Distribuição do tamanho das partículas de amostra de folhas de (a) citros C1 e (b) soja S3 moídas criogenicamente por 10 min e peneiradas em malha com abertura de 75 µm..... 68
Figura 3.3 - Espectros de EDXRF e intensidade dos sinais dos raios-X característicos de pastilhas de folhas de cana-de-açúcar preparadas com amostras laboratoriais cominuídas não-peneiradas e peneiradas através de malha de 75 µm 71
Figura 3.4 - Microscopia eletrônica de varredura das crateras formadas por ablação a laser nas pastilhas de folhas de boldo preparadas com frações peneiradas entre < 20 e < 150 µm..... 74
Figura 3.5 – Intensidades dos sinais de emissão das linhas P I 213,618 e Mn II 257,610 nm na análise de pastilhas preparadas com diferentes frações de tamanho das partículas interrogadas com pulsos de 25 e 50 J cm^{-2} (diâmetro de focalização de 750 µm) 76
Figura 3.6 – Efeito da distribuição do tamanho das partículas na intensidade de emissão das linhas P I 213,618 e Mn II 257,610 nm 77
Figura 3.7 - Intensidades dos sinais de emissão das linhas P I 213,618 e Mn II 257,610 nm na análise de pastilhas preparadas com diferentes frações de tamanho das partículas interrogadas com pulsos de 25 e 50 J cm^{-2} (diâmetro de focalização de 320 µm) 78
Figura 3.8 – Coeficientes de variação (%) das medições de Ca, K, Mg, P, B e Mn feitas em pastilhas preparadas com diferentes frações de tamanho de partículas (n = 10 crateras, 20 pulsos por cratera)..... 80
Figura 3.9 – Distribuição espacial de potássio em pastilhas preparadas com frações peneiradas em malhas com abertura de 150, 75 e 20 µm determinada por µ-EDXRF 81
Figura 3.10 - Resultados para Fe II 261,187 e Zn II 206,200 nm obtidos na análise de pastilhas de 23 variedades de folhas de cana-de-açúcar aplicando-se (a) 25 ou (b) 50 J cm^{-2} (diâmetro de focalização de 750 µm) 83
Figura 3.11 – Intensidade dos sinais de emissão de B I 249,773, Cu I 324,755, Mn II 257,610 e P I 213,618 nm em função do diâmetro de focalização..... 86
Figura 3.12 – Fragmento do espectro contendo as linhas de emissão B I 249,773 e Cu I 324,755 nm de pastilha de folhas de cana-de-açúcar obtidos com 50, 100, 200 e 400 pulsos acumulados 87
Figura 3.13 – Fragmentos do espectro de emissão de plasmas induzidos por laser operando a 1064, 532, 355 e 266 nm em pastilhas de materiais vegetais..... 88
Figura 3.14 – Distribuição de Boltzmann para linhas de Fe II em plasma induzido por laser a 1064, 532, 355, e 266 nm em pastilhas de folhas de espinafre (NIST 1570a) 89

Figura 3.15 - Curvas de calibração para P I 213,618 nm construídas com CRMs analisados por LIBS a 266, 355, 532 e 1064 nm 90
Figura 3.16 – Resultados para K I 404,414 nm após ablação de pastilhas de folhas de cana-de-açúcar (n = 14) com laser de Nd:YAG a 1064, 532, 355 e 266 nm 93
Figura 3.17 – Resultados para Mg I 277,669 nm após ablação de pastilhas de folhas de cana-de-açúcar (n = 14) com laser de Nd:YAG a 1064, 532, 355 e 266 nm 94
Figura 3.18 – Resultados para Cu I 324,755 nm após ablação de pastilhas de folhas de cana-de-açúcar (n = 14) com laser de Nd:YAG a 1064, 532, 355 e 266 nm 95
Figura 3.19 – Resultados para Mn II 257,610 nm após ablação de pastilhas de folhas de cana-de-açúcar (n = 14) com laser de Nd:YAG a 1064, 532, 355 e 266 nm 96
Figura 3.20 – Fragmentos dos espectros de emissão de plasmas induzidos por laser operando a 1064 e 266 nm em pastilhas de materiais vegetais 99
Figura 3.21 – Resultados para Ca II 370, 603 e K I 404,414 nm após ablação de pastilhas de folhas de cana-de-açúcar (n = 14) com laser de Nd:YAG a 266 e 1064 nm 100
Figura 3.22 – Resultados para P I 213,618 e B I 249,773 nm após ablação de pastilhas de folhas de cana-de-açúcar (n = 14) com laser de Nd:YAG a 266 e 1064 nm 101
Figura 3.23 - Evolução temporal de plasmas induzidos por laser de Nd:YAG a 266 nm na superfície de pastilhas de materiais vegetais 105
Figura 3.24 – Imagens de plasmas induzidos por laser de Nd:YAG a 266 nm em pastilha de tecido vegetal adquiridas em diferentes tempos de atraso após o pulso do laser (entre 250 e 2000 ns), integrando-se os sinais durante 15 ns 106
Figura 3.25 – Intensidade dos sinais de emissão de Fe II 238,204 nm e respectivos coeficientes de variação em função da distância entre a lente de focalização (*f* = 75 mm) e a amostra.... 107
Figura 3.26 - Evolução temporal de plasmas induzidos por laser em regime temporal de femtossegundos na superfície de pastilhas de materiais vegetais 108
Figura 3.27 – Espectros de emissão (200-260 e 280-340 nm) de plasmas induzidos por laser em regimes temporais de femtossegundos (fs-LIBS) e de nanossegundos (ns-LIBS) a 1064, 532 e 266 nm, em pastilhas de folhas de espinafre NIST 1570a 109
Figura 3.28 – Classificação dendrográfica das amostras de folhas provenientes de diferentes culturas obtida por análise de agrupamentos hierárquicos considerando-se as faixas espectrais 200-265 e 280-345 nm 111
Figura 3.29 – Gráficos de regressão entre as frações de massa de referência de Mg e as previstas por fs- e ns-LIBS a 1064, 532 e 266 nm nas amostras peneiradas empregando-se modelos de calibração univariados 115
Figura 3.30 – Gráficos de regressão entre as frações de massa de referência de Mn e as previstas por fs- e ns-LIBS a 1064, 532 e 266 nm nas amostras peneiradas empregando-se modelos de calibração univariados 116
Figura 3.31 – Gráficos de regressão entre as frações de massa de referência de Ca e as previstas por fs- e ns-LIBS a 1064, 532 e 266 nm nas amostras peneiradas empregando-se modelos PLS 123
Figura 3.32 – Gráficos de regressão entre as frações de massa de referência de Mg e as previstas por fs- e ns-LIBS a 1064, 532 e 266 nm nas amostras peneiradas empregando-se modelos PLS 124
Figura 3.33 – Gráficos de regressão entre as frações de massa de referência de P e as previstas por fs- e ns-LIBS a 1064, 532 e 266 nm nas amostras peneiradas empregando-se modelos PLS 125
Figura 3.34 – Gráficos de regressão entre as frações de massa de referência de Fe e as previstas por fs- e ns-LIBS a 1064, 532 e 266 nm nas amostras peneiradas empregando-se modelos PLS 126

Figura 3.35 – Gráficos de regressão entre as frações de massa de referência de Mn e as previstas por fs- e ns-LIBS a 1064, 532 e 266 nm nas amostras peneiradas empregando-se modelos PLS 127
Figura 3.36 – Região da elipse de confiança para o intercepto e a inclinação da regressão entre as frações de massa de referência de Ca, Mg, P, Fe e Mn, e as previstas por fs- e ns-LIBS empregando-se modelos PLS nas amostras peneiradas..... 129
Figura 3.37 – Região da elipse de confiança para o intercepto e a inclinação da regressão entre as frações de massa de referência de Ca, Mg, P, Fe e Mn, e as previstas por fs- e ns-LIBS empregando-se modelos PLS nas amostras não-peneiradas..... 131
Figura 3.38 - Microscopia eletrônica de varredura das crateras formadas por ablação a laser em regime temporal de (a) femto- e de (b) nanossegundos a 1064, (c) 532 e (d) 266 nm na superfície de pastilhas de folhas de espinafre NIST 1570a..... 133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Lasers comumente empregados em LIBS 34

Tabela 2.1 – Espécies de plantas utilizadas nesta tese (*n* = número de amostras) 49

Tabela 2.2 - Materiais de referência certificados (CRM) de origem vegetal 49

Tabela 2.3 – Programa de aquecimento para decomposição de amostras de tecido vegetal assistida por radiação micro-ondas 58

Tabela 2.4 – Parâmetros operacionais utilizados nos espectrômetros de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente Perkin Elmer Optima 3000 DV e Varian Vista RL 58

Tabela 2.5 – Parâmetros operacionais utilizados nas determinações por EDXRF 59

Tabela 2.6 – Constantes espectroscópicas das linhas de Fe (II) usadas para a determinação da temperatura do plasma induzido por laser pela distribuição de Boltzmann 62

Tabela 3.1 – Informações sobre a distribuição do tamanho das partículas das frações peneiradas 67

Tabela 3.2 – Distribuição do tamanho das partículas de folhas moídas criogenicamente por 10 min e peneiradas e malha com abertura de 75 µm 69

Tabela 3.3 - Características analíticas de modelos univariados de calibração para a determinação de Ca, K, Mg, P, B, Cu, Fe, Mn, Zn e Al em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar por LIBS, com laser de Nd:YAG a 1064 nm, empregando-se pulsos de 25 e 50 J cm^{-2} (diâmetro de focalização de 750 µm) 84

Tabela 3.4 – Valores das razões sinal-ruído (SNR) e limites de detecção (LOD), para linhas de emissão selecionadas, empregando-se laser de Nd:YAG a 1064, 532, 355 e 266 nm 91

Tabela 3.5 - Características analíticas dos modelos univariados de calibração para a determinação de Ca, K, Mg, P, B, Cu, Fe, Mn, Zn, Al e Na em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar por ns-LIBS a 1064, 532, 355 e 266 nm 97

Tabela 3.6 – Parâmetros analíticos dos modelos univariados de calibração para a determinação de Ca, K, Mg, P, B, Cu, Fe, Mn, Zn, Al e Na em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar por ns-LIBS operando a 1064 e 266 nm 102

Tabela 3.7 – Intervalo dos coeficientes de variação das medições de intensidade das linhas de emissão (n = 6) feitas em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar com laser de Nd:YAG a 266, 355, 532 e 1064 nm 103

Tabela 3.8 – Estatística descritiva dos conjuntos de calibração e validação usados para a análise univariada e multivariada de materiais vegetais por LIBS 112

Tabela 3.9 – Características analíticas dos modelos de calibração univariada para a determinação de Ca, Mg, P, Cu, Fe, Mn e Zn em pastilhas preparadas com materiais vegetais peneirados e não-peneirados por fs- e ns-LIBS a 1064, 532 e 266 nm 114

Tabela 3.10 – Características analíticas dos modelos PLS para a determinação de Ca, Mg, P, Cu, Fe, Mn e Zn em materiais vegetais por fs- e ns-LIBS a 1064, 532 e 266 nm 119

Tabela 3.11 – Características analíticas dos modelos PLS para a determinação de Ca, Mg, P, Cu, Fe, Mn e Zn em pastilhas preparadas com materiais vegetais peneirados e não-peneirados por fs- e ns-LIBS a 1064, 532 e 266 nm 121

Tabela 3.12 – Parâmetros estatísticos referentes à precisão das medições feitas por fs- e ns-LIBS a 1064, 532 e 266 nm nas pastilhas das amostras do conjunto de validação empregando-se modelos PLS 132

Tabela 3.13 – Limites de detecção (3,3 σ) em fs- e ns-LIBS 135

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

2ω	2º harmônico
3ω	3º harmônico
4ω	4º harmônico
CF-LIBS	*Calibration-free LIBS*
CRM	Material de referência certificado
CCD	*Charge-coupled device*
CV	Coeficiente de variação
EDXRF	Espectrometria de fluorescência de raios-X de energia dispersiva
ETV-ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente empregando atomização eletrotérmica
ETV-ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente empregando atomização eletrotérmica
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama
fs-LIBS	Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser em regime temporal de femtossegundos
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite
HCA	Análise de agrupamentos hierárquicos
KDP	Di-hidrogenofosfato de potássio
KD*P	Di-deutériofosfato de potássio
ICCD	*Intensified charge-coupled device*
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente
IR	Infravermelho
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
LTE	Equilíbrio termodinâmico local
LTSD	Distância entre a lente de focalização do laser e a amostra
ns-LIBS	Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser em regime temporal de nanossegundos
OES	Espectroscopia de emissão óptica
PLS	Regressão pelos mínimos quadrados parciais
PCR	Regressão pelos componentes principais
QC	Coeficiente de qualidade
RMSEC	Raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração
RMSEP	Raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão
RPD	Desvio residual de previsão
r_{cal}	Coeficiente de correlação da curva de calibração
r_{val}	Coeficiente de correlação das amostras de validação
sat	Saturado
SNR	Razão sinal-ruído

s_{trip}	Desvio-padrão combinado das triplicatas de validação
SS-GFAAS	Espectrometria de absorção atômica com amostragem direta de sólidos em forno de grafite
UV	Ultravioleta
VIS	Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 25

1.1 Histórico de LIBS 26

1.2 Fundamentos de LIBS 29

1.2.1 Instrumentação 31

1.2.2 Influência do comprimento de onda em LIBS 35

1.2.3 Influência da duração do pulso em LIBS 38

1.3 Análise de materiais vegetais por LIBS 42

1.3.1 Importância 42

1.3.2 Estratégias de calibração 43

1.3.3 Análise quantitativa 44

1.4 Objetivos 46

2 MATERIAL E MÉTODOS 47

2.1 Preparo das amostras 47

2.2 Instrumentação em LIBS 50

2.2.1 Sistema ns-LIBS com laser de Nd:YAG e espectrômetro com óptica *Echelle* e *ICCD* .. 50

2.2.2 Sistema ns-LIBS com laser de Nd:YAG e espectrômetro com óptica *Czerny-Turner* e *ICCD* 52

2.2.3 Sistema fs-LIBS com laser de Ti:Safira e espectrômetro com óptica *Czerny-Turner* e *ICCD* 55

2.3 Método de referência 57

2.3.1 Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas 57

2.3.2 Determinação dos elementos por ICP OES 58

2.3.3 Espectrometria de fluorescência de raios-X por energia dispersiva (EDXRF) 59

2.3.3.1 EDXRF de bancada 59

2.3.3.2 μ-EDXRF 60

2.4 Determinação da distribuição do tamanho das partículas 61

2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 61

2.6 Determinação da temperatura do plasma 61

2.7 Tratamento quimiométrico dos dados 62

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 66

3.1 Caracterização física e química das amostras peneiradas 66

3.1.1 Frações peneiradas em malhas com aberturas de 150 a 20 µm 66

3.1.2 Amostras provenientes de diferentes espécies moídas criogenicamente e peneiradas em abertura de 75 µm 68

3.2 Influência da distribuição do tamanho das partículas na análise de materiais vegetais por LIBS 72

3.2.1 Efeitos da ablação 73

3.2.2 Efeitos espectroscópicos 75

3.2.3 Considerações adicionais 82

3.3 Efeito da fluência na análise de pastilhas de cana-de-açúcar por ns-LIBS 82

3.4 Influência do comprimento de onda do laser na análise materiais vegetais por ns-LIBS 85

3.4.1 Definição das condições experimentais do sistema LIBS com laser de Nd:YAG operando a 266 nm 85

3.4.2 Resultados preliminares obtidos por ns-LIBS a 266, 355, 532 e 1064 nm 87

3.4.3 Desempenho analítico de LIBS operando a 1064, 532, 355 e 266 nm na análise de folhas de cana-de-açúcar empregando-se calibração univariada 92

3.5 Comparação de LIBS em regime temporal de ns e de fs para a análise de folhas de diferentes culturas 103

3.5.1 Definição das condições experimentais 103

3.5.1.1 Sistema ns-LIBS com laser de Nd:YAG *Brilliant B* operando a 266 nm 103

3.5.1.2 Sistema fs-LIBS com laser de Ti:Safira 106

3.5.2 Seleção das amostras para os conjuntos de calibração e validação 110

3.5.3 Determinação de Ca, Mg, P, Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de diferentes culturas empregando-se calibração univariada 113

3.5.4 Determinação de Ca, Mg, P, Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de diferentes culturas empregando-se calibração multivariada 118

3.5.5 Precisão das medições e limites de detecção 132

4 CONCLUSÕES 136

REFERÊNCIAS 138

ANEXOS 153

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos 10 anos, a potencialidade da espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) tem sido demonstrada para a análise de materiais vegetais no cenário das ciências agronômicas e ambientais. De maneira geral, as amostras têm sido analisadas diretamente, na forma de materiais secos ou *in natura* (*e.g.*, folhas inteiras, secções foliares, grãos, frutos e legumes), e na forma de pastilhas preparadas a partir da prensagem do material seco e moído. O laser pulsado de Nd:YAG, em regime temporal de nanossegundos (ns), é o mais empregado em LIBS. No entanto, o número de aplicações envolvendo o uso de lasers com pulsos ultracurtos, como o laser de Ti:Safira em regime de femtossegundos (fs), tem crescido nos últimos anos. A radiação emitida pelas espécies excitadas (átomos, íons e moléculas) no plasma induzido por laser na superfície da amostra é coletada e direcionada para a fenda de entrada de um espectrômetro de emissão óptica, permitindo, assim, a realização de análises quali- e quantitativas a partir da informação contida nos espectros de emissão.[1]

Recentemente, demonstrou-se que LIBS pode ser um método apropriado para a determinação de P, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn, B [1] e Si [2] em pastilhas de materiais vegetais. No entanto, apesar da versatilidade e das vantagens oferecidas por LIBS, incluindo o mínimo ou mesmo a ausência de preparo de amostra, é necessária a devida atenção a algumas condições de contorno para a realização de análises quantitativas de materiais vegetais. Na maioria das aplicações, essas condições estão geralmente associadas à forma de apresentação das amostras e à sua qualidade, assim como à calibração propriamente dita, sendo de fundamental importância considerar os seguintes pontos:

i) A massa relativamente pequena removida no processo de ablação e a heterogeneidade das amostras. Quando a massa das porções amostradas não reflete a composição da amostra laboratorial, é necessário um processo de cominuição para melhorar a distribuição do tamanho das partículas diminuindo, assim, a micro-heterogeneidade na distribuição dos analitos;

ii) A calibração dependente das características físico-químicas da matriz, principalmente quando se utiliza lasers em regime temporal de ns operando na região do infravermelho-próximo;

iii) A necessidade de melhorar a distribuição do tamanho das partículas utilizadas no preparo das pastilhas com o intuito de uniformizar a interação entre o laser e a amostra;

iv) A adequação e a falta de materiais de referência certificados (CRMs) para calibração. A similaridade entre as propriedades físicas e químicas entre os CRMs e as amostras é de fundamental importância para se assegurar a comutatividade.

Contudo, cabe informar que a análise direta de materiais vegetais, quando possível, contribui de maneira efetiva com a simplificação da sequência analítica quando comparada aos métodos convencionais que envolvem digestão ácida, reduzindo a possibilidade de ocorrência de erros sistemáticos.

1.1 Histórico de LIBS

O desenvolvimento de LIBS e o melhor entendimento dos plasmas induzidos por laser estão diretamente relacionados com os avanços na tecnologia dos lasers. Após a descoberta da emissão estimulada de radiação por Einstein em 1917, tardou-se mais de 40 anos para a construção do primeiro laser de rubi em 1960.[3] Em 1962, Brech e Cross [4] descreveram, pela primeira vez, o uso de plasmas induzidos por laser como fonte de excitação em espectroscopia. Nesta ocasião, os autores usaram um laser de rubi para produzir vapores na superfície de materiais metálicos e não-metálicos, os quais eram, posteriormente, reexcitados por uma fonte auxiliar antes de se registrar o espectro de emissão. Segundo Radziemski e Cremers,[5] este experimento marca o nascimento de LIBS.

Em 1963, Debras-Guédon e Liodec [6] descreveram o primeiro uso analítico de LIBS envolvendo análise espectroquímica de superfícies. Posteriormente em 1964, Runge et al. [7] construíram curvas de calibração para Cr e Ni em amostras de aço a partir dos espectros de emissão de plasmas induzidos por um laser pulsado de rubi. Cabe destacar que, a partir deste momento, LIBS tornou-se, de fato, um método de análise espectroquímica direta.[3, 5] O primeiro modelo teórico que descreveu os processos físicos envolvidos na ruptura induzida por laser em gases foi desenvolvido em 1965 por Zel'dovich e Raizer.[8] Este modelo mostrou-se bastante avançado uma vez que considerava as dinâmicas inerentes à expansão, ao aquecimento e ao decaimento do plasma, e seus efeitos no espectro de emissão. Em 1971, Ready [9] publicou a primeira monografia que descreveu aspectos teóricos e experimentais em LIBS.

Desde então, o interesse e o número de aplicações em espectroscopia utilizando-se LIBS mostrou-se diretamente relacionado ao desenvolvimento instrumental.[3] No entanto, após a primeira onda de entusiasmo verificada no começo da década de 1970, quando alguns

instrumentos comerciais foram introduzidos no mercado pelas empresas *Jarrell-Ash Corporation* e *VEB Carl Zeiss*, observou-se um desestímulo em pesquisas envolvendo LIBS até o final da década de 1970. Cabe destacar que este desinteresse foi motivado principalmente pelo custo relativamente elevado da instrumentação disponível e pelo desempenho analítico bastante inferior aos alcançados pelos métodos analíticos em ascensão na época, como a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES).[3]

Segundo Winefordner et al.[3] o interesse por LIBS começou a crescer novamente em meados da década de 1980, impulsionado pelo aumento na disponibilidade de lasers mais compactos, robustos e de menor custo, bem como pelo desenvolvimento de detectores mais sensíveis e versáteis, como por exemplo, os dispositivos de cargas acopladas intensificado (*ICCD - intensified charge-coupled device*). Esses detectores possibilitaram melhor resolução temporal nas medições espectroscópicas, e melhor discriminação entre o espectro de emissão dos analitos e a radiação de fundo, atendendo de maneira efetiva as necessidades espectroanalíticas de LIBS. Assim, a comunidade científica percebeu que as vantagens e características de LIBS como, por exemplo, a capacidade de realizar análises multielementares, simultâneas, e *in situ*, de qualquer tipo de amostra, podendo inclusive dispensar o preparo da amostra em muitos casos, poderia impulsionar uma nova geração de métodos analíticos. Posteriormente, este interesse estimulou muitos estudos teóricos em LIBS e em física de plasmas. Mais detalhes sobre o histórico de LIBS estão disponíveis em literatura especializada.[5, 10-13]

Nos últimos anos a análise direta de amostras por LIBS vem se mostrando como uma alternativa viável aos métodos bem consolidados de espectrometria atômica, e ocupa um lugar de destaque nos principais periódicos especializados, com um número crescente de publicações. Em consulta realizada na página do *Scopus* (http://www.scopus.com), com o termo "*laser-induced breakdown spectroscopy*", constatou-se um total de 2240 artigos publicados entre 1972 e abril de 2015, e um crescimento significativo do número de trabalhos sobre LIBS nos últimos 15 anos. (**Figura 1.1**). LIBS tem sido usado na análise de, por exemplo, aço e ligas metálicas,[14] materiais tecnológicos,[15] geológicos,[16, 17] poliméricos,[18] explosivos,[19] amostras agronômicas (*e.g.*, fertilizantes,[20] plantas,[1] solos[21]), tecidos animais,[22, 23] alimentos.[24] Observa-se também um aumento do uso de LIBS em aplicações industriais,[25] aeroespaciais, [26] e na análise de objetos à distância (*stand off* LIBS [27]), incluindo análise de objetos submersos.[28]

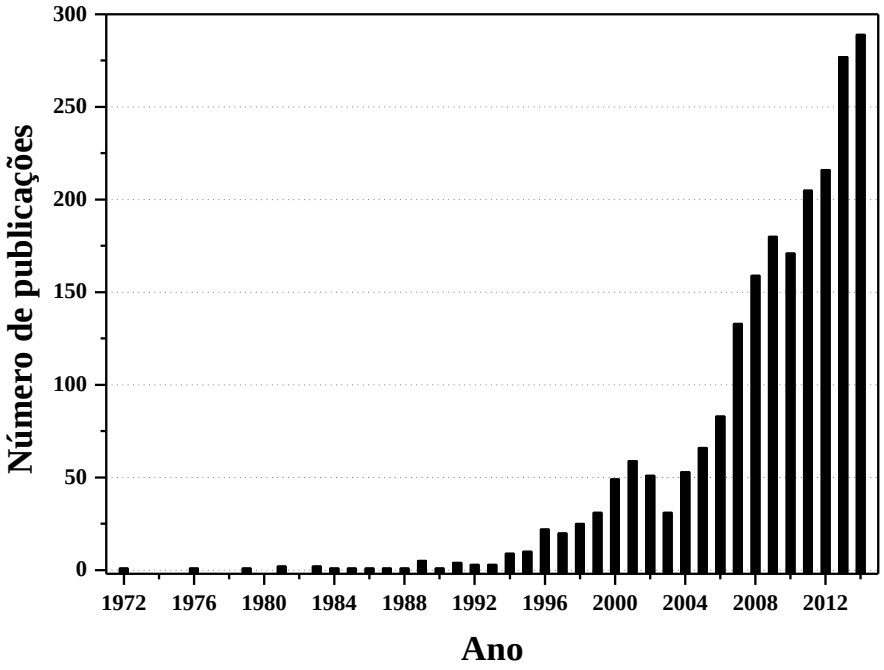


Figura 1.1 - Número de publicações científicas sobre espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser entre 1972 e 2014.

Este fato se deve, em parte, ao aumento expressivo na disponibilidade de equipamentos comerciais em LIBS. Recentemente, alguns equipamentos portáteis para uso em campo (*e.g.*, *handheld*) estão se tornando disponíveis no mercado. No entanto, dependendo da aplicação, o desempenho dos equipamentos portáteis ainda é limitado pelas dimensões e complexidade dos componentes atualmente empregados (*e.g.*, lasers e espectrômetros). Segundo Rakovský et al. [29] o surgimento cada vez mais frequente de lasers que oferecem melhor razão potência - peso (e/ou dimensão), como por exemplo, os lasers de estado sólido mais compactos (FLPSS - *flashlamp pumped solid state lasers*), os de microchip, e os lasers de fibra óptica, que são mais eficientes e consomem menos energia, certamente contribuirá para o desenvolvimento de equipamentos portáteis mais versáteis. Com relação aos espectrômetros, os avanços tecnológicos são mais evidentes no que diz respeito aos detectores, os quais estão se mostrando mais rápidos e sensíveis. No entanto, embora os espectrômetros tipo SWIFT (*Stationary-wave integrated Fourier transform spectrometer*) sejam limitados às regiões de comprimentos de onda mais longos (> 630 nm), o desenvolvimento em curso deverá expandir sua atuação às regiões de comprimentos de onda mais curtos, e novos espectrômetros, com melhor resolução, poderão substituir espectrômetros compactos atualmente utilizados com óptica *Czerny–Turner* e *CCD*.[29]

Embora a tecnologia dos equipamentos portáteis em LIBS ainda esteja bem menos avançada do que a dos espectrômetros de fluorescência de raios-X por energia dispersiva (EDXRF), os quais encontram-se de uma certa forma consolidados no mercado, LIBS apresenta algumas vantagens em relação à EDXRF no que se refere a limites de detecção para elementos de baixo número atômico, a maior resolução espacial, a maior rapidez na análise, e também por permitir a análise em função da profundidade.[29] Cabe destacar que a complementariedade de ambas os métodos pode enriquecer a informação analítica e, também, permitir estudos de validação cruzada.[24, 30, 31]

1.2 Fundamentos de LIBS

LIBS é um método espectroanalítico que emprega a microamostragem por ablação com laser e subsequente excitação dos átomos, íons e fragmentos moleculares presentes no microplasma induzido durante a ablação. LIBS pode ser considerado como uma forma reduzida do acrônimo LIBOES, *Laser Induced Breakdown Optical Emission Spectrometry*. O termo "*breakdown*" refere-se a um fenômeno coletivo relacionado à ruptura dielétrica das ligações químicas do material que ocorre anteriormente à formação do plasma.[32] A interação de um pulso de laser com a matéria é um fenômeno complexo e ainda não está totalmente elucidado. Quando um pulso de laser de alta energia atinge a superfície de um material, a irradiância no ponto focal promove a remoção de matéria, em um fenômeno conhecido como ablação. Assim, o material ablado comprime a atmosfera envolvente e leva à formação de ondas de choque. Durante esse processo ocorre o aquecimento local e uma ampla variedade de fenômenos de mudanças de estado, incluindo fusão e vaporização dos constituintes do material. Posteriormente, ocorre a expansão do material vaporizado na forma de uma pluma sobre a superfície da amostra e, devido às altas temperaturas, o plasma é formado. Esse plasma contém elétrons, íons, espécies neutras, assim como espécies excitadas do material ablado, cuja radiação emitida constitui o sinal analítico a ser medido em LIBS.[33]

A focalização do pulso de laser na superfície da amostra provoca a dissociação das moléculas constituintes do material tanto em átomos, devido à ruptura das ligações químicas, quanto em íons e elétrons, devido à ruptura das ligações eletrônicas.[10, 32] A formação dos plasmas induzidos por laser é altamente dependente das propriedades da amostra, do meio em que o plasma se expande e das características do pulso do laser. Nos primeiros instantes da interação entre o laser e a matéria ocorre a formação de elétrons na superfície da amostra, os quais são posteriormente acelerados e, quando a densidade eletrônica atinge valores da ordem

de 10^{18} e^- cm^{-3}, ocorre o processo de ruptura e formação do plasma.[3] O processo de ignição do plasma pode ocorrer por ionização em cascata ou por ionização multifotônica, dependendo do comprimento de onda dos fótons do laser. Esse processo é seguido por uma avalanche eletrônica provocada por colisões entre os elétrons livres acelerados e elétrons ligados aos átomos. Posteriormente, o plasma sofre um aquecimento promovido pela absorção do laser e se expande de forma adiabática.[32]

Em geral, LIBS utiliza um feixe de laser pulsado de alta irradiância, da ordem de GW cm^{-2}, que é focalizado sobre a superfície de uma amostra, provocando a formação de um plasma de alta temperatura (*e.g.*, 8000 a 20000 K) que vaporiza certa quantidade de material.[32] Parte da radiação emitida pelo plasma é capturada por um sistema óptico e transferida para um espectrômetro que dispersa as radiações emitidas pelas espécies atômicas e iônicas excitadas no plasma. Um detector registra os sinais de emissão e os equipamentos eletrônicos digitalizam e computam os dados. O espectro emitido é usado para determinar quali ou quantitativamente os elementos constituintes da amostra.[10, 11, 34] Alternativamente, podem ser utilizados lasers com duração de ps a fs, mas a maioria dos trabalhos presentes na literatura empregam lasers com pulsos de ns. Para fins de comparação, os lasers de fs fornecem irradiâncias da ordem de TW cm^{-2}.

A inicialização, formação e decaimento do plasma são processos complexos e dinâmicos. A absorção da radiação incidente do laser ocorre por mecanismos de *bremsstrahlung* inverso e envolve colisões entre fótons, elétrons e átomos ou moléculas.[10, 35] A excitação eletrônica para níveis específicos de energia depende de fatores como o equilíbrio termodinâmico e interações com espécies neutras e/ou carregadas, geralmente influenciados pelas características da matriz. Em espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser em regime temporal de nanossegundos (ns-LIBS), após o término do pulso do laser (*e.g.*, 5-10 ns), o plasma decai em um intervalo compreendido por alguns microssegundos, dependendo da energia depositada e pressão da atmosfera de ablação.[10]

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

decaimento, observa-se uma diminuição da intensidade de emissão de radiação de fundo e melhor discriminação das linhas iônicas e atômicas.[10]

Os processos físicos envolvidos na interação entre o laser e a amostra, na expansão dinâmica do plasma e em outros fenômenos envolvidos na ablação com laser dependem diretamente das (i) características do pulso de laser (*e.g.*, comprimento de onda, regime temporal, energia, fluência), (ii) das propriedades físicas e químicas da matriz (*e.g.*, condutividade, refletância, composição química, estado de agregação das partículas) e (iii) da atmosfera de ablação (*e.g.*, pressão e composição atmosférica).[33, 36, 37] Neste sentido, para cada aplicação, deve haver uma consonância entre todos esses fatores que proporcione um acoplamento óptico entre o laser e a amostra que seja mais adequado, e que também forneça as melhores características analíticas (*e.g.*, a melhor razão sinal-ruído - SNR) em uma determinada condição temporal de aquisição dos espectros.[37, 38]

1.2.1 Instrumentação

LIBS é um método de espectroscopia de emissão óptica (OES) com plasma induzido por laser que utiliza instrumentação bastante similar às usadas em outros métodos de OES. LIBS destaca-se dentre os métodos de OES por utilizar um plasma induzido por laser como fonte de excitação, o que permite análise direta de amostras sólidas.

Os principais componentes de um sistema LIBS são:

i. Laser pulsado para a geração do plasma;
ii. Sistema de focalização composto por espelhos e lentes que direcionam e focalizam os pulsos do laser na superfície da amostra;
iii. Suporte da amostra (se necessário);
iv. Sistema óptico de coleta da radiação emitida pelo plasma composto por lentes, espelhos, colimadores e/ou fibras ópticas;
v. Dispositivos de dispersão de radiação, como espectrógrafos, e detectores para registrar os espectros;
vi. Computador com controladores de tempo para sincronizar o laser com o detector e armazenar os espectros.

Para exemplificar, na **Figura 1.2** está mostrado o diagrama de um sistema LIBS. Neste sistema os pulsos de laser são refletidos por um espelho dicroico e focalizados por uma lente convergente na superfície de uma amostra, criando-se um plasma na região focal do laser. Posteriormente, a radiação emitida pelo plasma é coletada por um telescópio e transmitida para a fenda de entrada de um espectrômetro através de um cabo de fibra óptica, onde será dispersa em componentes ópticos em função do comprimento de onda e os sinais fotoelétricos convertidos em um espectro de emissão.

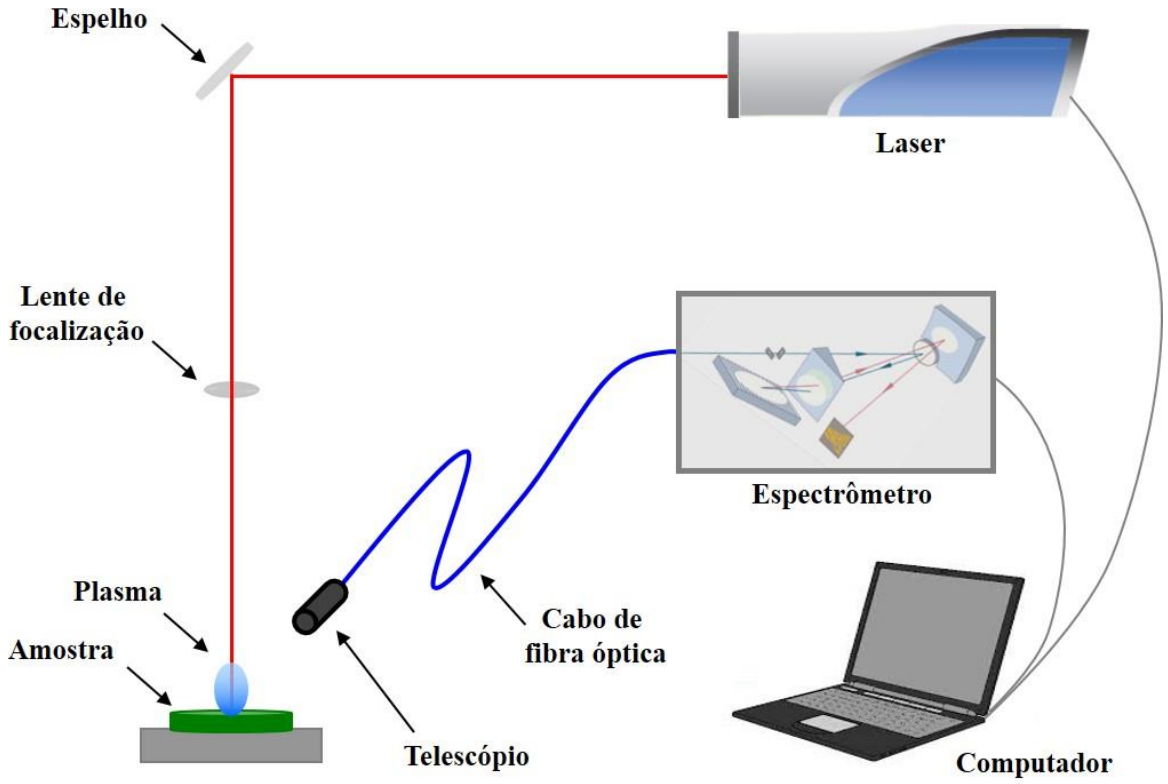


Figura 1.2 – Sistema LIBS.

As especificações de cada componente devem ser ajustadas de acordo com a aplicação desejada e devem considerar alguns aspectos técnicos como, por exemplo, o comprimento de onda do laser, a energia por pulso, a duração do pulso, a resolução espectral do espectrômetro, assim como a sensibilidade e eficiência quântica do detector.

Diferentes tipos de laser têm sido empregados em LIBS, cujos comprimentos de onda variam entre a região ultravioleta e infravermelho-distante do espectro eletromagnético. Conforme destacado no **item 1.1**, o primeiro experimento envolvendo LIBS, realizado por Brech e Cross em 1962,[4] foi feito com laser de rubi operando a 694 nm. Naquela ocasião,

a baixa estabilidade pulso a pulso deste laser fez com que LIBS fosse classificado como um método espectroquímico pouco promissor. A próxima fase do desenvolvimento de LIBS, na década de 1980, foi marcada pela tecnologia dos lasers pulsados. Nesta época, foram explorados, principalmente, os lasers de Nd:YAG operando no infravermelho (IR), visível (VIS) e ultravioleta (UV), e os lasers de excímeros operando no UV.[39]

Atualmente, apesar das vantagens proporcionadas pelos lasers com pulsos ultracurtos (i.e. < 1 ps),[40] o mais utilizado em LIBS é o de Nd:YAG,[10] em regime temporal de ns, com pulsos entre 5 a 10 ns. Este laser possui custo relativamente baixo (US$ 5000 – 20000), requer pouca manutenção, é compacto (o que possibilita o uso em equipamentos portáteis) e relativamente estável (flutuação de energia pulso a pulso menor que 2 %).[34, 41] Os lasers de excímeros, cujo meio ativo é um haleto de gás nobre (*e.g.*, XeCl, KrF) ao invés de cristais de estado sólido, também são bastante empregados em LIBS, em LA-ICP-MS e LA-ICP OES.[41, 42] No entanto, estes lasers são menos utilizados pois necessitam maior manutenção (*e.g.*, troca periódica dos gases) e possuem maior custo.[41]

O comprimento de onda do laser é definido pelas transições eletrônicas que ocorrem entre os diferentes níveis energéticos na cavidade do laser, resultando em emissão de radiação eletromagnética de acordo com a composição do meio ativo.[34] Por exemplo, os lasers de CO_2 emitem no IR-médio (i.e., 10,6 µm), os de Nd:YAG emitem no IR-próximo (i.e., 1064 nm), e os excímeros no UV (*e.g.*, 193, 248 nm). No caso do laser de Nd:YAG, o íon ativo é o Nd^{3+} incorporado em um cristal de granada de ítrio e alumínio (YAG, $Y_3Al_5O_{12}$). O laser de Nd:YAG é um sistema de quatro níveis que oferece alta amplificação, e propriedades térmicas e mecânicas apropriadas.[13] De acordo com Krupke et al.[43] os íons Nd^{3+} são excitados, por bombeamento óptico a 808 nm, do nível eletrônico fundamental $^4I_{9/2}$ para o nível excitado $^4F_{5/2}$, o qual decai imediatamente para o nível metaestável $^4F_{3/2}$ (transição não radiativa). A emissão de radiação em 1064 nm ocorre pela transição entre os níveis metaestáveis $^4F_{3/2}$ e $^4I_{11/2}$, e subsequente decaimento para o nível fundamental $^4I_{9/2}$.

O comprimento de onda do laser pode ser alterado para valores menores acoplando-se cristais ópticos birrefringentes e não-lineares (*e.g.*, di-hidrogenofosfato de potássio - KDP - ou di-deutériofosfato de potássio - KD*P) na janela de saída do laser. Este recurso é frequentemente utilizado em lasers de estado sólido, como o de Nd:YAG e o de Ti:Safira, onde a frequência dos fótons do laser pode ser multiplicada, possibilitando a conversão do comprimento de onda da região do IR para a UV.[10] No caso mais simples, o comprimento de onda fundamental do laser de Nd:YAG (1064 nm) pode ser convertido à 532 nm (2º harmônico - 2ω), o qual pode ser posteriormente convertido para 266 nm (4º harmônico - 4ω).

Combinando-se a radiação residual de 1064 nm com a convertida em 532 nm, gera-se o 3º harmônico - 3ω (355 nm).[10] Informações detalhadas sobre cristais não-lineares usados para conversão de comprimento de onda de lasers são descritas em literatura apropriada.[44, 45] No caso dos lasers de excímeros, o comprimento de onda é definido pelo gás de enchimento, sendo que os lasers com XeCl, KrF, ArF e F_2 emitem em 308, 248, 193 e 157 nm, respectivamente.[41] Os lasers comumente utilizados em LIBS e suas características estão listados na **Tabela 1.1**.

Tabela 1.1 – Lasers comumente empregados em LIBS. Adaptado das referências [5, 12, 29]

Tipo de laser	Comprimento de onda (nm)	Duração do pulso (ns)	Energia por pulso (mJ)
$CO_{2\,(g)}$	$10{,}6 \times 10^3$	10^4 a 10^5	1 a 500
Excímeros $_{(g)}$	308 (XeCl), 248 (KrF), 193 (ArF)	8 a 30	0,5 a 200
Nd:YAG $_{(s)}$	1064	5 a 10	10 a 1000
Microchip $_{(s)}$	1064	< 1	< 0,1
Fibra óptica $_{(s)}$	900 (Nd^{+3}), 1060 (Pr^{+3}), 1540 (Er^{+3})	< 50	< 2
Ti:Safira $_{(s)}$	800	3 a 200×10^{-6}	0,01 a 6

Em experimentos envolvendo ablação com laser (*e.g.*, LIBS e LA-ICP-MS), o comprimento de onda do laser deve ser definido de acordo com as propriedades absortivas das amostras a serem analisadas como, por exemplo, a refletância e a condutividade. No ponto focal da lente usada para convergir o feixe do laser, os materiais opacos apresentam alta absortividade para os comprimentos de onda no IR, enquanto os comprimentos de onda no UV são melhor absorvidos em amostras transparentes como quartzo, calcita e fluorita, por exemplo.[42] No caso da análise de materiais vegetais por LIBS, o laser de Nd:YAG operando em seu comprimento de onda fundamental (i.e., 1064 nm) é o mais utilizado. No entanto, conforme destacado por Santos Jr et al.,[1] ainda são necessários mais estudos envolvendo a análise desses materiais com diferentes comprimentos de onda. Além disso, espera-se que os efeitos de matriz possam ser minimizados com lasers operando no ultravioleta,[1] os quais geralmente proporcionam melhores figuras de mérito em termos de sensibilidade, precisão e exatidão das medições.[42, 46, 47]

1.2.2 Influência do comprimento de onda em LIBS

As propriedades absortivas de uma dada substância dependem do comprimento de onda da radiação do laser incidente e determinam a porção da energia que será acoplada ao material nos instantes que antecedem mudanças do estado de agregação das partículas a serem analisadas (i.e., < 1 ns). A geração da fase vapor e do plasma modifica esta absorção, a qual é dominantemente influenciada pela interação da radiação do laser com a fase vapor, com o plasma e com as partículas.[13]

Lasers com comprimentos de onda curtos possuem fótons mais energéticos, capazes de promover quebras de ligações e, portanto, processos de ionização. Por exemplo, um laser de Nd:YAG operando a 1064, 532 ou 266 nm possui fótons com 1,2, 2,3 e 4,7 eV, respectivamente.[10] A interação da radiação do laser com a matéria é caracterizada por reações de fotoionização quando a energia dos fótons é maior do que a energia de ligação entre os átomos, e o processo de ablação é caracterizado por mecanismos não térmicos.[12]

O comprimento de onda do laser (i.e., a energia do fóton) afeta os processos de formação do plasma como, por exemplo, a geração dos elétrons livres iniciais e a interação entre o laser e o plasma. Os processos de geração de elétrons livres e inicialização do plasma ocorrem, preferencialmente, por ionização multifotônica quando a ablação é feita com lasers operando no UV, e por ionização em cascata utilizando-se lasers operando no IR. Após a formação do plasma, a absorção de energia do laser pelo plasma ocorre, principalmente, por mecanismos de *bremsstrahlung* inverso, o qual é favorecido à medida que o comprimento de onda do laser é aumentado.[3, 48, 49] Como resultado, os pulsos no IR proporcionam plasmas mais quentes, maiores densidades eletrônicas e maior expansão do plasma (maior absorção de energia pelo plasma e maiores interações entre plasma e laser).[3, 34, 50, 51] Desta forma, o efeito de blindagem do plasma (*shielding effect*), o qual reduz a taxa de ablação, é proporcional ao quadrado do comprimento de onda do laser,[41] sendo favorecido para lasers operando no IR. De maneira geral, o uso de pulsos no UV resulta em maiores eficiências de ablação (quantidade de massa removida por unidade de energia aplicada), maior reprodutibilidade, menor fracionamento e menor emissão de radiação de fundo.[3, 35, 51-53]

Cabalín e Laserna [54] avaliaram a fluência mínima necessária para a formação do plasma em amostras de ligas metálicas com lasers de Nd:YAG operando a 1064, 532 e 266 nm. Embora o acoplamento do laser com a amostra seja mais efetivo em comprimentos de onda mais curtos, verificou-se que o limiar de fluência para formação do plasma induzido por laser a 266 nm foi maior do que aquele para a formação de plasmas empregando lasers a 1064 e 532 nm. Esses

resultados corroboram com o fato de que o crescimento em cascata da densidade eletrônica (formação do plasma via *bremsstrahlung* inverso, o qual é proporcional ao quadrado do comprimento de onda) é mais favorável para lasers operando no IR do que no UV, embora o acoplamento seja mais efetivo para comprimentos de onda mais curtos. Esses autores também observaram uma diminuição dos efeitos de matriz relacionados com as diferenças nos pontos de ebulição dos metais analisados quando pulsos no IR foram utilizados em condição de fluência próxima da mínima necessária para a formação do plasma. Quanto menor o comprimento de onda, maior é a taxa de ablação e menor o fracionamento ou evaporação preferencial de elementos.[12, 55-57]

Shaikh et al. [58] observaram que as temperaturas de plasmas induzidos por laser de Nd:YAG operando a 355, 532 e 1064 nm em amostras de alumínio foram 8160, 8590 e 9630 K, respectivamente. Esses autores verificaram que a densidade eletrônica aumentou com a diminuição do comprimento de onda do laser, ou seja, de $1,3 \times 10^{18}$ a $2,7 \times 10^{18}$ e^{-} cm^{-3} para 1064 e 355 nm, respectivamente. Cabe destacar que esses valores foram obtidos sob mesma condição de fluência (275 J cm^{-2}). Para fluências menores (i.e. 50 J cm^{-2}), Ma et al. [59] observaram que o plasma gerado por laser no UV em amostras de alumínio apresentou temperaturas e densidades eletrônicas maiores do que no IR. Hafeez et al. [60] observaram que as temperaturas de plasmas induzidos por laser de Nd:YAG operando a 355, 532 e 1064 nm em amostras de cálcio foram 13700, 15400 e 16200 K, respectivamente, empregando-se 150 J cm^{-2}. As densidades eletrônicas variaram entre $1,3 \times 10^{18}$ e $1,6 \times 10^{18}$ e^{-} cm^{-3} para 1064 e 355 nm, respectivamente.

Lee et al. [61] avaliaram o efeito do comprimento de onda do laser na análise de amostras de cobre de alta pureza por LIBS com laser de XeCl a 308 nm, e de Nd:YAG a 532 e 1064 nm. Os autores observaram que ablações com laser a 308 nm resultaram em linhas atômicas de emissão de Cu bastante intensas e estreitas, enquanto que os sinais de emissão de Cu I gerados com 1064 nm apresentaram efeitos de auto-absorção bem pronunciados. Ablação com pulsos em 532 nm resultou em linhas relativamente menos intensas e mais largas do que as obtidas a 308 nm. Por outro lado, os autores observaram que as temperaturas do plasma induzido pelos lasers em 308 e 532 nm foram maiores do que em 1064 nm, e associaram esse aumento à maior onda de choque produzida pela ablação com UV.

Geertsen et al. [62] verificaram que a eficiência de ablação (massa ablada por unidade de energia por área) em amostras de cobre foi 20 vezes maior para laser operando no UV (ArF a 193 nm e XeCl a 308 nm) do que para Nd:YAG a 1064 e 532 nm, e que o plasma gerado com laser no IR apresentava maior temperatura do que os gerados no UV. Os autores

concluíram que o desempenho analítico em termos de reprodutibilidade, efeitos de matriz, resolução espacial, quantificação e sensibilidade, foi melhor com laser no UV do que no IR.

Fornarini et al. [51] avaliaram os efeitos do comprimento de onda do laser na análise de bronzes por LIBS com laser de Nd:YAG a 355 e 1064 nm. Com laser no UV, as concentrações dos elementos no plasma praticamente não foram afetadas pela fluência, sendo que os valores determinados de Cu, Sn, Pb e Zn foram mais próximos dos reais do que os obtidos com IR. Observaram-se também que a concentração de Zn no plasma induzido por IR diminuiu quando a fluência foi aumentada. A ablação com IR proporcionou menor taxa de aquecimento da amostra do que com UV, o que resultou em um plasma enriquecido dos elementos mais voláteis. No entanto, os autores verificaram que a ablação estequiométrica (i.e., condição em que a composição do plasma reflete a composição da amostra teste) nunca foi alcançada tanto com 1064 quanto para 355 nm, sendo sempre mais rica em Zn, mesmo com alta fluência (250 J cm^{-2}). Os autores concluíram que a ablação com UV proporcionou menos efeitos térmicos na amostra, pois esta radiação possui menor penetrabilidade em relação ao IR. Por outro lado, Borisov et al. [63] observaram ablação estequiométrica de ligas binárias de Cu-Zn empregando-se laser de KrF a 248 nm (para fluência > 6 J cm^{-2}) e laser de Nd:YAG operando em 266 nm (para fluência > 14 J cm^{-2}).

Cabalín et al. [64] não observaram diferenças significativas nas curvas de calibração, nos coeficientes de correlação, nas faixas lineares de calibração, na precisão e exatidão das medições, quando lasers de Nd:YAG a 266 e 532 nm foram utilizados na determinação de Si, Ti, Nb e Mo em amostras de aço inoxidável. Cabe destacar que Fe foi utilizado como padrão interno.

Wang et al. [65] analisaram amostras de plásticos e explosivos por LIBS com laser de Nd:YAG em 266 e 1064 nm, e observaram um aumento de 5 vezes na intensidade de emissão de carbono e nitrogênio quando a ablação foi feita a 1064 nm, empregando-se pulsos com 27 J cm^{-2}. Segundo os autores, esse aumento na intensidade de emissão foi devido ao aumento da temperatura do plasma gerado em 1064 nm, uma vez que a absorção de radiação pelo plasma é proporcional ao quadrado do comprimento de onda. Os valores de temperatura não foram informados pelos autores.

Mao et al. [66] observaram que a ablação em amostras de cobre e bronze com laser de Nd:YAG a 266 nm foi mais eficiente do que a 1064 e 532 nm, resultando em sinais de emissão uma ordem de magnitude maiores, sob condições de fluência constante. Castillejo et al. [67] também observaram maior taxa de ablação a 266 nm em relação aos 3 comprimentos de onda mais longos do laser de Nd:YAG (1064, 532 e 355 nm) na análise de pigmentos de obras de

arte por LIBS. Segundo os autores, os mecanismos de interação entre o laser e a amostra foram dependentes do comprimento de onda do laser, sendo que a ablação com UV proporcionou apenas a remoção da camada orgânica mais externa, sem interferir nas camadas mais inferiores. Por outro lado, a ablação a 532 e 1064 nm resultou em descoloração e escurecimento das superfícies pintadas causadas por degradação térmica e carbonização.[67]

No tocante à análise de amostras vegetais por LIBS, existe apenas 1 trabalho que aborda os efeitos do comprimento de onda do laser no desempenho analítico. Zhang et al. [68] analisaram amostras de folhas frescas de azevinho empregando-se laser de Nd:YAG operando a 266 e 1064 nm. De acordo com os espectros apresentados pelos autores, foi possível observar que a ablação a 1064 nm resultou em linhas de emissão mais intensas e maior emissão de radiação de fundo (*background*). Os autores concluíram que a ablação com laser operando no UV proporcionou melhor precisão das medições e plasmas mais estáveis. É importante ressaltar que a falta de informações com respeito às condições experimentais e à discussão dos resultados impossibilitou melhores interpretações deste trabalho.

Por outro lado, cabe informar que a maioria dos estudos envolvendo ablação com laser em diferentes comprimentos de onda foram feitos por LA-ICP-MS ou LA-ICP OES. É importante destacar que os processos físicos envolvidos na ablação com laser para esses casos são bem distintos aos que ocorrem em LIBS.[44] No entanto, a interação entre o laser e a amostra pode ocorrer de maneira semelhante nestes 2 casos. Hoffmann et al. [69] avaliaram o desempenho do laser de Nd:YAG operando em 266, 355, 532 e 1064 nm para a determinação de Mg, Ca, Cu, Ni, Ba, Al, Pb, Sr e Mn em folhas frescas de carvalho por LA-ICP-MS e observaram que a maior eficiência de ablação ocorreu a 355 nm. Estes autores concluíram que a absorção do laser pelas amostras de folhas é determinada pela clorofila, cuja absortividade máxima ocorre entre 350 e 450 nm.

1.2.3 Influência da duração do pulso em LIBS

Em LIBS, independentemente do regime temporal (i.e., duração do pulso), a taxa de deposição de energia do pulso de laser é muito maior que a taxa de redistribuição e dissipação de energia, o que resulta em temperaturas substancialmente altas (*e.g.*, 15000-20000 K) nas regiões onde ocorreu a interação laser e amostra e a formação do plasma. De fato, a interação de pulsos curtos (> 1,0 ps) com as amostras diferem substancialmente daquelas com pulsos ultra-curtos (< 1,0 ps), pois a taxa de transferência de energia é significativamente maior neste último caso.[33, 43, 70]

Do ponto de vista instrumental, os lasers comerciais de Nd:YAG e de Ti:Safira operam em regimes temporais da ordem de 6 ns e 100 fs, respectivamente. Os lasers novos de fibra óptica de Yb produzem pulsos com duração de 300 fs. Para fins comparativos, cabe informar que um pulso de 100 fs possui 30 μm de comprimento, ao passo que o de 6 ns apresenta 1,8 m. Assim, os pulsos do laser de Nd:YAG são 60.000 vezes maiores que os de Ti:Safira e 20.000 vezes maiores que os de fibra óptica de Yb.[71] Esta característica física dos pulsos em regime temporal de fs é responsável por proporcionar irradiâncias da ordem de TW cm^{-2}. Segundo a literatura,[72] a irradiância do laser é o principal fator que governa o processo de ablação, uma vez que a taxa de transferência de energia afeta a quebra de ligações e promove a transição de átomos e/ou partículas do estado sólido para fase vapor e, posteriormente, para a condição de plasma. Desta forma, pulsos em regime de fs proporcionam menor penetração do laser na amostra e também menor difusão térmica em comparação com os pulsos de ns. Cabe informar que a região termicamente afetada pela ablação com laser é proporcional à raiz quadrada da duração do pulso, sendo, por exemplo, cerca de 4 nm (em raio) para pulsos com duração de 100 fs, e em torno de 1000 nm para pulsos de 6 ns. Essa transferência de energia relativamente lenta, inerente à ablação com pulsos em regime temporal de ns, leva à maior dissipação de calor. Esse efeito é considerado prejudicial, pois pode provocar a vaporização preferencial de alguns constituintes da amostra.[70, 71, 73] Neste fenômeno, conhecido como ablação não estequiométrica, a composição do aerossol ou do plasma torna-se enriquecida pelos elementos mais voláteis e, portanto, pode não representar a amostra-teste. A ocorrência deste fracionamento elementar é mais comum na análise de materiais condutores (*e.g.*, ligas metálicas) e pode resultar em determinações inexatas e imprecisas, principalmente quando se utiliza padrões sem compatibilidade de matriz.[71]

Outra característica bastante importante na ablação com pulsos em regime de fs é que não existe interação entre o laser e o plasma neste regime temporal de ablação, pois toda a energia do pulso é depositada na amostra antes de ocorrerem mudanças termodinâmicas de estado físico e formação do plasma. Consequentemente, os efeitos de blindagem do plasma não se aplicam neste regime temporal.[71] Por outro lado, as interações entre o laser e o plasma são dominantes nos processos de ablação com laser em regime de ns. Neste caso, os primeiros instantes do pulso (< 1,0 μs) promovem mudanças termodinâmicas de estado dos constituintes da amostra e a formação do plasma, enquanto que os instantes finais (i.e., após 1,0 μs) interagem com o plasma recém formado, provocando seu aquecimento, principalmente, via *bremsstrahlung* inverso.[10, 35, 44]

O regime temporal de ablação afeta diretamente o tempo de vida do plasma. Enquanto os plasmas em ns-LIBS possuem tempo de vida da ordem de alguns µs (e.g., < 10 µs), os plasmas em fs-LIBS possuem decaimento muito mais rápido e perduram por menos que 1µs, por exemplo.[33] Desta forma, a evolução temporal dos plasmas induzidos por laser é altamente dependente da duração do pulso e, do ponto de vista espectroscópico, essas diferenças na escala de tempo devem ser cuidadosamente consideradas uma vez que as medições em LIBS são resolvidas no tempo. A aquisição dos espectros em fs-LIBS ocorre após algumas dezenas de ns (*e.g.*, 50 ns) após a incidência do pulso do laser, ao passo que as medições em ns-LIBS são feitas após alguns µs (*e.g.*, 1 µs) em relação ao pulso do laser.

Outro fator que concorre para a melhoria dos parâmetros analíticos de desempenho (*e.g.*, precisão e exatidão das medições) inerente à ablação com lasers em regime de fs é a produção de partículas menores e com tamanhos mais uniformes.[71, 73] Em LIBS, este comportamento pode favorecer a eficiência dos processos de decomposição e ionização das partículas. No caso de LA-ICP-MS e LA-ICP OES, a introdução de um aerossol com partículas menores e mais uniformes no plasma acoplado indutivamente proporciona processos de decomposição e ionização mais efetivos e reprodutíveis. [70, 71, 73]

Em 2007, Gurevich e Hergenröeder [33] previram que as características e vantagens dos lasers de fs acima descritas favoreceriam o desempenho analítico dos métodos em fs-LIBS, e que isto iria impulsionar tanto o desenvolvimento instrumental quanto o número de aplicações. De fato, passados quase dez anos, observa-se um aumento expressivo no número de publicações em fs-LIBS, e também na disponibilidade de lasers mais estáveis, compactos e com maior energia por pulso (*e.g.*, 6 mJ por pulso). No entanto, cabe destacar que estes equipamentos ainda apresentam complexidade e custo relativamente elevados quando comparados com os lasers de estado sólido em regime de ns.

Margetic et al. [74] avaliaram o uso de pulsos de laser com duração de 170 fs e 6 ns na análise de amostras de latão por LIBS e observaram que a fluência mínima necessária para formação do plasma foi significativamente menor em fs-LIBS, sendo 0,1 e 1,5 J cm^{-2} para fs e ns, respectivamente. Freeman et al. [75] observaram que os plasmas induzidos por laser em regime de ns em amostras de latão apresentaram maior emissão de radiação de fundo e de espécies iônicas excitadas. Por outro lado, os plasmas induzidos por laser em regime de fs foram caracterizados por emissão de espécies atômicas excitadas e radiação de fundo praticamente desprezível. De Bonis et al. [76] compararam o desempenho de ns- e fs-LIBS para a caracterização do perfil de profundidade de amostras de bronze. Embora a intensidade de emissão do plasma em fs-LIBS tenha sido significativamente menor, a ablação com pulsos de 250 fs melhorou a

precisão das medições feitas em diferentes camadas da amostra por proporcionar menores efeitos térmicos quando comparado aos pulsos de 7 ns.

Recentemente, Banerjee e Fedosejevs [77] demonstraram que os espectros em fs-LIBS (pulsos de 120 fs) não necessariamente refletiam a composição média de toda a profundidade analisada, mas sim a da camada superficial da região ablada de amostras de *wafers* de Cr/Cu/Cr e de silício recoberto com Cu. Em termos gerais, as contribuições em LA-ICP-MS têm mostrado que os pulsos ultracurtos podem fornecer melhores parâmetros analíticos de desempenho em termos de precisão e exatidão das medições quando comparado com os pulsos em regime de ns.[40, 71, 73] No entanto, cabe destacar que resultados apropriados também podem ser obtidos empregando-se pulsos em regime temporal de ns, principalmente quando se utiliza padrões e/ou amostras de calibração com compatibilidade matricial.[71, 78] Recentemente, Ohata et al.[79] demonstraram que a ablação com laser em regime de fs não ofereceu melhorias substanciais na exatidão das medições em amostras de vidros por LA-ICP-MS. Os autores concluíram que, embora a ablação com pulsos em regime de fs apresente melhor desempenho e maior flexibilidade com relação à variabilidade matricial, a ablação com pulsos de ns deve ser reconsiderada em algumas situações.

Santos Jr et al.[23] avaliaram o desempenho de fs-LIBS visando à determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na e P em pastilhas de tecidos animais. Os autores construíram curvas de calibração a partir de CRMs provenientes de diferentes tecidos animais e observaram que a calibração não foi dependente da matriz. Gill et al.[80] empregaram fs-LIBS visando à classificação de materiais biológicos (*e.g.*, casca de ovo, osso, cartilagem e vísceras) a partir de propriedades dos espectros de emissão. Os autores concluíram que a intensidade dos espectros de emissão mostrou-se dependente das condições de focalização dos pulsos do laser.

Cabe informar que, até o momento, não existe nenhum trabalho visando à análise quantitativa de materiais vegetais por fs-LIBS, sendo que seu uso está restrito somente às aplicações envolvendo mapeamento elementar de estruturas vegetais devido aos menores efeitos térmicos inerentes à ablação com pulsos de fs.[1, 81-83] A ablação em regime de fs proporciona melhor precisão lateral e axial, com resolução da ordem de 100 nm,[84] permitindo inclusive a análise de células individuais de plantas sem dano colateral induzido pelas ondas de choque.[85]

1.3 Análise de materiais vegetais por LIBS

1.3.1 Importância

A determinação de macro- e micronutrientes em material foliar é de suma importância para avaliar o estado nutricional de plantas e é comumente utilizada para a detecção de deficiências nutricionais que podem limitar a produção e a qualidade de frutas, legumes e cereais.[1]

Em geral, a determinação dos elementos nas folhas é realizada em amostras devidamente coletadas, limpas (lavadas), secas e homogeneizadas. Os métodos tradicionais incluem a digestão por via úmida de uma porção de amostra (*e.g.*, 250 – 1000 mg), em sistemas abertos ou fechados, para a posterior determinação dos elementos por métodos bem estabelecidos como a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES).[86] A digestão assistida por radiação micro-ondas, em frascos fechados, com HNO_3 e H_2O_2 constitui o método de preparo de amostras mais recomendado para a decomposição de plantas. Segundo Trevizan et al., [87, 88] a análise dos digeridos por ICP OES é o método mais apropriado para as determinações em rotina da maioria dos macro- e micronutrientes devido à sua características multielementar e simultânea. Pode-se realizar as determinações de P, K, Ca, Mg, S, Fe, Cu, Mn, Zn e B em aproximadamente 20-30 s em cada digerido empregando-se instrumentação moderna com configuração óptica radial e axial.

LIBS apresenta características bastante atraentes como a análise multielementar e simultânea,[10] e também as vantagens associadas à análise direta de sólidos como por exemplo a diminuição do número de etapas do pré-tratamento da amostra, redução dos riscos de contaminação, e eliminação ou redução da geração de resíduos.[89] No entanto, cabe destacar que, até o momento, o grande desafio em se propor um procedimento em LIBS é demonstrar que seu desempenho é apropriado para o problema analítico em questão.

No caso da análise de amostras vegetais por LIBS, observa-se um aumento expressivo no número de aplicações envolvendo a análise elementar qualitativa e quantitativa.[1, 81] Embora a análise qualitativa seja uma tarefa bastante simples, a obtenção de resultados quantitativos no que se refere à composição elementar das amostras é mais complexa.[90]

1.3.2 Estratégias de calibração

Em termos gerais, a calibração ainda é uma etapa bastante crítica na análise direta de sólidos. Esta afirmação é particularmente válida para LIBS, LA-ICP-MS e LA-ICP OES, uma vez que estes métodos apresentam calibração bastante dependente das características físicas e químicas da matriz e, também, por se observar uma carência de CRMs adequados.[78]

Curvas de calibração preparadas com CRMs têm sido eventualmente utilizadas para análises quantitativas em LIBS,[91] e esta estratégia tem sido usada para a análise de amostras vegetais.[87, 88, 92-94] Além disso, o uso de curvas de calibração construídas com amostras previamente analisadas por um método de referência também é uma alternativa viável, principalmente quando CRMs apropriados não estão disponíveis.[95] Recentemente, outra estratégia bastante interessante para a produção de materiais de calibração com compatibilidade de matriz foi proposta por Gomes et al.[78] Esses autores submeteram uma porção de amostras de folhas de cana-de-açúcar cominuídas a um procedimento de extração ácida a fim de se produzir uma amostra contendo baixas concentrações dos analitos, ou até mesmo um branco, que, posteriormente, foi misturado à amostra original, em diferentes proporções, obtendo-se um conjunto de amostras de calibração com compatibilidade de matriz. Posteriormente, a composição química desses materiais foi determinada por ICP OES após digestão ácida, e a adequabilidade desses materiais foi demonstrada visando à determinação de Ca, P, K, Mg, Cu, Mn e Zn por ns-LIBS em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar.

Métodos de calibração multivariada como, por exemplo, a regressão pelos mínimos quadrados parciais (*PLS – partial least square regression*) também têm sidos empregados em análise quantitativa de plantas por LIBS.[95, 96] Esses métodos são mais versáteis frente à complexidade dos espectros de emissão, uma vez que fatores relacionados com as variações nas respostas analíticas podem ser correlacionados com as propriedades de interesse de maneira mais eficiente e robusta. Idealmente, cada fator adicionado ao modelo de calibração deveria descrever uma variação relevante para a previsão das espécies de interesse.[97] No tocante à análise de materiais vegetais, o uso de PLS mostrou-se apropriado para a análise de folhas,[95, 96] grãos de café,[98] e madeiras tratadas.[99]

Outra possibilidade é o uso do método *Calibration-free LIBS* (CF-LIBS), que constitui em uma estratégia para análises multielementares quantitativas que não requer o uso de curvas de calibração e de padrões com compatibilidade de matriz.[100, 101] Em CF-LIBS, as frações de massa dos analitos são determinadas a partir de algoritmos que consideram as intensidades das linhas do espectro de emissão, as constantes espectroscópicas (*e.g.*, probabilidades da transição

eletrônica e energias de excitação), as propriedades físicas do plasma (*e.g.*, densidade eletrônica e temperatura), e a hipótese de que o plasma encontra-se em equilíbrio termodinâmico local. Informações detalhadas sobre o estado da arte de CF-LIBS foram descritas por Tognoni et al.[101]

CF-LIBS tem sido usado para a análise de folhas de álamo [102] e de batatas frescas.[103-105] Segundo os autores, [103, 104] resultados concordantes entre os dados estimados por CF-LIBS e as frações de massa determinadas pelos métodos de referência (i.e., ICP OES, ICP-MS, e AAS) foram obtidos. No entanto, os dados apresentados nos trabalhos mencionados não suportam as respectivas conclusões. Analogamente, Lei et al. [105] e Ma et al. [102] não apresentaram dados sobre a exatidão dos resultados. Cabe informar que essas dificuldades observadas na análise de amostras orgânicas deveriam ser esperadas, pois, segundo Tognoni et al., [101] apesar de CF-LIBS ser adequado para uma caracterização global de uma dada matriz, este método pode apenas fornecer uma análise semi-quantitativa dos componentes minoritários, pois as incertezas relativas às determinações dos elementos majoritários podem refletir em erros relativos que prejudicam a determinação dos elementos minoritários.

Recentemente, Cavalcanti et al. [106] propuseram o método "*One-point calibration for CF-LIBS*", que se baseia no uso de apenas uma amostra de calibração, com compatibilidade de matriz, para melhor determinar os parâmetros probabilísticos a serem empregados em CF-LIBS. No entanto, ainda não existe nenhuma aplicação deste método para a análise de materiais vegetais.

1.3.3 Análise quantitativa

Duas estratégias podem ser usadas para a análise de amostras vegetais pulverizadas por LIBS. A primeira baseia-se na análise direta do pó fixado em uma fita adesiva de dupla-face colada sobre uma lâmina de vidro.[93] Apesar de ser aparentemente simples, esta alternativa requer uma manipulação cuidadosa do material cominuído, a fim de se obter uma camada fina, uniforme e reprodutível sobre a fita adesiva.[107] A outra estratégia baseia-se no preparo de pastilhas a partir da prensagem da amostra cominuída (*e.g.*, 0,5 a 2,0 g). Esta abordagem tem sido amplamente explorada, pois proporciona maior repetitividade e reprodutibilidade das medições. Contudo, a distribuição do tamanho das partículas deve ser considerada para se obter uma apresentação apropriada das pastilhas para a análise por LIBS.[107, 108]

Trevizan et al. avaliaram ns-LIBS para a determinação de macronutrientes (P, K, Ca e Mg) [87] e de micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn) [88] em pastilhas de plantas provenientes de diferentes espécies (*e.g.*, soja, café e milho), preparadas a partir da prensagem de amostras de

folhas moídas criogenicamente por 2 min. Cabe informar que a distribuição do tamanho das partículas das amostras não foi considerada no preparo das pastilhas. A repetitividade das medições feitas em 10 pontos de amostragem na superfície da pastilha variou entre 4 e 30 %.[88] Os resultados previstos por ns-LIBS foram parcialmente concordantes com os de referência, obtidos por ICP OES após digestão ácida das amostras. Os resultados discrepantes foram atribuídos aos efeitos de matriz e às diferenças na distribuição do tamanho das partículas dos CRMs e das amostras analisadas.

Posteriormente, Pouzar et al.[109] propuseram um método para a determinação de K, P, Mg e Ca em pastilhas de folhas de plantas provenientes de diferentes espécies, preparadas a partir da prensagem do material cominuído criogenicamente por 4 min, empregando-se na calibração 7 amostras de folhas de cevada e 3 de folhas de papoula. Os autores observaram resultados concordantes com os de referência (ICP OES e FAAS após digestão ácida) quando amostras com composição química similar foram analisadas, sendo que os resultados discrepantes foram associados às diferenças na composição química entre os CRMs utilizados na validação e as amostras utilizadas na calibração.

Em outra contribuição, Braga et al.[96] compararam o desempenho de modelos de calibração uni- e multivariados, baseados em PLS, para a determinação de B, Cu, Fe, Mn e Zn em pastilhas de folhas provenientes de diferentes espécies, preparadas a partir da prensagem de amostras moídas criogenicamente por 6 min e misturadas com celulose 30 % m/m. Os autores empregaram um conjunto de 15 amostras, previamente analisadas por ICP OES após digestão ácida, para a construção dos modelos de calibração, sendo observados desempenhos similares entre as duas estratégias de calibração. No entanto, o uso de PLS mostrou-se mais robusto, pois proporcionou um número menor de amostras anômalas (*outliers*). Embora o uso de aglutinante tenha melhorado a geometria das crateras e reduzido a porosidade das pastilhas, ele não reduziu os efeitos de matriz.

Observou-se uma melhora significativa na qualidade dos resultados quando amostras de calibração e de validação semelhantes em termos de composição química e de propriedades físicas foram utilizadas, conforme demonstrado por Nunes et al.[95] na determinação de P, K, Ca, Mg, B, Cu, Fe, Mn e Zn em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar (41 amostras provenientes de 6 variedades), preparadas a partir da prensagem das folhas moídas criogenicamente por 40 min. Com exceção do Fe, os resultados previstos por ns-LIBS empregando-se tanto calibração univariada quanto PLS mostraram-se bastante concordantes com os de referência (ICP OES após digestão ácida). Somente PLS forneceu resultados exatos para Fe. Esses resultados

demonstram que existe uma dependência das propriedades físico-químicas da matriz na calibração em ns-LIBS.

Posteriormente, Souza et al.[2] confirmaram que a calibração é dependente das propriedades físico-químicas da matriz e, também, do uso de condições experimentais apropriadas como, por exemplo, a fluência do laser, conforme demonstrado para a determinação de Si em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar provenientes de 18 variedades distintas, preparadas a partir da prensagem das folhas moídas criogenicamente por 40 min. Esses autores observaram uma maior concordância entre os resultados previstos por ns-LIBS e os de referência (ICP OES após digestão alcalina) quando a fluência do laser foi aumentada de 25 para 50 J cm^{-2}.

1.4 Objetivos

O objetivo desta tese foi avaliar estratégias visando à diminuição dos efeitos de matriz na determinação quantitativa de macro- e micronutrientes em plantas por LIBS. Em uma primeira etapa, foram avaliados os efeitos do tamanho das partículas e da fluência na análise de material foliar por ns-LIBS a 1064 nm. As variações nas intensidades dos sinais de emissão de Ca, K, Mg, P, B e Mn e na precisão das medições foram avaliadas com a análise de pastilhas preparadas com diferentes distribuições do tamanho das partículas em diferentes condições de fluência.

Em uma segunda etapa, avaliaram-se os efeitos do comprimento de onda do laser de Nd:YAG, de 266 a 1064 nm, na determinação de P, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn, B, Al e Na em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar por ns-LIBS.

Posteriormente, foram investigados os desempenhos de ns-LIBS e fs-LIBS na determinação de macro- e micronutrientes em amostras de folhas de várias culturas de interesse agronômico. Nesta etapa, modelos de calibração uni- e multivariado também foram investigados visando à determinação de Ca, Mg, P, Cu, Fe, Mn e Zn.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo das amostras

A análise quantitativa de tecidos vegetais por LIBS requer que as amostras sejam analisadas na forma de pastilhas, preparadas pela prensagem de folhas previamente secas e moídas/cominuídas. Este procedimento visa ao aumento da micro-homogeneidade dos elementos na amostra teste, e à minimização de variações na densidade, porosidade e rugosidade das mesmas.[1]

Os experimentos para avaliar os efeitos da distribuição do tamanho das partículas nos sinais de emissão foram feitos com amostras de folhas de boldo-do-Chile (*Peumus boldus* Molina) adquiridas no Laboratório Fármaco-botânico Prof. Walter Radamés Accorsi. Alíquotas de 2 g de folhas de boldo, previamente moídas em moinho de facas com peneira com abertura de 600 µm (Marconi, Brasil), foram cominuídas em moinho criogênico (Spex 6800 Freezer Mill, USA), fixando-se a etapa de pré-congelamento de 5 min e os intervalos de recongelamento durante 1 min. Utilizaram-se 3, 5 e 15 ciclos de 2 min de moagem. Após cominuição criogênica, o material foi peneirado através de peneiras de aço inoxidável com aberturas de 150, 106, 75, 53 e 20 µm (ASTM 100, 140, 200, 270 e 635, respectivamente) com o auxílio de um agitador de peneiras vibratório.[110] O procedimento de moagem/peneiramento foi repetido até a obtenção de alíquotas de cada fração suficientes para a realização dos experimentos.

Para a avaliação dos efeitos da fluência do laser na exatidão das medições, utilizou-se um conjunto de amostras de folhas provenientes de 23 variedades de cana-de-açúcar, sendo 18 desenvolvidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC - Piracicaba, SP) e 05 pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC – Campinas, SP). Essas amostras foram coletadas de acordo com protocolo recomendado para fins de diagnose foliar.[111, 112] Para cada variedade foram coletadas 40 folhas diagnóstico ("folha + 1"), ao acaso, dentro do talhão. Cada folha foi dividida em 3 partes e somente o terço médio foi amostrado. Retirou-se a nervura central manualmente. Os terços médios foram lavados com água corrente e, posteriormente, com água destilada para retirar as partículas de poeira e solo aderidas à superfície das mesmas. Em seguida, eles foram transferidos para sacos de papel perfurados, devidamente identificados, e colocados em estufa com circulação forçada de ar (Fanem, São Paulo, Brasil) entre 60 e 65 ºC até massa constante (cerca de 72 horas). Alíquotas de 2 g de folhas de cana-de-açúcar, previamente moídas em moinho de facas (partículas < 600 µm), foram cominuídas em moinho criogênico (Spex 6800 Freezer Mill, USA), fixando-se a etapa de pré-congelamento de 5 min e os intervalos de

recongelamento durante 1 min. Utilizou-se 20 ciclos de 2 min de moagem, conforme recomendado.[95]

Os experimentos para avaliar os efeitos do comprimento de onda do laser foram feitos com um conjunto de amostras de folhas de cana-de-açúcar provenientes de 14 variedades. Essas amostras foram cominuídas em moinho de bolas planetário PM 400 (Retsch, Alemanha). Cerca de 20 g de amostra, previamente moída em moinho de facas (partículas < 600 µm), e 100 bolas de ágata com 10 mm de diâmetro foram introduzidos no interior de um frasco de ágata de 250 mL, submetendo-se o conjunto a 400 rpm durante 60 min. O sentido de rotação dos frascos foi alternado, permanecendo 10 min no sentido horário e 10 min no sentido anti-horário, conforme recomendado.[107, 110]

Os experimentos para comparar o desempenho de LIBS em regime temporal de femto- e de nanossegundos foram feitos com um conjunto de 26 amostras de folhas de várias culturas de interesse agronômico, provenientes de 15 espécies distintas (**Tabela 2.1**). A cominuição dessas amostras laboratoriais, previamente moídas em moinho de facas com peneira com abertura de 600 µm, foi feita em moinho criogênico Spex 6800 Freezer Mill (Spex, USA). Cerca de 2 g de amostra foram moídos por 10 min, fixando-se a etapa de pré-congelamento em 5 min, e empregando-se 5 ciclos de moagem de 2 min, com intervalos de 1 min para recongelamento entre os ciclos.[113] O peneiramento das amostras moídas criogenicamente foi feito através de peneiras de aço inoxidável (Bertel, Brasil) com abertura de 75 µm (ASTM 200) empregando-se um agitador vibratório (Bertel, Brasil) por 10 min, conforme recomendado.[108] Para essas amostras, a fração das partículas maiores que 75 µm foi descartada.

Além das amostras mencionadas na **Tabela 2.1**, foram analisados materiais de referência certificados (CRMs) de origem vegetal produzidos pelo *National Institute of Standards and Technology* (NIST). Os códigos dos CRMs e as respectivas matrizes estão listados na **Tabela 2.2**.

Conforme destacado anteriormente, todas as amostras foram analisadas na forma de pastilhas, as quais foram preparadas transferindo-se 500 mg da amostra para uma matriz de aço inoxidável, aplicando-se 8,0 t cm^{-2} durante 3 min.[87] As pastilhas apresentaram 15 mm de diâmetro e aproximadamente 2 mm de espessura.

Tabela 2.1 – Espécies de plantas utilizadas nesta tese (*n* = número de amostras)

Nome popular	***Nome científico***	***n***
Cana-de-açúcar	*Saccharum officinarum*	6
Soja	*Glycine max*	3
Citros	*Citrus sinensis*	3
Café	*Coffea arabica*	2
Milho	*Zea mays*	2
Eucalipto	*Eucalyptus* spp.	1
Manga	*Mangifera indica*	1
Feijão*	*Phaseolus vulgaris*	1
Banana	*Musa paradisiaca*	1
Alface	*Lactuca sativa*	1
Braquiária	*Brachiaria decumbens*	1
Milheto*	*Pennisetum americanum*	1
Videira	*Vitis* spp.	1
Seringueira	*Hevea brasiliensis*	1
Tomate	*Solanum lycopersicum*	1

* Planta inteira.

Tabela 2.2 - Materiais de referência certificados (CRM) de origem vegetal.

Código	**Matriz**
NIST 1515	Folhas de macieira
NIST 1547	Folhas de pessegueiro
NIST 1570a	Folhas de espinafre
NIST 1573a	Folhas de tomateiro
NIST 1575a	Acículas de pinheiro

2.2 Instrumentação em LIBS

2.2.1 Sistema ns-LIBS com laser de Nd:YAG e espectrômetro com óptica *Echelle* e *ICCD*

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. A geração dos harmônicos foi feita com cristais deuterizados (KD*P). Cada módulo de geração dos harmônicos possui um cristal posicionado no interior de uma célula selada e com estabilização térmica. As janelas das células possuem revestimento anti-reflexo de acordo com o respectivo comprimento de onda. O segundo harmônico (532 nm) foi gerado acoplando-se o módulo 2ω em frente à janela de saída do laser. A geração do terceiro (355 nm) ou do quarto harmônico (266 nm) pode ser feita acoplando-se os respectivos módulos (3ω ou 4ω) na janela de saída do módulo 2ω. A temperatura dos módulos 2ω e 3ω é estabilizada automaticamente, enquanto que a do módulo 4ω é definida experimentalmente pela resistividade aplicada na célula selada.

Os pulsos de laser foram focalizados na superfície da pastilha com uma lente convergente plano-convexa de sílica fundida (2,54 cm de diâmetro e distância focal de 20,0 cm (Edmund Optics, EUA). As pastilhas foram posicionadas em um suporte, o qual foi fixado em um controlador manual com translação em 2 eixos, movendo-se ortogonalmente em relação ao feixe do laser, que também permite a análise das pastilhas em movimento giratório. A ablação foi feita em fluxo laminar de argônio, com vazão de 4 L min^{-1}, tangencialmente à superfície da pastilha fixada no suporte da amostra, diminuindo a presença de ar atmosférico no ambiente de reação.

A emissão do plasma foi focalizada por um telescópio composto por lentes plano-convexas convergentes de sílica fundida com distância focal de 50 e 80 mm (LLA Instruments GmbH, Alemanha), o qual foi acoplado com o auxílio de uma fibra óptica na fenda de entrada do espectrômetro. Utilizou-se um espectrômetro ESA 3000 (LLA Instruments GmbH, Alemanha) equipado com óptica Echelle (distância focal de 25 cm e abertura numérica de 1:10) e detecção por um ICCD (*intensified charge coupled device*) Kodak KAF 1001 de 1024 x 1024 pixels. Este sistema proporciona uma imagem plana de 24,6 mm × 24,6 mm. 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 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 de Hg e de Zn (EDL II System, Perkin Elmer, Alemanha). A energia dos pulsos do laser foi monitorada com um detector de energia equipado com sensor piroelétrico (FieldMax II-P Coherent, USA), com desempenho apropriado para os comprimentos de onda utilizados neste trabalho. O controle deste equipamento e a aquisição dos dados foi feita por computador com o software fornecido pelo fabricante. A **Figura 2.1** mostra o sistema ns-LIBS e o arranjo óptico utilizados. Neste sistema, os pulsos de laser são focalizados diretamente na superfície da pastilha através de uma lente plano-convexa, e a radiação emitida pelo plasma é coletada pelo telescópio, e direcionada para o espectrômetro por um cabo de fibra óptica.

Realizou-se os experimentos envolvendo a influência da distribuição do tamanho das partículas a partir da análise de 10 pontos de amostragem independentes na superfície de cada pastilha (1,5 mm equidistantes entre si). Por conseguinte, coletou-se 10 espectros de emissão em cada pastilha (20 pulsos acumulados por espectro) e o processamento dos dados baseou-se na análise de 10 replicatas. Analogamente, no caso dos experimentos envolvendo os efeitos da fluência do laser na análise de pastilhas de folhas de cana-de-açúcar, considerou-se 30 espectros de emissão (i.e., $n = 30$).

Os experimentos envolvendo os efeitos do comprimento de onda do laser foram feitos com a amostra em movimento (i.e., rodando), coletando-se cada espectro a partir da acumulação de 200 pulsos. Posteriormente, o processamento dos dados baseou-se na análise de 6 replicatas.

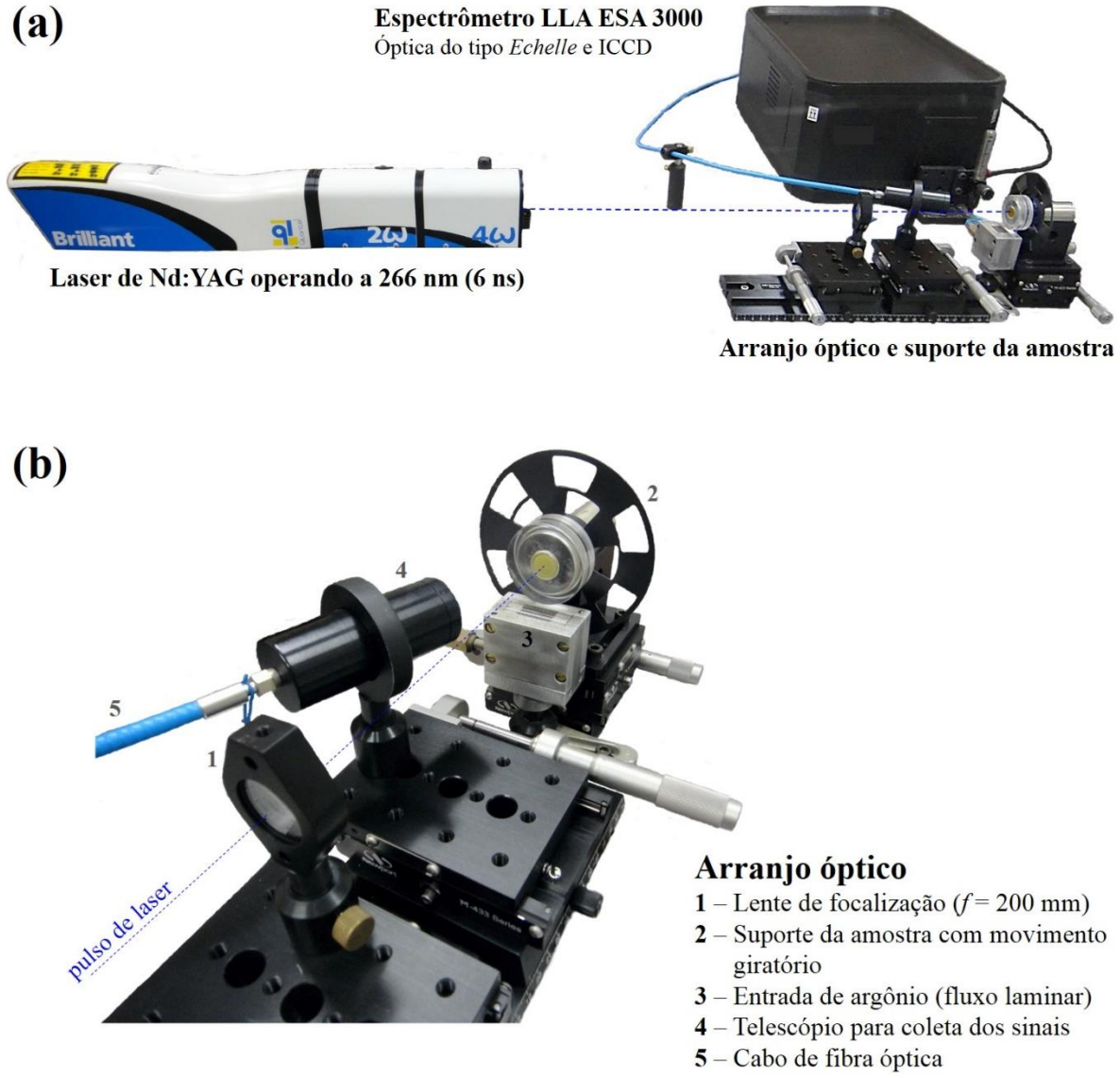


Figura 2.1 – (a) Montagem do sistema LIBS com laser de nanossegundos *Brilliant* operando a 266 nm; e (b) arranjo óptico com o suporte giratório da amostra.

2.2.2 Sistema ns-LIBS com laser de Nd:YAG e espectrômetro com óptica *Czerny-Turner* e *ICCD*

A segunda parte do experimento envolvendo a análise de plantas provenientes de diferentes espécies por ns-LIBS operando em diferentes comprimentos de onda foi feita no Departamento de Química Analítica da Universidade de Málaga, Espanha. Utilizou-se um laser pulsado de Nd:YAG (*Brilliant B*, Quantel, França) com energia máxima de 850 mJ por pulso no comprimento de onda fundamental, produzindo pulsos com 9 mm de diâmetro (fator de qualidade $M^2 < 2$), 6 ns de duração (*full width at half maximum* - FWHM) e taxa de

repetição de até 20 Hz. A geração do segundo e quarto harmônicos foi feita com os respectivos módulos dobradores de frequência com cristais não-lineares de KD*P (Quantel, França). Após serem direcionados ortogonalmente por um espelho dicroico plano com refletância > 99 % de acordo com o comprimento de onda do laser (Newport, EUA), os pulsos de laser foram focalizados na superfície da pastilha com uma lente convergente plano-convexa (2,54 cm de diâmetro e distância focal de 75 mm, Edmund Optics, EUA). As pastilhas foram posicionadas em um suporte afixado em um controlador manual com translação em 2 eixos, movendo-se ortogonalmente em relação ao feixe do laser. A ablação foi feita em atmosfera de argônio com vazão de 4,0 L min^{-1} tangencialmente à superfície da pastilha.

Para a obtenção dos espectros de emissão, a radiação emitida pelo plasma foi focalizada na entrada de uma fibra óptica (diâmetro interno de 600 µm, 2 m de comprimento), acoplada na fenda de entrada do espectrômetro, através de uma lente plano-convexa de sílica fundida (2,54 cm de diâmetro e distância focal de 120 mm, Edmund Optics, EUA), posicionada a 120 mm do plasma. Utilizou-se um espectrômetro *Shamrock* 303i (Andor Technology, Irlanda) equipado com óptica *Czerny-Turner* (distância focal de 303 mm) e câmera ICCD (*intensified charge-coupled device*) Andor iStar DH740-25F-03 de 1024 x 1024 pixels (dimensão de cada pixel = 13,5 μm^2). A temperatura da ICCD foi mantida em -10 ºC. A fenda de entrada do espectrômetro foi fixada em 10 µm e utilizou-se uma rede de difração com 1200 linhas mm^{-1}. Esta condição proporcionou uma janela espectral de cerca de 65 nm com resolução de 0,10 nm. As medições foram feitas em 2 janelas espectrais compreendidas entre 200 e 265 nm, e entre 280 e 345 nm. A **Figura 2.2** mostra o sistema LIBS utilizado. Neste sistema, os pulsos de laser são refletidos por um espelho dicroico plano e focalizados na superfície da pastilha através de uma lente plano-convexa. A radiação emitida pelo plasma é coletada por uma lente, focalizada na entrada de um cabo de fibra óptica e direcionada para o espectrômetro.

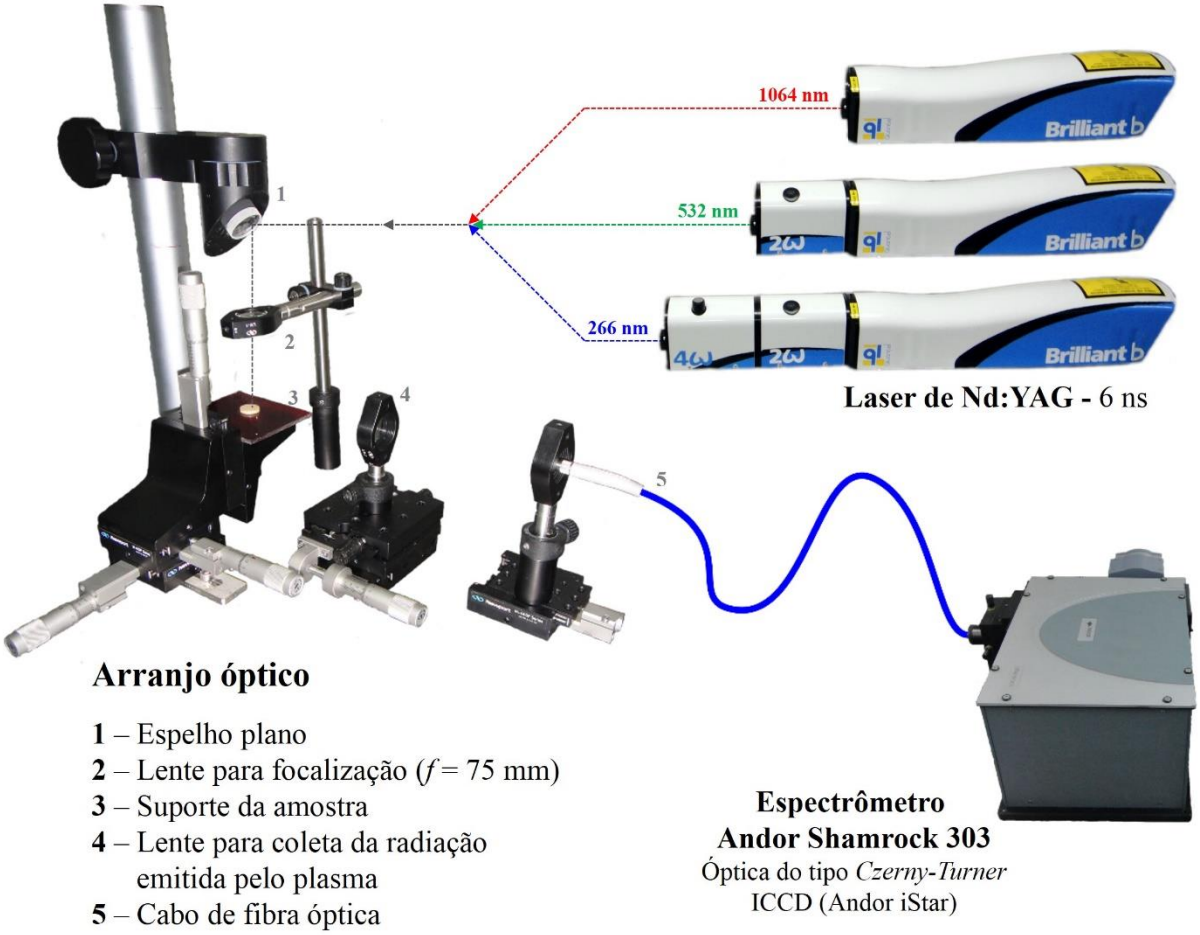


Figura 2.2 - Montagem do sistema LIBS com laser de nanossegundos *Brilliant B* operando a 1064, 532 e 266 nm.

Para a aquisição de imagens do plasma, a radiação emitida pelo plasma foi focalizada por uma lente plano-convexa de sílica fundida (2,54 cm de diâmetro e distância focal de 120 mm, Edmund Optics, EUA) na janela de entrada da câmera ICCD. Para atenuar a radiação emitida pelo plasma, empregou-se um filtro de densidade óptica de 1,5 (25 mm de diâmetro, neutro para as regiões UV-VIS) que proporciona transmitância de 3 % da radiação incidente (#47-209, Edmund Optics, EUA). As imagens foram integradas durante 15 ns, empregando-se diferentes tempos de atraso em relação ao pulso do laser (de 250 a 2000 ns). A **Figura 2.3** ilustra a montagem óptica usada nesse experimento. Neste sistema, a imagem do plasma induzido por laser, atenuada por um filtro, é projetada na janela de entrada da câmara ICCD através de uma lente.

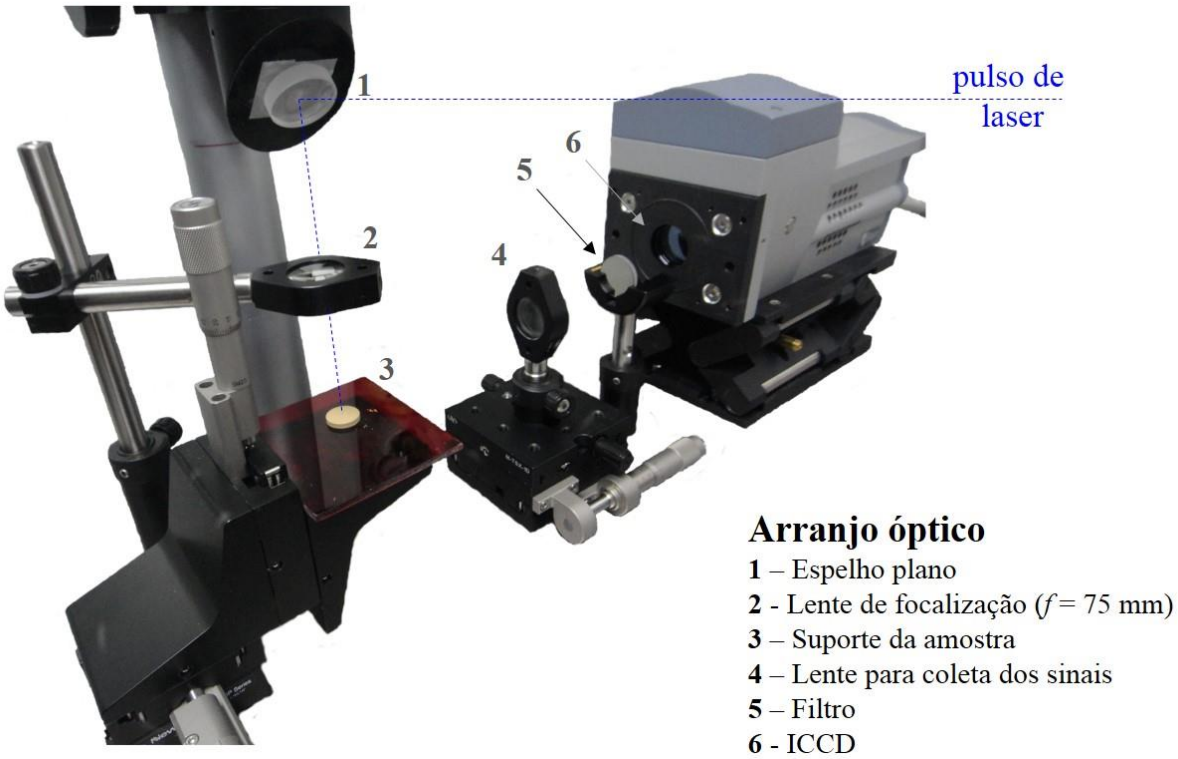


Figura 2.3 - Montagem óptica usada para aquisição de imagens do plasma.

2.2.3 Sistema fs-LIBS com laser de Ti:Safira e espectrômetro com óptica *Czerny-Turner* e *ICCD*

Os experimentos com LIBS em regime temporal de femtossegundos foram feitos no Departamento de Química Analítica da Universidade de Málaga, Espanha. Utilizou-se um laser pulsado de Ti:Safira modelo Mai Tai e um amplificador Spitfire Pro (Spectra-Physics, Estados Unidos) operando a 800 nm, com energia máxima de 3,3 mJ por pulso (fator de qualidade M^2 < 1,3), 60 fs de duração (FWHM) e taxa de repetição de até 10 kHz. Após serem direcionados ortogonalmente por um espelho dicroico plano com refletância > 99 % na região de 800 nm (EKSMA Optics, Lituânia), os pulsos do laser foram focalizados na superfície da pastilha com uma lente convergente plano-convexa BK7 (2,54 cm de diâmetro e distância focal de 75 mm, EKSMA Optics, Lituânia). As pastilhas foram posicionadas em um suporte afixado em um controlador manual com translação em 2 eixos, movendo-se ortogonalmente em relação ao feixe do laser. A ablação foi feita em atmosfera de argônio com vazão de 4,0 L min^{-1} tangencialmente à superfície da pastilha.

Para a obtenção dos espectros de emissão, a radiação emitida pelo plasma foi focalizada na entrada de uma fibra óptica (diâmetro interno de 1000 µm, 1,5 m de comprimento), acoplada na fenda de entrada do espectrômetro, através de uma lente plano-convexa de sílica fundida (3,81 cm de diâmetro e distância focal de 53 mm, Edmund Optics, EUA), posicionada a 53 mm do plasma.[15] Utilizou-se um espectrômetro *Shamrock* 303i (Andor Technology, Irlanda) equipado com óptica *Czerny-Turner* e ICCD, cujas especificações estão detalhadas no **item 2.2.2**. A **Figura 2.4** mostra o sistema fs-LIBS utilizado. Neste sistema, os pulsos de laser são refletidos por um espelho dicroico plano e focalizados na superfície da pastilha através de uma lente plano-convexa. A radiação emitida pelo plasma é coletada por uma lente, focalizada na entrada de um cabo de fibra óptica e direcionada para o espectrômetro.

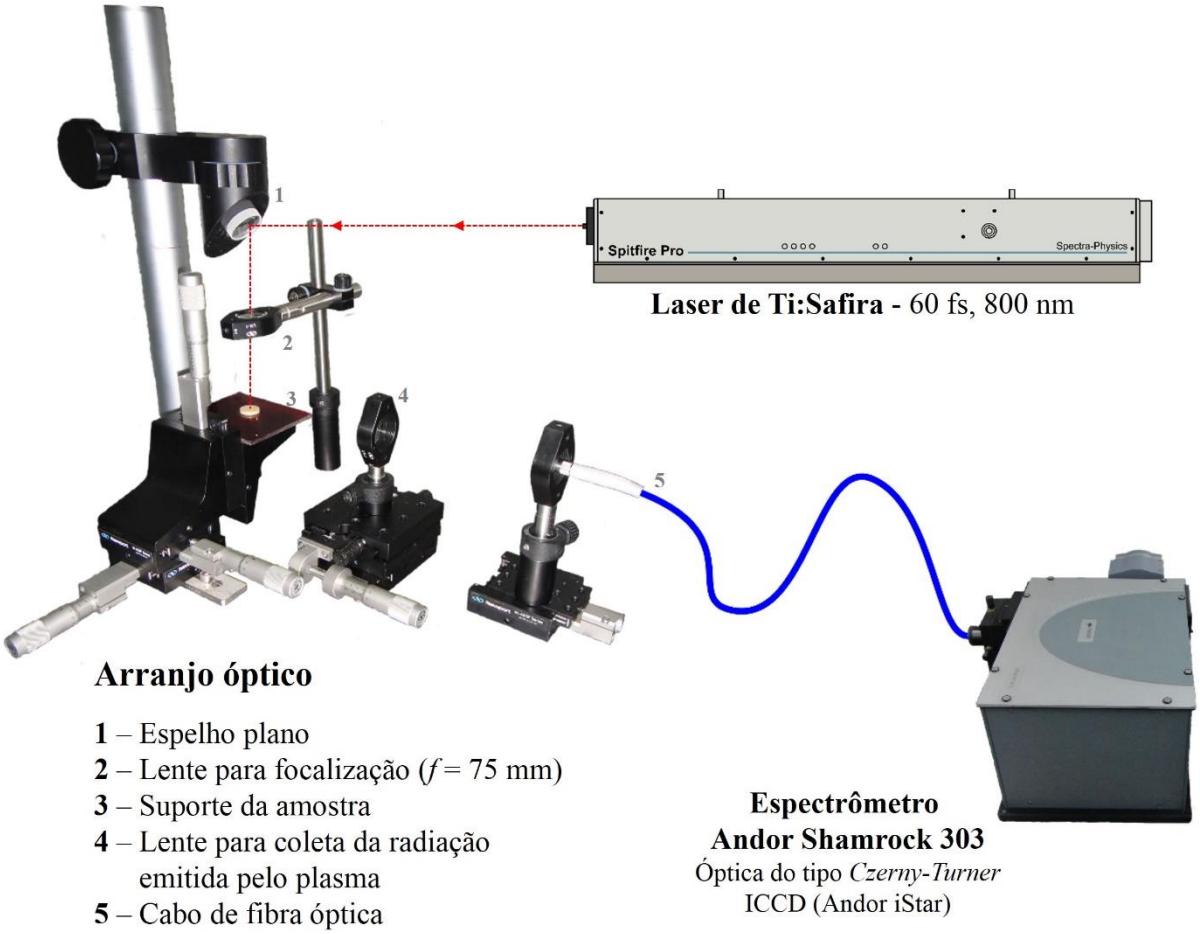


Figura 2.4 – Montagem do sistema LIBS com laser de femtossegundos operando a 800 nm.

Os experimentos envolvendo a comparação de LIBS em regime temporal de femto- e de nanossegundos (a 1064, 532 e 266 nm), **item 3.5**, foram feitos a partir da análise de

15 pontos de amostragem distintos na superfície de cada pastilha (1,5 mm equidistantes entre si). Embora um total de 15 espectros de emissão tenham sido coletados em cada pastilha, o processamento subsequente dos dados baseou-se na análise em triplicatas, onde cinco espectros acumulados (oriundos de 5 pontos de amostragem) foram processados em um espectro médio representativo da amostra. Esta estratégia de combinação de espectros individuais permite a obtenção de um espectro mais representativo, minimizando assim alguns inconvenientes relacionados à falta de homogeneidade dos analitos nas amostras consideradas.

2.3 Método de referência

A espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) foi usada como método de referência para a determinação dos elementos de interesse após decomposição ácida das amostras assistida por radiação micro-ondas. Este procedimento é bem consolidado e amplamente utilizado para a determinação de macro- e micronutrientes em material foliar.[1, 86, 114]

2.3.1 Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas

As decomposições das amostras de tecido vegetal assistidas por radiação micro-ondas foram feitas em triplicata, transferindo-se 250 mg do material seco e moído para os frascos de digestão de PTFE (TFM®) e adicionando-se 6,0 mL de 20 % v/v HNO_3 e 1,0 mL de 30 % m/m H_2O_2 em cada frasco.[114] Os frascos de TFM foram acondicionados individualmente em cilindros de proteção de PEEK (*polyether ether ketone*), fechados e fixados em rotor apropriado para 10 amostras. O rotor foi devidamente instalado na cavidade do forno de micro-ondas e um programa para digestão das amostras foi utilizado (**Tabela 2.3**). Após o resfriamento, a solução da amostra digerida foi transferida para tubos tipo *Falcon* de polietileno de 25,0 mL e o volume completado com água.

Tabela 2.3 – Programa de aquecimento para decomposição de amostras de tecido vegetal assistida por radiação micro-ondas.

Etapa	*Tempo (min)*	*Temperatura (ºC)*	*Potência (W)*
1	5	160	1000
2	2	-	0
3	5[a]	230	1000
4	15	230	1000
5	30	25	0

NOTA: [a] Rampa de aquecimento; como medida de segurança, para evitar aumentos abruptos de pressão, a máxima temperatura externa dos cilindros de proteção foi programada para 90 ºC.

2.3.2 Determinação dos elementos por ICP OES

As determinações de macro- e micronutrientes nas amostras digeridas foram feitas por ICP OES com vista radial e nebulizador de fluxo cruzado em condições robustas de análise. [115, 116] Os digeridos das frações peneiradas de amostras de boldo foram analisados no espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente Optima 3000 DV (Perkin Elmer, Alemanha), com vista radial e axial, enquanto que os das demais amostras no equipamento Vista RL (Varian, Austrália) com vista radial. A **Tabela 2.4** apresenta os parâmetros operacionais utilizados nos 2 equipamentos. Os CRMs NIST 1515, NIST 1547, NIST 1570a, NIST 1573a e NIST 1575a foram usados para o controle de qualidade.

Tabela 2.4 – Parâmetros operacionais utilizados nos espectrômetros de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente Perkin Elmer Optima 3000 DV e Varian Vista RL.

Parâmetros operacionais	***Valores***	
	Optima 3000 DV	*Vista RL*
Potência da radiofrequência (kW)	1,4	1,3
Vazão do gás do plasma (L min^{-1})	15	15
Vazão do gás auxiliar (L min^{-1})	0,5	1,5
Vazão do gás de nebulização (L min^{-1})	0,7	0,6
Vazão da amostra (mL min^{-1})	1,0	1,0
Altura de observação (mm)	15	8
Número de replicatas	3	3
Linhas de emissão (nm)	Ca II 317,933, Mg I 285,212, K I 769,897, P I 214,914, B I 208.957, Cu I 327,396, Fe II 259,939, Mn II 294,920, Zn I 213,855, Al I 237,312, e Na I 588,995.	

2.3.3 Espectrometria de fluorescência de raios-X por energia dispersiva (EDXRF)

2.3.3.1 EDXRF de bancada

Para avaliar se o peneiramento das amostras descritas na **Tabela 2.1** em peneira com abertura de 75 µm provocou mudanças na composição química como, por exemplo, um aumento na concentração de micronutrientes na fração contendo partículas menores,[108, 117] as pastilhas preparadas com as amostras peneiradas e não-peneiradas foram analisadas por EDXRF. Cabe informar que a inerente característica não-destrutiva deste método permitiu que as mesmas pastilhas fossem, posteriormente, analisadas por LIBS.

Utilizou-se um espectrômetro de fluorescência de raios-X por energia dispersiva (Shimadzu EDX-720, Japão) equipado com tubo de raios X de Rh de 50 W e um detector de Si(Li) refrigerado com N_2 líquido. As amostras, na forma de pastilhas, foram acondicionadas sobre membrana Mylar® 3517 (6 µm de espessura, Spex, EUA) fixada em suporte de polietileno (31 mm de diâmetro) compatível com o autoamostrador do equipamento. As pastilhas foram analisadas em triplicata utilizando-se os parâmetros operacionais descritos na **Tabela 2.5**.[112]

Tabela 2.5 – Parâmetros operacionais utilizados nas determinações por EDXRF.

Parâmetro	***Condição***
Voltagem aplicada no tubo (kV)	50
Corrente elétrica aplicada no tubo (µA)	73
Atmosfera de irradiação	Vácuo (30 Pa)
Diâmetro do feixe de irradiação (mm)	5
Tempo de contagem (s)	300
Região espectral analisada (keV)	1 – 40
Raios-X característicos (keV)	Si Kα 1,74, P Kα 2,01, S Kα 2,31, K Kα 3,31, Ca Kα 3,69, Mn Kα 5,90, Fe Kα 6,40, Cu Kα 8,05 e Zn Kα 8,64.

Posteriormente, aplicou-se o teste *t-Student*, bicaudal, ao nível de 95 % de confiança, para comparar as intensidades de emissão de raios-X característicos dos elementos nas frações

peneiradas e nas amostras laboratoriais correspondentes. Nos casos em que foram observadas diferenças significativas entre as intensidades dos raios-X característicos de pastilhas preparadas com amostras peneiradas e não peneiradas, aplicou-se um fator de correção, proporcional à razão entre as intensidades de emissão, no valor de fração de massa correspondente.

2.3.3.2 µ-EDXRF

Realizou-se o mapeamento microquímico de potássio nas pastilhas preparadas com as diferentes frações de tamanho das partículas por µ-EDXRF. Este elemento foi escolhido por apresentar limite de quantificação apropriado por µ-EDXRF, de cerca de 0,9 g kg^{-1} K.[118] Isso permitiu a determinação deste elemento, de maneira adequada, nos 400 pontos de amostragem, mesmo nas frações mais heterogêneas. Cabe informar que os limites de quantificação relativamente altos para Fe, Mn, Cu e Zn [118] impediram a construção de mapas microquímicos para estes micronutrientes.

Utilizou-se o equipamento µEDX-1300 (Shimadzu, Japão) equipado com tubo de raios-X de Rh e detector semicondutor de Si(Li). Para a construção dos mapas microquímicos, selecionou-se, de maneira aleatória, uma área de 1,0 mm^2 na superfície de cada pastilha. Essa área contém 400 pontos de amostragem, com 50 µm de diâmetro cada, espaçados 50 µm entre si. Os parâmetros operacionais utilizados no equipamento foram: diferença de potencial e corrente aplicadas no tubo: 15 kV e 100 µA; tempo de integração dos sinais: 10 s por ponto de amostragem (com tempo morto de 25 %).[118]

A fração de massa de potássio foi estimada de maneira semiquantitativa dividindo-se o teor de K da amostra laboratorial pela intensidade média do raio-X característico K Kα 3,31 keV dos 400 pontos de amostragem (1,0 mm^2). O fator resultante foi empregado para converter as unidades de intensidade (cps μA^{-1}) em fração de massa (g kg^{-1}).

2.4 Determinação da distribuição do tamanho das partículas

A distribuição do tamanho das partículas das frações peneiradas foi obtida por difração a laser, pela via úmida, utilizando-se o equipamento Laser Particle Sizer MicroTec Plus Analysette 22 (Fritsch, Alemanha). As medições foram feitas em triplicata, em porções de cerca de 50 mg.

2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens microscópicas foram adquiridas nas pastilhas recobertas com platina empregando-se um microscópio eletrônico de varredura com detector de elétrons secundários (LEO Stereoscan 440).

2.6 Determinação da temperatura do plasma

A temperatura do plasma induzido por laser foi estimada pelo método de Boltzmann a partir da **Equação 2.1**:[87, 119]

$$\ln\left(\frac{I.\lambda}{g.A}\right) = -\frac{E}{k.T} - \ln\left(\frac{4\pi Z}{h.c.N_0}\right) \qquad \textbf{(Equação 2.1)}$$

onde: I é a intensidade da linha de emissão, λ é o comprimento de onda, A é a probabilidade de transição eletrônica, g é o peso estatístico do nível eletrônico, E é a energia no estado excitado, k é a constante de Boltzmann ($1{,}38 \times 10^{-23}$ J K^{-1}), T é a temperatura (em Kelvin), Z é a função de partição derivada do peso estatístico no estado fundamental, h é a constante de Plank (6,626 x 10^{-34} J s), c é a velocidade da luz (3 x 10^{8} m s^{-1}) e N_0 é a população do estado fundamental. O gráfico do termo da direita da Equação 1 em função de E resulta em uma reta cujo coeficiente angular é igual a $-\frac{1}{kT}$. Os valores das constantes espectroscópicas das linhas iônicas de Fe utilizadas na distribuição de Boltzmann estão listadas na **Tabela 2.6**.

Neste trabalho, a temperatura do plasma foi estimada empregando-se as intensidades das linhas de Fe II emitidas pelo plasma induzido por laser de Nd:YAG, operando nos 4 harmônicos, formado na superfície de pastilhas de folhas de espinafre (NIST 1570a). A intensidade das linhas de emissão foi medida empregando-se 200 pulsos acumulados, 2,0 µs de atraso e 5,0 µs de integração.

Tabela 2.6 – Constantes espectroscópicas das linhas de Fe II usadas para a determinação da temperatura do plasma induzido por laser pela distribuição de Boltzmann. λ = comprimento de onda, A = probabilidade da transição eletrônica, E = energia, g = peso estatístico do nível eletrônico. Dados da referência.[121]

λ (nm)	A (s^{-1})	E (eV)	g	λ (nm)	A (s^{-1})	E (eV)	g
232,739	$6,55 \times 10^{7}$	5,40	4	242,269	$1,46 \times 10^{8}$	9,00	8
233,131	$3,17 \times 10^{7}$	5,54	8	243,226	$1,57 \times 10^{8}$	7,94	8
233,280	$1,31 \times 10^{8}$	5,36	6	244,451	$2,78 \times 10^{8}$	7,65	8
233,801	$1,13 \times 10^{8}$	5,40	4	244,557	$2,07 \times 10^{8}$	7,77	6
234,349	$1,73 \times 10^{8}$	5,28	8	245,878	$2,31 \times 10^{8}$	8,24	12
235,120	$7,19 \times 10^{7}$	7,92	10	252,181	$2,36 \times 10^{8}$	9,06	8
235,448	$8,13 \times 10^{7}$	7,94	8	254,338	$6,7 \times 10^{7}$	7,54	12
235,489	$2,67 \times 10^{7}$	5,61	4	255,068	$1,07 \times 10^{8}$	8,10	12
236,483	$5,9 \times 10^{7}$	5,28	8	256,253	$1,79 \times 10^{8}$	5,82	6
236,859	$6,06 \times 10^{7}$	5,58	4	256,348	$1,51 \times 10^{8}$	5,87	4
238,076	$3,1 \times 10^{7}$	5,28	8	257,436	$2,43 \times 10^{8}$	7,39	4
238,439	$3,22 \times 10^{7}$	5,58	4	258,588	$8,94 \times 10^{7}$	4,79	8
239,924	$1,39 \times 10^{8}$	5,24	6	259,837	$1,43 \times 10^{8}$	4,81	6
240,488	$1,96 \times 10^{8}$	5,23	8	259,940	$2,35 \times 10^{8}$	4,76	10
240,666	$1,61 \times 10^{8}$	5,25	4	260,709	$1,73 \times 10^{8}$	4,83	4
241,331	$1,02 \times 10^{8}$	5,25	4	261,187	$1,2 \times 10^{8}$	4,79	8
241,786	$9,5 \times 10^{7}$	8,37	12	266,466	$1,91 \times 10^{8}$	8,03	10
242,269	$1,46 \times 10^{8}$	9,00	8	275,573	$2,15 \times 10^{8}$	5,48	10

2.7 Tratamento quimiométrico dos dados

Empregou-se a análise de agrupamentos hierárquicos (*Hierarchical Cluster Analysis* - HCA) para selecionar o conjunto de amostras para calibração e validação. Os métodos de HCA empregam diferentes técnicas de segmentação para agrupar aquelas amostras que compartilham características semelhantes dentro de um conjunto de dados. Baseado em uma análise supervisionada, a HCA procura semelhanças entre os objetos por meio de cálculos de distâncias, empregando-se processos aglomerativos ou divisivos. Enquanto o método aglomerativo considera inicialmente cada objeto como um grupo unitário e segue agrupando-os sistematicamente por ordem de similaridade, o método divisivo considera inicialmente um único grupo de objetos e divide-o em dois ou mais grupos começando pelos objetos que são

mais dissimilares. A resposta gráfica é um dendrograma que mostra a similaridade entre os objetos em função das propriedades consideradas (i.e., o espectro de emissão óptica no presente caso).[120]

Empregou-se o método de Ward como algoritmo de agrupamento hierárquico considerando-se os intervalos de comprimento de onda 200-265 e 280-340 nm, e utilizando-se a distância Euclidiana para computar a similaridade entre as amostras a serem agrupadas.[120] Considerou-se variabilidade intraobjeto (i.e., entre replicatas de uma mesma amostra) como critério para selecionar o valor de dissimilaridade mais apropriado que define os diferentes grupos de objetos. Utilizou-se o *software OPUS*® (Versão 4.2, Bruker, Alemanha) para realizar o tratamento quimiométrico dos espectros (i.e., HCA e calibração multivariada).

O conjunto de amostras de calibração selecionados a partir da classificação dendrográfica foi inicialmente utilizado para se estabelecer as funções univariadas de regressão entre as respostas analíticas (área de pico da linha de emissão correspondente após subtração da radiação de fundo) e as correspondentes frações de massa dos analitos empregando-se os modelos clássicos de regressão pelos mínimos quadrados.[122] Particularmente, considerando-se a sensibilidade e a seletividade espectral, as seguintes linhas de emissão foram selecionadas: Ca II 315,887, Mg I 285,212, P I 213,618, Cu I 324,755, Fe II 238,204, Mn II 257,610, e Zn II 202,548 nm.

Analogamente, empregou-se o mesmo conjunto de calibração para a construção dos modelos PLS (*Partial least squares regression*) a partir da definição dos intervalos de comprimentos de onda, do pré-processamento dos dados (*e.g.*, eliminação de deslocamento constante, normalização vetorial), e do número de variáveis latentes mais apropriados. Empregou-se uma estratégia similar à usada em siPLS (*synergy interval PLS*) [123] para definir os intervalos espectrais. Neste caso, o intervalo espectral considerado é dividido em um número definido de intervalos. Posteriormente, o procedimento de otimização é feito com um intervalo espectral e, sucessivamente, outros intervalos são considerados com o objetivo de se estabelecer uma combinação que proporcione o menor valor da raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (*RMSEP*). Selecionou-se o número de variáveis latentes (*rank*) com base nos menores valores da soma dos quadrados dos erros de previsão (*PRESS*) do desvio médio do modelo em relação aos valores de referência. Utilizou-se a raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração (*RMSEC*) e coeficiente de regressão r_{cal} das amostras de calibração para descrever a coerência dos modelos de calibração.

Tanto os modelos de calibração univariados quanto os multivariados foram validados a partir da previsão da fração de massa dos analitos em amostras distintas àquelas empregadas no conjunto de calibração (i.e., conjunto de amostras de validação). Utilizaram-se os parâmetros estatísticos raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (*RMSEP*), coeficiente de regressão r_{val} das amostras de validação, coeficiente de qualidade (*QC*) e desvio residual de previsão (*RPD*) para avaliar a capacidade de previsão dos modelos de calibração. Os valores de RMSEP foram calculados pela **Equação 2.2**:[124]

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum^{n} (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - k}} \qquad \textbf{(Equação 2.2)}$$

onde: y_i é a fração de massa de referência determinada para a enésima amostra de validação, $\hat{y}_i$ é o valor associado previsto pelo modelo, n é o número de amostras do conjunto de validação e k é número de variáveis latentes empregadas no modelo PLS.

O parâmetro *QC*, calculado a partir da expressão proposta por Vankeerberghen and Smeyers-Verbeke[125] (**Equação 2.3)**, determina a taxa de erro esperada para a previsão das frações de massa dos analitos em amostras futuras.[120, 125] Quanto mais alto for o valor de *QC*, menor será a concordância entre as previsões.

$$QC(\%) = \sqrt{\frac{\sum^{n} \left(\frac{\hat{y}_i - y_i}{y_i}\right)^2}{(n-1)}} \times 100 \qquad \textbf{(Equação 2.3)}$$

Entretanto, o parâmetro *RPD* avalia a habilidade do modelo de calibração em prever a fração de massa de um dado nutriente de acordo com o intervalo de fração de massa abrangido pelo modelo.[126] Assim, o índice *RPD* é calculado pela razão entre o desvio-padrão dos valores de fração de massa de referência do conjunto de calibração (*sd*) e o valor de *RMSEP* correspondente (**Equação 2.4**). Quanto mais alto for o valor de *RPD*, melhor será a exatidão das previsões.[120]

$$RPD = \frac{sd}{RMSEP} \qquad \textbf{(Equação 2.4)}$$

Por último, utilizou-se o desvio-padrão combinado das triplicatas de validação (s_{trip}) para completar a descrição do desempenho preditivo dos modelos. Este parâmetro, calculado pela **Equação 2.5**, expressa a qualidade (repetitividade) das previsões de um determinado analito em uma dada amostra.[127]

$$s_{trip} = \sqrt{\sum^{n} \frac{(r-1)s_i{}^2}{(r-1) \times n}} \qquad \textbf{(Equação 2.5)}$$

onde: r é o número de replicatas (3 neste caso por se tratar de triplicatas); s_i é o desvio-padrão da fração de massa estimada pelo modelo de calibração para cada uma das n amostras que englobam o conjunto de validação.

Amostras de calibração que apresentaram erros de previsão maiores que 100 % foram consideradas anômalas e retiradas do conjunto de calibração. Os limites de detecção (LOD) foram estimados utilizando a **Equação 2.6**:[128]

$$LOD = \frac{s_{ruído} \times k}{\propto} \qquad \textbf{(Equação 2.6)}$$

onde: $s_{ruído}$ = desvio-padrão da intensidade de emissão do ruído. Este valor foi calculado com base na intensidade de emissão de regiões espectrais independentes, localizadas nas vizinhanças das linhas de emissão de interesse; k = 3,3; α = coeficiente angular da função de calibração.

A exatidão dos métodos em LIBS foi avaliada estatisticamente empregando-se o método das elipses de confiança, calculadas a partir de uma função linear empregando-se regressão pelos mínimos quadrados ordinários OLS.[129] Este método emprega a comparação dos valores obtidos para a inclinação e o intercepto de uma função linear de regressão entre os valores de referência e os estimados pelo modelo a ser testado. Nos casos em que o ponto ideal (0, 1) para o intercepto e a inclinação, respectivamente, estiver contido nos intervalos de confiança definidos pelas elipses, os conjuntos de dados podem ser considerados estatisticamente equivalentes no nível de confiança considerado (99 % no presente caso).[130] Utilizou-se o *software* Matlab 6.5 (The MathWorks, Natick, MA) para o cálculo das elipses de confiança.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização física e química das amostras peneiradas

3.1.1 Frações peneiradas em malhas com aberturas de 150 a 20 µm

Considerando-se a distribuição do tamanho das partículas das frações peneiradas, observou-se que as frações mais grosseiras foram caracterizadas por distribuição bimodal, enquanto que as três frações mais finas apresentaram distribuição tipicamente unimodal, cujos intervalos de distribuição se tornaram menores à medida que as frações foram peneiradas em peneiras com malhas de aberturas menores (**Figura 3.1**).

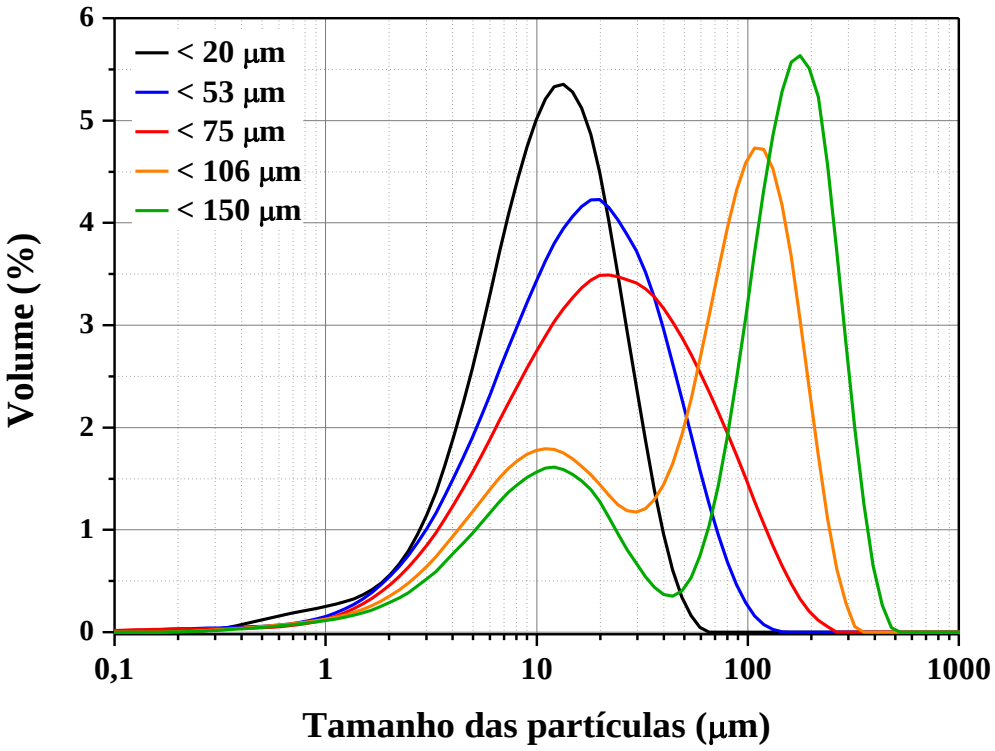


Figura 3.1 – Distribuição do tamanho das partículas das frações peneiradas em malhas com aberturas de 150, 106, 75, 53 e 20 µm.

O peneiramento deveria, idealmente, restringir o tamanho máximo das partículas ao diâmetro nominal dos poros da peneira. No entanto, partículas alongadas, como as fibras, por exemplo, podem atravessar transversalmente os poros da peneira contribuindo para o aumento do intervalo do tamanho das partículas, conforme observado para todas as frações (**Tabela 3.1**).

Além disso, os poros da peneira também podem apresentar dimensões irregulares, o que contribui para esse efeito. Na difratometria com laser todas as partículas são tratadas como esferas, representando, portanto resultados sobre as partículas irregulares em diâmetros equivalentes.[131] Assim, é evidente que quanto menor for o tamanho médio das partículas, menor será o intervalo de sua distribuição, conforme descrito na literatura para materiais biológicos peneirados.[117, 131]

Tabela 3.1 – Informações sobre a distribuição do tamanho das partículas das frações peneiradas. Dados expressos em µm.

Abertura nominal da malha da peneira	***Intervalo de tamanho das partículas***	***Média***	d_{95}
150	1,2 – 371	121	297
106	1,0 – 249	74	195
75	0,9 – 158	32	102
53	0,8 – 84	21	58
20	0,7 – 43	13	32

d_{95} = 95 % do volume acumulado

Em relação à possível mudança de composição após o peneiramento, nenhuma diferença significativa nas frações de massa de P, K, Ca, Mg, B e Mn, determinadas por ICP OES após digestão ácida das amostras, foram observadas ao se analisar todas as frações peneiradas, ao nível de 95 % de confiança. Por outro lado, com relação à composição química estimada para a amostra laboratorial não-peneirada, observou-se que o peneiramento em peneira com abertura de 53 µm provocou um aumento na fração de massa de Zn de 4,5 vezes. O peneiramento com abertura de 20 µm provocou um aumento nos teores de Cu e Fe de 1,9 e 1,3 vezes, respectivamente. Estes fracionamentos podem estar relacionados à distribuição desses elementos na amostra bem como a forma em que se encontram ligados às diferentes estruturas vegetais, como a parede celular e organelas, por exemplo. No entanto, estudos mais aprofundados ainda são necessários para conhecimento dessas possibilidades. Assim, para evitar interpretações errôneas devido ao fracionamento de Fe, Cu e Zn, as futuras discussões se restringiram às determinações de Ca, K, Mg, P, B e Mn. Cabe informar que as frações de massa destes elementos são (11,7 ± 0,1) g kg^{-1} Ca, (8,8 ± 0,5) g kg^{-1} K, (2,1 ± 0,1) g kg^{-1} Mg, (1,4 ± 0,1) g kg^{-1} P, (16,1 ± 0,6) mg kg^{-1} B e (81,8 ± 1,3) mg kg^{-1} Mn.

3.1.2 Amostras provenientes de diferentes espécies moídas criogenicamente e peneiradas em abertura de 75 µm

Observou-se uma variação apreciável na distribuição do tamanho das partículas das 24 amostras moídas criogenicamente por 10 min, como por exemplo, entre 1 e 190 µm para folhas de café, e entre 1 e 430 µm para cana-de-açúcar. Esses resultados confirmaram que a eficiência da cominuição criogênica é dependente das propriedades físicas e químicas da matriz vegetal, como por exemplo, os teores de fibras e lignina.[107] Após o peneiramento, as amostras, que antes apresentavam distribuição bimodal, passaram a apresentar distribuição unimodal e intervalos de distribuição de tamanho de partículas menores (**Tabela 3.2**). Um exemplo deste efeito é mostrado para folhas de citros na **Figura 3.2**. No caso das amostras que já apresentavam distribuição unimodal, observou-se menor intervalo de distribuição de tamanho de partículas após o peneiramento, conforme observado para soja (**Figura 3.2**). De acordo com Zeisler,[132] uma melhor distribuição do tamanho das partículas, idealmente menores que 10 µm, provavelmente irá satisfazer os requisitos de homogeneidade desejáveis para amostragem de pequenas massas de amostra (*e.g.*, < 10 mg).

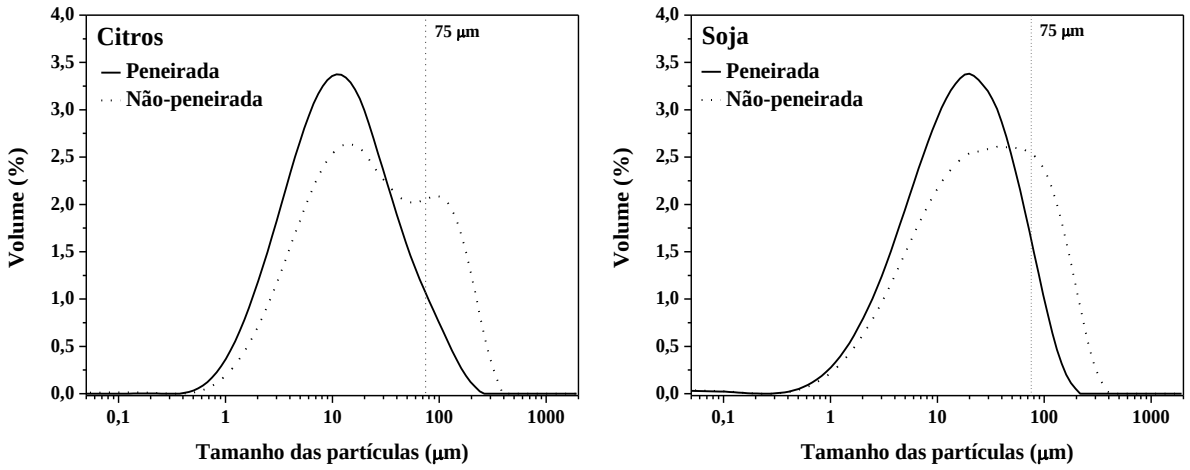


Figura 3.2- Distribuição do tamanho das partículas de amostra de folhas de (a) citros C1 e (b) soja S3 moídas criogenicamente por 10 min e peneiradas em malha com abertura de 75 µm.

Tabela 3.2 – Distribuição do tamanho das partículas de folhas moídas criogenicamente por 10 min e peneiradas e malha com abertura de 75 µm. NP = não-peneirado; P = peneirado; B = bimodal; U = unimodal.

Amostra	Intervalo (µm)		d_{95} (µm)		Média (µm)		Distribuição	
	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P
Citros K1	1,0-290	1,0-160	166	92,4	39,8	27,4	B	U
Cana K2	1,1-430	0,9-210	264	121	79,5	37,0	B	U
Eucalipto K3	0,6-260	0,6-160	137	73,4	36,7	21,5	B	U
Manga K4	0,7-260	0,6-160	134	86,7	35,7	23,9	B	U
Cana K5	1,2-480	0,9-175	323	98,9	101	31,0	B	U
Feijão K6*	1,1-430	1,0-235	236	114	59,4	31,7	B	U
Banana K9	0,7-200	0,7-145	93,5	76,2	26,7	23,5	U	U
Alface K10	1,4-530	1,1-180	260	126	108	35,3	B	B
Braquiária K11	1,1-350	0,9-145	207	75,9	56,5	23,6	B	U
Cana K12	0,9-350	0,9-220	195	122	53,1	37,2	B	U
Milheto K13*	1,1-390	1,1-290	235	158	62,5	46,3	B	U
Cana K14	1,0-430	1,0-265	240	143	73,5	43,8	B	U
Uva K15	0,8-210	0,8-135	85,5	70,2	25,2	23,6	U	U
Seringueira K16	0,9-350	0,8-180	206	105	55,6	34,5	B	U
Soja S1	0,8-290	0,8-160	131	70,5	35,8	22,8	U	U
Soja S2	0,8-260	0,8-135	72,0	54,4	21,5	16,5	U	U
Soja S3	0,9-390	0,8-175	172	84,6	49	26,1	U	U
Milho M1	0,9-320	0,8-130	111	58,5	33,7	19,9	U	U
Milho M2	1,0-430	0,8-150	187	75,3	52,8	24,4	U	U
Citros C1	1,1-350	0,9-195	181	79,0	47,8	21,4	B	U
Citros C2	1,0-320	0,9-160	146	67,4	37,0	19,5	B	U
Café CF1	0,6-215	0,6-100	94,5	47,4	24,1	15,2	U	U
Café CF2	0,7-190	0,7-95	72,3	49,9	21,8	16,6	U	U
Tomate T1	0,8-240	0,8-72	98,9	39,2	28,6	13,5	U	U
Cana CN1**	0,8-80	-	39,3	-	13,7	-	U	-
Cana CN2**	0,8-75	-	33,7	-	12,3	-	U	-

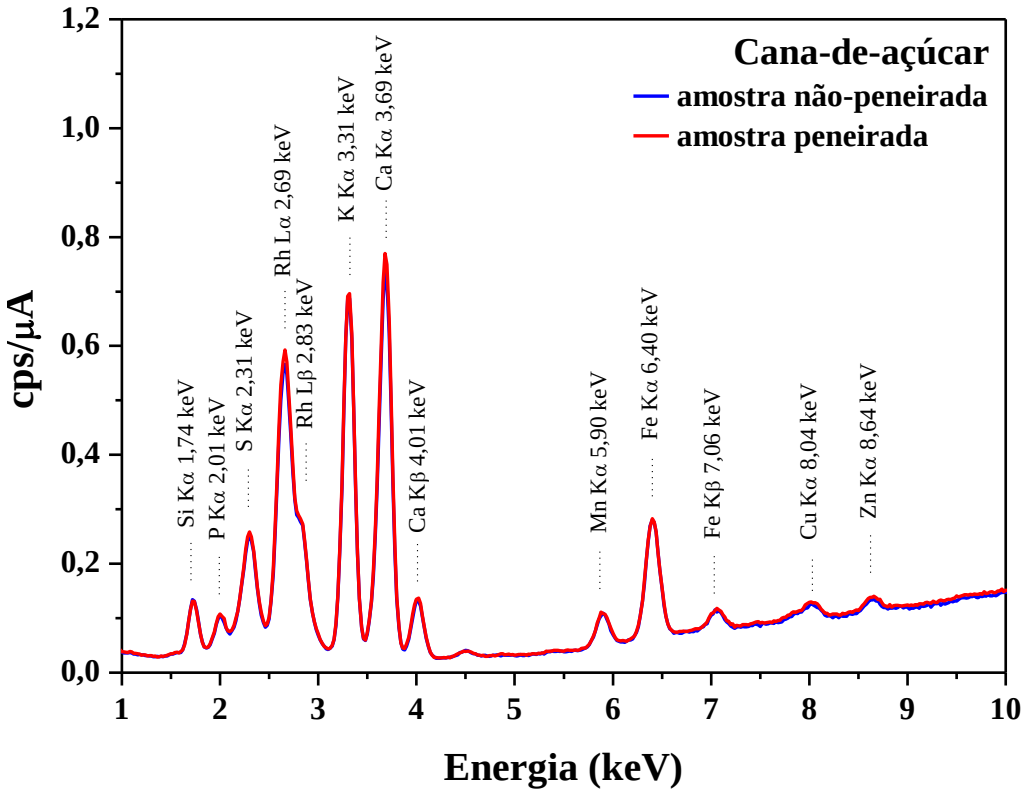
* planta inteira; ** cominuição em moinho de bolas planetário por 60 min.

Embora o peneiramento tenha sido feito através de malha com abertura de 75 µm, observou-se a presença de partículas > 75 µm em todas as amostras peneiradas, que podem ser atribuídas às fibras que atravessaram transversalmente os poros da peneira, e, também, às irregularidades dos poros da mesma. Cabe informar que, com exceção das amostras de folhas de milho, as plantas da família *Poaceae* (cana-de-açúcar e milheto) apresentaram 10 % das partículas maiores que 75 µm devido, provavelmente, ao alto teor de fibras.

A EDXRF foi selecionada para avaliar se o peneiramento provocou mudanças na composição química das amostras, como, por exemplo, um aumento na concentração de micronutrientes na fração contendo partículas menores.[117] Apesar de existir uma diferença significativa no aspecto visual das pastilhas preparadas com as amostras de cana-de-açúcar peneiradas e não-peneiradas, os espectros de EDXRF destas pastilhas foram praticamente idênticos e não foram observadas diferenças significativas na intensidade de emissão característica dos raios-X dos elementos de interesse (**Figura 3.3**).

Com exceção das amostras de folhas de soja, o peneiramento das folhas moídas criogenicamente por 10 min, através de malha com abertura de 75 µm, não provocou alterações nas frações de massa de Si, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn em todas as amostras utilizadas neste estudo. Aplicando-se o teste-*t* ao nível de 95 % de confiança, não foram observadas diferenças significativas nas intensidades dos raios-X característicos Si Kα 1,74 keV, P Kα 2,01 keV, S Kα 2,31 keV, K Kα 3,31 keV, Ca Kα 3,69 keV, Mn Kα 5,90 keV, Fe Kα 6,40 keV, Cu Kα 8,04 keV e Zn Kα 8,64 keV. Esta é uma indicação de que não houve mudança na composição química das amostras peneiradas. Assim, com base nos resultados discutidos no item 3.1.1., assumiu-se, também, que os teores de Mg não foram alterados. Nos casos pontuais, onde foram observadas alterações nas frações de massa dos elementos em função do peneiramento (*e.g*. Fe, Mn, Ca e K nas amostras de folhas de soja), houve uma correção dos valores de intensidade dos raios-X característicos.

Recentemente, Oliveira e Arruda [133] demonstraram que o Fe está concentrado nas nervuras principais e secundárias das folhas de soja não transgênica. Uma vez que as nervuras são mais resistentes que o limbo foliar e, consequentemente, oferecem maior resistência à moagem, uma possível causa de mudança de composição de Fe nessas amostras é a separação, pelo peneiramento, das partículas maiores, compostas por fragmentos de nervuras, as quais apresentam maiores teores de Fe. No entanto, as causas para o fracionamento das concentrações de Mn, Ca e K podem estar relacionadas a esse comportamento, mas ainda precisam ser melhor avaliadas.



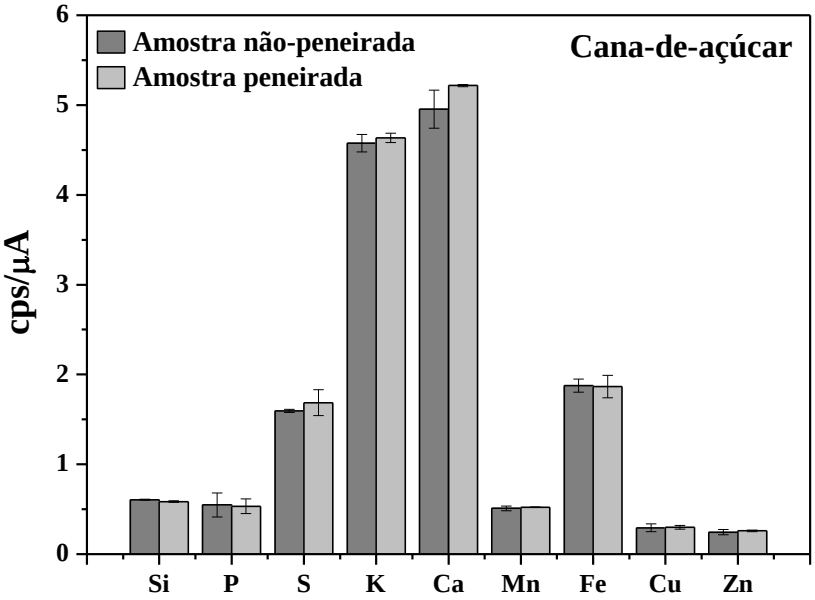


Figura 3.3 - Espectros de EDXRF e intensidade dos sinais dos raios-X característicos de pastilhas de folhas de cana-de-açúcar preparadas com amostras laboratoriais cominuídas não-peneiradas e peneiradas através de malha de 75 µm. As barras de incerteza correspondem a ±1 desvio-padrão (n = 3).

3.2 Influência da distribuição do tamanho das partículas na análise de materiais vegetais por LIBS

A distribuição do tamanho das partículas é uma variável de grande importância para se apresentar as amostras, de maneira apropriada, na forma de pastilhas.[1, 107] De fato, existem algumas indicações de que os efeitos de matriz podem ser reduzidos analisando-se pastilhas preparadas com partículas menores que 75 µm.[1, 107] A decomposição e vaporização das partículas, assim como a eficiência dos processos de atomização e excitação das espécies de interesse no plasma induzido por laser são geralmente favorecidas quando partículas menores são abladas. Existe uma relação inversa entre o tamanho das partículas e a sensibilidade, uma vez que os coeficientes angulares das curvas de calibração aumentam à medida em que o tamanho das partículas é diminuído.[134, 135]

Os efeitos do tamanho das partículas na análise de aerossóis por LIBS têm sido amplamente explorados pela comunidade científica.[136] Enquanto a análise de aerossóis remonta a algumas das primeiras contribuições de LIBS, a complexa natureza dos processos físicos envolvidos nas interações entre o laser e as partículas ainda está na fronteira do conhecimento.[136, 137] Existe um limite superior do tamanho das partículas pelo qual ela não é completamente vaporizada, decrescendo, assim, a relação entre tamanho de partícula e intensidade dos sinais das linhas de emissão.[134, 138, 139] Segundo alguns trabalhos científicos, para que ocorra vaporização completa das partículas, assim como difusão quantitativa dos analitos dentro do plasma induzido por laser, as partículas devem ser menores que 10 µm.[140] No entanto, deve-se ressaltar que este limite depende da composição química das partículas e principalmente das condições experimentais (*e.g.*, fluência do laser e diâmetro de ablação).

A distribuição do tamanho das partículas afeta criticamente o desempenho dos métodos microanalíticos [132] uma vez que a pequena massa das porções amostradas (*e.g.* 0,001 - 10 mg) pode não representar a composição da amostra teste, o que leva a resultados imprecisos e inexatos.[131, 132, 141] Essa afirmação também é válida para outros métodos microanalíticos como, por exemplo, ICP OES com atomização eletrotérmica (ETV-ICP OES),[142] LA-ICP OES,[143] LA-ICP-MS,[144] ETV-ICP-MS,[145] espectrometria de absorção atômica com amostragem direta de sólidos em forno de grafite (SS-GFAAS),[146] e µ-EDXRF.[118, 147]

Materiais vegetais particulados geralmente contêm partículas com diferenças apreciáveis de composição, as quais são intrinsicamente heterogêneas em escala microscópica.[117, 148] Assim, os procedimentos de moagem devem ser efetivos para se obter uma

cominuição apropriada (i.e., partículas < 100 µm).[107] Assim, a qualidade dos resultados de LIBS (i.e., precisão e exatidão das medições) depende da distribuição do tamanho das partículas empregadas no preparo das pastilhas e da microheterogeneidade da distribuição dos analitos na pastilha.[1]

3.2.1 Efeitos da ablação

Quando as amostras são preparadas na forma de pastilhas, a estrutura das partículas aglutinadas depende, principalmente, da distribuição do tamanho das partículas.[1] A **Figura 3.4** apresenta as imagens de MEV das crateras formadas na superfície das pastilhas preparadas com amostras peneiradas em malhas com aberturas entre 20 e 150 µm após a ablação com 20 pulsos de laser a 10 Hz. Observou-se que houve uma diminuição significativa na rugosidade superficial à medida em que o tamanho das partículas foi reduzido. Além disso, observaram-se variações apreciáveis na morfologia das crateras devido às diferenças na distribuição do tamanho das partículas empregadas no preparo das pastilhas. No caso das pastilhas preparadas com a fração < 150 µm (tamanho médio de 121 µm), observou-se uma cratera com aspecto heterogêneo com formato não reprodutível, enquanto que aspectos bem mais uniformes foram obtidos nas pastilhas preparadas com as frações < 20, < 53 e < 75 µm [**Figura 3.4** (tamanhos médios de 13, 21, e 32 µm, respectivamente)]. É possível observar nas imagens de MEV a presença de fibras nas pastilhas referentes às frações < 106 e < 150 µm (tamanhos médios de 74 e 121 µm, respectivamente). As pastilhas preparadas com amostras laboratoriais não cominuídas (com a maioria das partículas > 150 µm) foram friáveis, o que impossibilita uma análise adequada por LIBS.

Cabe informar que o preparo das pastilhas com partículas apresentando distribuição unimodal, com a maioria das partículas com diâmetro menor que 102 µm (peneiradas em abertura de 75 µm; d_{95} = 102 µm; **Tabela 3.1**), foi decisivo para produzir pastilhas com coesão e resistência mecânica apropriadas, sem sinais de fraturas ao redor das crateras. A coesão das pastilhas apresenta relação direta com a precisão das medições uma vez que quanto mais compacta for a pastilha, mais reprodutível é a interação entre o laser e a amostra.[144]

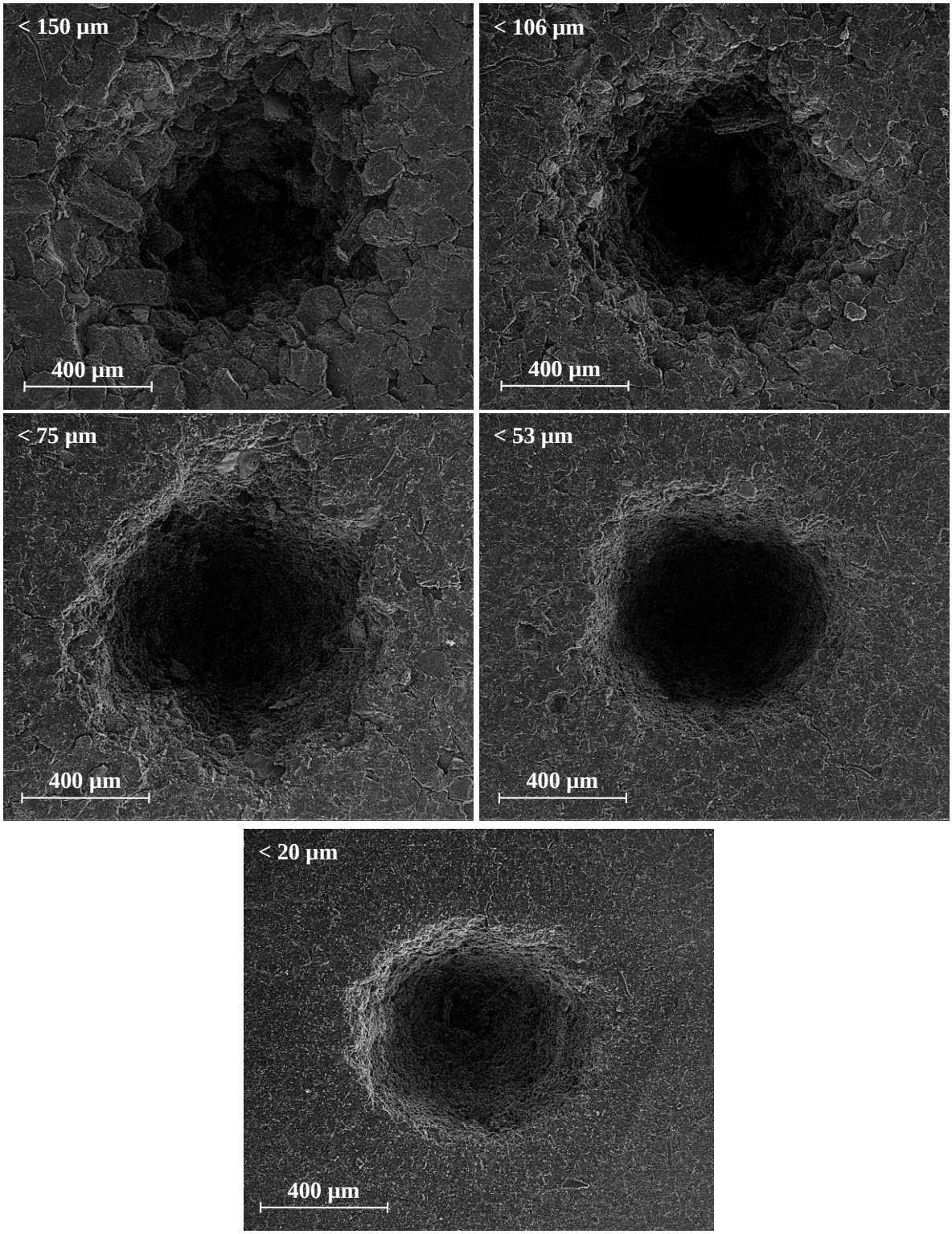
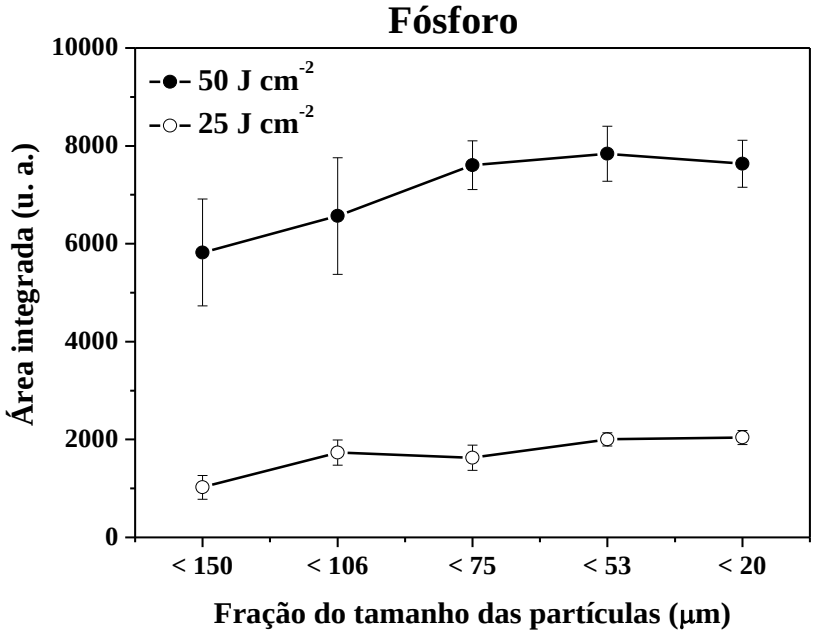


Figura 3.4 - Microscopia eletrônica de varredura das crateras formadas por ablação a laser nas pastilhas de folhas de boldo preparadas com frações peneiradas entre < 20 e < 150 µm. Dados para 20 pulsos (Nd:YAG a 1064 nm) de 25 J cm^{-2} (110 mJ por pulso; diâmetro de focalização de 750 µm).

3.2.2 Efeitos espectroscópicos

Observou-se um aumento na intensidade dos sinais de emissão à medida em que o tamanho das partículas foi diminuído (**Figura 3.5**). Quando as pastilhas preparadas com as diferentes frações peneiradas foram analisadas com pulsos de 25 J cm^{-2} (110 mJ por pulso), verificou-se um aumento médio de 1,6 vezes na intensidade dos sinais de emissão das linhas Ca I 442,544, K I 404,414, P I 213,618, Mg I 277,983, B I 249,773 e Mn II 257,610 nm quando o tamanho das partículas usadas no preparo das pastilhas foi reduzido de 150 para 53 µm (diâmetro nominal da abertura da malha da peneira). A **Figura 3.6** mostra os fragmentos dos espectros das pastilhas preparadas com as frações < 150 e < 53 µm (diâmetros médios de 121 e 21 µm, respectivamente) e exemplifica o aumento típico da intensidade das linhas de emissão P I 213,618 e Mn II 257,610 nm de 1,6 e 1,9 vezes, respectivamente, em função da diminuição do tamanho das partículas. Cabe destacar que não houve diferenças significativas na intensidade dos sinais de emissão dos analitos nas pastilhas preparadas com as frações < 53 e < 20 µm (**Figura 3.5**).

No entanto, quando as mesmas pastilhas foram analisadas com uma fluência maior, de 50 J cm^{-2} (220 mJ por pulso; diâmetro de focalização de 750 µm), observou-se um aumento de apenas 1,3 vezes na intensidade dos sinais de emissão para todos os analitos quando o tamanho das partículas (diâmetro nominal da abertura da peneira) usadas no preparo das pastilhas foi reduzido de 150 para 75 µm. É importante destacar que, sob essas condições, não houve diferenças significativas na intensidade dos sinais de emissão dos analitos nas pastilhas preparadas com as frações < 75 µm (distribuições com diâmetros médios de 13, 21 e 32 µm), conforme demonstrado para Mn e P na **Figura 3.5**. Esses dados indicam que os efeitos de matriz causados pelas diferenças no tamanho das partículas foram minimizados quando as pastilhas foram analisadas com pulsos de 50 J cm^{-2}.



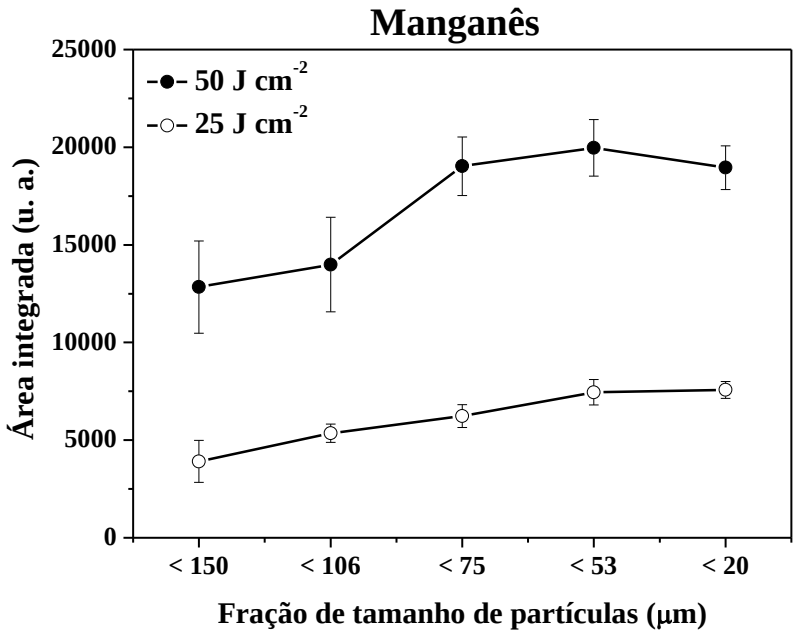


Figura 3.5 – Intensidades dos sinais de emissão das linhas P I 213,618 e Mn II 257,610 nm na análise de pastilhas preparadas com diferentes frações de tamanho das partículas interrogadas com pulsos de 25 e 50 J cm^{-2} (diâmetro de focalização de 750 µm). As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 10 crateras, 20 pulsos/cratera).

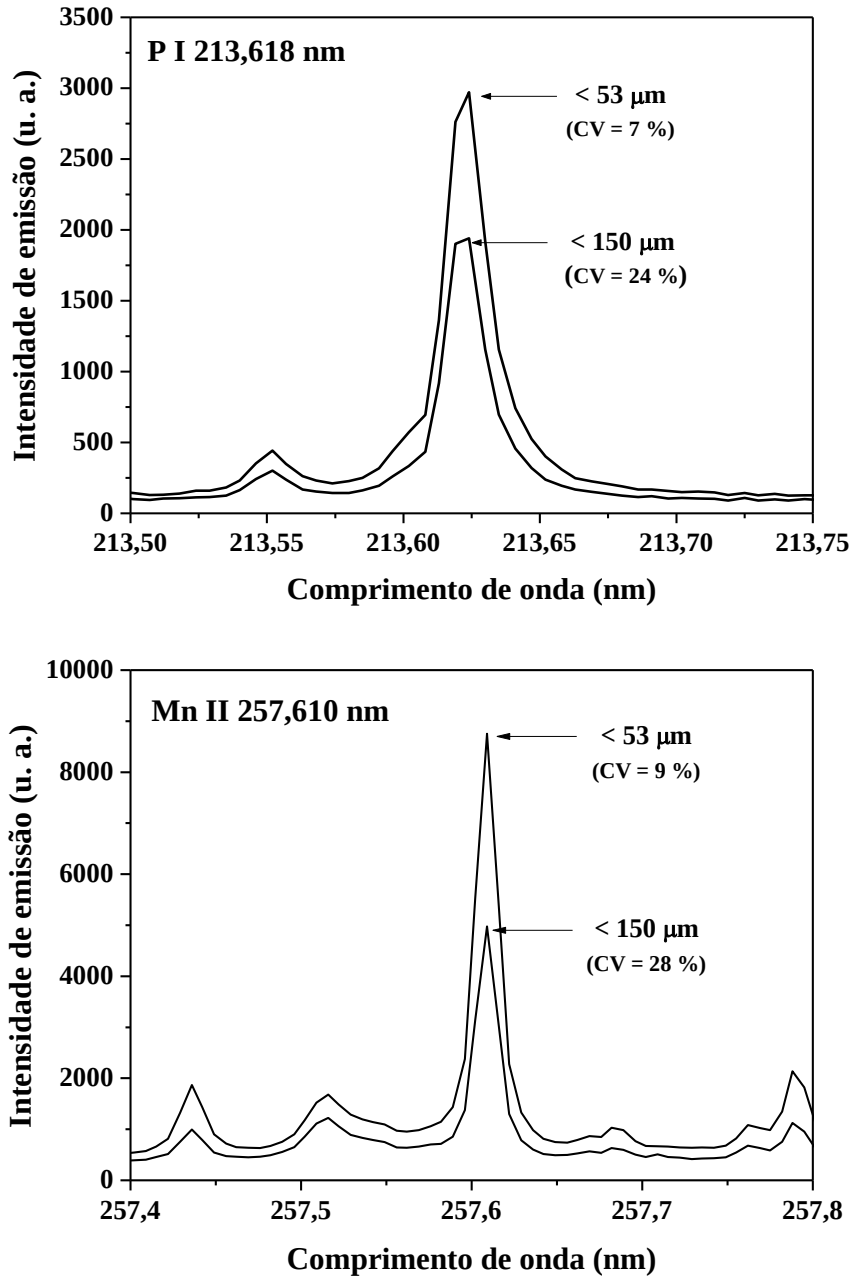


Figura 3.6 – Efeito da distribuição do tamanho das partículas na intensidade de emissão das linhas P I 213,618 e Mn II 257,610 nm. Espectro médio obtido de pastilhas preparadas com frações peneiradas em < 150 e < 20 µm analisadas com pulsos de 25 J cm^{-2} (110 mJ por pulso, diâmetro de focalização de 750 µm). CV = Coeficiente de variação (n = 10 crateras, 20 pulsos/cratera).

É interessante observar que resultados similares foram observados empregando-se as mesmas condições de fluência, porém empregando-se um diâmetro de focalização do laser menor, da ordem de 320 µm (**Figura 3.7**). Cabe informar que, nessas condições, para se obter fluências de 25 e 50 J cm^{-2}, é necessário diminuir a energia por pulso para 20 e 40 mJ, respectivamente. Observou-se que o uso do diâmetro de focalização de 320 µm proporcionou

o mesmo comportamento verificado para 750 µm (**Figura 3.5**). Assim, esses resultados demonstram que a variável fluência foi mais relevante que o diâmetro de focalização. No entanto, cabe ressaltar a importância de se trabalhar com diâmetros de focalização maiores uma vez que, sob fluência constante, estes proporcionam maiores SNRs e melhor precisão das medições.[20, 92]

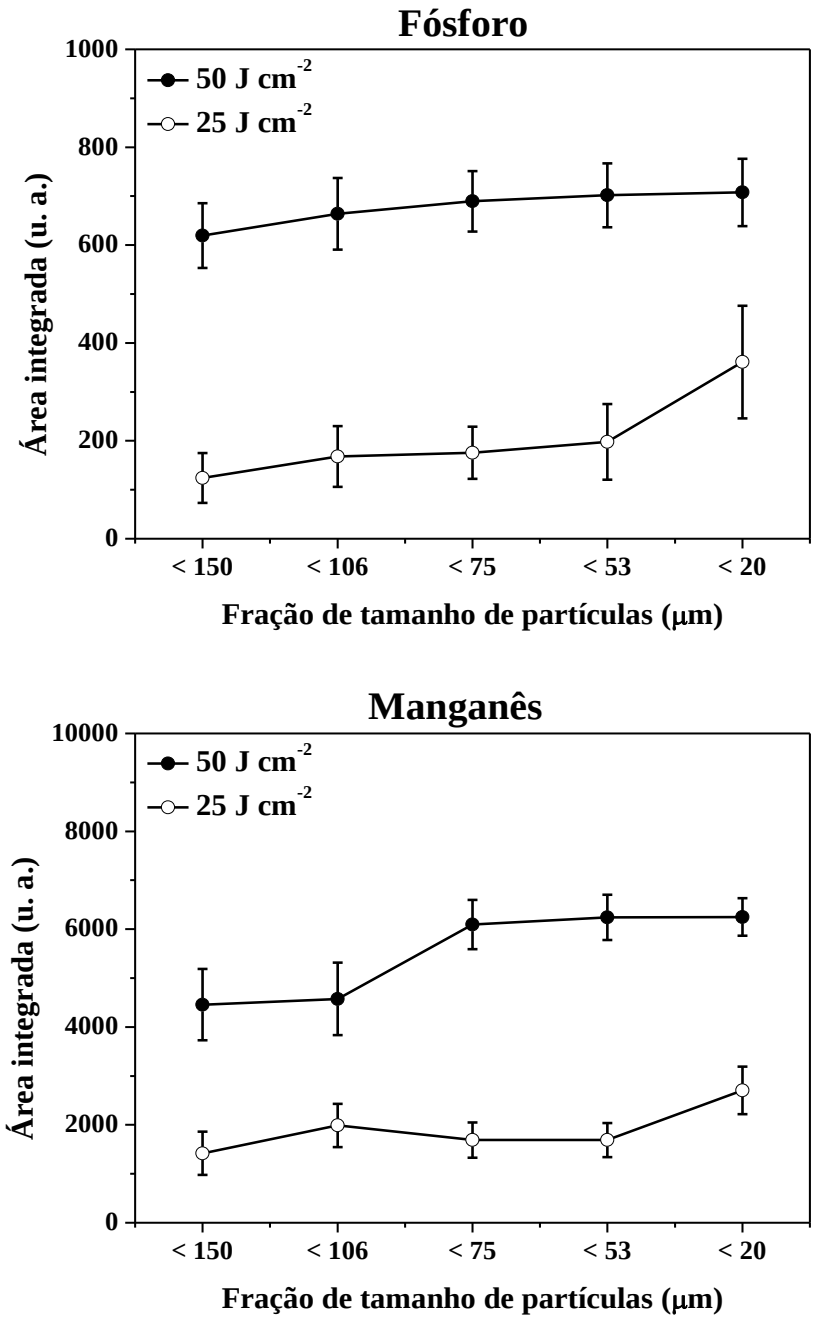


Figura 3.7 - Intensidades dos sinais de emissão das linhas P I 213,618 e Mn II 257,610 nm na análise de pastilhas preparadas com diferentes frações de tamanho das partículas interrogadas com pulsos de 25 e 50 J cm^{-2} (diâmetro de focalização de 320 µm). As barras de incerteza correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 10 crateras, 20 pulsos/cratera).

As variações na intensidade dos sinais de emissão em função do tamanho das partículas foram, provavelmente, provocadas por efeitos físicos de matriz, uma vez que a decomposição incompleta das partículas aumenta o número de átomos que permanecem ligados com material particulado no plasma induzido por laser diminuindo as intensidades dos sinais de emissão.[136] Efeitos físicos de matriz causados por vaporização e/ou decomposição incompleta já foram descritos em LIBS na análise de partículas de berílio aprisionadas em filtros,[134] de suspensões de minério de ferro[149] e alumina,[135] e de aerossóis de sílica,[138, 150] borosilicato,[151] $CuSO_4$ [139] e glicose.[152] Além do tamanho das partículas, a sua distribuição também é importante. Pouzar et al.[153] observaram um aumento na sensibilidade na determinação de vanádio em sílica mesoporosa por LIBS analisando-se amostras contendo distribuição do tamanho das partículas mais uniforme e, também, com menor diâmetro médio das partículas. No entanto, deve-se considerar que os processos físicos envolvidos nas interações entre o laser e a amostra, assim como na expansão dinâmica do plasma, são dependentes da composição química da matriz e também das condições experimentais em LIBS, como o comprimento de onda do laser, fluência, diâmetro de focalização e volume do plasma.[92, 136]

Observou-se um aumento significativo na precisão das medições com a diminuição do tamanho das partículas (**Figura 3.8**). Esse efeito ocorreu para as duas condições de focalização investigadas. Os coeficientes de variação (CV) das medições feitas com diâmetro de focalização de 750 µm nas pastilhas preparadas com as frações < 75 µm foram geralmente menores que 10 % (n = 10 crateras; 20 pulsos por cratera). Para o diâmetro de focalização de 320 µm, CVs menores que 10 % foram observados na análise das pastilhas preparadas com fração menor que 20 µm. Cabe informar que a flutuação de energia pulso a pulso é menor que 2 %, a 10 Hz, e não contribuiu de maneira significativa na incerteza das medições. Esses resultados estão de acordo com a literatura uma vez que, quanto menor for o tamanho das partículas, mais homogênea é a distribuição dos analitos na porção amostrada.[131, 132, 154] Esse comportamento foi demonstrado experimentalmente pelo mapeamento de potássio por µ-EDXRF, que mostrou que as pastilhas preparadas com as partículas menores apresentaram uma distribuição mais homogênea deste elemento (**Figura 3.9**). Observou-se que houve uma diminuição significativa na razão entre a concentração máxima e mínima à medida em que o tamanho das partículas foi reduzido. As razões variaram de 3,8 a 1,2 para as pastilhas preparadas com as frações entre < 150 µm e < 20 µm, e os CVs das medições de K por LIBS (50 J cm^{-2}, diâmetro de focalização de 750 µm) variaram de 21 a 8,5 % (n = 10 crateras, 20 pulsos por cratera), respectivamente.

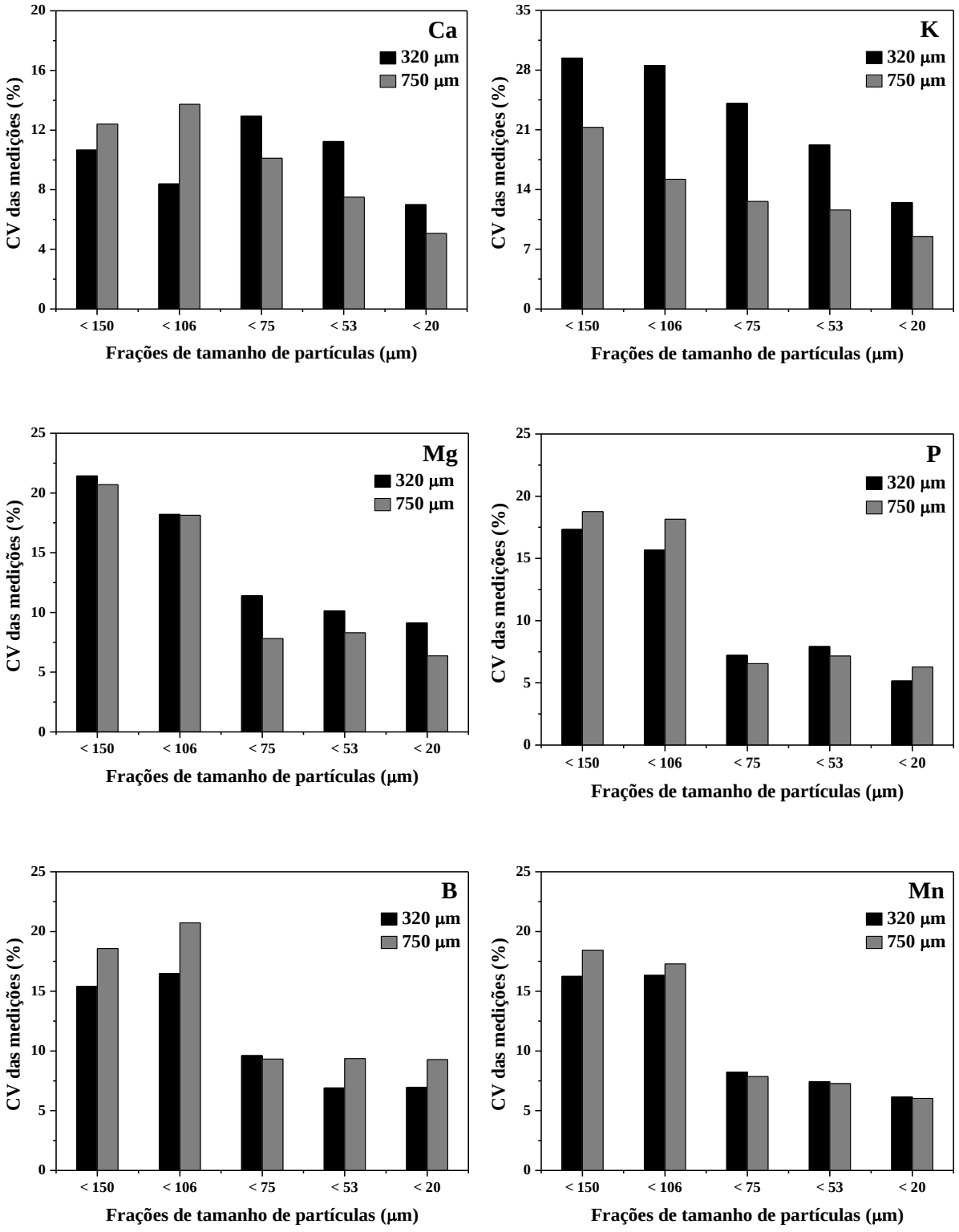


Figura 3.8 – Coeficientes de variação (%) das medições de Ca, K, Mg, P, B e Mn feitas em pastilhas preparadas com diferentes frações de tamanho de partículas (n = 10 crateras, 20 pulsos por cratera). Dados para 20 pulsos de 50 J cm^{-2}, diâmetro de focalização de 320 e 750 µm.

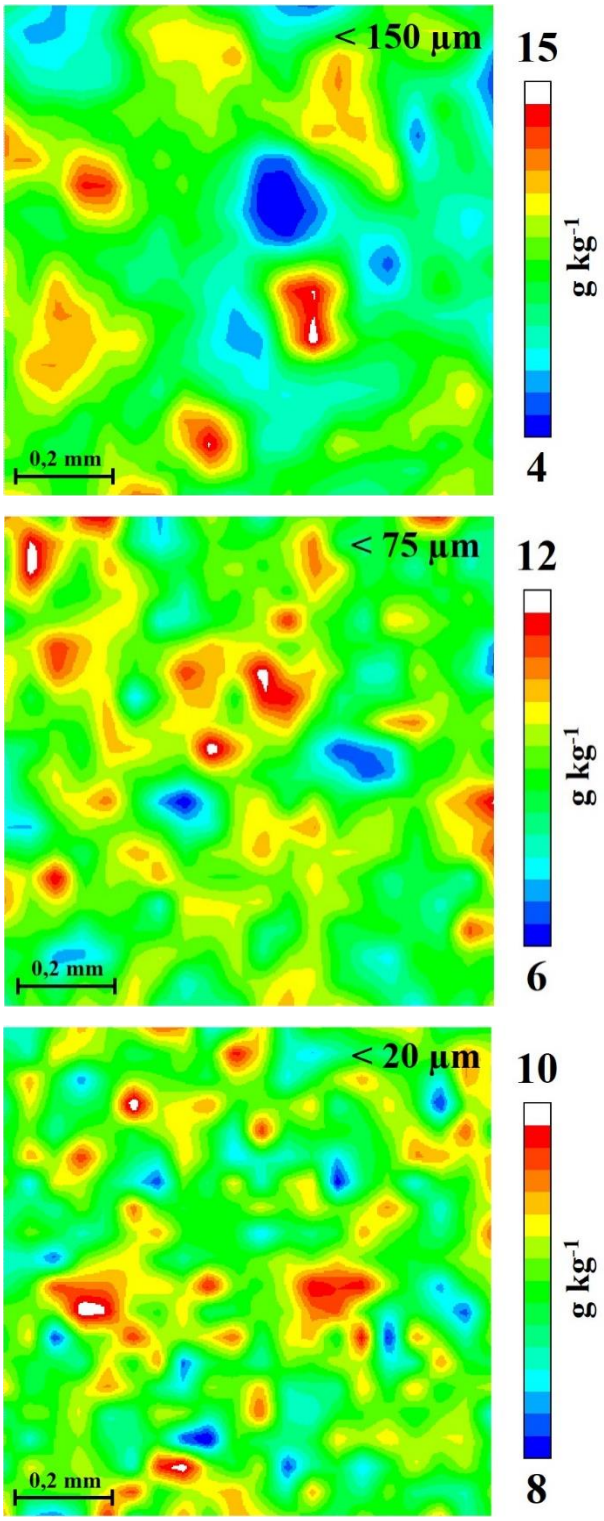


Figura 3.9 – Distribuição espacial de potássio em pastilhas preparadas com frações peneiradas em malhas com abertura de 150, 75 e 20 µm determinada por µ-EDXRF. Imagens de 1 mm^2 obtidas a partir de 400 pontos de amostragem (diâmetro de focalização do raio-X de 50 µm). Raio-X característico monitorado: K Kα 3,31 keV.

3.2.3 Considerações adicionais

As estratégias de cominuição para gerar partículas menores que 100 µm costumam ser dispendiosas e lentas, o que pode limitar sua atratividade para análises de rotina. De acordo com a literatura,[107] quando se utiliza um moinho de bolas do tipo planetário com conjuntos de moagem de ágata, são necessários 20 min de moagem para se obter 95 % das partículas menores que 75 µm no caso de folhas de citros e de soja. No caso de folhas de cana-de-açúcar, são necessários 60 min de moagem para atingir essa granulometria. Por outro lado, quando se utiliza um moinho criogênico, essa mesma distribuição do tamanho das partículas pode ser alcançada utilizando 10, 20 e 30 min de moagem para citros, soja e cana-de-açúcar, respectivamente. Uma vez que a eficiência de cominuição depende do método de moagem e, principalmente, das características da matriz vegetal (*e.g.*, teores de fibras e/ou lignina),[107] recomenda-se o uso de um método rápido de moagem (*e.g.*, 10 min de moagem criogênica) e o peneiramento das amostras com peneira com abertura de 75 µm. No entanto, os riscos de fracionamento de alguns elementos devem ser cuidadosamente avaliados para cada espécie de planta.

Os resultados apresentados neste tópico foram publicados no periódico *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* (**Anexo A**).

3.3 Efeito da fluência na análise de pastilhas de cana-de-açúcar por ns-LIBS

Os resultados apresentados neste tópico se referem às análises de pastilhas preparadas com folhas de cana-de-açúcar (23 variedades) moídas criogenicamente por 40 min. Este procedimento proporcionou distribuições de tamanho de partículas caracterizadas por 95 % das partículas menores que 80 µm.[155]

As pastilhas foram analisadas com 20 pulsos de 25 e 50 J cm^{-2} (diâmetro de focalização de 750 µm), 2,0 µs de atraso e 5,0 µs de integração. Observou-se que o uso de pulsos de 50 J cm^{-2} proporcionou um aumento significativo nas correlações entre as intensidades dos sinais de emissão de Mg I 277,669, Fe II 261,187, Mn II 257,610, Zn II 206,200 e Al I 309,271 nm, e as respectivas frações de massa de Mg, Fe, Mn, Zn e Al, previamente determinadas por ICP OES após digestão ácida assistida por radiação micro-ondas, conforme exemplificado para Fe e Zn (**Figura 3.10**). No entanto, para Ca e K, observaram-se correlações satisfatórias para Ca I 442,544 nm e K I 404,414 nm para as duas condições de fluência avaliadas.

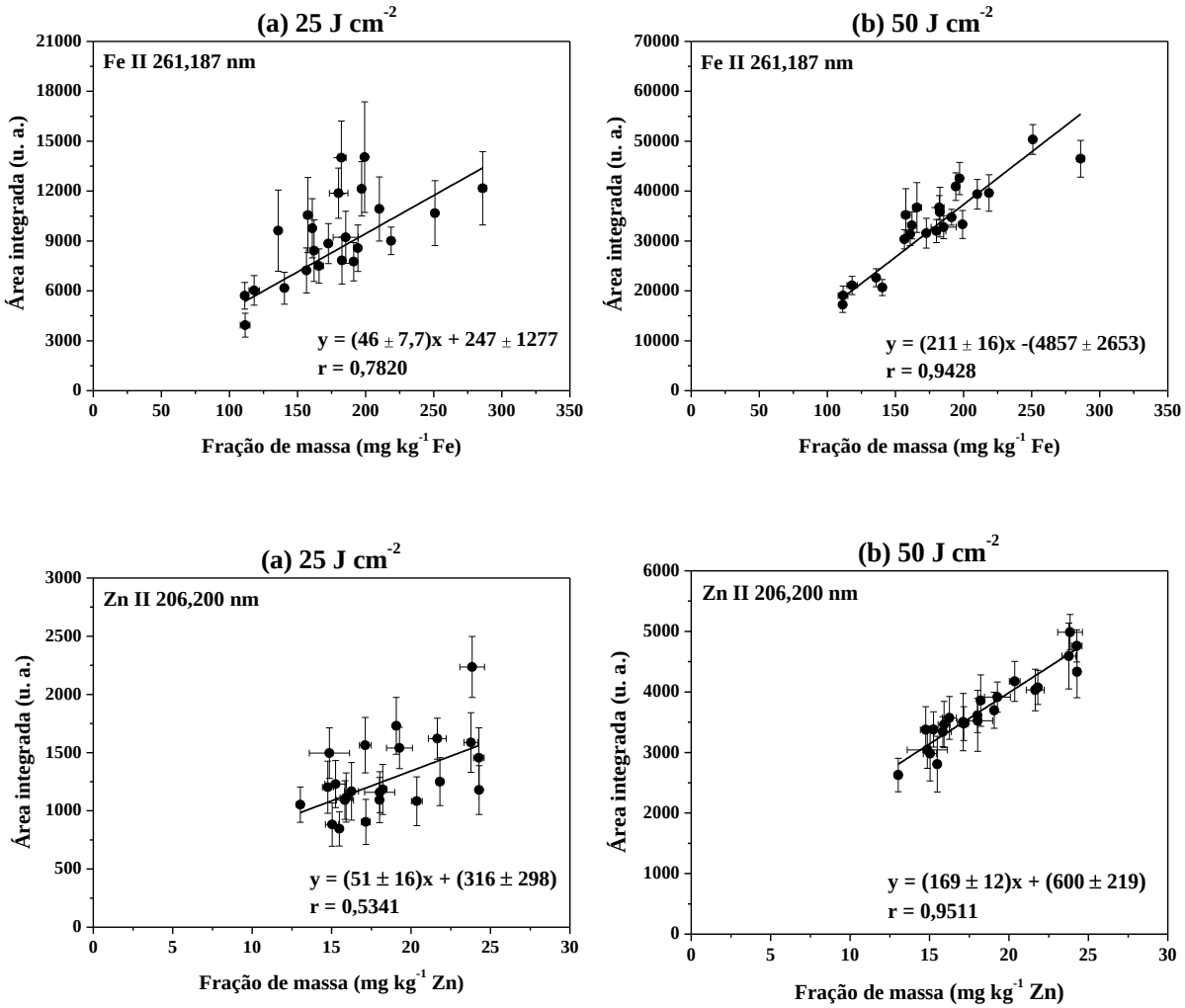


Figura 3.10 - Resultados para Fe II 261,187 e Zn II 206,200 nm obtidos na análise de pastilhas de 23 variedades de folhas de cana-de-açúcar aplicando-se (a) 25 ou (b) 50 J cm^{-2} (diâmetro de focalização de 750 µm). As barras de erro verticais correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 30 crateras, 20 pulsos/cratera). As barras de erro horizontais correspondem às incertezas das frações de massa determinadas por ICP OES após digestão ácida das amostras (n = 3).

Para B, Cu e P, não foi possível inferir sobre as duas condições de fluência, uma vez que esses elementos apresentaram frações de massa relativamente próximas nas amostras estudadas (i.e. 4,4 a 6,9 mg kg^{-1} B, 5,7 a 7,2 mg kg^{-1} Cu e 1,2 a 1,9 g kg^{-1} P) e as correlações foram bastante semelhantes para as duas fluências avaliadas. Observou-se também uma diminuição de até duas vezes nos valores de RMSEC (raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração) para Mg, Fe, Zn e Al (**Tabela 3.3**).

Cabe ressaltar que, em publicação anterior do nosso grupo, envolvendo análise quantitativa de pastilhas de folhas de cana-de-açúcar, resultados mais concordantes foram

obtidos empregando-se 25 J cm^{-2} e calibração multivariada.[95] Deve-se notar que no trabalho referido foram analisadas 42 amostras de folhas de cana-de-açúcar provenientes de apenas 6 variedades, que apresentavam bastante similaridade entre si. Os resultados apresentados nesta tese referem-se à análise de amostras provenientes de 23 variedades de cana-de-açúcar, as quais mostraram diferenças significativas na composição de suas matrizes, destacando-se diferentes teores de celulose que variaram de (31,5 ± 4,4) a (39,7 ± 1,4) %, e de lignina entre (3,8 ± 0,2) e (6,9 ± 0,1) %. Desta forma, os dados apresentados são uma indicação de que os efeitos de matriz podem ser minimizados empregando-se 50 J cm^{-2}. Além disso, observou-se que o incremento na fluência do laser proporcionou um aumento significativo na sensibilidade e na precisão das medições (**Figura 3.10**).

Os resultados apresentados neste tópico foram publicados no periódico *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* (**Anexo B**).

Tabela 3.3 - Características analíticas de modelos univariados de calibração para a determinação de Ca, K, Mg, P, B, Cu, Fe, Mn, Zn e Al em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar por LIBS, com laser de Nd:YAG a 1064 nm, empregando-se pulsos de 25 e 50 J cm^{-2} (diâmetro de focalização de 750 µm).

Analito	**Linha (nm)**	**25 J cm^2**		**50 J cm^2**	
		r_{cal}	***RMSEC***	r_{cal}	***RMSEC***
Ca (g kg^{-1})	I 442,544	0,9341	0,36	0,9262	0,38
K (g kg^{-1})	I 404,414	0,8780	0,83	0,7992	1,15
Mg (g kg^{-1})	I 277,669	0,7345	0,74	0,9218	0,34
P (g kg^{-1})	I 213,618	0,7426	0,16	0,6225	0,22
B (mg kg^{-1})	I 249,773	0,3820	1,6	0,4761	1,2
Cu (mg kg^{-1})	I 324,755	0,7633	0,4	0,8350	0,3
Fe (mg kg^{-1})	II 261,187	0,7820	48,8	0,9428	18,7
Mn (mg kg^{-1})	II 257,610	0,8289	12,7	0,9126	13,5
Zn (mg kg^{-1})	II 206,200	0,5341	5,2	0,9511	1,2
Al (mg kg^{-1})	I 309,271	0,8436	38,2	0,9477	20,2

r_{cal} = coeficiente de correlação da curva de calibração; ***RMSEC*** = raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração.

3.4 Influência do comprimento de onda do laser na análise materiais vegetais por ns-LIBS

3.4.1 Definição das condições experimentais do sistema LIBS com laser de Nd:YAG operando a 266 nm

De acordo com os experimentos realizados com o laser operando em 1064 nm,[47] observou-se que deve haver uma condição de compromisso entre a fluência e o diâmetro de focalização que resulte nas maiores intensidades de emissão. Para ablações em 1064 nm maiores intensidades de emissão foram observadas com 50 J cm^{-2} (230 mJ por pulso) e 750 µm de diâmetro de focalização. Uma vez que a geração dos harmônicos resulta em perdas de energia da ordem de 50 %,[38] a energia máxima por pulso alcançada pelo laser de Nd:YAG *Brilliant* (o qual opera no comprimento de onda fundamental com ~ 360 mJ por pulso) operando no quarto harmônico (i.e. 266 nm) é de, aproximadamente, 40 mJ por pulso. No presente trabalho, o delineamento experimental foi desenvolvido de maneira univariada, fixando-se a energia por pulso em 40 mJ e variando-se o diâmetro de focalização (de 90 a 1050 µm) com o objetivo de selecionar a condição de fluência e diâmetro de focalização que resultasse nas mais altas SNRs para todos os analitos. Cabe destacar que o estudo foi feito tendo como resposta as maiores SNRs para B e Cu, elementos que ocorrem em baixas concentrações em tecidos foliares.[1] Este experimento foi feito com pastilhas de folhas de cana-de-açúcar, empregando-se 2,0 µs de atraso, 5,0 µs de integração e 50 pulsos acumulados (i.e. com a pastilha rodando).

As maiores intensidades dos sinais de emissão de B I 249,773, Cu I 324,755, Mn II 257,610 e P I 213,618 nm foram obtidas quando o diâmetro de focalização foi ajustado entre 450 e 320 µm (**Figura 3.11**), correspondendo, respectivamente, a fluências de 25 e 50 J cm^{-2}. Cabe destacar que ambas as condições de focalização resultaram nas mais altas SNRs. O mesmo comportamento foi observado para as linhas Ca II 370,603, K I 404,414, Mg I 277,669, Fe II 261,187, Zn II 206,200, Al I 308,216 e Na I 589,593 nm.

Conforme destacado anteriormente, a forma considerada mais apropriada para a análise das pastilhas foi a de aplicar os pulsos de laser sobre a superfície da amostra em movimento (i.e. rodando a 30 rpm). Esta estratégia permitiu acumular um número de pulsos maior do que os geralmente empregados nas análises pontuais (*e.g.*, 20 pulsos). Foram avaliadas amostragem com 50, 100, 200 e 400 pulsos na superfície da pastilha rodando. As maiores intensidades dos sinais de emissão foram obtidas quando as pastilhas foram analisadas com 200 e 400 pulsos (**Figura 3.12**). Para Cu I 342,755 nm, SNRs de 17, 21, 90 e 140 foram obtidas com 50, 100,

200 e 400 pulsos, respectivamente. No entanto, o uso de 400 pulsos aumentou significativamente as incertezas das medições, resultando em coeficientes de variação (CV) maiores que 30 % para a maioria dos analitos (n = 3). Resultados semelhantes foram obtidos para as demais linhas de emissão. O uso de 200 pulsos provocou saturação do detector ICCD para a maioria das linhas de Ca e Mg. Desta forma, os efeitos do comprimento de onda do laser na análise de pastilhas de folhas de cana-de-açúcar foram avaliados com 200 pulsos de 25 e de 50 J cm^{-2}.

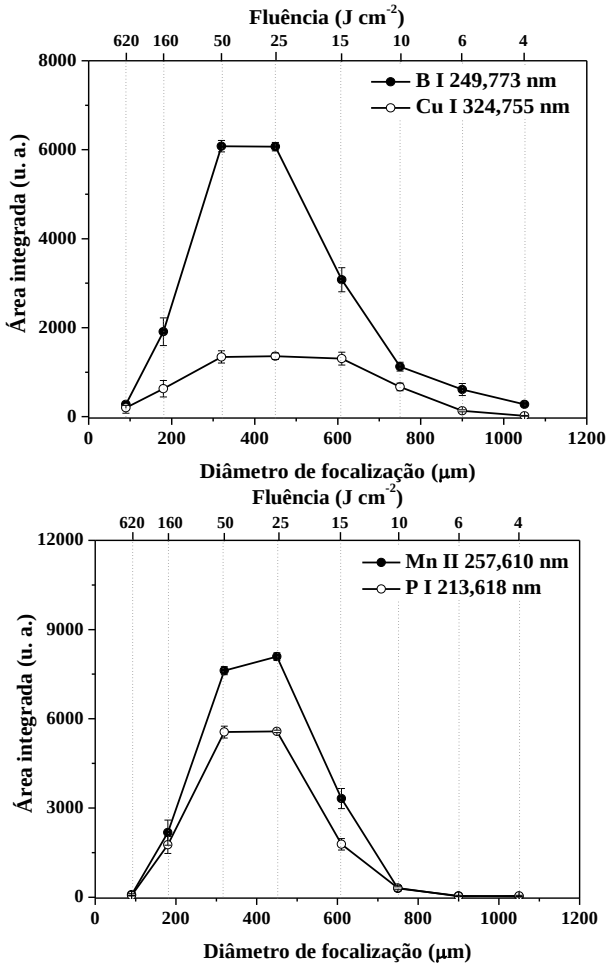


Figura 3.11 – Intensidade dos sinais de emissão de B I 249,773, Cu I 324,755, Mn II 257,610 e P I 213,618 nm em função do diâmetro de focalização. Dados para Nd:YAG operando em 266 nm, 50 pulsos, 40 mJ por pulso (n = 5).

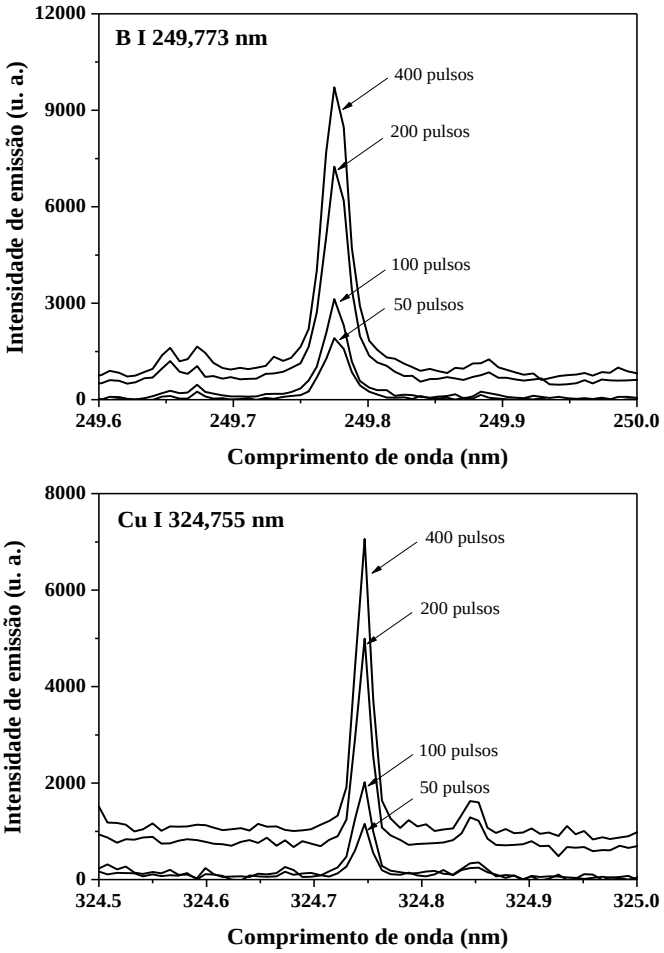


Figura 3.12 – Fragmento do espectro contendo as linhas de emissão B I 249,773 e Cu I 324,755 nm de pastilha de folhas de cana-de-açúcar obtidos com 50, 100, 200 e 400 pulsos acumulados. Dados para laser de Nd:YAG operando em 266 nm, (10 Hz), 50 J cm^{-2}, 320 µm de diâmetro de focalização, 2,0 µs de atraso e 5,0 µs de integração.

3.4.2 Resultados preliminares obtidos por ns-LIBS a 266, 355, 532 e 1064 nm

A **Figura 3.13** mostra os fragmentos do espectro de emissão contendo as linhas Mg I 277,669, P I 213,618, Cu I 327,396 e Mn II 257,610 nm obtidos após ablação de pastilhas de CRMs (NIST 1515 e NIST 1570a) com laser operando em 266, 355, 532 e 1064 nm. Estes experimentos foram feitos com 200 pulsos, 50 J cm^{-2}, diâmetro de focalização de 320 µm, 2,0 µs de atraso e 5,0 µs de integração. Observou-se que as linhas de emissão foram mais intensas quando os plasmas foram induzidos por laser em 1064 nm, sendo que para o cobre esse aumento foi mais discreto. Resultados semelhantes foram observados por Zhang et al.[68] na análise de folhas frescas com laser operando em 266 e 1064 nm. Esse comportamento pode estar relacionado à maior temperatura alcançada pelos plasmas induzidos por laser no IR.[51, 65]

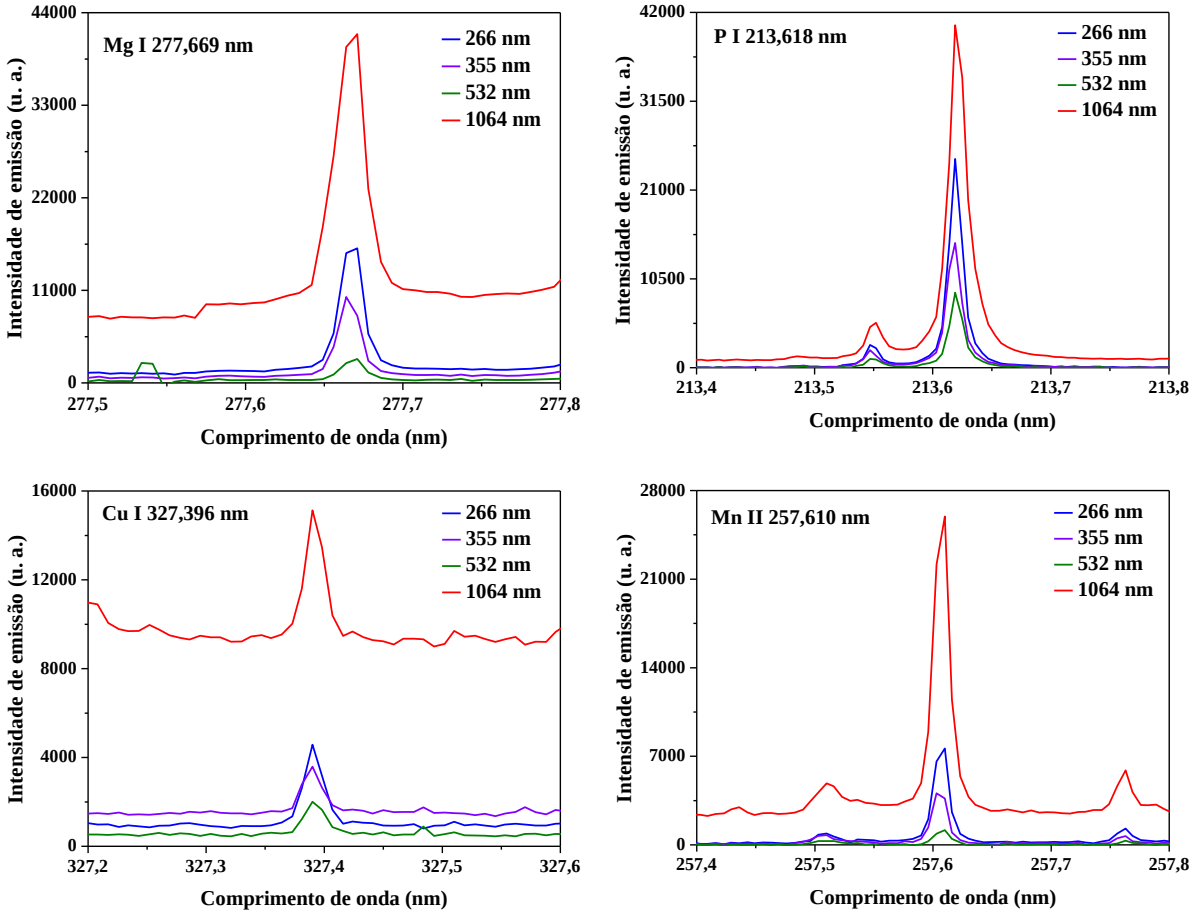


Figura 3.13 – Fragmentos do espectro de emissão de plasmas induzidos por laser operando a 1064, 532, 355 e 266 nm em pastilhas de materiais vegetais. Sinais líquidos das linhas Mg I 277,669, P I 213,618, Cu I 327,396 e Mn II 257,610 nm obtidos com 200 pulsos de 50 J cm^{-2}, 320 µm de diâmetro de focalização, 2,0 µs de atraso e 5,0 µs de integração. Dados para (2,71 ± 0,08) g kg^{-1} Mg; (5,18 ± 0,11) g kg^{-1} P; (12,2 ± 0,6) mg kg^{-1} Cu; (54 ± 3) mg kg^{-1} Mn.

A título de informação, as distribuições de Boltzmann foram empregadas para determinar as temperaturas de plasmas induzidos por laser a 266, 355, 532 e 1064 nm na superfície de pastilhas de folhas de espinafre - NIST 1570a (**Figura 3.14**). Com exceção dos dados referentes a 532 nm, maiores temperaturas foram observadas aumentando-se o comprimento de onda do laser. Para 2,0 µs de atraso, os plasmas induzidos a 266, 355, 532 e 1064 nm apresentaram temperaturas entre 13900 e 17200 K. As temperaturas mais altas observadas nos plasmas induzidos por laser no IR em relação ao UV são concordantes com a literatura pois, após a formação do plasma, a absorção de energia do laser pelo plasma ocorre, principalmente, por mecanismos de *bremsstrahlung* inverso, o qual é mais favorável para o IR do que para o UV.[48, 49] No entanto, cabe relembrar que a determinação da temperatura do plasma pelo método de Boltzmann é acompanhada de erros sistemáticos relacionados às incertezas nas probabilidades de transição eletrônicas (*A*) de até 50 %.[156] Além disso, a natureza transiente

dos plasmas induzidos por laser torna esta questão ainda mais complexa, uma vez que o plasma tende a evoluir para o estado de equilíbrio a partir das colisões entre elétrons com alta energia cinética e átomos / íons.[11] Cabe relembrar que a distribuição de Boltzmann foi utilizada em trabalho anterior para investigar a temperatura de plasmas induzidos por laser de Nd:YAG a 1064 nm na superfície de pastilhas de folhas de feijão.[87] Naquela ocasião, após 2 µs da incidência do pulso de laser de 35 J cm^{-2}, a temperatura foi estimada em (9130 ± 130) K.

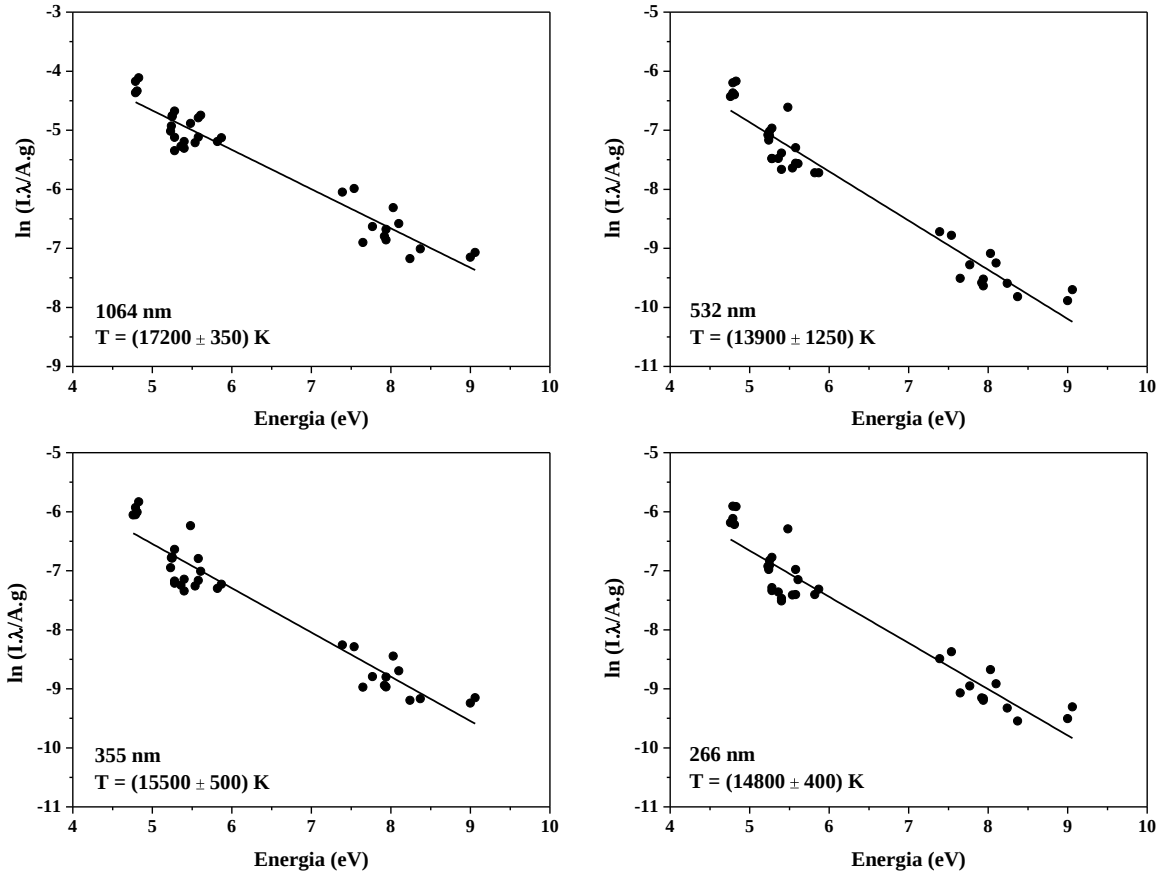


Figura 3.14 – Distribuição de Boltzmann para linhas de Fe II em plasma induzido por laser a 1064, 532, 355, e 266 nm em pastilhas de folhas de espinafre (NIST 1570a). Condições experimentais: 50 J cm^{-2}, 320 µm de diâmetro de focalização, 200 pulsos, 2,0 µs de atraso e 5,0 µs de integração.

Comparando-se os dados obtidos a 266, 355 e 1064 nm, é importante destacar que a emissão de radiação de fundo foi discretamente menor para os plasmas induzidos por laser a 266 e 355 nm. Este aspecto ficou claramente evidenciado na **Figura 3.13**, principalmente para as linhas de emissão com comprimentos de onda maiores que 300 nm, como é o caso de Al I 308,216, Cu I 324,755, Ca II 370,603, K I 404,414 e Na I 589,593 nm. Este efeito também está relacionado ao fato do plasma absorver em menor extensão a radiação emitida pelo laser no UV quando comparado aos plasmas gerados no IR.[34, 51] Fornarini et al.[51] observaram redução

significativa da emissão de radiação de fundo, principalmente entre 500 e 860 nm, quando amostras de bronze foram analisadas com laser em 355 ao invés de 1064 nm. No tocante à análise de materiais vegetais, Zhang et al.[68] também observaram redução apreciável da radiação de fundo empregando-se laser no UV.

Pastilhas preparadas com CRMs descritos na **Tabela 2.2** foram analisadas por LIBS operando nos 4 comprimentos de onda do laser de Nd:YAG e as intensidades dos sinais de emissão foram correlacionadas com as respectivas frações de massa dos analitos. A **Figura 3.15** mostra as curvas de calibração de P obtidas a partir de plasmas induzidos por laser operando em 266, 355, 532 e 1064 nm. Estes resultados são concordantes com os apresentados na **Figura 3.12** e demonstram que a sensibilidade foi maior para a condição de 1064 nm, seguido de 266, 355 e 532 nm. Resultados semelhantes foram observados para a maioria dos analitos.

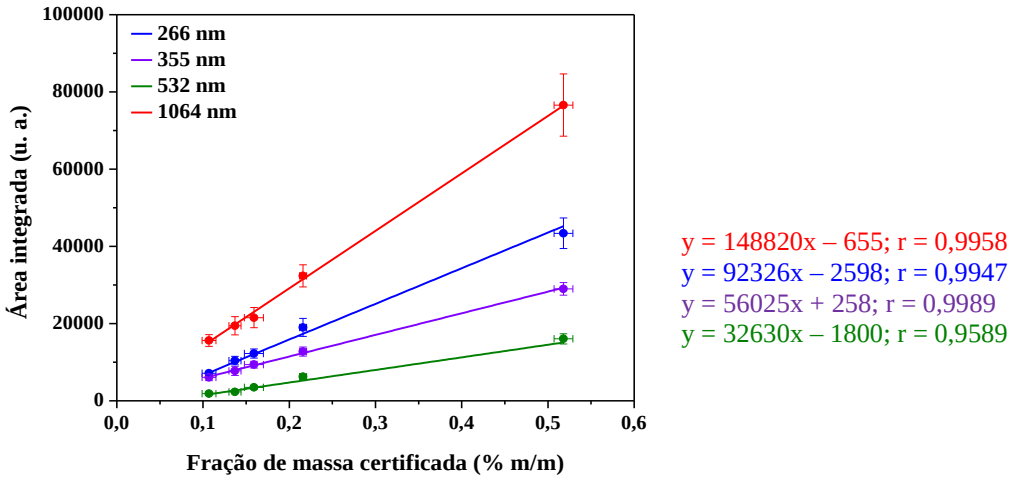


Figura 3.15 - Curvas de calibração para P I 213,618 nm construídas com CRMs analisados por LIBS a 266, 355, 532 e 1064 nm. Dados para 200 pulsos de 50 J cm^{-2}, 320 µm de diâmetro de focalização, 2,0 µs de atraso e 5,0 µs de integração. As barras de erro verticais correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 6) e as horizontais às incertezas dos valores certificados.

A **Tabela 3.4** mostra os valores de SNR e LOD calculados para as linhas de emissão dos analitos avaliados. Observou-se que as ablações a 1064 e 266 nm forneceram os LODs mais baixos em relação aos demais comprimentos de onda. No entanto, apesar dos espectros de ns-LIBS a 266 nm apresentarem menor emissão de radiação de fundo, não foram observadas diferenças significativas nos LODs obtidos a 1064 e 266 nm.

Tabela 3.4 – Valores das razões sinal-ruído (SNR) e limites de detecção (LOD), para linhas de emissão selecionadas, empregando-se laser de Nd:YAG a 1064, 532, 355 e 266 nm. Dados para 200 pulsos de 50 J cm^{-2}, 320 µm de diâmetro de focalização, 2,0 µs de atraso e 5,0 µs de integração.

Analito	**Linha (nm)**	***1064 nm***		***532 nm***		***355 nm***		***266 nm***	
		SNR	***LOD***	***SNR***	***LOD***	***SNR***	***LOD***	***SNR***	***LOD***
Ca (g kg^{-1})	(II) 370,306	141	0,4	29	2,3	123	0,4	108	0,5
K (g kg^{-1})	(I) 404,414	43	3,6	20	4,1	40	2,0	56	1,2
Mg (g kg^{-1})	(I) 277,669	320	0,03	54	0,2	180	0,05	326	0,03
P (g kg^{-1})	(I) 213,618	455	0,04	253	0,07	322	0,05	475	0,04
B (mg kg^{-1})	(I) 249,773	350	0,4	84	1,6	211	0,6	278	0,5
Cu (mg kg^{-1})	(I) 324,755	141	0,5	82	0,6	133	0,4	106	0,4
Cu (mg kg^{-1})	(I) 327,396	132	0,8	40	1,4	74	0,9	79	0,6
Fe (mg kg^{-1})	(I) 259,940	172	1,9	12	24	18	17	37	8,0
Mn (mg kg^{-1})	(II) 257,610	257	0,8	26	7,2	75	2,4	174	1,1
Zn (mg kg^{-1})	(I) 213,855	205	1,4	37	7,5	55	5,0	81	3,3
Al (mg kg^{-1})	(I) 308,216	*sat*	*sat*	64	16	85	12	104	9,8
Na (mg kg^{-1})	(I) 589,593	49	3,5	16	7,8	30	3,4	32	3,2

3.4.3 Desempenho analítico de LIBS operando a 1064, 532, 355 e 266 nm na análise de folhas de cana-de-açúcar empregando-se calibração univariada

Os dados apresentados neste tópico são referentes à análise de pastilhas preparadas com folhas de cana-de-açúcar cominuídas em moinho de bolas com movimento planetário por 60 min. Este procedimento proporciona distribuições do tamanho de partículas caracterizadas por 95 % das partículas menores que 60 µm.[107]

Pastilhas preparadas com folhas de 14 variedades de cana-de-açúcar foram analisadas por LIBS operando a 1064, 532, 355 e 266 nm e as intensidades dos sinais de emissão foram correlacionadas com as respectivas frações de massa dos analitos, previamente determinadas por ICP OES após digestão ácida assistida por radiação micro-ondas, conforme demonstrado nas **Figuras 3.16** a **3.19** para K, Mg, Cu e Mn. O comprimento de onda do laser não apresentou influência significativa nos coeficientes de correlação (r_{cal}) entre os sinais de emissão e as frações de massa dos analitos. No entanto, observou-se que os menores r_{cal} e os maiores valores de *RMSEC* foram obtidos a 532 nm (**Tabela 3.5**). Por outro lado, os menores valores de *RMSEC* foram obtidos empregando-se 1064 e 266 nm. Com base nesses resultados, não foi possível inferir que a ablação com laser operando no UV diminua os efeitos de matriz na análise de pastilhas de materiais vegetais por LIBS.

Cabe destacar que os resultados apresentados nas **Figuras 3.16** a **3.19** e na **Tabela 3.5** foram obtidos com uma condição de fluência relativamente alta (i.e. 50 J cm^{-2}) e, conforme demonstrado anteriormente na análise de pastilhas de folhas de cana-de-açúcar empregando-se laser de Nd:YAG a 1064 nm (**item 3.3** desta tese), o uso de pulsos com 50 J cm^{-2} proporciona uma condição analítica mais robusta frente às variações físicas e químicas da matriz.[92, 108] Assim, formulou-se a hipótese de reduzir a fluência do laser com o objetivo de verificar se a ablação com laser no UV realmente pode superar os efeitos de matriz, conforme destacado na literatura.[1, 40, 54] Nesta etapa, as amostras foram analisadas com laser de Nd:YAG operando a 266 nm, empregando-se 200 pulsos, 25 J cm^{-2}, 450 µm de diâmetro de focalização, 2,0 µs de atraso e 5,0 µs de integração. Para fins comparativos, as amostras também foram analisadas empregando-se o laser de Nd:YAG a 1064 nm, sob as mesmas condições.

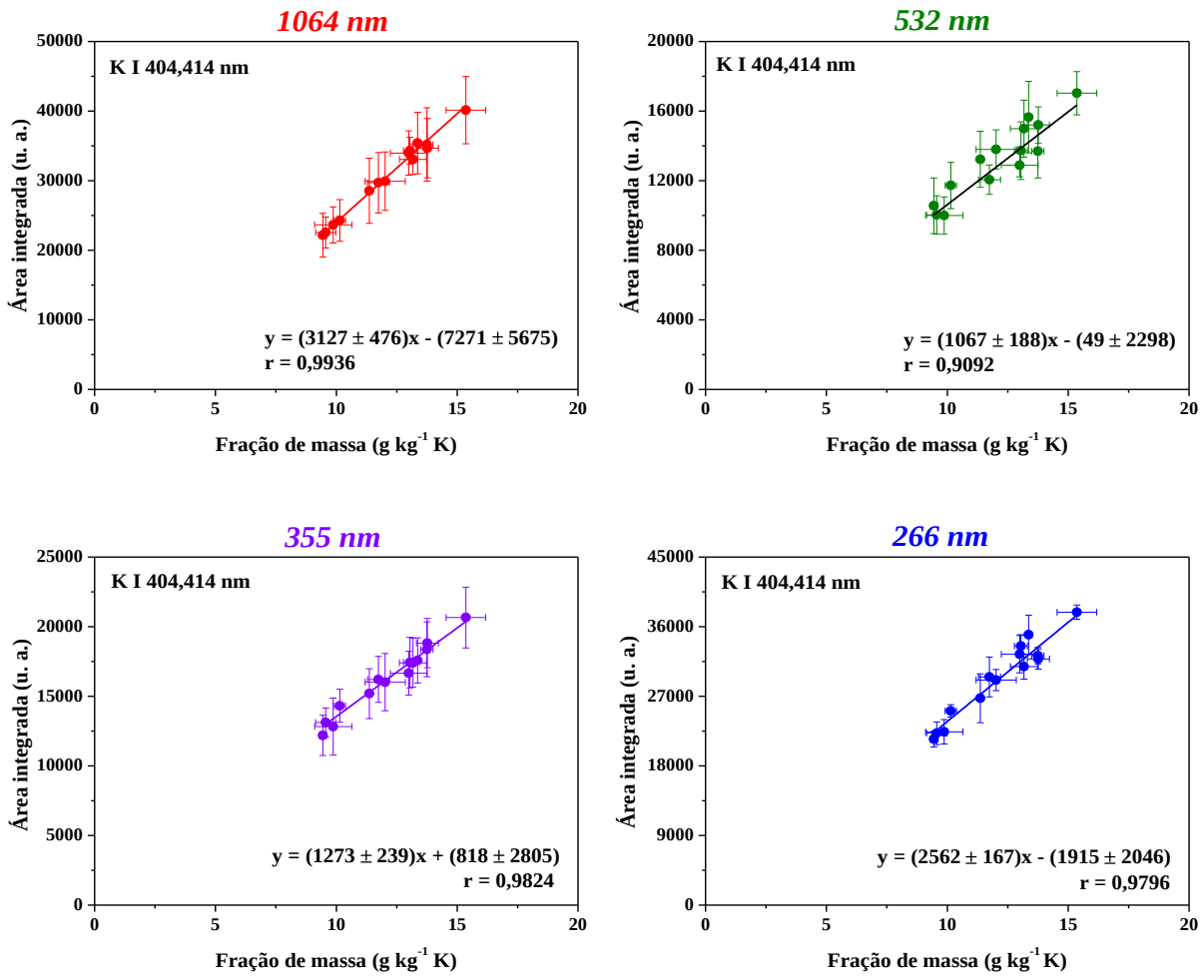


Figura 3.16 – Resultados para K I 404,414 nm após ablação de pastilhas de folhas de cana-de-açúcar (n = 14) com laser de Nd:YAG a 1064, 532, 355 e 266 nm. Dados para 200 pulsos de 50 J cm^{-2}, 320 µm de diâmetro de focalização, 2,0 µs de atraso e 5,0 µs de integração. As barras de erro verticais correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 6) e as horizontais às incertezas das frações de massa determinadas por ICP OES após digestão ácida (n = 3).

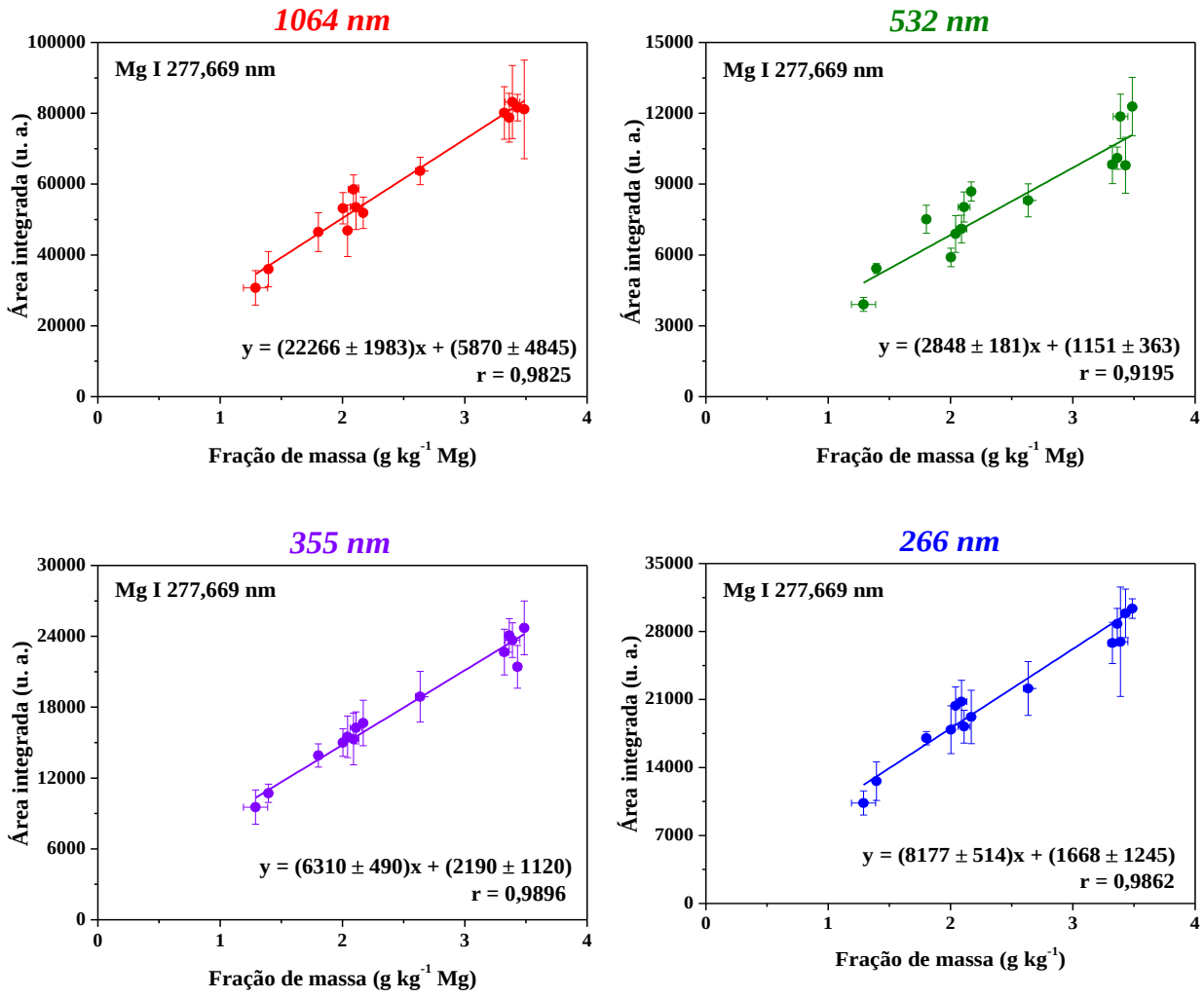


Figura 3.17 – Resultados para Mg I 277,669 nm após ablação de pastilhas de folhas de cana-de-açúcar (n = 14) com laser de Nd:YAG a 1064, 532, 355 e 266 nm. Dados para 200 pulsos de 50 J cm^{-2}, 320 µm de diâmetro de focalização, 2,0 µs de atraso e 5,0 µs de integração. As barras de erro verticais correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 6) e as horizontais às incertezas das frações de massa determinadas por ICP OES após digestão ácida (n = 3).

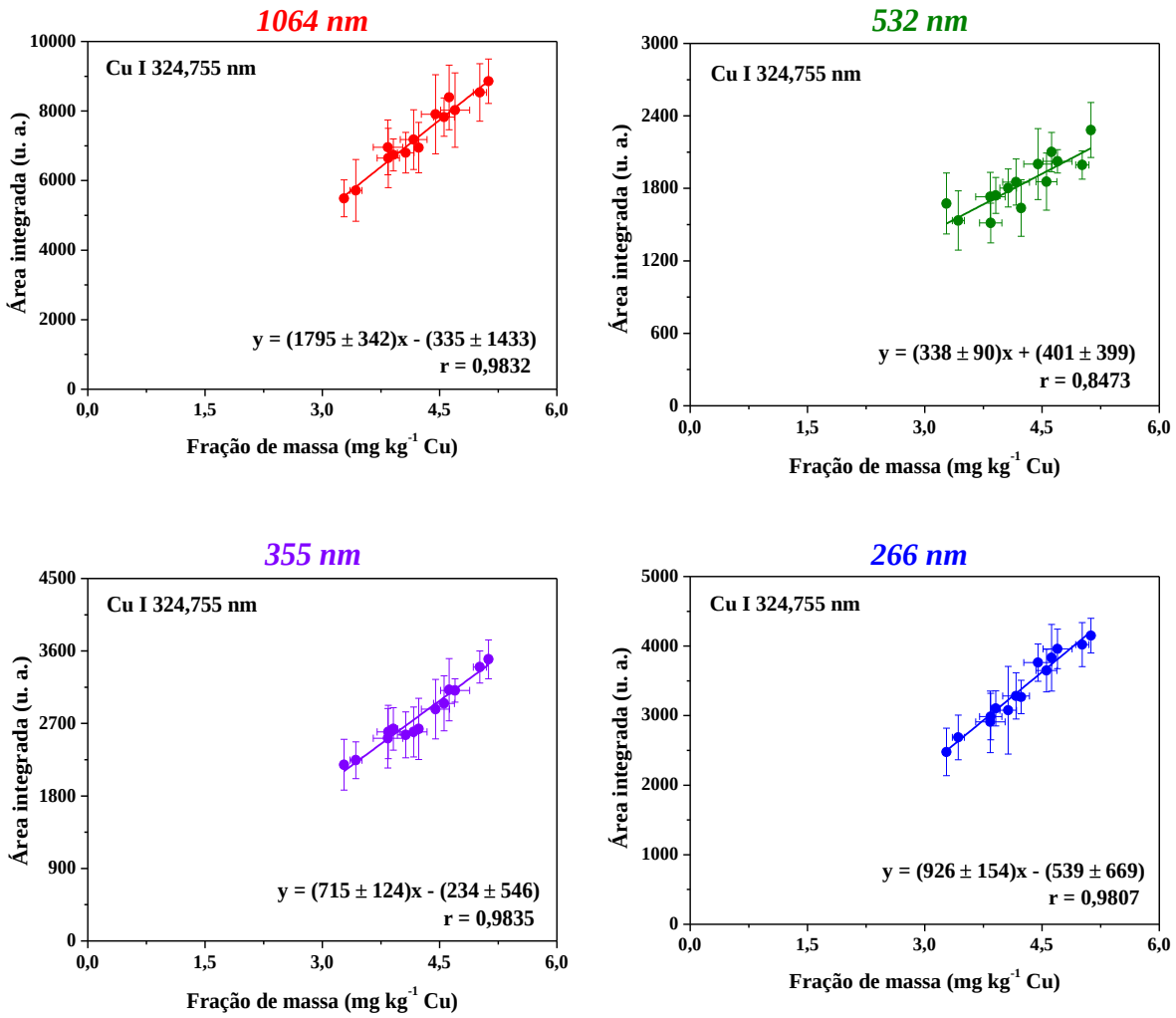


Figura 3.18 – Resultados para Cu I 324,755 nm após ablação de pastilhas de folhas de cana-de-açúcar (n = 14) com laser de Nd:YAG a 1064, 532, 355 e 266 nm. Dados para 200 pulsos de 50 J cm^{-2}, 320 µm de diâmetro de focalização, 2,0 µs de atraso e 5,0 µs de integração. As barras de erro verticais correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 6) e as horizontais às incertezas das frações de massa determinadas por ICP OES após digestão ácida (n = 3).

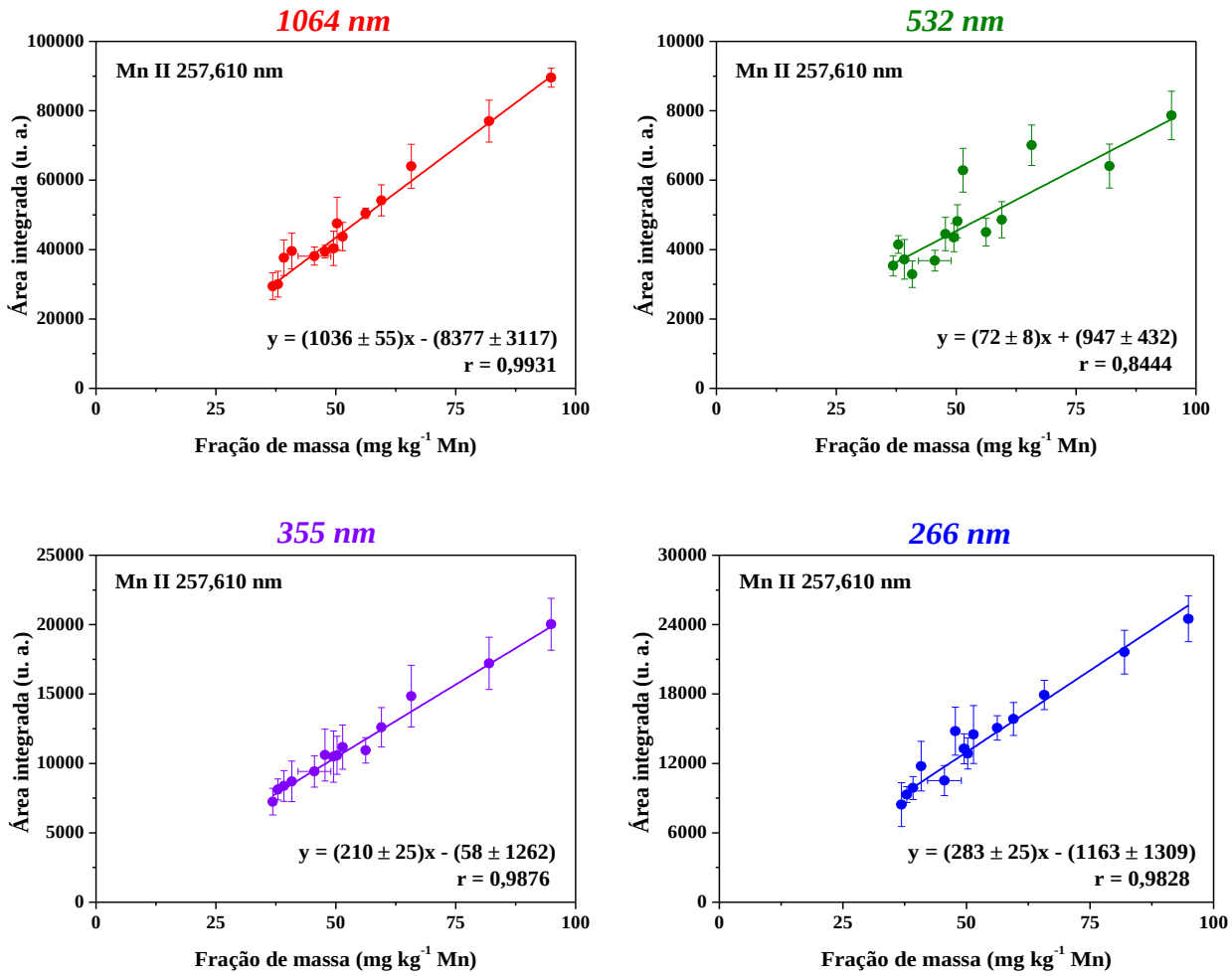


Figura 3.19 – Resultados para Mn II 257,610 nm após ablação de pastilhas de folhas de cana-de-açúcar (n = 14) com laser de Nd:YAG a 1064, 532, 355 e 266 nm. Dados para 200 pulsos de 50 J cm^{-2}, 320 µm de diâmetro de focalização, 2,0 µs de atraso e 5,0 µs de integração. As barras de erro verticais correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 6) e as horizontais às incertezas das frações de massa determinadas por ICP OES após digestão ácida (n = 3).

Tabela 3.5 - Características analíticas dos modelos univariados de calibração para a determinação de Ca, K, Mg, P, B, Cu, Fe, Mn, Zn, Al e Na em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar por ns-LIBS a 1064, 532, 355 e 266 nm. Dados para 200 pulsos de 50 J cm^{-2} (diâmetro de focalização de 320 µm).

Analito	**Linha (nm)**	***1064 nm***		***532 nm***		***355 nm***		***266 nm***	
		r_{cal}	*RMSEC*	r_{cal}	*RMSEC*	r_{cal}	*RMSEC*	r_{cal}	*RMSEC*
Ca (g kg^{-1})	(II) 370,602	*sat*	*sat*	0,8665	0,54	0,9894	0,14	0,9406	0,34
K (g kg^{-1})	(I) 404,414	0,9936	0,17	0,9092	0,66	0,9824	0,29	0,9796	0,39
Mg (g kg^{-1})	(I) 277,669	0,9825	0,12	0,9195	0,31	0,9896	0,13	0,9862	0,16
P (g kg^{-1})	(I) 213,618	0,9950	0,02	0,7460	0,15	0,9563	0,05	0,9127	0,08
B (mg kg^{-1})	(I) 249,773	0,8085	0,5	0,5824	0,8	0,9209	0,3	0,9675	0,2
Cu (mg kg^{-1})	(I) 324,755	0,9832	0,1	0,8473	0,3	0,9835	0,1	0,9807	0,1
Fe (mg kg^{-1})	(II) 261,187	0,9836	7,1	0,8027	28,7	0,9719	9,3	0,9870	6,3
Mn (mg kg^{-1})	(II) 257,610	0,9931	2,6	0,8444	8,8	0,9876	2,0	0,9828	3,5
Zn (mg kg^{-1})	(I) 213,855	0,9638	0,9	0,6848	3,9	0,9719	0,9	0,9796	0,7
Al (mg kg^{-1})	(I) 308,216	*sat*	*sat*	0,9180	20,7	0,9945	5,0	0,9876	7,6
Na (mg kg^{-1})	(I) 589,593	0,9831	2,5	0,9271	5,4	0,6980	13,8	0,9362	5,0

NOTA: r_{cal} = coeficiente de correlação da curva de calibração; *RMSEC* = raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração; *sat* = saturação do ICCD.

A **Figura 3.20** mostra os fragmentos dos espectros, contendo as linhas de interesse, obtidos após ablação de pastilhas de CRMs (NIST 1515 e NIST 1570a) com laser operando em 266 e 1064 nm. Em contraposição aos resultados apresentados na **Figura 3.13**, obtidos com 50 J cm^{-2} e 320 µm de diâmetro de focalização, verificou-se, neste caso, que a ablação com laser a 266 nm resultou em espectro de emissão mais intenso do que a 1064 nm. Observou-se que as características do plasma dependem não só do comprimento de onda do laser, mas também das condições experimentais como a fluência. Os plasmas induzidos por laser no UV com pulsos de 25 J cm^{-2} apresentaram temperaturas menores do que no IR, sendo estimadas, pela distribuição de Boltzmann, em (12500 ± 650) e (15300 ± 800) K, respectivamente. Assim, pode-se atribuir os aumentos nas intensidades das linhas de emissão aos processos de fotoionização inerentes à ablação no UV, uma vez que os fótons a 266 nm são cerca de 4 vezes mais energéticos que os a 1064 nm (i.e., 4,7 e 1,2 eV, respectivamente[10]). O comportamento da radiação de fundo foi o mesmo verificado anteriormente, caracterizado por diminuição de sua intensidade nos espectros obtidos a 266 nm. Por conseguinte, os *LODs* estimados para 266 nm foram cerca de 2 vezes mais baixos que a 1064 nm.

A análise do conjunto de pastilhas preparadas com folhas de 14 variedades de cana-de-açúcar com pulsos de 25 J cm^{-2} mostrou que maiores r_{cal} para Ca, K, P e B foram obtidos quando as pastilhas de folhas de cana-de-açúcar foram analisadas com laser de Nd:YAG a 266 nm (**Figuras 3.21** e **3.22**). Desta forma, estes resultados demonstram que a ablação com laser no UV proporcionou resultados mais exatos do que no IR em fluências mais baixas. No entanto, para a maioria dos elementos (i.e., Mg, Cu, Fe, Mn, Zn, Al e Na), observou-se que o comprimento de onda não afetou significativamente a correlação entre a intensidade dos sinais de emissão e as frações de massa dos analitos, mesmo empregando-se condições de fluências relativamente menores (i.e., de 25 J cm^{-2}), sendo verificadas funções lineares com $r_{cal} > 0{,}95$ nos 2 comprimentos de onda do laser avaliados (**Tabela 3.6**). Consequentemente, para estes elementos, não foram evidenciadas diferenças significativas nos valores de *RMSEC* em função do comprimento de onda.

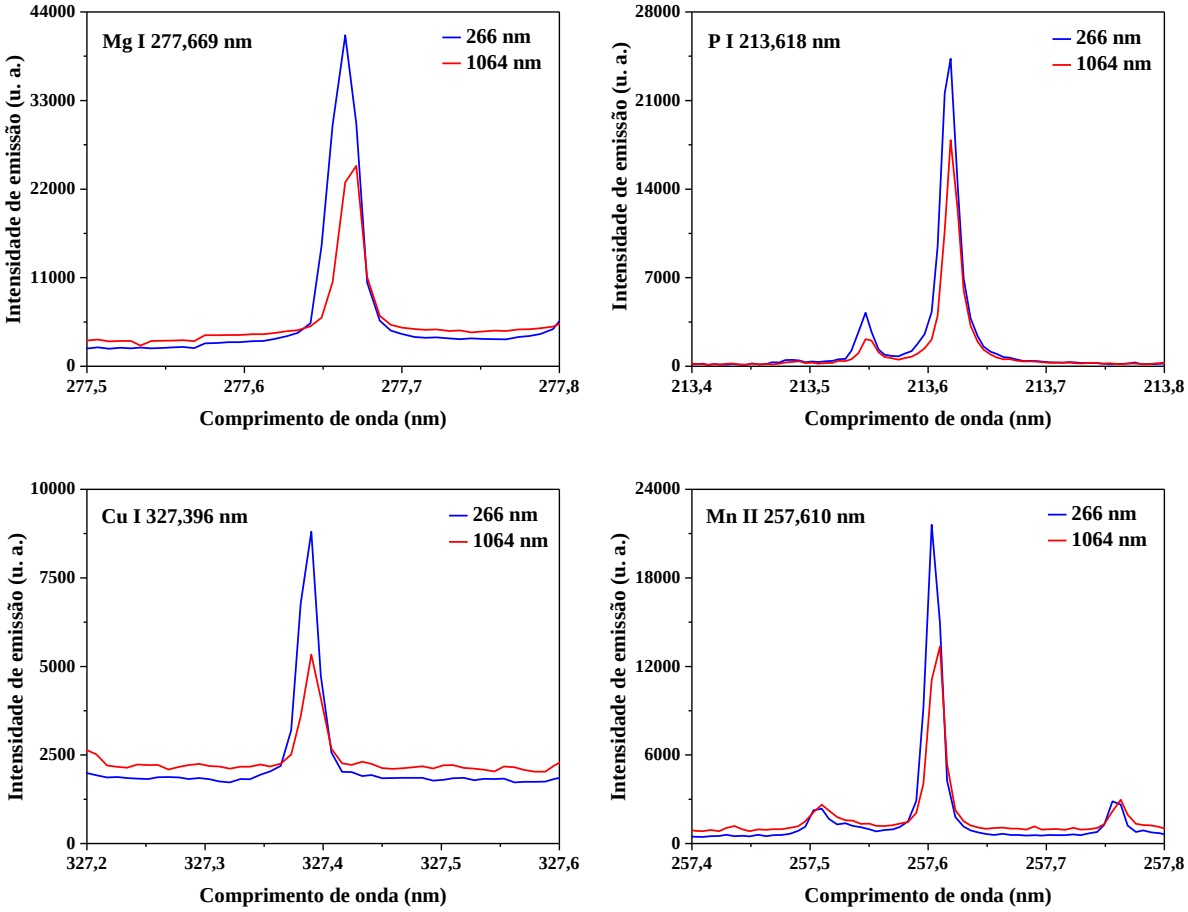


Figura 3.20 – Fragmentos dos espectros de emissão de plasmas induzidos por laser operando a 1064 e 266 nm em pastilhas de materiais vegetais. Sinais líquidos das linhas Mg I 277,669, P I 213,618, Cu I 327,396 e Mn II 257,610 nm obtidos com 200 pulsos de 25 J cm^{-2}, 450 µm de diâmetro de focalização, 2,0 µs de atraso e 5,0 µs de integração. Dados para (2,71 ± 0,08) g kg^{-1} Mg; (5,18 ± 0,11) g kg^{-1} P; (12,2 ± 0,6) mg kg^{-1} Cu; (54 ± 3) mg kg^{-1} Mn.

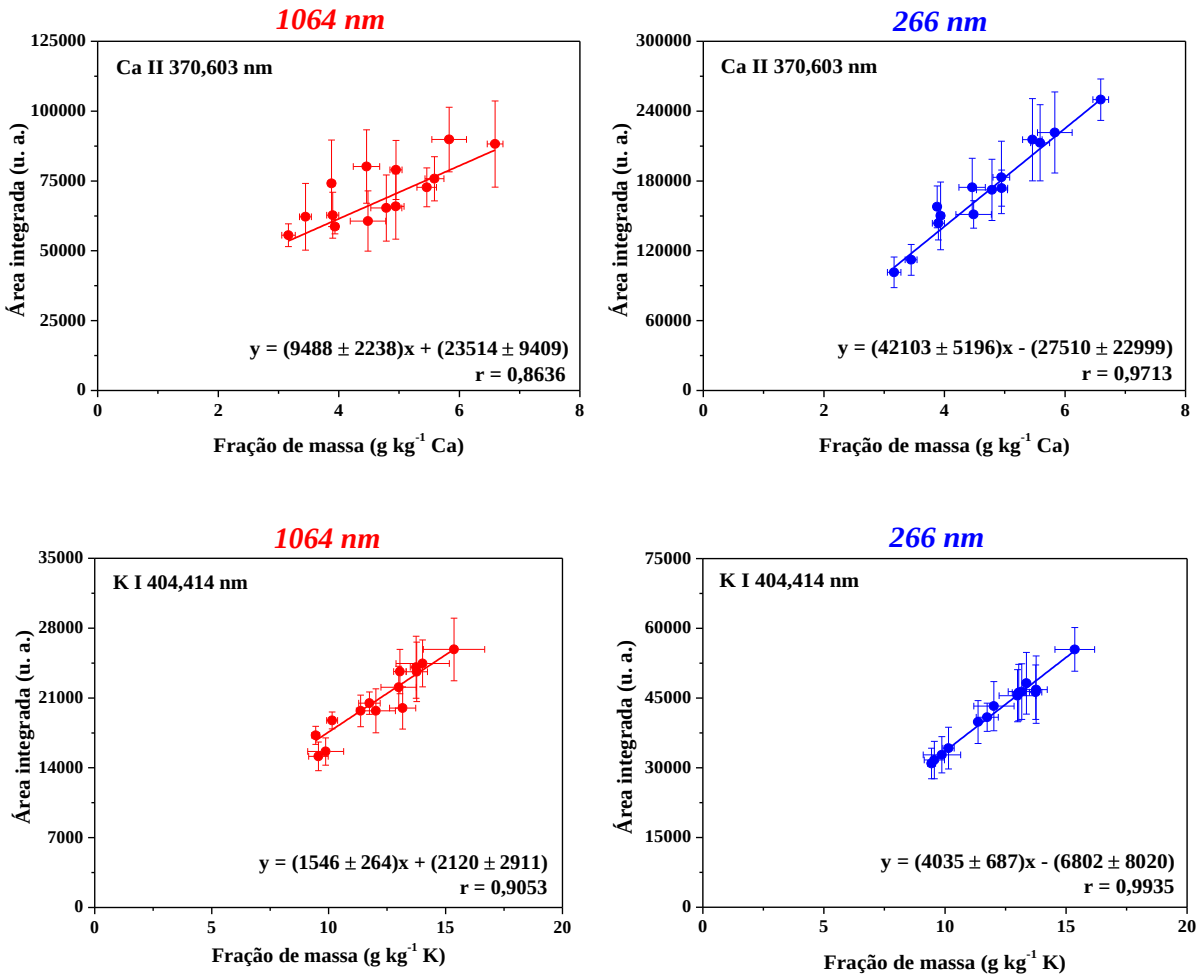


Figura 3.21 – Resultados para Ca II 370, 603 e K I 404,414 nm após ablação de pastilhas de folhas de cana-de-açúcar (n = 14) com laser de Nd:YAG a 266 e 1064 nm. Dados para 200 pulsos de 25 J cm^{-2}, 450 µm de diâmetro de focalização, 2,0 µs de atraso e 5,0 µs de integração. As barras de erro verticais correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 6) e as horizontais às incertezas das frações de massa determinadas por ICP OES após digestão ácida (n = 3).

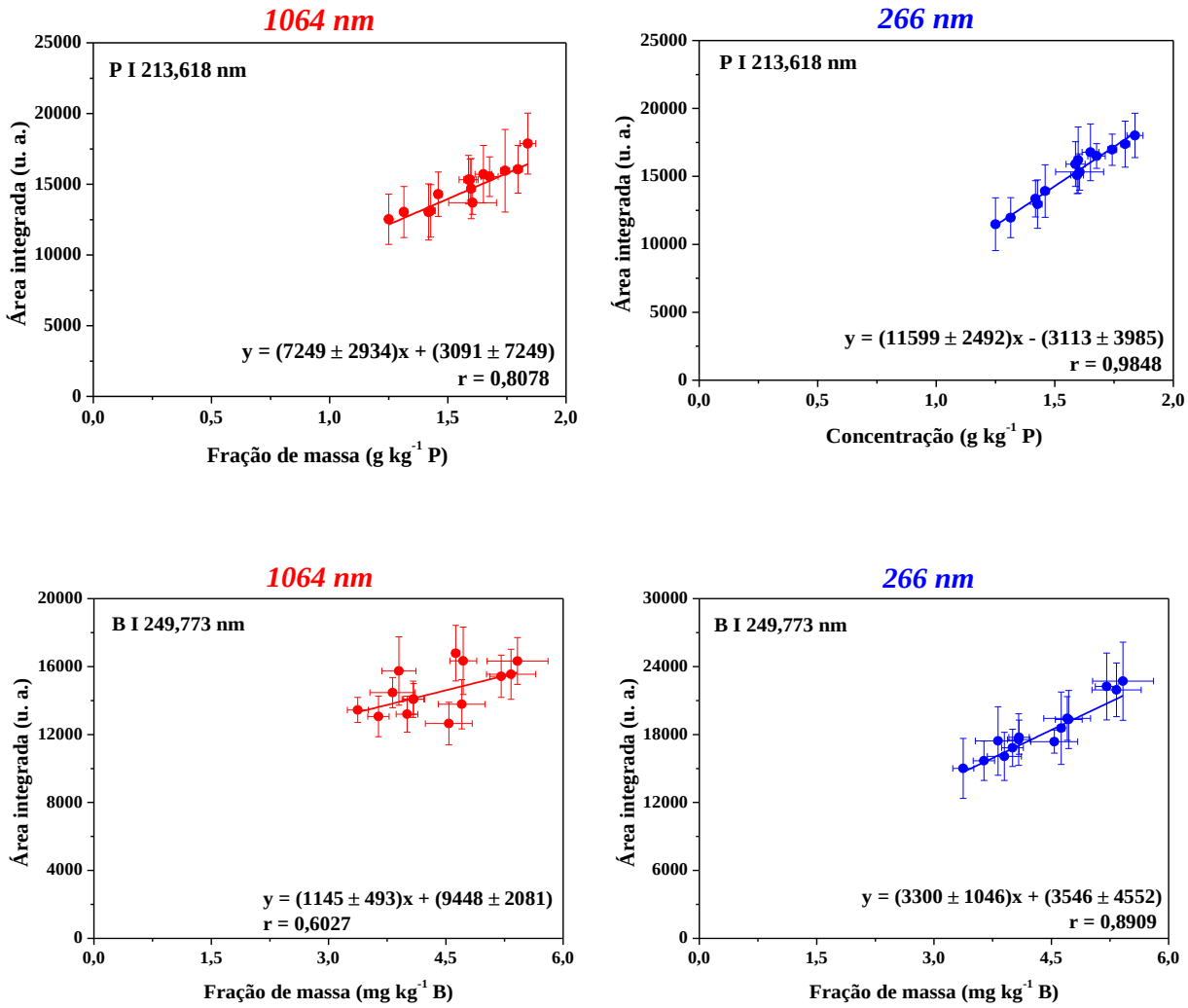


Figura 3.22 – Resultados para P I 213,618 e B I 249,773 nm após ablação de pastilhas de folhas de cana-de-açúcar (n = 14) com laser de Nd:YAG a 266 e 1064 nm. Dados para 200 pulsos de 25 J cm^{-2}, 450 µm de diâmetro de focalização, 2,0 µs de atraso e 5,0 µs de integração. As barras de erro verticais correspondem a ± 1 desvio-padrão (n = 6) e as horizontais às incertezas das frações de massa determinadas por ICP OES após digestão ácida (n = 3).

Tabela 3.6 – Parâmetros analíticos dos modelos univariados de calibração para a determinação de Ca, K, Mg, P, B, Cu, Fe, Mn, Zn, Al e Na em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar por ns-LIBS operando a 1064 e 266 nm. Dados para 200 pulsos de 25 J cm^{-2} (diâmetro de focalização de 450 µm).

Analito	Linha (nm)	*1064 nm*		*266 nm*	
		r_{cal}	*RMSEC*	r_{cal}	*RMSEC*
Ca (g kg^{-1})	(II) 370,602	0,8636	0,74	0,9713	0,21
K (g kg^{-1})	(I) 404,414	0,9053	0,63	0,9935	0,25
Mg (g kg^{-1})	(I) 277,669	0,9900	0,09	0,9929	0,11
P (g kg^{-1})	(I) 213,618	0,8078	0,07	0,9848	0,03
B (mg kg^{-1})	(I) 249,773	0,6027	0,9	0,8909	0,2
Cu (mg kg^{-1})	(I) 324,755	0,9822	0,1	0,9857	0,1
Fe (mg kg^{-1})	(II) 261,187	0,9579	11,6	0,9728	9,2
Mn (mg kg^{-1})	(II) 257,610	0,9880	2,7	0,9873	2,3
Zn (mg kg^{-1})	(I) 213,855	0,9788	0,7	0,9730	0,8
Al (mg kg^{-1})	(I) 308,216	0,9453	16,5	0,9953	4,7
Na (mg kg^{-1})	(I) 589,593	0,9642	3,7	0,9788	2,8

NOTA: r_{cal} = coeficiente de correlação da curva de calibração; *RMSEC* = raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração; *sat* = saturação do ICCD.

Não foram observadas diferenças significativas na precisão das medições feitas com LIBS em 266, 355, 532 e 1064 nm (**Tabela 3.7**). No entanto, esperava-se observar menores CVs para as determinações feitas com laser a 266 nm, pois a ablação com laser no UV geralmente resulta em crateras mais uniformes devido ao menor efeito térmico envolvido na ablação.[40]

A hipótese de que o uso de lasers no UV poderia reduzir a dependência da matriz na análise de materiais vegetais por ns-LIBS não foi confirmada, uma vez que não se observaram diferenças significativas no desempenho de ns-LIBS operando a 1064 e 266 nm na análise de amostras de folhas de cana-de-açúcar. No entanto, cabe destacar que, apesar das amostras serem provenientes de variedades distintas, elas se mostraram bastante semelhantes em termos de composição química, sendo obtidos resultados concordantes mesmo no IR. Assim, avaliou-se um conjunto de amostras com grande variabilidade matricial empregando-se um laser em regime temporal de ns (de maior energia por pulso) e de fs.

Tabela 3.7 – Intervalo dos coeficientes de variação das medições de intensidade das linhas de emissão (n = 6) feitas em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar com laser de Nd:YAG a 266, 355, 532 e 1064 nm. Dados para 200 pulsos de 50 J cm^{-2}, diâmetro de focalização de 320 µm, 2,0 µs de atraso e 5,0 µs de integração.

Linha (nm)	*1064 nm*	*532 nm*	*355 nm*	*266 nm*
Ca II 370,306	*sat*	5,2 – 19	4,9 – 16	6,3 – 16
K I 404,414	5,6 – 16	5,2 – 15	7,8 – 16	2,4 – 12
Mg I 277,669	5,6 – 17	3,9 – 12	5,9 – 15	3,3 – 21
P I 213,618	4,6 – 16	5,9 – 17	5,6 – 18	4,0 – 12
B I 249,773	3,3 – 14	5,9 – 12	6,1 – 18	6,8 – 16
Cu I 324,755	6,8 – 16	4,7 – 16	4,7 – 15	6,0 – 20
Fe I 261,187	5,2 – 24	9,0 – 17	6,3 – 21	3,9 – 14
Mn II 259,373	6,6 – 19	7,0 – 21	5,8 – 19	9,3 – 31
Zn I 213,855	4,6 – 20	5,7 – 20	6,4 – 18	7,1 – 18
Al I 308,216	*sat*	5,1 – 13	5,9 – 15	3,9 – 21
Na I 589,593	4,8 – 16	8,9 - 29	4,8 – 14	2,4 – 10

sat = saturação do ICCD.

3.5 Comparação de LIBS em regime temporal de ns e de fs para a análise de folhas de diferentes culturas

3.5.1 Definição das condições experimentais

3.5.1.1 Sistema ns-LIBS com laser de Nd:YAG *Brilliant B* operando a 266 nm

O laser *Brilliant B* empregado nesta etapa proporcionou energia máxima de 70 mJ por pulso no 4º harmônico (i.e. 266 nm), com boa estabilidade a 3,3 Hz (coeficientes de variação menores que 1,5 % pulso a pulso). A otimização dos parâmetros operacionais do sistema ns-LIBS a 266 nm foi feita de maneira univariada com pastilhas de folhas de cana-de-açúcar (95 % das partículas < 50 µm; tamanho médio = 12 µm).

Conforme ressaltado no item **3.4.1**, deve haver uma condição de compromisso entre a fluência do laser e o seu diâmetro de focalização que resulte nas maiores intensidades de emissão. Nesta etapa, o delineamento experimental foi desenvolvido de maneira univariada, fixando-se a energia por pulso em 70 mJ e variando-se a distância entre a lente de focalização do laser e a amostra (LTSD) de 75 a 65 mm com o objetivo de selecionar a condição de fluência

que resultasse no melhor acoplamento óptico entre o laser e a pastilha de tecido vegetal, isto é, selecionar a condição que resultasse nas mais altas SNRs para todos os analitos. Aplicando-se 20 pulsos de 70 mJ, observou-se que as maiores intensidades de emissão foram obtidas quando a LTSD foi fixada em 69 mm. Essa condição proporcionou um diâmetro de focalização de aproximadamente 500 µm, uma fluência de 35 J cm^{-2} e irradiância de 6 GW cm^{-2}.

Uma vez que a emissão de radiação de fundo decai a uma taxa mais rápida do que as linhas de emissão dos elementos de interesse, deve-se esperar alguns instantes após a incidência do pulso do laser para efetuar as medições de emissão óptica [157]. Assim, avaliou-se a evolução temporal do plasma realizando-se medições em diferentes tempos de atraso, de 250 a 2000 ns. Devido à natureza transiente dos plasmas induzidos por lasers pulsados, verificou-se que o espectro evoluiu rapidamente em função do tempo, provocando diminuição da emissão de radiação de fundo devido à expansão e ao resfriamento (**Figura 3.23**).[10, 23] Empregando-se 250, 500, 750, 1000 e 2000 ns de atraso, as SNRs para a linha P I 213,618 nm foram 20, 60, 55, 21 e 11, respectivamente. Embora as mais altas SNRs tenham sido observadas em 500 ns, a condição de 750 ns proporcionou melhor resolução espectral e foi selecionada para os próximos experimentos. Avaliou-se o tempo de integração das medições de 1,5 a 6,0 µs, sendo que não houve aumento nas SNR para tempos maiores que 3,0 µs. Desta forma, definiu-se 0,75 µs de atraso e 3,0 µs de integração como uma condição de compromisso entre altas SNRs, melhor resolução espectral e menor contribuição da radiação de fundo.

As imagens do plasma adquiridas entre 250 ns e 2000 ns após a incidência do pulso de laser ilustram a expansão dinâmica do plasma e o decaimento da intensidade de emissão em função do tempo (**Figura 3.24**). Nos primeiros instantes (i.e., < 500 ns) observou-se emissão de radiação muito intensa, resultante, principalmente, de reações de freamento (*bremsstrahlung*) e de recombinação, a qual se torna menos intensa com o passar do tempo após o pulso do laser. Após 1000 ns, verificou-se redução significativa na intensidade de emissão de radiação do plasma devido à diminuição da temperatura e densidade eletrônica do plasma inerentes à sua expansão, o que prejudica as medições de emissão nesses instantes. Cabe destacar que essas imagens são concordantes com os dados apresentados na **Figura 3.23**.

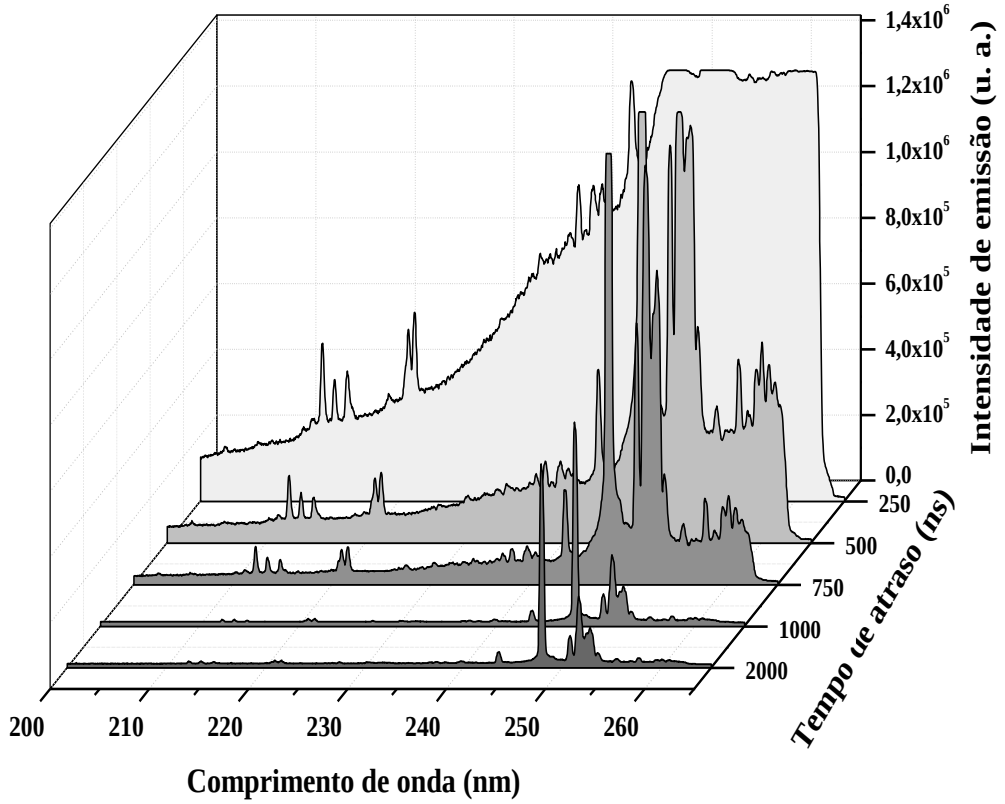


Figura 3.23 - Evolução temporal de plasmas induzidos por laser de Nd:YAG a 266 nm na superfície de pastilhas de materiais vegetais. Fragmentos dos espectros de emissão com os sinais líquidos de 200 a 265 nm adquiridos em diferentes tempos de atraso (250 a 2000 ns), durante 500 ns. Dados para 20 pulsos de 35 J cm^{-2} (6 GW cm^{-2}).

Avaliou-se também o uso de 10 a 30 de pulsos acumulados em um mesmo ponto de amostragem na superfície da pastilha. Observou-se um aumento nas SNRs para os analitos com o aumento do número de pulsos. No entanto, esta relação mostrou-se linear até 20 pulsos. Assim, a condição experimental foi definida em 20 pulsos acumulados de 70 mJ por pulso, 0,75 µs de atraso e 3,0 µs de integração. Essa condição proporcionou um diâmetro de focalização de 500 µm, 35 J cm^{-2} e 6 GW cm^{-2}. Cabe destacar que, para fins comparativos, estes mesmos parâmetros operacionais foram utilizados nos experimentos com ns-LIBS a 532 e 1064 nm. Dentre os macro- e micronutrientes, foi possível medir apenas as intensidades de Zn II 202,458, P I 213,618, Fe II 238,204, Mn II 257,610, Mg I 285,213, Ca II 315,887 e Cu I 324,755 nm, empregando-se as 2 janelas espectrais (200-265 e 280-345 nm).

Cabe informar que a determinação de boro foi prejudicada pela baixa resolução do espectrômetro usado neste experimento, uma vez que a linha de emissão mais sensível deste elemento (i.e., B I 249,773 nm) foi sobreposta pelas linhas de Fe e Si presentes nas suas vizinhanças.

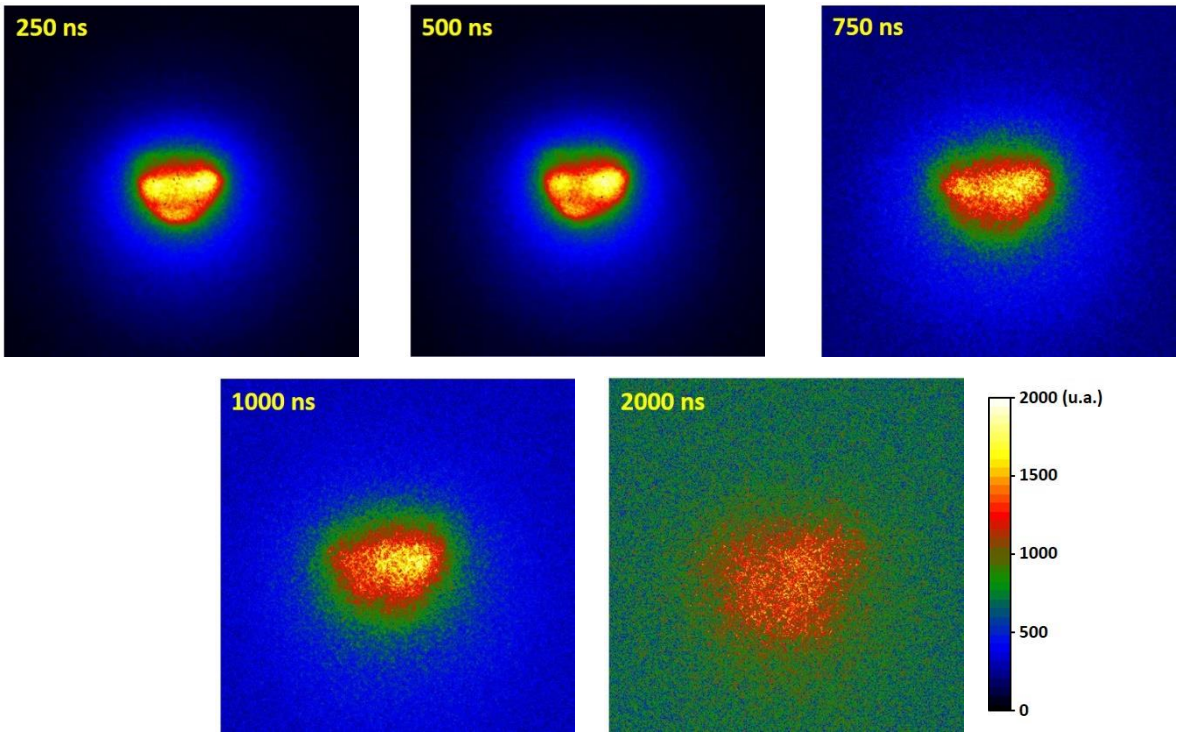


Figura 3.24 – Imagens de plasmas induzidos por laser de Nd:YAG a 266 nm em pastilha de tecido vegetal adquiridas em diferentes tempos de atraso após o pulso do laser (entre 250 e 2000 ns), integrando-se os sinais durante 15 ns.

3.5.1.2 Sistema fs-LIBS com laser de Ti:Safira

O laser de Ti:Safira empregado nesta etapa proporcionou energia máxima de 1,65 mJ por pulso a 800 nm e 4 Hz (variação pulso a pulso < 2,0 %). O delineamento experimental foi desenvolvido de maneira univariada, fixando-se a energia por pulso em 1,65 mJ e variando-se os parâmetros operacionais como a LTSD, os parâmetros temporais (tempos de atraso e de integração) e número de pulsos acumulados com o intuito de estabelecer uma condição que proporcionasse as mais altas SNRs para todos os analitos. Os experimentos foram feitos com pastilhas de folhas de cana-de-açúcar (95 % das partículas < 50 µm; tamanho médio = 12 µm).

Observou-se que maiores intensidades dos sinais de emissão e as mais altas SNRs foram alcançadas quando o ponto focal nominal da lente foi projetado 1 mm acima da superfície da pastilha, i.e., LTSD = 76 mm (**Figura 3.25**). Essa condição proporcionou um diâmetro de focalização de aproximadamente 150 µm, uma fluência de 9,5 J cm^{-2} e irradiância de 1,6 x 10^5 GW cm^{-2}.

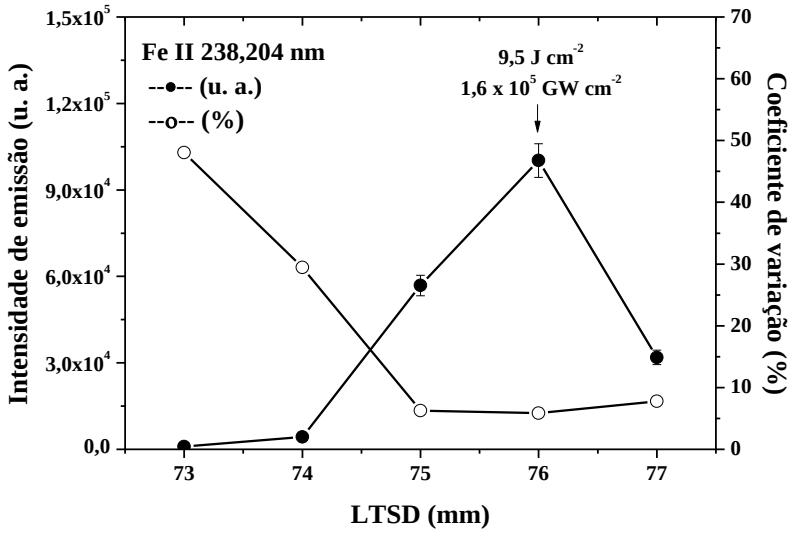


Figura 3.25 – Intensidade dos sinais de emissão de Fe II 238,204 nm e respectivos coeficientes de variação em função da distância entre a lente de focalização (*f* = 75 mm) e a amostra. Dados para 30 pulsos acumulados de 1,65 mJ, 25 ns de atraso e 1000 ns de integração.

Avaliou-se a evolução temporal de plasmas induzidos por laser em regime de fs realizando-se medições em diferentes tempos de atraso, de 15 a 65 ns. Verificou-se que o espectro evoluiu rapidamente em função do tempo devido à expansão e ao resfriamento. No entanto, cabe destacar que o comportamento observado na **Figura 3.26** difere substancialmente daquele observado em plasmas induzidos por laser em regime de ns, sendo que, no presente caso, a escala de tempo é cerca de 2 ordens de grandeza menor. Nos primeiros instantes (i.e., 15-25 ns), observou-se uma pequena contribuição da radiação de fundo, causada por reações de freamento (*bremsstrahlung*) e de recombinação de elétrons livres e íons, por exemplo.[10] Assim, as SNRs mais altas foram obtidas entre 35 e 45 ns de atraso.

Ainda, com respeito aos parâmetros temporais de medição, observou-se que não houve melhora nas SNRs empregando-se tempos de integração dos sinais maiores que 250 ns. As SNRs referentes à linha Mn II 257,610 nm foram 46, 32, 28 e 17 utilizando-se tempos de integração de 250, 500, 100 e 2000 ns, respectivamente (empregando-se 35 ns de atraso). Avaliou-se também o uso de 10 a 50 pulsos acumulados em um mesmo ponto de amostragem na superfície da pastilha. Observou-se um aumento linear nas SNRs dos analitos para até 30 espectros acumulados. Assim, a condição experimental que proporcionou a maior sensibilidade para a maioria dos analitos foi definida em 30 pulsos acumulados de 1,65 mJ pulso^{-1}, 35 ns de atraso e 250 ns de integração.

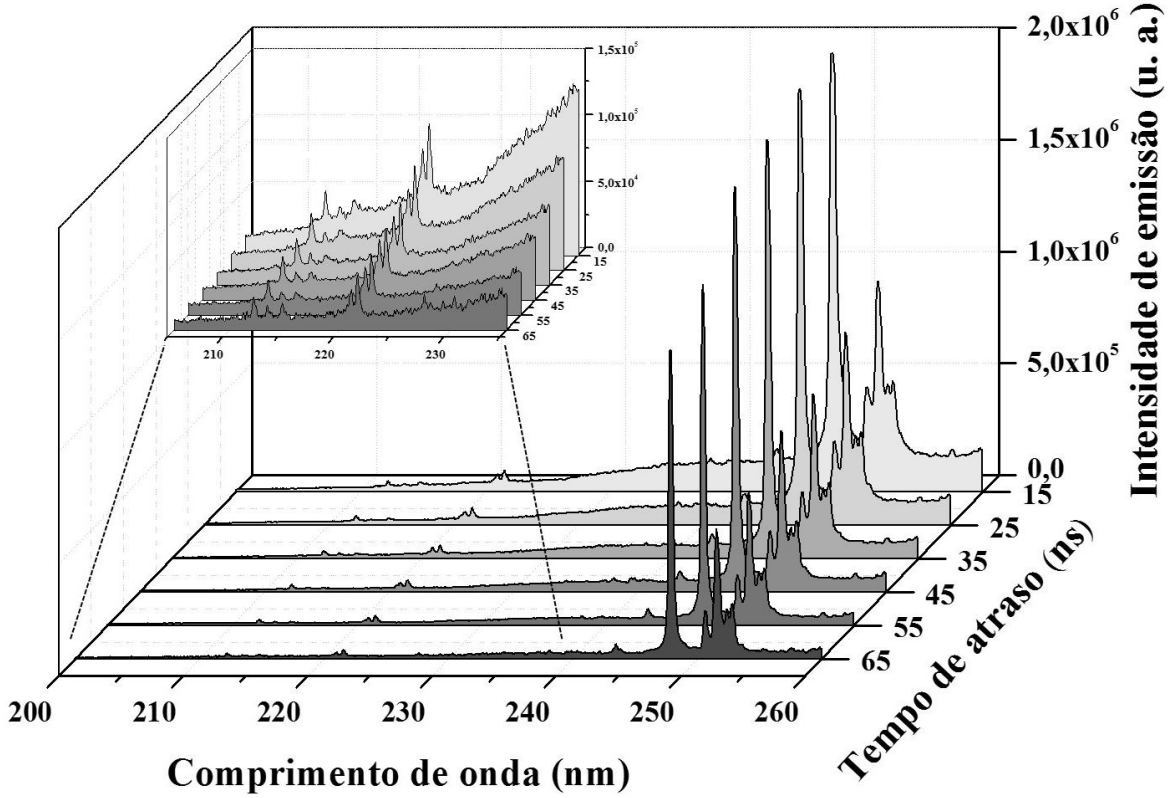


Figura 3.26 - Evolução temporal de plasmas induzidos por laser em regime temporal de femtossegundos na superfície de pastilhas de materiais vegetais. Fragmentos dos espectros de emissão com os sinais líquidos de 200 a 265 nm adquiridos em diferentes tempos de atraso (15 a 65 ns), durante 100 ns. Dados para 30 pulsos de 9,5 J cm^{-2} (1,6 x 10^5 GW cm^{-2}).

Entre os macro- e micronutrientes, foi possível determinar apenas Ca, Mg, P, Fe e Mn selecionando-se as linhas Ca II 315,887, Mg I 285,213, P I 213,618, Fe II 238,204 e Mn II 257,610 nas 2 janelas espectrais (200-265 e 280-345 nm).

Observou-se que não houve redução nos coeficientes de variação das medições de Fe, Mn e P analisando-se mais de 15 pontos na superfície da pastilha. Assim, a estratégia de amostragem foi definida na interrogação de 15 pontos independentes. Logo, 15 espectros de emissão foram coletados em cada pastilha.

Na **Figura 3.27** são mostrados os espectros de emissão de plasmas induzidos por laser em regimes temporais de fs e de ns, este último induzido por laser de Nd:YAG a 1064, 532 e 266 nm, com destaque para as principais linhas de emissão dos elementos de interesse, obtidos sob as condições definidas experimentalmente. Cabe informar que os fundos de escala das intensidades de emissão dos espectros são diferentes. Observou-se que os espectros obtidos com ns-LIBS possuem um número de linhas de emissão maior que os de fs-LIBS. Esse efeito se deve, principalmente, às temperaturas mais altas alcançadas pelos plasmas induzidos por

laser de ns, uma vez que, neste regime temporal, interação entre o laser e o plasma (via *bremsstrahlung* inverso) promove o re-aquecimento do plasma e, por conseguinte, a reexcitação das espécies.[10, 11, 48, 49] No entanto, o comprimento de onda do laser não influenciou de maneira significativa os espectros obtidos com ns-LIBS.

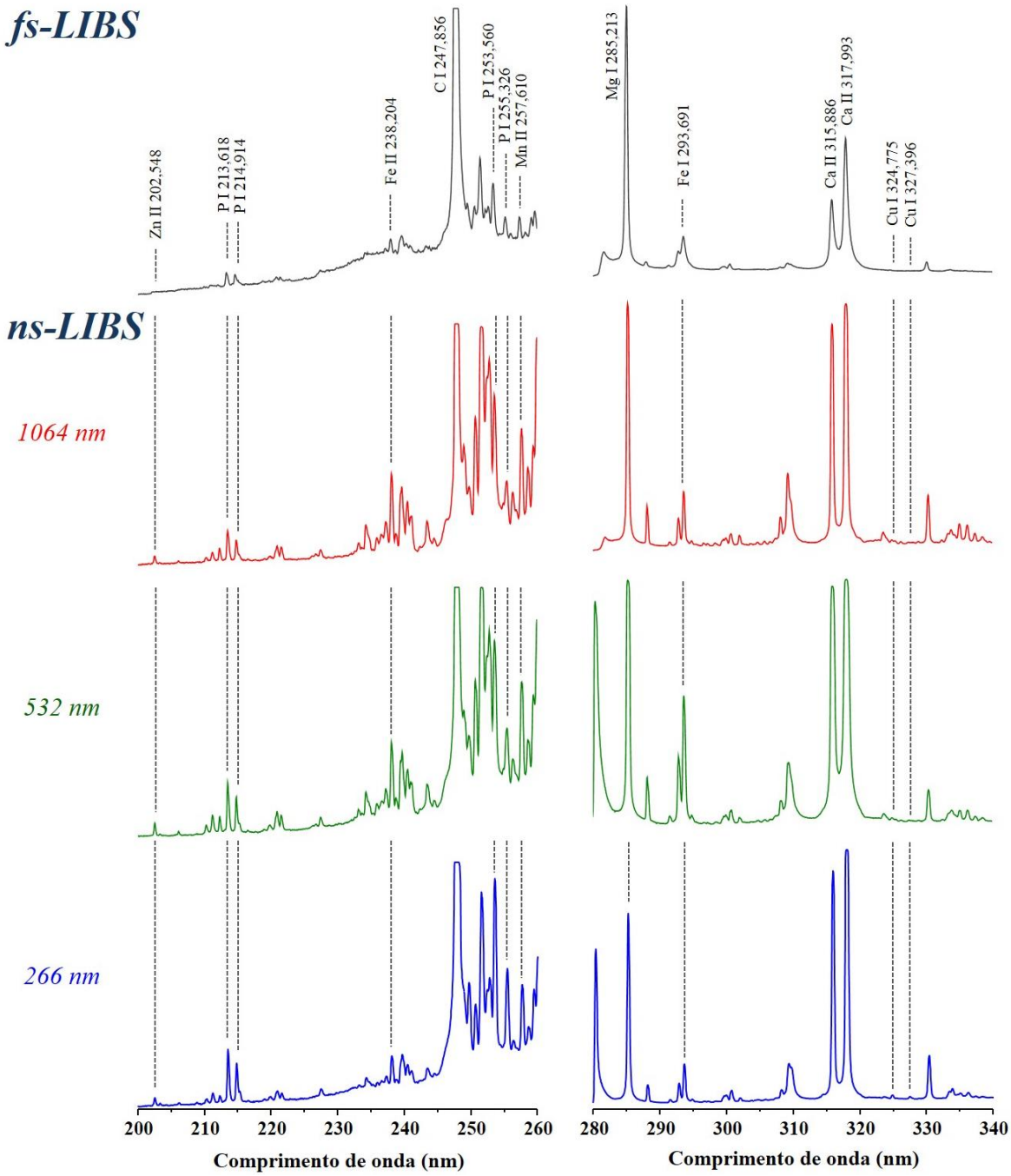


Figura 3.27 – Espectros de emissão (200-260 e 280-340 nm) de plasmas induzidos por laser em regimes temporais de femtossegundos (fs-LIBS) e de nanossegundos (ns-LIBS) a 1064, 532 e 266 nm, em pastilhas de folhas de espinafre NIST 1570a. *fs-LIBS*: Dados para 30 pulsos de 9,5 J cm^{-2} e 1,6 x 10^5 GW cm^{-2}; *ns-LIBS*: 20 pulsos de 35 J cm^{-2} e 6 GW cm^{-2}.

3.5.2 Seleção das amostras para os conjuntos de calibração e validação

Antes do desenvolvimento dos modelos de calibração, empregou-se a análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) para selecionar as amostras do conjunto de calibração que abrangessem, de maneira representativa, a variabilidade espectral do universo de amostras envolvidas no experimento. Observou-se, pela classificação dendrográfica, que as amostras foram agrupadas em 8 diferentes classes (**Figura 3.28**), adotando-se como critério o limiar de heterogeneidade pelo qual as replicatas de uma mesma amostra são mantidas dentro da mesma classe (dados não mostrados). Previsivelmente, as classes formadas estão diretamente correlacionadas com as intensidades das linhas de emissão mais sensíveis. Assim, como essa propriedade específica corresponde às espécies de interesse, os grupos formados estão inevitavelmente relacionados com a variação das frações de massa dos analitos.

O critério para a seleção das amostras do conjunto de calibração foi baseado na inclusão de, pelo menos, 1 amostra de cada grupo. Nos casos em que os grupos continham mais de 3 amostras, selecionou-se o número correspondente à raiz quadrada do número total de amostras no grupo (valor arredondado superior), sendo que as demais amostras do grupo foram incluídas no conjunto de validação. Selecionaram-se as amostras sempre de maneira aleatória.[120] No entanto, para todos os elementos, estabeleceu-se que o intervalo de fração de massa dos analitos nas amostras de validação deveria estar contido nos respectivos intervalos de fração de massa dos analitos das amostras de calibração.

Nestas condições, os modelos de calibração foram desenvolvidos com 17 amostras de calibração (3 CRMs incluídos). A capacidade e as características analíticas dos modelos de calibração foram avaliadas empregando-se um conjunto de 14 amostras de validação (2 CRMs incluídos). A **Tabela 3.8** resume as informações sobre os intervalos de fração de massa dos analitos nos conjuntos de calibração e validação, assim como os valores médios e os desvios-padrão correspondentes. Nota-se que a fração de massa média é bem semelhante nos dois conjuntos, e que as dispersões ao redor dos valores médios do conjunto de calibração são bem maiores do que a do conjunto de validação. Essas características indicam que a variabilidade composicional que será prevista nas amostras de validação está sendo modelada.

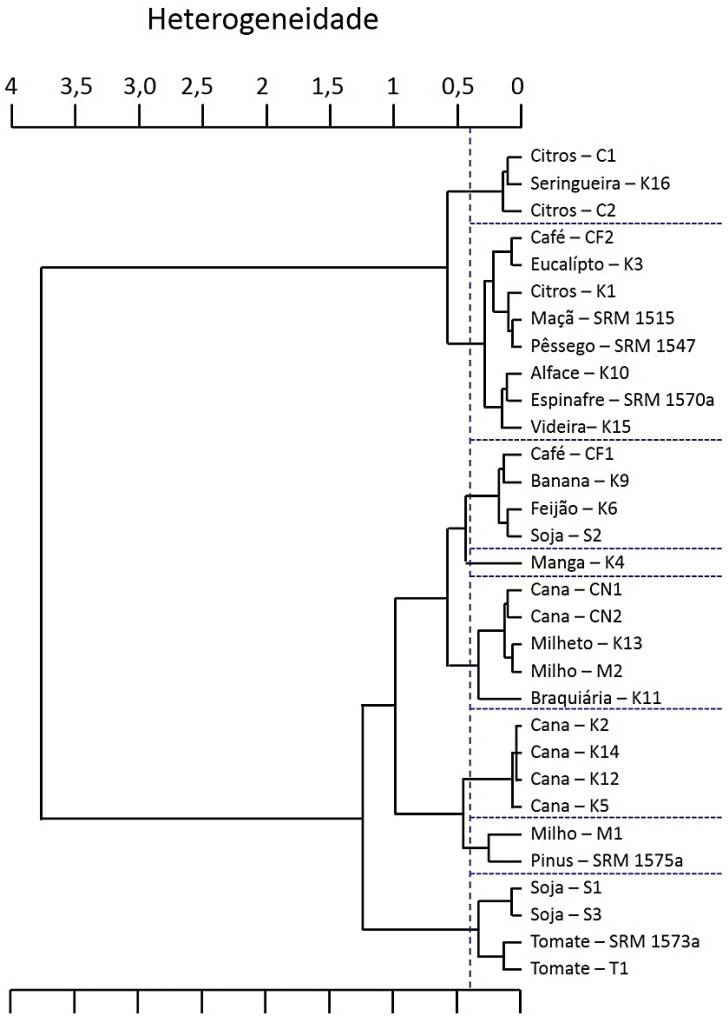


Figura 3.28 – Classificação dendrográfica das amostras de folhas provenientes de diferentes culturas obtida por análise de agrupamentos hierárquicos considerando-se as faixas espectrais 200-265 e 280-345 nm.

Tabela 3.8 – Estatística descritiva dos conjuntos de calibração e validação usados para a análise univariada e multivariada de materiais vegetais por LIBS.

Conjunto	*Plantas (folhas)*	*Intervalo de fração de massa dos analitos*						
		Ca	*Mg*	*P*	*Cu*	*Fe*	*Mn*	*Zn*
		g kg^{-1}	*g kg^{-1}*	*g kg^{-1}*	*mg kg^{-1}*	*mg kg^{-1}*	*mg kg^{-1}*	*mg kg^{-1}*
		min - max	*min - max*	*min - max*	*min - max*	*min - max*	*min - max*	*min - max*
		(m ± sd)	*(m ± sd)*	*(m ± sd)*	*(m ± sd)*	*(m ± sd)*	*(m ± sd)*	*(m ± sd)*
Calibração	Alface, café, cana-de-açúcar(2), citros, eucalipto, espinafre[a], feijão, manga, milheto, pinus[b], seringueira, soja(2), tomate[c](2), uva	2,5 – 64	1,0 – 12	0,7 – 5,2	2,8 – 16	46 – 2137[f]	13 – 1221	12 – 100
n = 17		(20 ± 17)	(4,5 ± 3,5)	(2,0 ± 1,1)	(8 ± 12)	(456 ± 488)	(216 ± 279)	(41 ± 29)
Validação	Banana, braquiária, café, cana-de-açúcar(4), citros(2), maçã[d], milho(2), pêssego[e], soja	5,2 – 40	1,3 – 7,2	0,7 – 2,8	3,7 – 16	83 – 1872[g]	21 – 377	13 – 53
n = 14		(14 ± 11)	(3,3 ± 1,6)	(1,7 ± 0,5)	(6,7 ± 2,7)	(388 ± 435)	(125 ± 104)	(23 ± 12)

[a] NIST SRM 1570a; [b] NIST SRM 1575a; [c] NIST SRM 1573a; [d] NIST SRM 1515; [e] NIST SRM 1547; [f] 46 – 1726 (intervalo para as amostras não-peneiradas); [g] 83 – 1476 (intervalo para as amostras não-peneiradas).

3.5.3 Determinação de Ca, Mg, P, Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de diferentes culturas empregando-se calibração univariada

Utilizaram-se os valores de área de pico, após a subtração dos sinais médios de emissão da radiação de fundo, para a construção dos modelos clássicos de calibração univariados com as linhas de emissão Ca II 315,887, Mg I 285,212, P I 213,618, Cu I 324,755, Fe II 238,204, Mn II 257,610, e Zn II 202,548 nm. Em ns-LIBS, as amostras de folhas de tomate (T1 e NIST 1573a) foram removidas do conjunto de calibração, pois apresentaram erros residuais de calibração que excederam 100 %. Cabe informar que os espectros das pastilhas de folhas de tomate apresentaram emissão de radiação de fundo significativamente maior que a observada para as demais amostras, provavelmente devido às altas frações de massa de Ca e Mg nessas amostras (i.e., > 50 g kg^{-1} Ca, > 12 g kg^{-1} Mg). Assim, mesmo subtraindo-se a radiação de fundo, os sinais de emissão foram sempre maiores do que o previsto pelas curvas de calibração. Em fs-LIBS, houve necessidade de remover as amostras de folhas de tomate somente para o Fe devido à dificuldade de se corrigir a radiação de fundo nas vizinhanças da linha Fe II 238,204 nm. Os parâmetros mais relevantes de calibração e validação dos modelos de regressão obtidos em fs- e ns-LIBS estão descritos na **Tabela 3.9**.

Para fs-LIBS, independentemente do método de preparo de amostras utilizado, observaram-se funções lineares entre as intensidades dos sinais de emissão e as frações de massa dos analitos, com coeficientes de correlação (r_{cal}) maiores que 0,96 para todos os elementos. Por outro lado, os modelos de calibração univariados derivados dos espectros de ns-LIBS apresentaram linearidade pouco satisfatórias para os 3 comprimentos de onda do laser de Nd:YAG avaliados, fornecendo valores de r_{cal}, na maioria das vezes, menores que 0,90. Esse comportamento indica uma baixa robustez de ns-LIBS frente às variações na composição química das amostras de calibração, mesmo analisando-se amostras com distribuição de tamanho das partículas semelhantes (i.e., peneiradas em malha com abertura de 75 µm), conforme destacado em trabalhos com LIBS em regime temporal de ns.[87, 88]

Tabela 3.9 – Características analíticas dos modelos de calibração univariada para a determinação de Ca, Mg, P, Cu, Fe, Mn e Zn em pastilhas preparadas com materiais vegetais peneirados e não-peneirados por fs- e ns-LIBS a 1064, 532 e 266 nm.

Analito	*Linha (nm)*	*PA*	*fs-LIBS*			*ns-LIBS*								
			800 nm			*1064 nm*			*532 nm*			*266 nm*		
			r_{cal}	*RMSEC*	*RMSEP*	r_{cal}	*RMSEC*	*RMSEP*	r_{cal}	*RMSEC*	*RMSEP*	r_{cal}	*RMSEC*	*RMSEP*
Ca (g kg^{-1})	II 315,887	*P*	0,9656	4,3	4,3	0,2211	25	26	0,6888	7,5	6,1	0,8408	4,8	3,6
		NP	0,9641	4,5	3,6	0,0686	16	18	0,6213	9,0	6,4	0,7686	5,5	3,6
Mg (g kg^{-1})	I 285,212	*P*	0,9764	0,7	0,5	0,8312	1,4	1,0	0,5561	3,0	1,2	0,8655	1,2	1,6
		NP	0,9670	0,9	0,7	0,7912	1,7	0,9	0,5052	3,0	0,8	0,8026	1,6	1,5
P (g kg^{-1})	I 213,618	*P*	0,9696	0,3	0,2	0,8903	0,6	0,2	0,8570	0,7	0,5	0,8204	0,8	0,5
		NP	0,9481	0,4	0,2	0,8954	0,6	0,2	0,9093	0,5	0,5	0,8645	0,7	0,5
Cu (mg kg^{-1})	I 324,755	*P*	*nd*	*nd*	*nd*	0,3354	7,5	4,0	0,3953	6,2	3,3	0,4870	5,7	3,0
		NP	*nd*	*nd*	*nd*	0,2449	10,5	5,3	0,4246	5,7	3,0	0,4998	5,5	3,3
Fe (mg kg^{-1})	II 238,204	*P*	0,9971	38	40	0,9008	117	215	0,9214	111	143	0,9603	83	119
		NP	0,9862	70	73	0,8203	159	123	0,8654	132	149	0,9328	160	130
Mn (mg kg^{-1})	II 257,610	*P*	0,9847	48	26	0,6692	88	63	0,6557	88	78	0,8919	41	50
		NP	0,9849	49	40	0,7313	74	63	0,6235	100	85	0,8844	122	59
Zn (mg kg^{-1})	II 202,548	*P*	*nd*	*nd*	*nd*	0,7212	22,7	13	0,7467	23,1	16	0,8952	12,9	18
		NP	*nd*	*nd*	*nd*	0,7956	18,0	15,1	0,7549	22,6	13,5	0,8847	13,7	10

NOTA: ***PA*** = preparo de amostra; *P* = peneirada; *NP* = não-peneirada; r_{cal} = coeficiente de correlação da curva de calibração; ***RMSEC*** = raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração; ***RMSEP*** = raiz quadrada do erro médio quadrático de validação; *nd* = não determinado.

A partir da análise das **Figuras 3.29** e **3.30** é possível comparar as frações de massa de referência de Mg e Mn determinadas por ICP OES após digestão ácida e os valores previstos por fs- e ns-LIBS nas amostras do conjunto de validação peneiradas em malha com abertura de 75 µm. Conforme demonstrado, observou-se que os modelos univariados de fs-LIBS proporcionaram previsões mais concordantes com os valores de referência (*RMSEP* = 0,5 g kg^{-1} Mg; 26 mg kg^{-1} Mn). Em contrapartida, verificou-se para ns-LIBS uma dispersão significativa dos dados para os 3 comprimentos de onda avaliados, proporcionando coeficientes de correlação linear entre os teores previstos e os de referência (r_{val}) menores que 0,90, e valores de *RMSEP* relativamente elevados (> 1,0 g kg^{-1} Mg; > 50 mg kg^{-1} Mn). Resultados semelhantes foram observados para Ca, P, Cu, Fe e Zn.

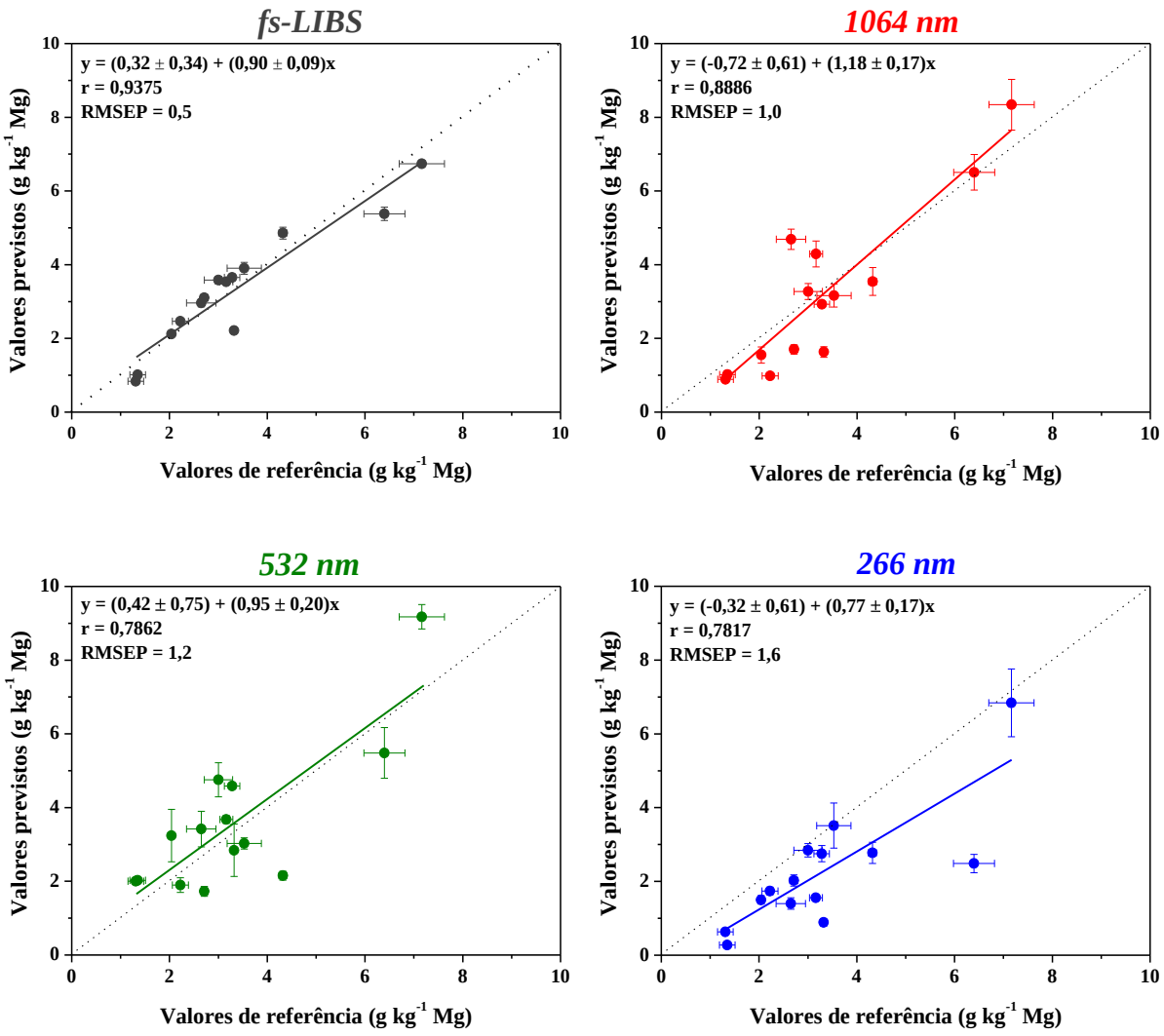


Figura 3.29 – Gráficos de regressão entre as frações de massa de referência de Mg e as previstas por fs- e ns-LIBS a 1064, 532 e 266 nm nas amostras peneiradas empregando-se modelos de calibração univariados. As barras de erros correspondem a ± 1 desvio-padrão (LIBS: n = 3 espectros médios; ICP OES: n = 3 digeridos). As linhas pontilhadas representam a correlação idealmente perfeita entre os dados de ICP OES e LIBS.

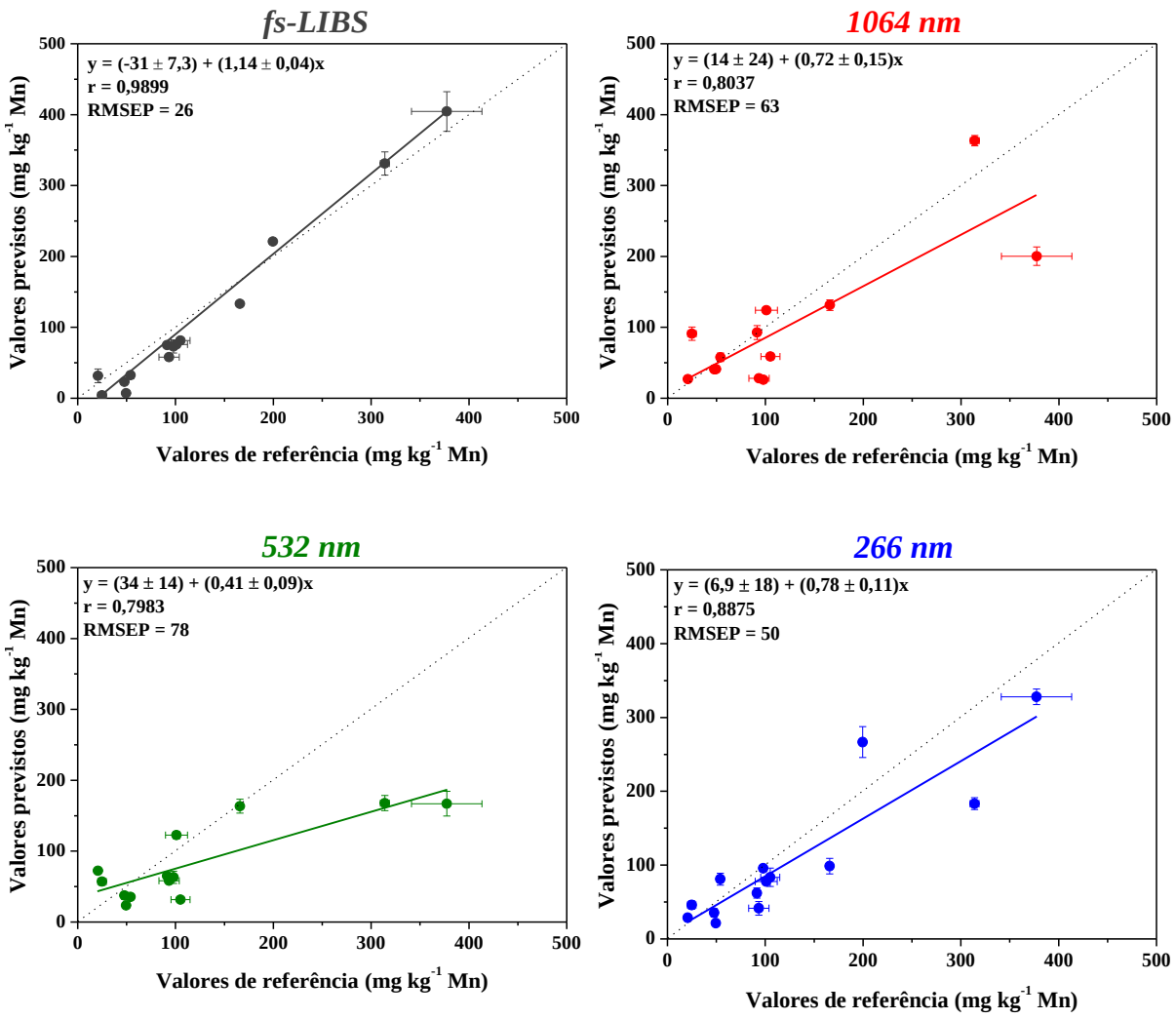


Figura 3.30 – Gráficos de regressão entre as frações de massa de referência de Mn e as previstas por fs- e ns-LIBS a 1064, 532 e 266 nm nas amostras peneiradas empregando-se modelos de calibração univariados. As barras de erros correspondem a ± 1 desvio-padrão (LIBS: n = 3 espectros médios; ICP OES: n = 3 digeridos). As linhas pontilhadas representam a correlação idealmente perfeita entre os dados de ICP OES e LIBS.

Estes resultados demonstram que o regime temporal dos pulsos de laser é uma variável decisiva para fornecer resultados mais exatos na análise de pastilhas de folhas provenientes de diferentes espécies, que apresentam diferenças substanciais em termos de composição química da matriz. Segundo a literatura, a ablação com laser em regime de fs proporciona menor dissipação de calor na superfície da amostra, o que pode resultar em menores efeitos de fracionamento elementar inerentes ao processo de ablação, principalmente no caso de materiais condutores e semicondutores.[35, 70, 71, 73] No entanto, até o momento, não existe nenhuma informação sobre a análise quantitativa de materiais vegetais por fs-LIBS. Assim, a geração de

plasmas estequiométricos, cuja composição melhor corresponde àquela da amostra teste (i.e., pastilha), deve ser a principal razão para a melhoria da exatidão das medições. Não obstante, ainda são necessárias mais investigações para confirmar esta hipótese.

Entretanto, a capacidade preditiva dos modelos univariados de fs-LIBS variou consideravelmente em função dos elementos. As incertezas nas previsões das frações de massa de Ca, Mg e P, estimadas pelos respectivos valores de *RMSEP*, variaram entre 0,2 e 4,3 g kg^{-1}, enquanto que para Fe e Mn, os valores de *RMSEP* foram 40 e 26 mg kg^{-1}, respectivamente. Além disso, considerando-se a variabilidade das frações de massa dos analitos nas amostras do conjunto de validação, essas incertezas podem ser consideradas apropriadas uma vez que os desvios residuais de previsão (*RPD*) variaram entre 2 e 9,7. Cabe informar que é desejável que os modelos de calibração proporcionem valores de $RPD \geq 2$.[158] Os valores de *RPD* mais altos foram obtidos para Fe e Mn, o que indica uma variabilidade modesta das frações de massa destes elementos. Além disso, a exatidão esperada para a previsão das frações de massa nas amostras do conjunto de validação também variou significativamente entre os elementos, com valores de coeficiente de qualidade (*QC*) entre 18 e 43 %. Neste caso, a previsão das frações de massa de Mg e P mostrou-se mais exata (i.e., valores de *QC* mais baixos).

Além disso, a hipótese de se reduzir os efeitos de matriz à medida em que o comprimento de onda do laser é diminuído, da região IR para a UV,[35, 52, 79] não foi confirmada uma vez que não houveram diferenças significativas na qualidade dos resultados obtidos por ns-LIBS operando a 1064, 532 e 266 nm. O uso do laser de Nd:YAG a 266 nm proporcionou os menores valores de *RMSEC* para Ca, Cu, Fe e Mn, enquanto que para Mg, P e Zn, os menores erros de calibração foram observados para Nd:YAG a 1064 nm (**Tabela 3.9**). No caso do Fe, por exemplo, apesar das curvas de calibração apresentarem valores de r_{cal} maiores que 0,90, os modelos apresentaram baixa capacidade preditiva quando comparado com fs-LIBS, com erros de calibração (representado pelo *RMSEC*) relativamente altos, alcançando 220 mg kg^{-1} no caso de Nd:YAG a 1064 nm (**Tabela 3.9**). Inicialmente, esperava-se obter melhores resultados na análise das pastilhas preparadas com as amostras peneiradas, as quais possuem distribuição do tamanho das partículas mais uniforme, com a maioria das partículas menores que 75 µm. No entanto, não se observou nenhuma relação entre o método de preparo das amostras e os indicadores de previsão *RMSEC* / *RMSEP*.

As dificuldades observadas na capacidade de previsão dos modelos univariados em ns-LIBS antecipam a necessidade de transformações não-lineares das intensidades das linhas

de emissão. Desse modo, espera-se que a análise multivariada dos dados possa compensar as variações oriundas de diversas fontes como, por exemplo, na interação laser-amostra, nos mecanismos de autoabsorção não lineares, e nas possíveis interferências espectrais.

3.5.4 Determinação de Ca, Mg, P, Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de diferentes culturas empregando-se calibração multivariada

Os modelos de calibração PLS foram desenvolvidos após a otimização dos intervalos espectrais, do método de pré-tratamento espectral e do número de variáveis latentes (VL) para cada um dos elementos considerados nesta tese. A **Tabela 3.10** resume as principais características dos modelos PLS desenvolvidos para a determinação de Ca, Mg, P, Cu, Fe, Mn e Zn em materiais vegetais por fs- e ns-LIBS. Cabe informar que o pré-tratamento espectral (quando usado) e a modelagem PLS conseguiu contornar as diferenças na emissão de radiação de fundo inicialmente observadas nos espectros das pastilhas de folhas de tomate, sendo possível manter estas amostras no conjunto de calibração.

Os modelos PLS foram construídos a partir da combinação de 2 a 3 intervalos espectrais, que compreendem de maneira efetiva as informações analíticas de cada elemento. Inicialmente, todos os espectros foram centrados na média e, para a maioria dos elementos, empregou-se a eliminação de deslocamento constante (*COE - constant offset elimination*) como pré-tratamento espectral.[159] Uma vez que o processo de ablação afeta de maneira significativa algumas características do espectro de emissão (*e.g.*, emissão de radiação de fundo) de acordo com as variações físico-químicas da matriz, o uso de COE sobre os intervalos espectrais permite que esses efeitos sejam minimizados. Essa estratégia permitiu uma discreta redução nos valores de *RMSEP* para Ca, P, Cu, Fe e Zn, e diminuiu, em pelo menos 1 unidade, o número de VLs necessárias para ajustar os modelos PLS. Cabe informar que o número de VLs dos modelos PLS foi determinado como o valor que apresentou os menores valores de *RMSEP* para cada elemento. Verificou-se que os modelos em fs-LIBS exigiram um número menor de variáveis latentes (i.e., cerca de 3 VLs) do que os necessários em ns-LIBS (*e.g.*, até 10 VLs). Entretanto, apesar dos modelos PLS em ns-LIBS exigirem um número maior de VLs, eles ainda mostraram-se inferiores (i.e., maiores valores de *RMSEC*) aos desenvolvidos para fs-LIBS (**Tabela 3.10**). Por outro lado, os modelos PLS proporcionaram melhorias significativas em relação aos univariados no processamento dos dados em ns-LIBS, principalmente a 1064 e 532 nm.

Tabela 3.10 – Características analíticas dos modelos PLS para a determinação de Ca, Mg, P, Cu, Fe, Mn e Zn em materiais vegetais por fs- e ns-LIBS a 1064, 532 e 266 nm.

Analito	*Intervalo espectral (nm)*	*fs-LIBS*			*ns-LIBS*								
		800 nm			*1064 nm*			*532 nm*			*266 nm*		
		VL	r_{cal}	*RMSEC*	*VL*	r_{cal}	*RMSEC*	*VL*	r_{cal}	*RMSEC*	*VL*	r_{cal}	*RMSEC*
Ca (g kg^{-1})	306,0 – 317,4* 298,2– 300,3*	4	0,9848	2,9	2	0,9636	4,4	6	0,9658	4,5	3	0,9625	4,5
Mg (g kg^{-1})	280,7 – 286,4 309,3 – 312,4	3	0,9906	0,5	2	0,9116	1,4	8	0,9961	0,4	3	0,9732	0,8
P (g kg^{-1})	223,4 – 236,0* 210,9 – 217,2*	3	0,9886	0,2	5	0,9712	0,3	10	0,9935	0,1	7	0,9940	0,1
Cu (mg kg^{-1})	324,2 – 325,4* 326,8 – 325,4*	*nd*	*nd*	*nd*	10	0,9233	1,2	2	0,4829	2,3	5	0,8337	1,5
Fe (mg kg^{-1})	230,0 – 232,7* 238,0 – 239,2* 257,8 – 260,5*	3	0,9945	72	2	0,9122	199	8	0,9958	58	4	0,9828	98
Mn (mg kg^{-1})	247,5 – 249,3 254,2 – 255,9 259,1 – 262,6	3	0,9917	41	3	0,9210	47	4	0,9810	18	4	0,9135	35
Zn (mg kg^{-1})	201,3 – 203,6* 209,0 – 214,5*	*nd*	*nd*	*nd*	2	0,8784	10,5	5	0,9635	7,7	6	0,9875	5,3

NOTA: ***VL*** = variáveis latentes; r_{cal}= coeficiente de correlação linear da curva de calibração; ***RMSEC*** = Raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração; ***** Espectro pré-processado com eliminação de deslocamento constante; *nd* = não determinado.

As principais figuras de mérito analíticas na determinação dos elementos nas amostras do conjunto de validação (peneiradas e não-peneiradas) por fs- e ns-LIBS estão descritas na **Tabela 3.11**. Com exceção do P, os modelos PLS em fs-LIBS forneceram valores de $RMSEP$ menores do que os obtidos a partir da calibração univariada, os quais variaram entre 0,2 e 3,0 g kg^{-1} para os macronutrientes, e entre 20 e 84 mg kg^{-1} para os micronutrientes. Cabe informar que essas incertezas de previsão foram apropriadas considerando-se os intervalos de fração de massa de cada analito, fornecendo índices RPD entre 1,8 e 6,6. De maneira semelhante à observada na calibração univariada, os valores de RPD mais altos foram obtidos para Fe e Mn devido à alta variabilidade nas frações de massa destes elementos nas amostras do conjunto de validação. Entretanto, a exatidão nas determinações dos elementos nas amostras analisadas foi apropriada para todos os analitos, com indicadores QC entre 11 e 22 %. Cabe informar que esses valores de QC foram apreciavelmente menores do que os obtidos na modelagem univariada, o que ressalta o aumento na qualidade dos dados empregando-se calibração multivariada. No tocante ao método de preparo das amostras, apesar da análise das pastilhas preparadas com as amostras peneiradas (em malha com abertura de 75 µm) ter proporcionado características analíticas discretamente melhores que as observadas para as não-peneiradas, a distribuição do tamanho das partículas não afetou de maneira significativa a qualidade dos dados obtidos por fs-LIBS em termos de previsão da fração de massa dos analitos (i.e., exatidão das medições). Esses resultados provavelmente se devem à produção de partículas menores pela ablação com laser em regime temporal de fs, o que, posteriormente, favorece a decomposição do aerossol no plasma induzido por laser.[71] A influência da distribuição do tamanho das partículas na precisão das medições é discutida no **item 3.5.5**.

Tabela 3.11 – Características analíticas dos modelos PLS para a determinação de Ca, Mg, P, Cu, Fe, Mn e Zn em pastilhas preparadas com materiais vegetais peneirados e não-peneirados por fs- e ns-LIBS a 1064, 532 e 266 nm.

Analito	*PA*	*fs-LIBS*				*ns-LIBS*											
		800 nm				*1064 nm*				*532 nm*				*266 nm*			
		RMSEP	r_{val}	*RPD*	*QC(%)*	*RMSEP*	r_{val}	*RPD*	*QC(%)*	*RMSEP*	r_{val}	*RPD*	*QC(%)*	*RMSEP*	r_{val}	*RPD*	*QC(%)*
Ca (g kg^{-1})	*P*	1,9	0,9818	5,9	20	5,7	0,9460	1,9	36	4,0	0,9332	2,8	44	5,1	0,9343	2,2	31
	NP	3,0	0,9787	3,6	21	6,5	0,9391	1,7	32	4,5	0,9229	2,4	43	5,8	0,9287	1,9	41
Mg (g kg^{-1})	*P*	0,3	0,9875	4,9	11	0,9	0,8738	1,9	26	0,9	0,8513	1,8	25	0,9	0,8199	1,8	22
	NP	0,4	0,9687	4,0	13	0,6	0,9432	2,6	20	0,9	0,8719	1,7	26	0,8	0,9372	2,2	20
P (g kg^{-1})	*P*	0,2	0,9318	2,1	12	0,3	0,7595	1,5	29	0,2	0,8685	2,0	13	0,2	0,9393	2,4	15
	NP	0,2	0,9343	1,8	17	0,3	0,7771	1,6	29	0,3	0,7401	1,4	18	0,3	0,8024	1,6	22
Cu (mg kg^{-1})	*P*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	2,2	0,8473	1,2	38	2,0	0,8935	1,3	38	1,8	0,9496	1,9	28
	NP	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	1,7	0,8994	2,1	25	2,1	0,9081	1,6	36	2,1	0,9284	1,6	30
Fe (mg kg^{-1})	*P*	66	0,9954	6,6	19	101	0,9815	4,3	42	104	0,9806	4,2	41	100	0,9786	4,3	32
	NP	84	0,9904	4,0	22	109	0,9622	3,1	43	119	0,9574	2,8	35	64	0,9856	5,2	22
Mn (mg kg^{-1})	*P*	20	0,9849	5,2	18	42	0,9247	2,5	59	48	0,9053	2,1	38	35	0,9684	2,9	35
	NP	21	0,9867	5,0	21	30	0,9662	3,4	48	44	0,9241	2,3	42	43	0,9690	2,4	46
Zn (mg kg^{-1})	*P*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	7,1	0,9894	0,7	40	9,5	0,8415	0,5	54	7,0	0,7701	0,7	37
	NP	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	9,8	0,7783	0,5	49	8,1	0,7741	1,4	41	9,9	0,6307	1,1	52

NOTA: ***PA*** = preparo de amostra; *P* = peneirada; *NP* = não-peneirada; ***RMSEP*** = raiz quadrada do erro médio quadrático de validação; r_{val} = coeficiente de correlação linear das amostras de validação; ***RPD*** = desvio residual de previsão; ***QC*** = coeficiente de qualidade; *nd* = não determinado.

Com relação aos dados de ns-LIBS, observou-se que os modelos PLS forneceram valores de *RMSEP* 2 vezes menores aos obtidos pela calibração univariada (principalmente para as amostras peneiradas), os quais variaram entre 0,2 e 6,5 g kg^{-1} para os macronutrientes, e entre 1,7 e 119 mg kg^{-1} para os micronutrientes. Esses dados complementam resultados anteriores [96] que não evidenciaram diferenças significativas na capacidade de previsão dos modelos univariados e multivariados (PLS) nas determinações de B, Cu, Fe, Mn e Zn em pastilhas de materiais vegetais provenientes de diferentes matrizes por ns-LIBS a 532 nm. Cabe informar que, na referida contribuição, as pastilhas foram preparadas com a adição de celulose (30 % m/m) e os sinais de emissão dos analitos foram normalizados com os da linha C I 193,090 nm. No entanto, o número limitado de amostras no conjunto de validação (n = 5) prejudicaram uma comparação adequada entre os métodos de calibração. Posteriormente, em outro trabalho, verificou-se que o uso de modelos PLS melhorou a previsão dos teores de Fe em amostras de folhas de cana-de-açúcar por ns-LIBS a 1064 nm.[95]

Além disso, com relação aos dados apresentados na **Tabela 3.11**, verificou-se que o comprimento de onda do laser de Nd:YAG em ns-LIBS não influenciou de maneira significativa os índices *RMSEP* e *RPD*. No caso das amostras peneiradas, verificou-se que a ablação no UV a 266 nm forneceu os melhores indicadores *QC* (i.e., os menores valores percentuais).

A partir da análise das **Figuras 3.31** a **3.35** é possível comparar as frações de massa de referência de Ca, Mg, P, Fe e Mn determinadas por ICP OES após digestão ácida e os valores previstos por fs- e ns-LIBS nas amostras do conjunto de validação peneiradas em malha com abertura de 75 µm. Conforme demonstrado, os modelos PLS em fs-LIBS previram com exatidão as frações de massa dos elementos, as quais apresentaram bastante concordância com os valores de referência. Por outro lado, embora os teores previstos por ns-LIBS empregando-se PLS tenham sido muito mais concordantes com os de referência do que os valores previstos pela calibração univariada, essas concordâncias ainda são apreciavelmente menores do que as alcançadas por fs-LIBS.

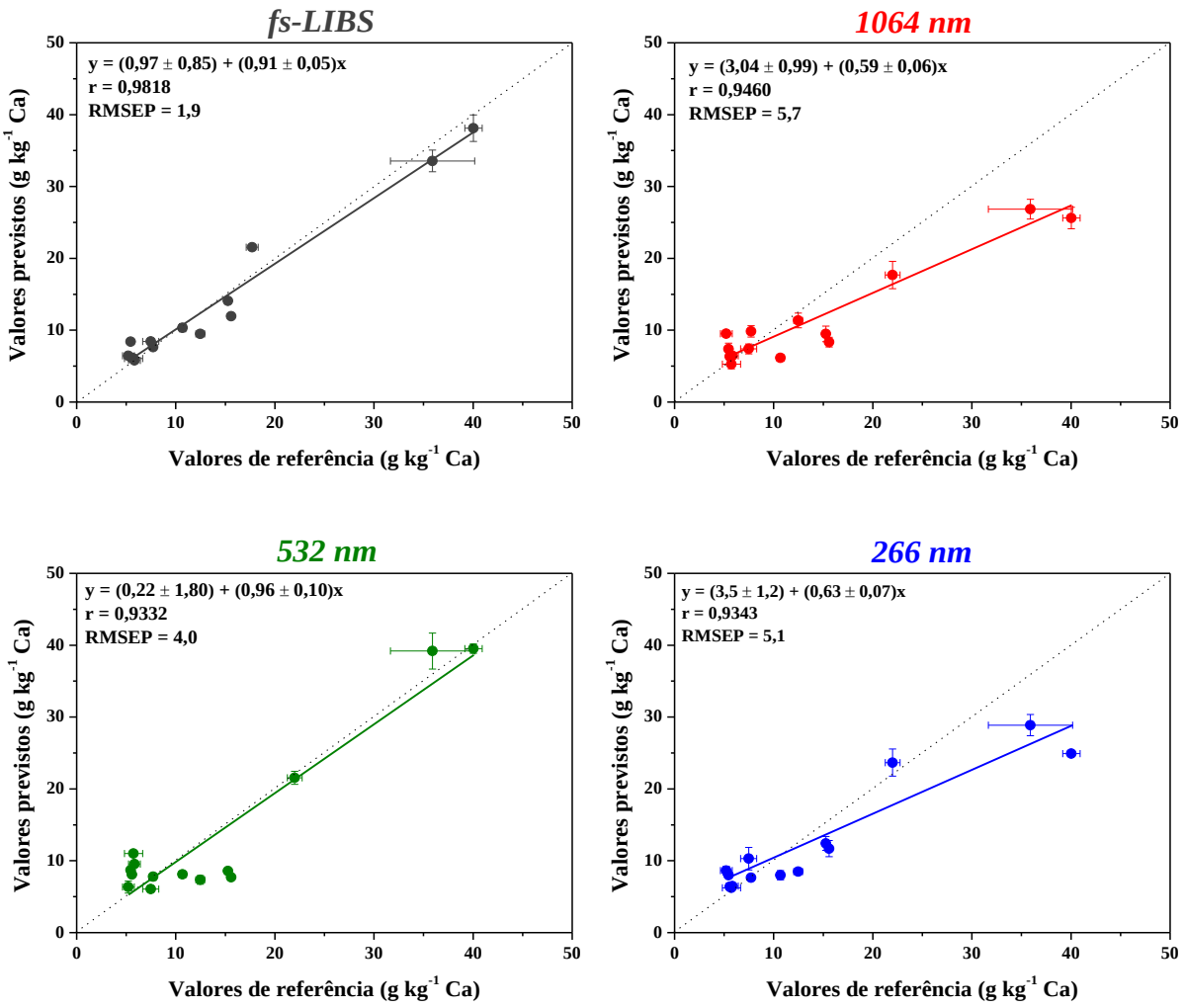


Figura 3.31 – Gráficos de regressão entre as frações de massa de referência de Ca e as previstas por fs- e ns-LIBS a 1064, 532 e 266 nm nas amostras peneiradas empregando-se modelos PLS. As barras de erros correspondem a ± 1 desvio-padrão (LIBS: n = 3 espectros médios; ICP OES: n = 3 digeridos). As linhas pontilhadas representam a correlação idealmente perfeita entre os dados de ICP OES e LIBS.

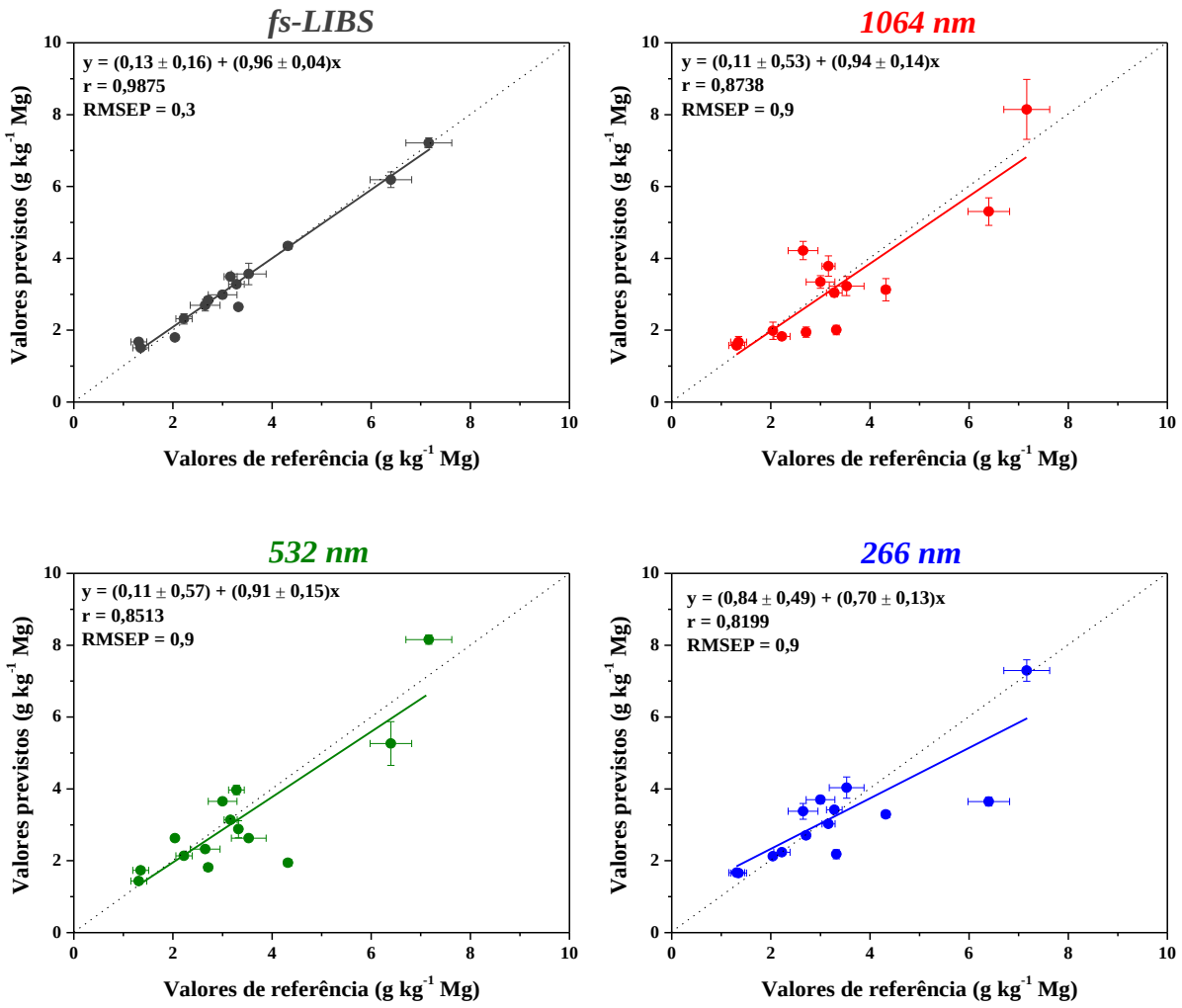


Figura 3.32 – Gráficos de regressão entre as frações de massa de referência de Mg e as previstas por fs- e ns-LIBS a 1064, 532 e 266 nm nas amostras peneiradas empregando-se modelos PLS. As barras de erros correspondem a ± 1 desvio-padrão (LIBS: n = 3 espectros médios; ICP OES: n = 3 digeridos). As linhas pontilhadas representam a correlação idealmente perfeita entre os dados de ICP OES e LIBS.

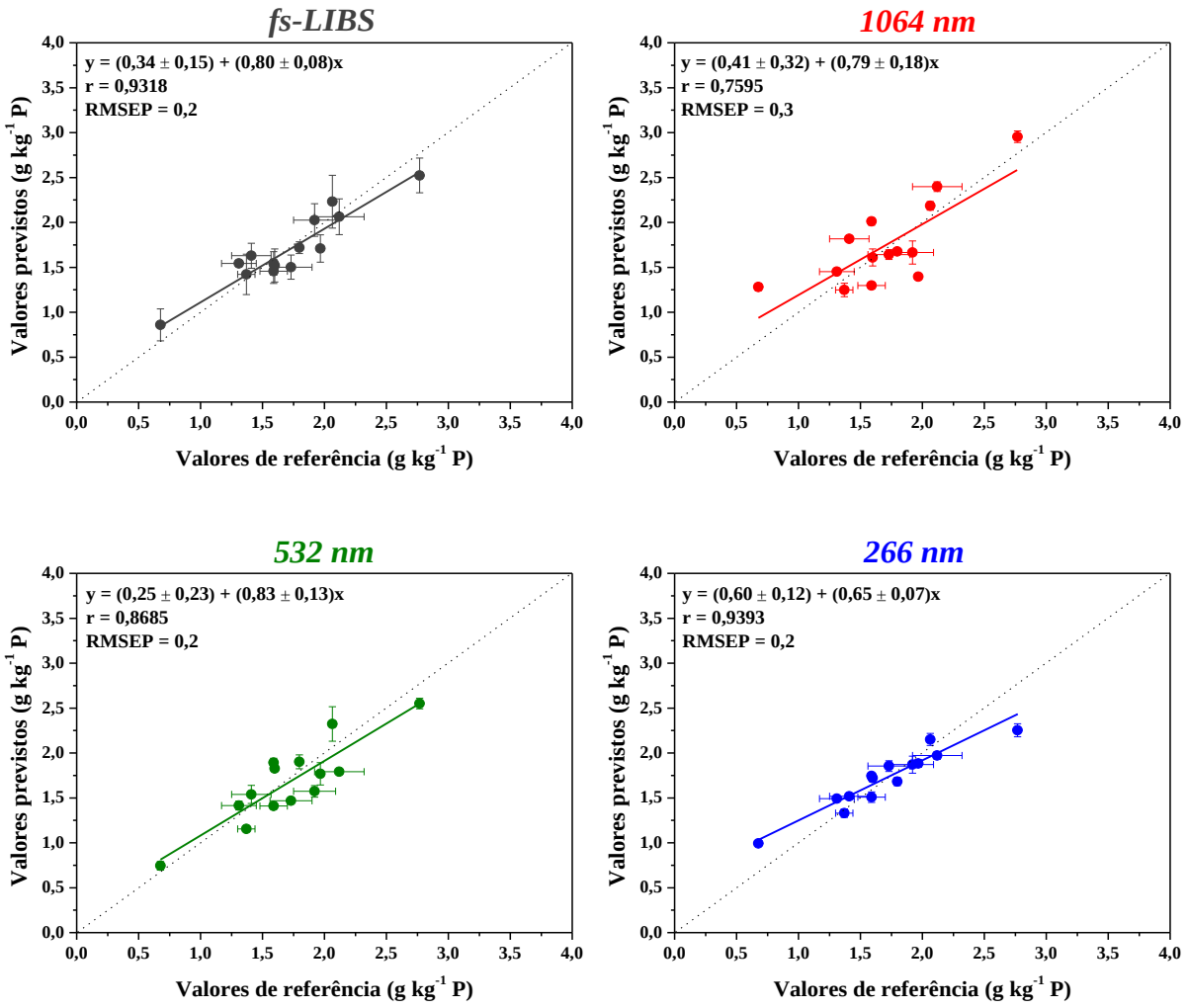


Figura 3.33 – Gráficos de regressão entre as frações de massa de referência de P e as previstas por fs- e ns-LIBS a 1064, 532 e 266 nm nas amostras peneiradas empregando-se modelos PLS. As barras de erros correspondem a ± 1 desvio-padrão (LIBS: n = 3 espectros médios; ICP OES: n = 3 digeridos). As linhas pontilhadas representam a correlação idealmente perfeita entre os dados de ICP OES e LIBS.

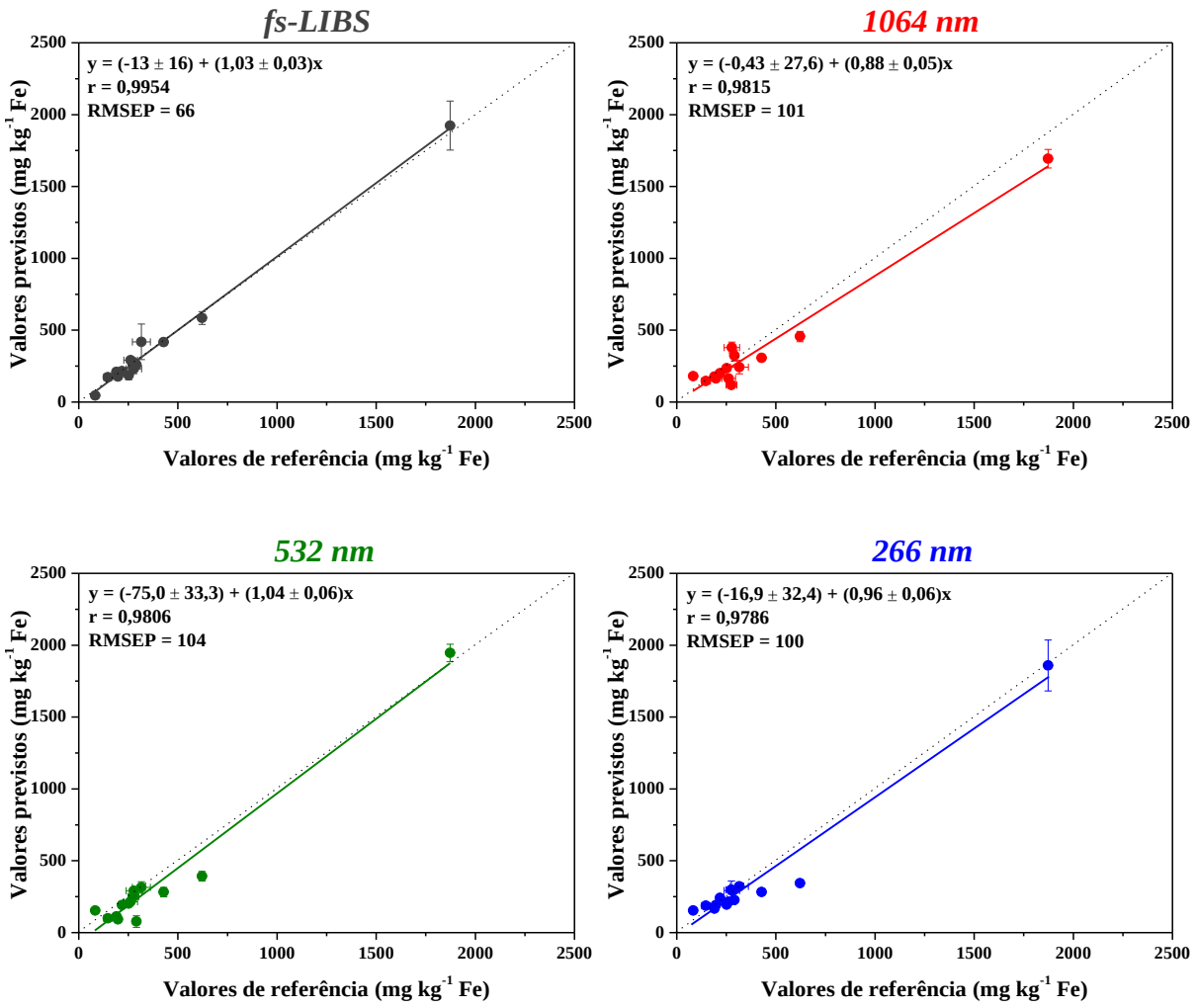


Figura 3.34 – Gráficos de regressão entre as frações de massa de referência de Fe e as previstas por fs- e ns-LIBS a 1064, 532 e 266 nm nas amostras peneiradas empregando-se modelos PLS. As barras de erros correspondem a ± 1 desvio-padrão (LIBS: n = 3 espectros médios; ICP OES: n = 3 digeridos). As linhas pontilhadas representam a correlação idealmente perfeita entre os dados de ICP OES e LIBS.

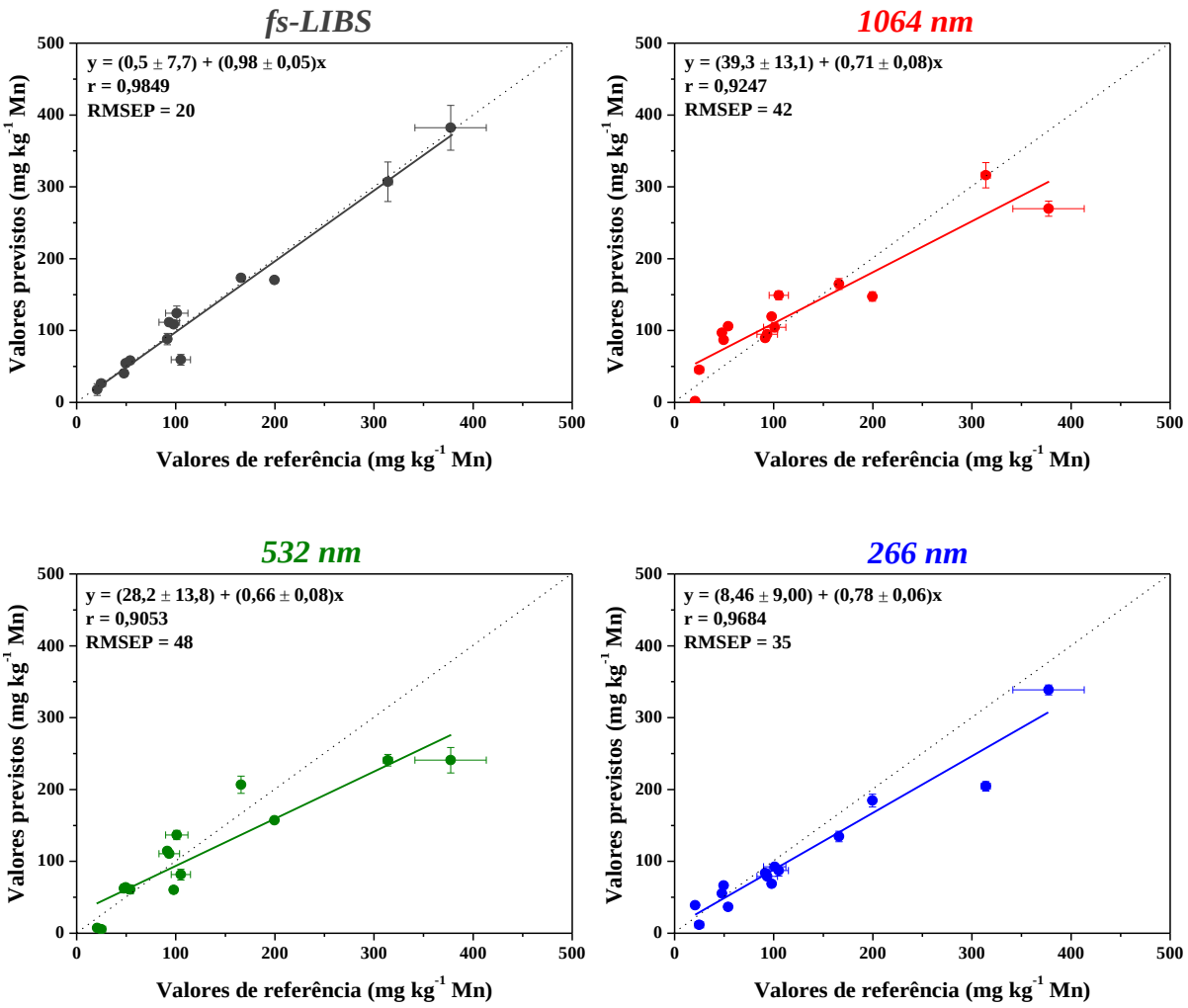


Figura 3.35 – Gráficos de regressão entre as frações de massa de referência de Mn e as previstas por fs- e ns-LIBS a 1064, 532 e 266 nm nas amostras peneiradas empregando-se modelos PLS. As barras de erros correspondem a ± 1 desvio-padrão (LIBS: n = 3 espectros médios; ICP OES: n = 3 digeridos). As linhas pontilhadas representam a correlação idealmente perfeita entre os dados de ICP OES e LIBS.

O erro médio de estimativa da propriedade de interesse, estimado pelo *RMSEP*, é referido como uma estimativa da exatidão e também é utilizado para a comparação dos resultados obtidos em diferentes condições. Entretanto, este é um parâmetro global que incorpora tanto os erros sistemáticos quanto os aleatórios.[130] Assim, os resultados obtidos por LIBS, em suas diferentes modalidades, foram comparados estatisticamente com os valores de referência empregando-se as elipses de confiança. A **Figura 3.36** apresenta as elipses de

confiança (ao nível de 99 % de confiança) referentes aos parâmetros de regressão (intercepto e inclinação) calculados para as funções lineares apresentadas nas **Figuras 3.31** a **3.35** empregando-se regressão ordinária pelos mínimos quadrados (OLS). Considerando-se os dados obtidos por fs-LIBS, observou-se que, para todos os analitos, as regiões de confiança englobaram os respectivos pontos ideais (0, 1), para intercepto e inclinação, respectivamente. Isto mostra que não existem diferenças estatísticas entre os valores de referência e os previstos por fs-LIBS empregando-se PLS, ao nível de 99 % de confiança.

Com relação ao tamanho das elipses, cabe destacar que quanto menores forem as áreas das mesmas, menores são as incertezas associadas à regressão entre os 2 conjuntos de dados. Assim, os resultados apresentados na **Figura 3.36** complementam o fato de que fs-LIBS forneceu resultados mais exatos que ns-LIBS, uma vez que, para todos os elementos, as elipses referentes a fs-LIBS foram menores que as de ns-LIBS. Apesar das elipses de confiança de Mg terem incluído os respectivos pontos ideais (0, 1) em todas as modalidades de LIBS, o que é um indicativo de que tanto a fs-LIBS quanto a ns-LIBS previram teores de Mg estatisticamente concordantes com os valores de referência, cabe observar que as elipses de ns-LIBS apresentaram incertezas relativamente elevadas (i.e., elipses muito maiores), o que reflete as dispersões relevantes apresentadas na **Figura 3.32**.

No caso de Mn, por exemplo, apesar da elipse referente à ns-LIBS a 266 nm não incluir o ponto ideal, ela está mais próxima ao ponto (0, 1) do que as elipses correspondentes à 1064 e 532 nm. Se amostras de validação que apresentaram erros residuais relativamente altos (sendo 1 para 1064 nm; 2 para 532 nm; e 1 para 266 nm) não fossem consideradas, os valores de *RMSEP* para Mn iriam diminuir de 42 para 31 mg kg^{-1} (1064 nm), de 48 para 27 mg kg^{-1} (532 nm), e de 35 para 21 mg kg^{-1} (266 nm). Nesses casos, as regiões das elipses de confiança iriam incluir o ponto ideal (0, 1) e as frações de massa previstas por ns-LIBS seriam estatisticamente iguais às de referência.

No caso do Fe, apesar da região elíptica referente à ns-LIBS a 1064 nm ter margeado o ponto ideal (0, 1), pode-se inferir que os métodos de LIBS produziram resultados muito próximos dos de referência. Para P, com exceção de ns-LIBS a 266 nm, os métodos foram concordantes apesar das incertezas relativamente grandes observadas para ns-LIBS a 1064 e 266 nm. Os maiores desvios foram observados para Ca.

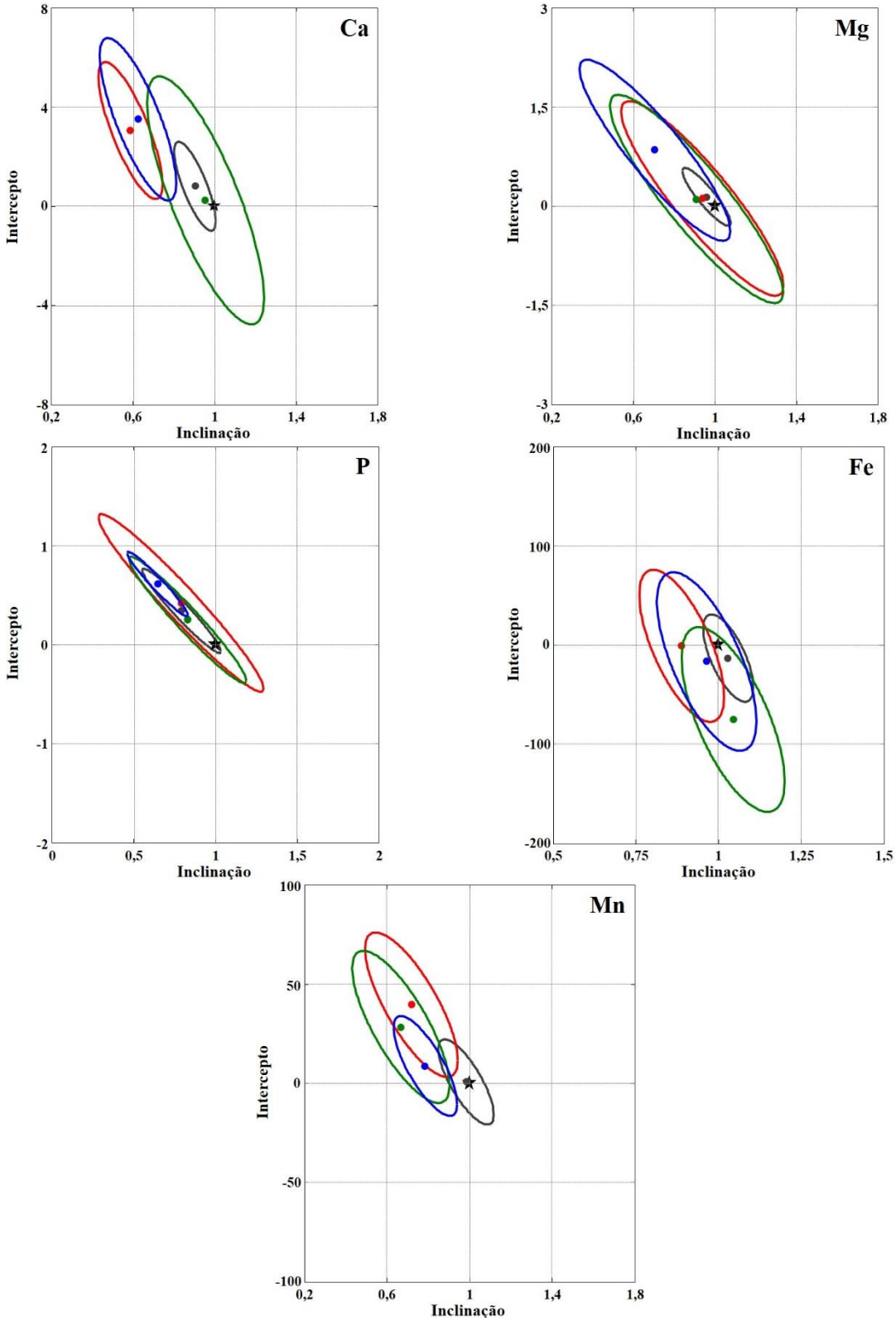


Figura 3.36 – Região da elipse de confiança para o intercepto e a inclinação da regressão entre as frações de massa de referência de Ca, Mg, P, Fe e Mn, e as previstas por fs- e ns-LIBS empregando-se modelos PLS nas amostras peneiradas. Legenda: ★ = ponto onde o intercepto é igual a 0 e a inclinação igual a 1; dados para ● fs-LIBS a 800 nm, e ns-LIBS a ● 1064 nm, ● 532 nm e ● 266 nm.

Considerando-se os resultados apresentados na **Tabela 3.11**, os valores de r_{val} entre os valores previstos por fs-LIBS nas amostras do conjunto de validação e os de referência variaram entre 0,9318 e 0,9954 em fs-LIBS. Por outro lado, os valores de r_{val} em ns-LIBS variaram entre 0,7595 e 0,9894.

Por outro lado, comparando-se estatisticamente os parâmetros de regressão (intercepto e inclinação) calculados para as funções lineares entre as frações de massa previstas pelos modelos PLS nas amostras não peneiradas e os valores de referência (gráficos não mostrados), empregando-se regressão ordinária pelos mínimos quadrados (OLS), observou-se que a diferença nas distribuições do tamanho das partículas foi relevante na determinação dos macronutrientes Ca, Mg e P por fs-LIBS (**Figura 3.37**). Nos casos de Ca e Mg, as respectivas elipses de confiança margearam o ponto ideal (0, 1), podendo-se inferir que fs-LIBS forneceu resultados muito próximos dos de referência para esses 2 elementos. No entanto, observou-se uma discrepância mais evidente no caso do P. O diâmetro de focalização do laser relativamente pequeno (i.e., 150 µm) empregado em fs-LIBS pode ter contribuído para as diferenças observadas para os macronutrientes em função da distribuição do tamanho das partículas das amostras não-peneiradas. Por outro lado, o preparo da amostra não afetou as previsões de Fe e Mn por fs-LIBS uma vez que as respectivas elipses de confiança englobaram o ponto ideal (0, 1). Não foram observadas diferenças significativas nas elipses de confiança referente aos dados previstos por ns-LIBS em função do preparo da amostra.

Em termos gerais, as características analíticas apresentadas neste tópico demonstram que fs-LIBS é a estratégia mais robusta para prever as frações de massa dos elementos, dentro dos intervalos modelados, em pastilhas de folhas provenientes de diferentes espécies.

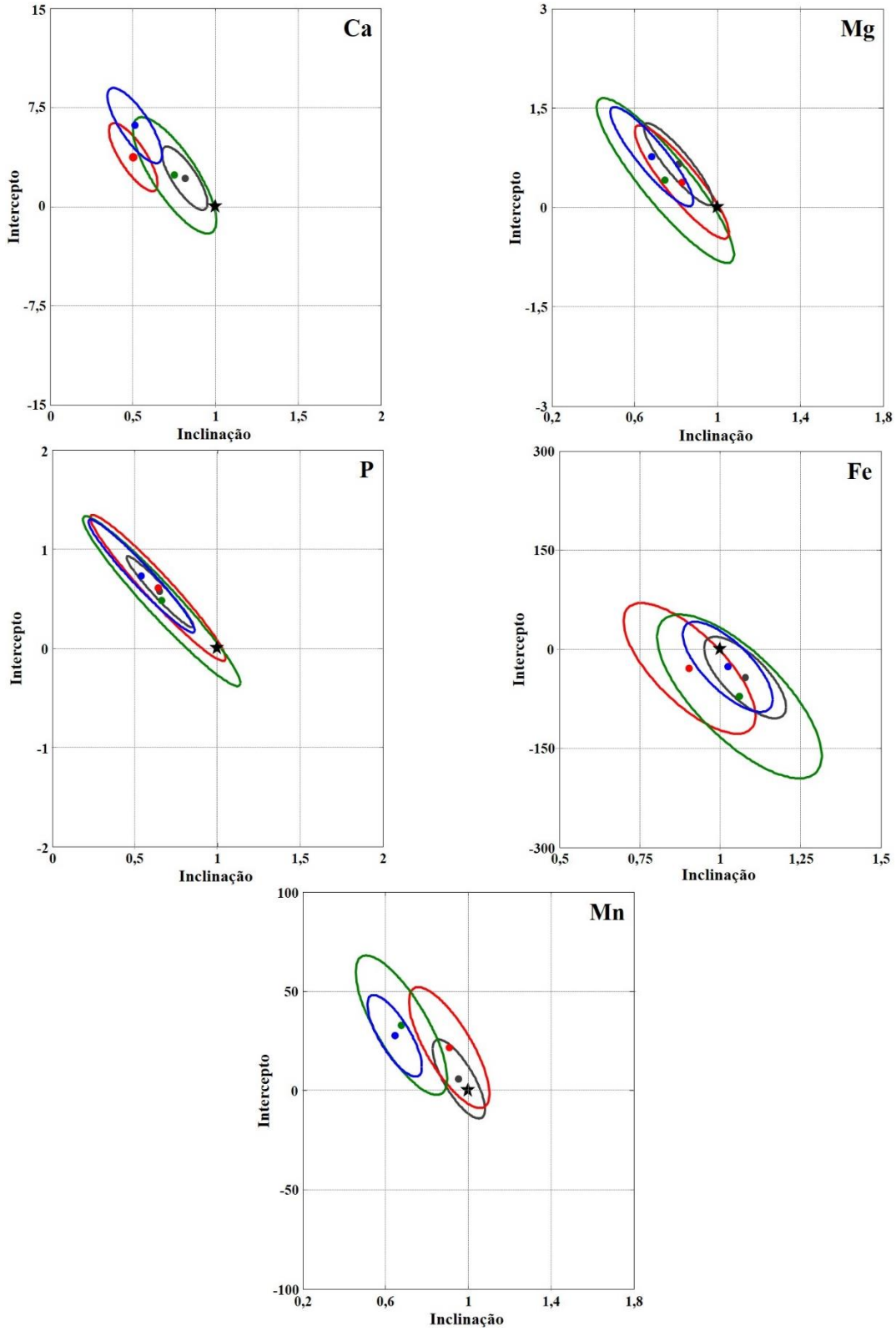


Figura 3.37 – Região da elipse de confiança para o intercepto e a inclinação da regressão entre as frações de massa de referência de Ca, Mg, P, Fe e Mn, e as previstas por fs- e ns-LIBS empregando-se modelos PLS nas amostras não-peneiradas. Legenda: ★ = ponto onde o intercepto é igual a 0 e a inclinação igual a 1; dados para ● fs-LIBS a 800 nm, e ns-LIBS a ● 1064 nm, ● 532 nm e ● 266 nm.

3.5.5 Precisão das medições e limites de detecção

A **Tabela 3.12** apresenta os valores dos desvios padrão combinados das triplicatas do conjunto de validação (s_{trip}), bem como a variação dos coeficientes de variação (CV), das frações de massa de Ca, Mg, P, Cu, Fe, Mn e Zn determinadas por fs- e ns-LIBS a partir da modelagem PLS. Observou-se que valores equivalentes de s_{trip} e CV foram obtidos tanto por fs-LIBS quanto por ns-LIBS, apesar das crateras produzidas por ablação com pulsos em regime temporal de fs ser significativamente menor (diâmetro: 210 ± 10 µm) do que as produzidas em regime temporal de ns (1064 nm: 730 ± 14 µm; 532 nm: 688 ± 5 µm; 266 nm: 380 ± 12 µm).

Tabela 3.12 – Parâmetros estatísticos referentes à precisão das medições feitas por fs- e ns-LIBS a 1064, 532 e 266 nm nas pastilhas das amostras do conjunto de validação empregando-se modelos PLS.

Analito	*PA*	*fs-LIBS*		*ns-LIBS*					
		800 nm		*1064 nm*		*532 nm*		*266 nm*	
		s_{trip}	*CV (%)*	s_{trip}	*CV (%)*	s_{trip}	*CV (%)*	s_{trip}	*CV (%)*
Ca	*P*	0,16	0,2 – 5,5	0,26	3,2 – 12	0,22	0,8 – 13	0,24	1,3 – 15
	NP	0,42	1,1 – 28	0,29	2,6 – 11	0,23	2,1 – 11	0,23	0,3 – 12
Mg	*P*	0,04	0,5 – 8,4	0,08	3,7 – 12	0,05	1,1 – 11	0,04	0,7 – 7,3
	NP	0,08	0,2 – 9,2	0,06	3,4 – 11	0,07	1,3 – 14	0,05	1,0 – 9,0
P	*P*	0,05	2,3 – 21	0,02	1,3 – 7,7	0,02	0,9 – 8,3	0,01	1,1 – 5,1
	NP	0,05	5,1 – 19	0,02	0,8 – 11	0,02	0,7 – 12	0,02	0,1 – 9,6
Cu	*P*	*nd*	6,7 [a]	0,32	3,9 – 33	0,13	1,2 – 9,7	0,14	1,6 – 11
	NP	*nd*	15,2 [a]	0,20	1,3 – 14	0,27	3,3 – 19	0,08	0,7 – 7,9
Fe	*P*	16	5,7 – 38	7,8	1,1 – 19	7,8	3,1 – 15	14	0,5 – 20
	NP	18	7,3 – 65	8,4	0,9 – 54	3,8	0,8 – 7,9	6,3	1,8 – 20
Mn	*P*	3,4	1,0 – 13	1,8	1,5 – 23	2,0	2,0 – 24	1,3	1,1 – 32
	NP	4,0	1,1 – 24	3,0	1,2 – 29	2,2	2,2 – 65	2,1	0,1 – 11
Zn	*P*	*nd*	17 [b]	0,3	1,1 – 6,3	1,1	3,8 – 33	1,1	6,4 – 34
	NP	*nd*	23 [b]	0,4	2,6 - 27	0,8	3,0 – 34	0,8	2,1 – 53

NOTA: ***PA*** = preparo de amostra; *P* = peneirada; *NP* = não-peneirada; s_{trip} = desvio padrão combinado das triplicatas do conjunto de validação; ***CV*** = coeficientes de variação (min - máx); *nd* = não determinado. [a] Estimado com pastilha de folhas de uva contendo 112 ± 17 mg kg^{-1} Cu; [b] Estimado com pastilha de folhas de soja contendo 97 ± 1 mg kg^{-1} Zn.

As microscopias eletrônicas de varredura das crateras produzidas por ablação a laser em regimes temporais de fs e de ns confirmam que o tamanho das crateras aumentou não só com o

aumento da duração dos pulsos, mas também, contrariamente ao esperado, em função do comprimento de onda (**Figura 3.38**). Observou-se maiores taxas de ablação à medida em que o comprimento de onda do laser foi alterado para a região IR. Segundo a literatura, quanto menor o comprimento de onda do laser, maior é a taxa de ablação, ou seja, maior é a massa removida por pulso de laser.[35, 41, 52] Este efeito já foi amplamente demonstrado na análise de amostras de metais e de ligas metálicas,[41, 62, 160, 161] e também é válido para amostras vítreas. Neste caso, o comprimento de onda do laser afeta de maneira substancial a taxa de ablação, pois os vidros são transparentes à radiação IR.[52, 79] Nesta tese, a menor taxa de ablação foi observada para os pulsos no UV.

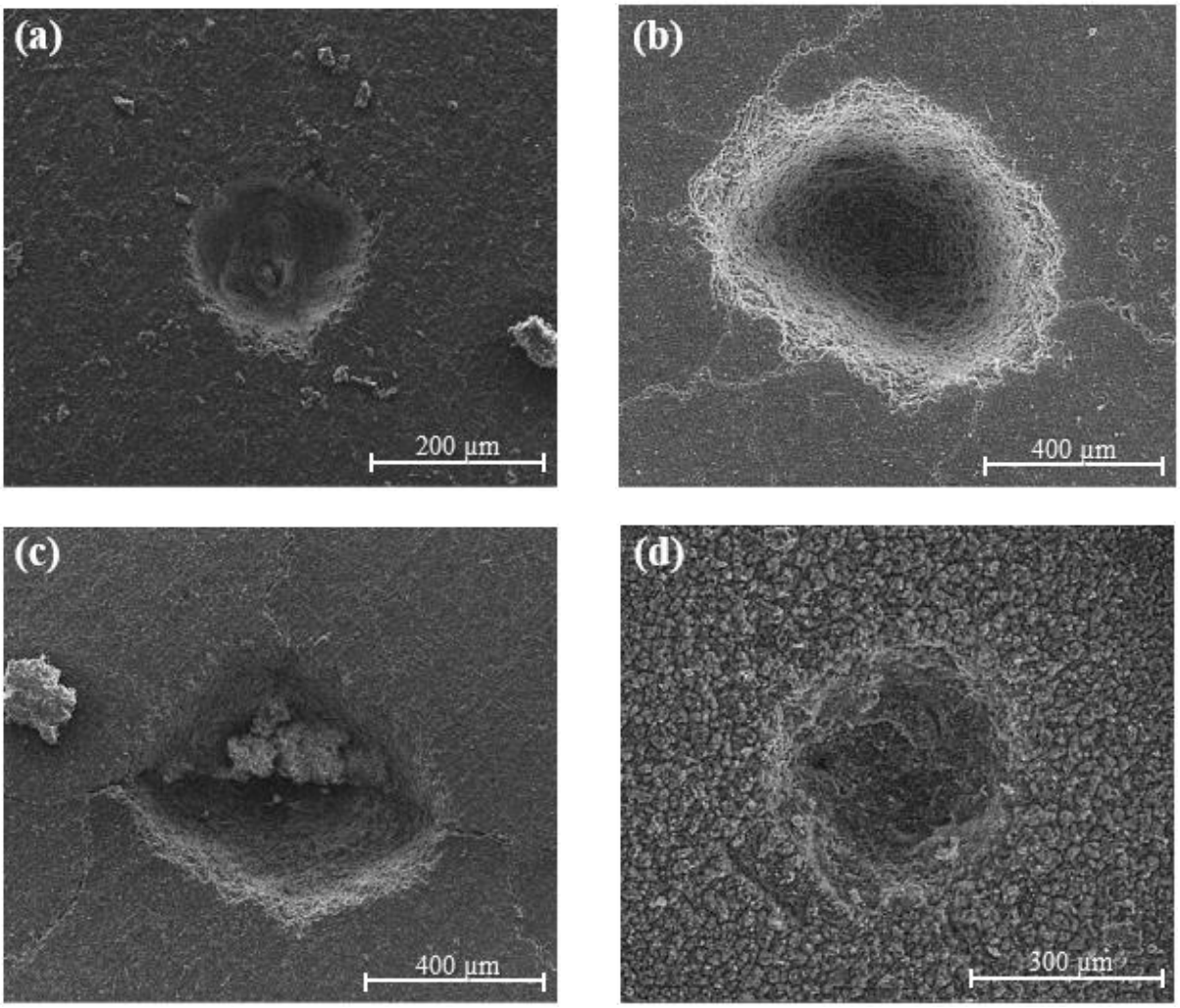


Figura 3.38 - Microscopia eletrônica de varredura das crateras formadas por ablação a laser em regime temporal de (a) femto- e de (b) nanossegundos a 1064, (c) 532 e (d) 266 nm na superfície de pastilhas de folhas de espinafre NIST 1570a. Condições experimentais: fs-LIBS: 30 pulsos com 9,5 J cm^{-2} / 1,6 x 10^5 GW cm^{-2}. ns-LIBS: 20 pulsos com 35 J cm^{-2} / 6 GW cm^{-2}.

De qualquer maneira, espera-se que a ablação de uma massa maior deva melhorar a representatividade das porções amostradas.[108, 132] No entanto, não foram observadas correlações entre a precisão das medições (valores de s_{trip} e CV) e a massa removida. No tocante ao método de preparo de amostra e, por conseguinte, a distribuição do tamanho das partículas, verificou-se um aumento na precisão das medições (i.e., valores menores de s_{trip}) feitas por fs-LIBS nas pastilhas preparadas com as amostras peneiradas. Neste caso, o diâmetro de focalização do laser relativamente pequeno (i.e., 150 µm) mostrou-se mais vulnerável à distribuição do tamanho das partículas das amostras não-peneiradas. Cabe informar que muitas destas amostras contêm partículas maiores que 150 µm e, consequentemente, são heterogêneas nesta ordem de grandeza, o que resultou em valores de s_{trip} maiores. Por outro lado, esse efeito não se tornou evidente quando se utilizou um diâmetro de focalização do laser apreciavelmente maior de 500 µm (que proporciona um aumento na área irradiada de cerca de 11 vezes). Assim, não foram verificadas diferenças significativas na precisão das medições feitas por ns-LIBS nas pastilhas preparadas com amostras peneiradas e não-peneiradas.

Em termos gerais, a ns-LIBS forneceu *LODs* mais baixos que a fs-LIBS (**Tabela 3.13**). Cabe informar que estes valores foram estimados a partir de curvas de calibração univariadas e, segundo a literatura,[96] não diferem significativamente dos estimados pela calibração multivariada. Embora os espectros de fs-LIBS sejam caracterizados pela baixa emissão de radiação de fundo, os de ns-LIBS apresentaram linhas de emissão muito mais intensas devido, principalmente, à reexcitação das espécies provocada pelos processos de interação entre o laser e o plasma. No entanto, é importante destacar que tanto fs-LIBS como ns-LIBS proporcionaram *LODs* apropriados para a determinação de Ca, Mg, P, Fe e Mn considerando-se os intervalos de fração de massa destes nutrientes comumente encontrados em amostras de interesse agronômico.[1, 162] Além disso, estes valores estão bem abaixo das frações de massa mínimas encontradas nas amostras selecionadas para calibração (**Tabela 3.8**). Nos casos de Cu e Zn, somente a ns-LIBS forneceu *LODs* apropriados para esses elementos tendo em vista as frações de massa diminutas desses micronutrientes nas amostras consideradas. Por outro lado, os *LODs* relativamente altos de 7 mg kg^{-1} Cu e 80 mg kg^{-1} Zn prejudicaram a determinação destes analitos por fs-LIBS. Cabe informar que esses valores foram estimados com amostras contendo altos teores de cobre (folhas de uva: 112 ± 17 mg kg^{-1} Cu) e de zinco (folhas de soja: 97 ± 1 mg kg^{-1} Zn).

Os resultados apresentados neste tópico foram publicados no periódico *Analytica Chimica Acta* (**Anexo C**).

Tabela 3.13 – Limites de detecção (3,3 σ) em fs- e ns-LIBS.

Analito	*Linha (nm)*	*fs-LIBS*	*ns-LIBS*		
		800 nm	*1064 nm*	*532 nm*	*266 nm*
Ca (g kg^{-1})	II 315,887	0,007	0,01	0,007	0,005
Mg (g kg^{-1})	I 285,213	0,02	0,01	0,04	0,05
P (g kg^{-1})	I 213,618	0,4	0,1	0,1	0,1
Cu (mg kg^{-1})	I 324,755	7 [a]	1	3	3
Fe (mg kg^{-1})	II 238,204	12	3	5	8
Mn (mg kg^{-1})	II 257,610	2	1	1	1
Zn (mg kg^{-1})	II 202,458	80 [b]	14	4	12

[a] Estimado com pastilha de folhas de uva contendo 112 ± 17 mg kg^{-1} Cu; [b] Estimado com pastilha de folhas de soja contendo 97 ± 1 mg kg^{-1} Zn.

4 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nesta tese destacam alguns aspectos instrumentais e matriciais que podem afetar a determinação quantitativa de macro- e micronutrientes em pastilhas de material foliar por LIBS.

A distribuição do tamanho das partículas para o preparo das pastilhas é um parâmetro intrínseco que afeta tanto a sensibilidade quanto a precisão das medições em LIBS. Demonstrou-se que o preparo das amostras-teste com distribuição do tamanho de partículas unimodal e menores que 100 µm, é fundamental para a obtenção de pastilhas com resistência mecânica apropriada, para a diminuição dos efeitos de matriz, e para proporcionar coeficientes de variação das medições geralmente menores que 10 %. No entanto, os aumentos na intensidade dos sinais de emissão em função da diminuição do tamanho das partículas são dependentes da fluência do laser, sendo que, em ns-LIBS a 1064 nm, o uso de fluências mais altas, como por exemplo 50 J cm^{-2}, tornou o sistema mais robusto com referência à distribuição do tamanho de partículas recomendada. Observou-se, também, que o uso de fluência apropriada é fundamental para proporcionar resultados mais exatos na análise de pastilhas preparadas com folhas de cana-de-açúcar por ns-LIBS a 1064 nm. Neste caso, para a maioria dos elementos, houve um aumento na correlação entre a intensidade dos sinais de emissão dos analitos e a suas respectivas frações de massa empregando-se 50 J cm^{-2} (220 mJ por pulso, diâmetro de focalização de 750 µm).

Verificou-se que o comprimento de onda do laser de Nd:YAG não afetou a análise das pastilhas das amostras de cana-de-açúcar por ns-LIBS. Funções lineares entre as intensidades dos sinais de emissão e as frações de massa de Ca, K, Mg, P, B, Cu, Fe, Mn, Zn, Al e Na foram obtidas na análise de pastilhas de folhas de cana-de-açúcar, provenientes de 14 variedades, por ns-LIBS operando a 1064, 532, 355 e 266 nm. Neste caso, os parâmetros analíticos de desempenho (*e.g.*, *RMSEC*, r_{cal}, *CV* das medições) mostraram-se bastante semelhantes para os 4 comprimentos de onda avaliados. Pode-se concluir que a composição química das amostras é uma variável mais relevante do que o comprimento de onda em ns-LIBS, pois resultados mais dispersos (i.e., maiores erros de previsão) foram obtidos na análise de um conjunto de amostras mais heterogêneo, constituído por pastilhas preparadas com folhas provenientes de diferentes matrizes, como soja, milho, cana-de-açúcar, citros, café, por exemplo, independentemente do comprimento de onda e da distribuição do tamanho das partículas das amostras.

Tratando-se de um universo de matrizes heterogêneas, observou-se que, entre outros fatores, a duração do pulso do laser foi a variável decisiva na análise de pastilhas de materiais vegetais por LIBS. O uso de pulsos em regime temporal de femtossegundos proporcionou calibrações e validação menos dependentes das propriedades físicas e químicas das matrizes, quando comparado ao regime de nanossegundos. Observou-se que as frações de massa de Ca, Mg, P, Fe e Mn previstas por fs-LIBS em pastilhas preparadas com folhas provenientes de diferentes matrizes foram estatisticamente concordantes com os valores de referência, previamente determinados por ICP OES após digestão ácida assistida por radiação micro-ondas, independentemente do modelo de calibração usado.

Por outro lado, somente o uso de calibração multivariada mostrou-se capaz de resolver as transformações não-lineares inerentes à variabilidade espectral provocada pelas diferenças matriciais em ns-LIBS. Assim, quando se utiliza calibração multivariada, os parâmetros de desempenho analítico que descrevem a capacidade preditiva de ns-LIBS se assemelham aos de fs-LIBS. Os resultados obtidos nesta tese mostram que as diferenças na capacidade de previsão dos modelos de calibração obtidos por fs-LIBS e ns-LIBS são, muitas vezes, pequenas e não justificam o uso de uma instrumentação mais complexa. De qualquer forma, apesar de sua sensibilidade ser um pouco menor em relação à ns-LIBS, fs-LIBS pode ser considerada uma estratégia mais robusta frente à variabilidade matricial entre diferentes tipos de amostras. No caso de amostras com composição química semelhante, sistemas LIBS com laser de Nd:YAG a 1064 nm e pulsos de 50 J cm^{-2} mostraram desempenho apropriado na análise das pastilhas considerando-se os limites de detecção, exatidão e precisão das medições.

REFERÊNCIAS

1. SANTOS JUNIOR, D.; NUNES, L. C.; DE CARVALHO, G. G. A.; GOMES, M. S.; LEME, F. O.; SOUZA, P. F.; SANTOS, L. G. C.; KRUG, F. J. Laser-induced breakdown spectroscopy for analysis of plant materials: a review. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 71-72, p. 3-13, 2012.

2. SOUZA, P. F.; SANTOS JR, D.; DE 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. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 83-84, p. 61-65, 2013.

3. WINEFORDNER, J. D.; GORNUSHKIN, I. B.; CORRELL, T.; GIBB, E.; SMITH, B. W.; OMENETTO, N. Comparing several atomic spectrometric methods to the super stars: special emphasis on laser induced breakdown spectrometry, LIBS, a future super star. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry,** London, v. 19, p. 1061-1083, 2004.

4. BRECH, F.; CROSS, L. Optical microemission stimulated by a ruby laser. **Applied Spectroscopy,** Frederick, v. 16, p. 59, 1962.

5. RADZIEMSKI, L.; CREMERS, D. A brief history of laser-induced breakdown spectroscopy: From the concept of atoms to LIBS 2012. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 87, p. 3-10, 2013.

6. DEBRAS-GUÉDON, J.; LIODEC, N. De l'utilisation du faisceau d'un amplificateur a ondes lumineuses par émission induite de rayonnement (laser á rubis), comme source énergetique pour l'excitation des spectres d'émission des elements. **Comptes Rendu de l'Academie des Sciences,** Paris, v. 257, p. 3336-3339, 1963.

7. RUNGE, E. F.; MINCK, R. W.; BRYAN, F. R. Spectrochemical analysis using a pulsed laser source. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 20, p. 733-736, 1964.

8. ZEL'DOVICH, Y. B.; RAIZER, Y. P. **Physics of shock waves and high-temperature hydrodynamic phenomena.** Mineola, NY: Dover Publications, 1965.

9. READY, J. F. **Effects of high-power laser radiation.** New York: Academic Press, 1971.

10. CREMERS, D. A.; RADZIEMSKI, L. J. **Handbook of laser-induced breakdown spectroscopy.** Chichester: John Wiley & Sons, 2006.

11. MIZIOLEK, A. W.; PALLESCHI, V.; SCHECHTER, I. **Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) -** fundamentals and applications. New York: Hindawi Publishing Corporation, 2006.

12. SINGH, J. P.; THAKUR, S. N. **Laser-induced breakdown spectroscopy.** Amsterdam: Elsevier Science, 2007.

13. NOLL, R. **Laser-Induced Breakdown Spectroscopy - fundamentals and applications.** Heidelberg: Springer-Verlag, 2012.

14. STURM, V.; FLEIGE, R.; DE KANTER, M.; LEITNER, R.; PILZ, K.; FISCHER, D.; HUBMER, G.; NOLL, R. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy for 24/7 Automatic Liquid Slag Analysis at a Steel Works. **Analytical Chemistry,** Washington, DC, v. 86, p. 9687-9692, 2014.

15. SERRANO, J.; CABALÍN, L. M.; MOROS, J.; LASERNA, J. J. Potential of laser-induced breakdown spectroscopy for discrimination of nano-sized carbon materials. Insights on the optical characterization of graphene. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 97, p. 105-112, 2014.

16. MCMILLAN, N. J.; REES, S.; KOCHELEK, K.; MCMANUS, C. Geological Applications of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. **Geostandards and Geoanalytical Research,** Hoboken, v. 38, p. 329-343, 2014.

17. HARMON, R. S.; RUSSO, R. E.; HARK, R. R. Applications of laser-induced breakdown spectroscopy for geochemical and environmental analysis: A comprehensive review. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 87, p. 11-26, 2013.

18. LEME, F. O.; GODOI, Q.; KIYATAKA, P. H. M.; SANTOS, 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. **Applied Surface Science,** Amsterdam, v. 258, p. 3598-3603, 2012.

19. SERRANO, J.; MOROS, J.; SÁNCHEZ, C.; MACÍAS, J.; LASERNA, J. J. Advanced recognition of explosives in traces on polymer surfaces using LIBS and supervised learning classifiers. **Analytica Chimica Acta,** Amsterdam, v. 806, p. 107-116, 2014.

20. NUNES, L. C.; DE CARVALHO, G. G. A.; SANTOS JÚNIOR, D.; KRUG, F. J. Determination of Cd, Cr and Pb in phosphate fertilizers by laser-induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 97, p. 42-48, 2014.

21. 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. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 64, p. 1073-1078, 2009.

22. SANCEY, L.; MOTTO-ROS, V.; BUSSER, B.; KOTB, S.; BENOIT, J. M.; PIEDNOIR, A.; LUX, F.; TILLEMENT, O.; PANCZER, G.; YU, J. Laser spectrometry for multi-elemental imaging of biological tissues. **Scientific Reports,** London, v. 4, p. 6065, 2014. doi: 10.1038/srep06065.

23. SANTOS JUNIOR, 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. **Applied Spectroscopy,** Frederick, v. 62, p. 1137-1143, 2008.

24. PERUCHI, L. C.; NUNES, L. C.; DE CARVALHO, G. G. A.; GUERRA, M. B. B.; DE ALMEIDA, E.; RUFINI, I. A.; SANTOS, D.; KRUG, F. J. Determination of inorganic nutrients in wheat flour by laser-induced breakdown spectroscopy and energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 100, p. 129-136, 2014.

25. NOLL, R.; FRICKE-BEGEMANN, C.; BRUNK, M.; CONNEMANN, S.; MEINHARDT, C.; SCHARUN, M.; STURM, V.; MAKOWE, J.; GEHLEN, C. Laser-induced breakdown spectroscopy expands into industrial applications. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 93, p. 41-51, 2014.

26. OLLILA, A. M.; NEWSOM, H. E.; CLARK III, B.; WIENS, R. C.; COUSIN, A.; BLANK, J. G.; MANGOLD, N.; SAUTTER, V.; MAURICE, S.; CLEGG, S. M.; GASNAULT, O.; FORNI, O.; TOKAR, R.; LEWIN, E.; DYAR, M. D.; LASUE, J.; ANDERSON, R.; MCLENNAN, S. M.; BRIDGES, J.; VANIMAN, D.; LANZA, N.; FABRE, C.; MELIKECHI, N.; PERRETT, G. M.; CAMPBELL, J. L.; KING, P. L.; BARRACLOUGH, B.; DELAPP, D.; JOHNSTONE, S.; MESLIN, P. Y.; ROSEN-GOODING, A.; WILLIAMS, J. Trace element geochemistry (Li, Ba, Sr, and Rb) using Curiosity's ChemCam: Early results for Gale crater from Bradbury Landing Site to Rocknest. **Journal of Geophysical Research E: Planets,** Washington, DC, v. 119, p. 255-285, 2014.

27. GAONA, I.; LUCENA, P.; MOROS, J.; FORTES, F. J.; GUIRADO, S.; SERRANO, J.; LASERNA, J. J. Evaluating the use of standoff LIBS in architectural heritage: Surveying the Cathedral of Málaga. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry,** London, v. 28, p. 810-820, 2013.

28. LAZIC, V.; JOVIĆEVIĆ, S. Laser induced breakdown spectroscopy inside liquids: Processes and analytical aspects. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 101, p. 288-311, 2014.

29. RAKOVSKÝ, J.; ČERMÁK, P.; MUSSET, O.; VEIS, P. A review of the development of portable laser induced breakdown spectroscopy and its applications. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 101, p. 269-287, 2014.

30. PÉREZ-SERRADILLA, J. A.; JURADO-LÓPEZ, A.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Complementarity of XRFS and LIBS for corrosion studies. **Talanta,** London, v. 71, p. 97-102, 2007.

31. PARDINI, L.; EL HASSAN, A.; FERRETTI, M.; FORESTA, A.; LEGNAIOLI, S.; LORENZETTI, G.; NEBBIA, E.; CATALLI, F.; HARITH, M. A.; DIAZ PACE, D.; ANABITARTE GARCIA, F.; SCUOTTO, M.; PALLESCHI, V. X-Ray Fluorescence and Laser-Induced Breakdown Spectroscopy analysis of Roman silver denarii. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 74–75, p. 156-161, 2012.

32. SANTOS JUNIOR, D.; KRUG, F. J.; TARELHO, L. V. G.; VIEIRA JR, N. D.; MILORI, D. M. B. P.; MARTIN NETO, L. Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) - Fundamentos, aplicações e perspectivas. **Analytica,** São Paulo, v. 24, p. 72-81, 2006.

33. FORTES, F. J.; MOROS, J.; LUCENA, P.; CABALIN, L. M.; JAVIER LASERNA, J. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. **Analytical Chemistry,** Washington, DC, v. 85, p. 640-669, 2013.

34. PASQUINI, C.; CORTEZ, J.; SILVA, L. M. C.; GONZAGA, F. B. Laser induced breakdown spectroscopy. **Journal of Brazilian Chemical Society,** São Paulo, v. 18, p. 463-512, 2007.

35. RUSSO, R. E.; MAO, X. L.; MAO, S. S. The physics of laser ablation in microchemical analysis. **Analytical Chemistry,** Washington, DC, v. 74, p. 70A-77A, 2002.

36. VADILLO, J. M.; ROMERO, J. M. F.; RODRÍGUEZ, C.; LASERNA, J. J. Effect of plasma shielding on laser ablation rate of pure metals at reduced pressure. **Surface and Interface Analysis,** Hoboken, v. 27, p. 1009-1015, 1999.

37. SIRVEN, J. B.; MAUCHIEN, P.; SALLÉ, B. Analytical optimization of some parameters of a Laser-Induced Breakdown Spectroscopy experiment. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 63, p. 1077-1084, 2008.

38. CARVALHO, G. G. A.; SANTOS JR, D.; NUNES, L. C.; GOMES, M. S.; LEME, F. O.; KRUG, F. J. Effects of laser focusing and fluence on the analysis of pellets of plant materials by laser induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 74-75, p. 162-168, 2012.

39. THAKUR, S. N.; SINGH, J. P. Fundamentals of laser induced breakdown spectroscopy. In: SINGH, J. P.; THAKUR, S. N. **Laser-Induced Breakdown Spectroscopy**. Amsterdam: Elsevier Science, 2007.

40. GUREVICH, E. L.; HERGENROEDER, R. Femtosecond laser-induced breakdown spectroscopy: Physics, applications, and perspectives. **Applied Spectroscopy,** Frederick, v. 61, p. 233A-242A, 2007.

41. RUSSO, R. E.; MAO, X.; LIU, H.; GONZALEZ, J.; MAO, S. S. Laser ablation in analytical chemistry - a review. **Talanta,** London, v. 57, p. 425-451, 2002.

42. GUNTHER, D.; HORN, I.; HATTENDORF, B. Recent trends and developments in laser ablation-ICP-mass spectrometry. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry,** Berlin, v. 368, p. 4-14, 2000.

43. KRUPKE, W. F. Ytterbium solid-state lasers. The first decade. **IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics**, New York, v. 6, p. 1287-1296, 2000.

44. BORDUI, P. F.; FEJER, M. M. Inorganic Crystals for Nonlinear Optical Frequency Conversion. **Annual Review of Material Science,** Palo Alto, v. 23, p. 321-379, 1993.

45. SASAKI, T.; MORI, Y.; YOSHIMURA, M.; YAP, Y. K.; KAMIMURA, T. Recent development of nonlinear optical borate crystals: key materials for generation of visible and UV light. **Materials Science and Engineering: R: Reports,** Amsterdam, v. 30, p. 1-54, 2000.

46. RUSSO, R. E.; SUEN, T. W.; BOL'SHAKOV, A. A.; YOO, J.; SORKHABI, O.; MAO, X.; GONZALEZ, J.; OROPEZA, D.; ZORBA, V. Laser plasma spectrochemistry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry,** London, v. 26, p. 1596-1603, 2011.

47. RUSSO, R. E. Laser-ablation. **Applied Spectroscopy,** Frederick, v. 49, p. A14-A28, 1995.

48. AMORUSO, S.; BRUZZESE, R.; SPINELLI, N.; VELOTTA, R. Characterization of laser-ablation plasmas. **Journal of Physics B,** Bristol, v. 32, p. R131-R172, 1999.

49. FORNARINI, L.; COLAO, F.; FANTONI, R.; LAZIC, V.; SPIZZICCHINO, V. Calibration analysis of bronze samples by nanosecond laser induced breakdown spectroscopy: A theoretical and experimental approach. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 60, p. 1186-1201, 2005.

50. BARTHÉLEMY, O.; MARGOT, J.; CHAKER, M.; SABSABI, M.; VIDAL, F.; JOHNSTON, T. W.; LAVILLE, S.; LE DROGOFF, B. Influence of the laser parameters on the space and time characteristics of an aluminum laser-induced plasma. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 60, p. 905-914, 2005.

51. FORNARINI, L.; SPIZZICHINO, V.; COLAO, F.; FANTONI, R.; LAZIC, V. Influence of laser wavelength on LIBS diagnostics applied to the analysis of ancient bronzes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** Heidelberg, v. 385, p. 272-280, 2006.

52. 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. **Applied Optics,** Easton, v. 49, p. C49-C57, 2010.

53. MOTELICA-HEINO, M.; LE COUSTUMER, P.; DONARD, O. F. X. Micro- and macro-scale investigation of fractionation and matrix effects in LA-ICP-MS at 1064 nm and 266 nm on glassy materials. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry,** London, v. 16, p. 542-550, 2001.

54. CABALÍN, L. M.; LASERNA, J. J. Experimental determination of laser induced breakdown thresholds of metals under nanosecond Q-switched laser operation. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 53, p. 723-730, 1998.

55. RUSSO, R. E.; MAO, X. L.; BORISOV, O. V.; LIU, H. C. Influence of wavelength on fractionation in laser ablation ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry,** London, v. 15, p. 1115-1120, 2000.

56. RUSSO, R. E.; MAO, X.; BORISOV, O. V. Laser ablation sampling. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry,** Amsterdam, v. 17, p. 461-469, 1998.

57. FABBRO, R.; FABRE, E.; AMIRANOFF, F.; GARBANLABAUNE, C.; VIRMONT, J.; WEINFELD, M.; MAX, C. E. Laser-wavelength dependence of mass-ablation rate and heat-flux inhibition in laser-produced plasmas. **Physical Review A,** Washington, DC, v. 26, p. 2289-2292, 1982.

58. SHAIKH, N. M.; HAFEEZ, S.; RASHID, B.; BAIG, M. A. Spectroscopic studies of laser induced aluminum plasma using fundamental, second and third harmonics of a Nd:YAG laser. **European Physical Journal D,** Heidelberg, v. 44, p. 371-379, 2007.

59. MA, Q.; MOTTO-ROS, V.; LAYE, F.; YU, J.; LEI, W.; BAI, X.; ZHENG, L.; ZENG, H. Ultraviolet versus infrared: Effects of ablation laser wavelength on the expansion of laser-induced plasma into one-atmosphere argon gas. **Journal of Applied Physics,** Menasha, v. 111, p. 053301-053311, 2012.

60. HAFEEZ, S.; SHAIKH, N. M.; BAIG, M. A. Spectroscopic studies of Ca plasma generated by the fundamental, second, and third harmonics of a Nd:YAG laser. **Laser and Particle Beams,** Cambridge, v. 26, p. 41-50, 2008.

61. LEE, Y. I.; SONG, K.; CHA, H. K.; LEE, J. M.; PARK, M. C.; LEE, G. H.; SNEDDON, J. Influence of atmosphere and irradiation wavelength on copper plasma emission induced by excimer and Q-switched Nd:YAG laser ablation. **Applied Spectroscopy,** Frederick, v. 51, p. 959-964, 1997.

62. GEERTSEN, C.; BRIAND, A.; CHARTIER, F.; LACOUR, J.-L.; MAUCHIEN, P.; SJOSTROM, S.; MERMET, J.-M. Comparison between infrared and ultraviolet laser ablation at atmospheric pressure-implications for solid sampling inductively coupled plasma spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry,** London, v. 9, p. 17-22, 1994.

63. BORISOV, O. V.; MAO, X. L.; FERNANDEZ, A.; CAETANO, M.; RUSSO, R. E. Inductively coupled plasma mass spectrometric study of non-linear calibration behavior during laser ablation of binary Cu-Zn Alloys. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 54, p. 1351-1365, 1999.

64. CABALÍN, L.; ROMERO, D.; GARCÍA, C. C.; BAENA, J.; LASERNA, J. Time-resolved laser-induced plasma spectrometry for determination of minor elements in steelmaking process samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** Heidelberg, v. 372, p. 352-359, 2002.

65. WANG, Q.; JANDER, P.; FRICKE-BEGEMANN, C.; NOLL, R. Comparison of 1064 nm and 266 nm excitation of laser-induced plasmas for several types of plastics and one explosive. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 63, p. 1011-1015, 2008.

66. MAO, X. L.; CIOCAN, A. C.; BORISOV, O. V.; RUSSO, R. E. Laser ablation processes investigated using inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy (ICP-AES). **Applied Surface Science,** Amsterdam, v. 127-129, p. 262-268, 1998.

67. CASTILLEJO, M.; MARTÍN, M.; OUJJA, M.; REBOLLAR, E.; DOMINGO, C.; GARCÍA-RAMOS, J. V.; SÁNCHEZ-CORTÉS, S. Effect of wavelength on the laser cleaning of polychromes on wood. **Journal of Cultural and Heritage,** Amsterdam, v. 4, p. 243-249, 2003.

68. ZHANG, D. C.; MA, X. W.; WEN, W. Q.; ZHANG, P. J.; ZHU, X. L.; LI, B.; LIU, H. P. Influence of laser wavelength on laser-induced breakdown spectroscopy applied to semi-quantitative analysis of trace-elements in a plant sample. **Chinese Physics Letters,** Bristol, v. 27, n. 6, 2010. doi:10.1088/0256-307X/27/6/063202.

69. HOFFMANN, E.; LÜDKE, C.; SKOLE, J.; STEPHANOWITZ, H.; ULLRICH, E.; COLDITZ, D. Spatial determination of elements in green leaves of oak trees (*Quercus robur*) by laser ablation-ICP-MS. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry,** Berlin, v. 367, p. 579-585, 2000.

70. FERNÁNDEZ, B.; CLAVERIE, F.; PÉCHEYRAN, C.; DONARD, O. F. X. Direct analysis of solid samples by fs-LA-ICP-MS. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry,** Amsterdam, v. 26, p. 951-966, 2007.

71. RUSSO, R. E.; MAO, X.; GONZALEZ, J. L.; YOO, J. Femtosecond versus nanosecond laser pulse duration for laser ablation chemical analysis. **Spectroscopy,** Amsterdam, v. 28, p. 24-39, 2013.

72. SHANNON, M. A.; MAO, X. L.; FERNANDEZ, A.; CHAN, W.-T.; RUSSO, R. E. Laser ablation mass removal versus incident power density during solid sampling for inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. **Analytical Chemistry,** Washington, DC, v. 67, p. 4522-4529, 1995.

73. KOCH, J.; GÜENTHER, D. Review of the State-of-the-Art of Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **Applied Spectroscopy,** Frederick, v. 65, p. 155A-162A, 2011.

74. MARGETIC, V.; PAKULEV, A.; STOCKHAUS, A.; BOLSHOV, M.; NIEMAX, K.; HERGENRÖDER, R. A comparison of nanosecond and femtosecond laser-induced plasma spectroscopy of brass samples. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 55, p. 1771-1785, 2000.

75. FREEMAN, J. R.; HARILAL, S. S.; DIWAKAR, P. K.; VERHOFF, B.; HASSANEIN, A. Comparison of optical emission from nanosecond and femtosecond laser produced plasma in atmosphere and vacuum conditions. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 87, p. 43-50, 2013.

76. DE BONIS, A.; DE FILIPPO, B.; GALASSO, A.; SANTAGATA, A.; SMALDONE, A.; TEGHIL, R. Comparison of the performances of nanosecond and femtosecond Laser Induced Breakdown Spectroscopy for depth profiling of an artificially corroded bronze. **Applied Surface Science,** Amsterdam, v. 302, p. 275-279, 2014.

77. BANERJEE, S. P.; FEDOSEJEVS, R. Single shot depth sensitivity using femtosecond Laser Induced Breakdown Spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 92, p. 34-41, 2014.

78. GOMES, M. S.; DE 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. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 86, p. 137-141, 2013.

79. OHATA, M.; TABERSKY, D.; GLAUS, R.; KOCH, J.; HATTENDORF, B.; GUNTHER, D. Comparison of 795 nm and 265 nm femtosecond and 193 nm nanosecond laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry for the quantitative multi-element analysis of glass materials. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry,** London, v. 29, p. 1345-1353, 2014.

80. GILL, R. K.; KNORR, F.; SMITH, Z. J.; KAHRAMAN, M.; MADSEN, D.; LARSEN, D. S.; WACHSMANN-HOGIU, S. Characterization of Femtosecond Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (fsLIBS) and Applications for Biological Samples. **Applied Spectroscopy,** Frederick, v. 68, p. 949-954, 2014.

81. KAISER, J.; NOVOTNY, K.; MARTIN, M. Z.; HRDLICKA, A.; MALINA, R.; HARTL, M.; ADAM, V.; KIZEK, R. Trace elemental analysis by laser-induced breakdown spectroscopy - Biological applications. **Surface Sciences Reports,** Amsterdam, v. 67, p. 233-243, 2012.

82. KAISER, J.; SAMEK, O.; REALE, L.; LISKA, M.; MALINA, R.; RITUCCI, A.; POMA, A.; TUCCI, A.; FLORA, F.; LAI, A.; MANCINI, L.; TROMBA, G.; ZANINI, F.; FAENOV, A.; PIKUZ, T.; CINQUE, G. Monitoring of the heavy-metal hyperaccumulation in vegetal tissues by X-ray radiography and by femto-second laser induced breakdown spectroscopy. **Microscopy Research and Techniques,** Hoboken, v. 70, p. 147-153, 2007.

83. SAMEK, O.; MARGETIC, V.; HERGENRÖDER, R. Sampling of material using femtosecond pulses. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** Heidelberg, v. 381, p. 54-56, 2005.

84. 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. **Applied Physics B,** Berlin, v. 77, p. 391-397, 2003.

85. SAMEK, O.; LAMBERT, J.; HERGENRODER, R.; LISKA, M.; KAISER, J.; NOVOTNY, K.; KUKHLEVSKY, S. Femtosecond laser spectrochemical analysis of plant samples. **Laser Physics Letters,** Weinheim, v. 3, p. 21-25, 2006.

86. KALRA, Y. P. **Handbook of reference methods for plant analysis.** Boca Raton: CRC Press, 1998.

87. 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. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 63, p. 1151-1158, 2008.

88. TREVIZAN, L. C.; SANTOS JR, D.; SAMAD, R. E.; VIEIRA JR, N. D.; NUNES, L. C.; RUFINI, I. A.; KRUG, F. J. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for the determination of micronutrients in plant materials. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 64, p. 369-377, 2009.

89. RESANO, M.; VANHAECKE, F.; DE LOOS-VOLLEBREGT, M. T. C. Electrothermal vaporization for sample introduction in atomic absorption, atomic emission and plasma mass spectrometry-a critical review with focus on solid sampling and slurry analysis. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry,** London, v. 23, p. 1450-1475, 2008.

90. LEE, W. B.; WU, J. Y.; LEE, Y. I.; SNEDDON, J. Recent applications of laser-induced breakdown spectrometry: A review of material approaches. **Applied Spectroscopy Reviews,** New York, v. 39, p. 27-97, 2004.

91. FANTONI, R.; CANEVE, L.; COLAO, F.; FORNARINI, L.; LAZIC, V.; SPIZZICHINO, V. Methodologies for laboratory Laser Induced Breakdown Spectroscopy semi-quantitative and quantitative analysis - A review. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 63, p. 1097-1108, 2008.

92. DE CARVALHO, G. G. A.; SANTOS JUNIOR, D.; NUNES, L. C.; GOMES, M. S.; LEME, F. O.; KRUG, F. J. Effects of laser focusing and fluence on the analysis of pellets of plant materials by laser-induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 74–75, p. 162-168, 2012.

93. SUN, Q.; TRAN, M.; SMITH, B. W.; WINEFORDNER, J. D. Direct determination of P, Al, Ca, Cu, Mn, Zn, Mg and Fe in plant materials by laser-induced plasma spectroscopy. **Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy,** Quebec, v. 44, p. 164-170, 1999.

94. KIM, G.; KWAK, J.; CHOI, J.; PARK, K. Detection of nutrient elements and contamination by pesticides in spinach and rice samples using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Easton, v. 60, p. 718-724, 2012.

95. 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. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry,** London, v. 25, p. 1453-1460, 2010.

96. 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. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 65, p. 66-74, 2010.

97. FEUDALE, R. N.; WOODY, N. A.; TAN, H.; MYLES, A. J.; BROWN, S. D.; FERRÉ, J. Transfer of multivariate calibration models: a review. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems,** Amsterdam, v. 64, p. 181-192, 2002.

98. BOL'SHAKOV, A. A.; YOO, J. H.; LIU, C. Y.; PLUMER, J. R.; RUSSO, R. E. Laser-induced breakdown spectroscopy in industrial and security applications. **Applied Optics,** Easton, v. 49, p. C132-C142, 2010.

99. 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. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 60, p. 1179-1185, 2005.

100. CIUCCI, A.; CORSI, M.; PALLESCHI, V.; RASTELLI, S.; SALVETTI, A.; TOGNONI, E. New procedure for quantitative elemental analysis by laser-induced plasma spectroscopy. **Applied Spectroscopy,** Frederick, v. 53, p. 960-964, 1999.

101. TOGNONI, E.; CRISTOFORETTI, G.; LEGNAIOLI, S.; PALLESCHI, V. Calibration-Free Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: State of the art. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 65, p. 1-14, 2010.

102. MA, S.; GAO, X.; GUO, K.; KAHSAY, M.; LIN, J. Analysis of the element content in poplar tree leaves by femtosecond laser-induced breakdown spectroscopy. **Science China - Physics, Mechanics and Astronomy,** Heidelberg, v. 54, p. 1953–1957, 2011.

103. BELDJILALI, S.; BORIVENT, D.; MERCADIER, L.; MOTHE, E.; CLAIR, G.; HERMANN, J. Evaluation of minor element concentrations in potatoes using laser-induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 65, p. 727-733, 2010.

104. BELDJILALI, S.; YIP, W. L.; HERMANN, J.; BABA-HAMED, T.; BELASRI, A. Investigation of plasmas produced by laser ablation using single and double pulses for food analysis demonstrated by probing potato skins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** Heidelberg, v. 400, p. 2173-2183, 2011.

105. LEI, W.; MOTTO-ROS, V.; BOUERI, M.; MA, Q.; ZHANG, D.; ZHENG, L.; ZENG, H.; YU, J. Time-resolved characterization of laser-induced plasma from fresh potatoes. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 64, p. 891-898, 2009.

106. CAVALCANTI, G. H.; TEIXEIRA, D. V.; LEGNAIOLI, S.; LORENZETTI, G.; PARDINI, L.; PALLESCHI, V. One-point calibration for calibration-free laser-induced breakdown spectroscopy quantitative analysis. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 87, p. 51-56, 2013.

107. GOMES, M. S.; SANTOS JUNIOR, D.; NUNES, L. C.; DE 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,** London, v. 85, p. 1744-1750, 2011.

108. DE CARVALHO, G. G. A.; SANTOS JUNIOR, D.; GOMES, M. S.; NUNES, L. C.; GUERRA, M. B. B.; KRUG, F. J. Influence of particle size distribution on the analysis of pellets of plant materials by laser-induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 105, p. 130–135, 2015.

109. POUZAR, M.; CERNOHORSKY, T.; PRUSOVA, M.; PROKOPCAKOVA, P.; KREJCOVA, A. LIBS analysis of crop plants. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry,** London, v. 24, p. 953-957, 2009.

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

111. MCCRAY, J. M.; ; RICE, R. W.; EZENWA, I. V.; LANG, T. A.; BAUCUM, L. Sugarcane Plant Nutrient Diagnosis. In: RICE, R. W. (Ed.). **Florida sugarcane handbook**. Gainsville: Institute of Food and Agricultural Sciences, 2009.

112. GUERRA, M. B. B.; ALMEIDA, E.; DE CARVALHO, G. G. A.; DE SOUZA, P. F.; NUNES, L. C.; SANTOS JUNIOR, D.; KRUG, F. J. Comparison of analytical performance of benchtop and handheld energy dispersive X-ray fluorescence systems for the direct analysis of plant materials. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry,** London, v. 29, p. 1667-1674, 2014.

113. SANTOS JUNIOR, D.; BARBOSA, F.; TOMAZELLI, A.; 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. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** Heidelberg, v. 373, p. 183-189, 2002.

114. ARAÚJO, G. C. L.; GONZALEZ, M. H.; FERREIRA, A. G.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 57, p. 2121-2132, 2002.

115. SILVA, F. V.; TREVIZAN, L. C.; SILVA, C. S.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Evaluation of inductively coupled plasma optical emission spectrometers with axially and radially viewed configurations. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 57, p. 1905-1913, 2002.

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

117. MARQUES, A. P.; FREITAS, M. C.; WOLTERBEEK, H. T.; VERBURG, T. G.; DE GOEIJ, J. J. M. Grain-size effects on PIXE and INAA analysis of IAEA-336 lichen reference material. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B,** Amsterdam, v. 255, p. 380-394, 2007.

118. BUENO GUERRA, M. B.; SCHAEFER, C. E. G. R.; DE CARVALHO, G. G. A.; DE SOUZA, P. F.; JUNIOR, D. S.; NUNES, L. C.; KRUG, F. J. Evaluation of micro-energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry for the analysis of plant materials. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry,** London, v. 28, p. 1096-1101, 2013.

119. ARAGÓN, C.; AGUILERA, J. A. Characterization of laser induced plasmas by optical emission spectroscopy: A review of experiments and methods. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 63, p. 893-916, 2008.

120. MOROS, J.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, M. J.; PÉREZ-SIRVENT, C.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Testing of the Region of Murcia soils by near infrared diffuse reflectance spectroscopy and chemometrics. **Talanta,** London, v. 78, p. 388-398, 2009.

121. FUHR, J. R.; WIESE, W. L. A critical compilation of atomic transition probabilities for neutral and singly ionized iron. **Journal of Physical and Chemical Reference Data,** Washington, DC, v. 35, p. 1669-1809, 2006.

122. DANZER, K.; CURRIE, L. A. Guidelines for calibration in analytical chemistry - Part 1. Fundamentals and single component calibration (IUPAC recommendations 1998). **Pure and Applied Chemistry,** Oxford, v. 70, p. 993-1014, 1998.

123. NØRGAARD, L.; SAUDLAND, A.; WAGNER, J.; NIELSEN, J. P.; MUNCK, L.; ENGELSEN, S. B. Interval Partial Least-Squares Regression (iPLS): A Comparative Chemometric Study with an Example from Near-Infrared Spectroscopy. **Applied Spectroscopy,** Frederick, v. 54, p. 413-419, 2000.

124. FERNÁNDEZ PIERNA, J. A.; JIN, L.; WAHL, F.; FABER, N. M.; MASSART, D. L. Estimation of partial least squares regression prediction uncertainty when the reference values carry a sizeable measurement error. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems,** Amsterdam, v. 65, p. 281-291, 2003.

125. VANKEERBERGHEN, P.; SMEYERS-VERBEKE, J. The quality coefficient as a tool in decisions about the quality of calibration in graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems,** Amsterdam, v. 15, p. 195-202, 1992.

126. WILLIAMS, P.; SOBERING, D. How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations. In: DAVIES, A. M. C.; WILLIAMS, P. **Near infrared spectroscopy**: the future waves. Chichester: NIR Publications, 1996.

127. MASSART, D. L.; VANDEGINSTE, B. G. M.; BUYDENS, L. M. C.; JONG, S. D.; LEWI, P. J.; SMEYERS-VERBEKE, J. **Handbook of Chemometrics and Qualimetrics Part A.** Amsterdam: Elsevier, 1997.

128. CURRIE, L. A. Limits for qualitative detection and quantitative determination. Application to radiochemistry. **Analytical Chemistry,** Washington, DC, v. 40, p. 586-593, 1968.

129. RIU, J.; RIUS, F. X. Assessing the Accuracy of Analytical Methods Using Linear Regression with Errors in Both Axes. **Analytical Chemistry,** Washington, DC, v. 68, p. 1851-1857, 1996.

130. VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Quimica Nova,** São Paulo, v. 32, p. 1278-1287, 2009.

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

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

133. OLIVEIRA, S. R.; ARRUDA, M. A. Z. Application of laser ablation (imaging) inductively coupled plasma mass spectrometry for mapping and quantifying Fe in transgenic and non-transgenic soybean leaves. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry,** London, v. 30, p. 389-395, 2015.

134. CREMERS, D. A.; RADZIEMSKI, L. J. Direct Detection of Beryllium on Filters Using the Laser Spark. **Applied Spectroscopy,** Frederick, v. 39, p. 57-63, 1985.

135. DIAZ ROSADO, J. C.; L'HERMITE, D.; LEVI, Y. Effect of particle size on laser-induced breakdown spectroscopy analysis of alumina suspension in liquids. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 74–75, p. 80-86, 2012.

136. HAHN, D. W. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy for Analysis of Aerosol Particles: The Path Toward Quantitative Analysis. **Spectroscopy,** Amsterdam, v. 24, p. 26-33, 2009.

137. 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. **Applied Spectroscopy,** Frederick, v. 64, p. 335A-366A, 2010.

138. ASGILL, M. E.; HAHN, D. W. Particle size limits for quantitative aerosol analysis using laser-induced breakdown spectroscopy: Temporal considerations. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 64, p. 1153-1158, 2009.

139. GALLOU, G.; SIRVEN, J. B.; DUTOUQUET, C.; LE BIHAN, O.; FREJAFON, E. Aerosols Analysis by LIBS for Monitoring of Air Pollution by Industrial Sources. **Aerosol Science and Technology,** New York, v. 45, p. 918-926, 2011.

140. PANNE, U.; HAHN, D. W. Analysis of aerosols by LIBS. In: MIZIOLEK, A. W.; PALLESCHI, V.; SCHECHTER. I. **Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) -** fundamentals and applications. New York: Cambridge University Press, 2006.

141. ROSSBACH, M.; ZEILLER, E. Assessment of element-specific homogeneity in reference materials using microanalytical techniques. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** Heidelberg, v. 377, p. 334-339, 2003.

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

143. GOMES, M. S.; SCHENK, E. R.; SANTOS JUNIOR, D.; KRUG, F. J.; ALMIRALL, J. R. Laser ablation inductively coupled plasma optical emission spectrometry for analysis of pellets of plant materials. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 94–95, p. 27-33, 2014.

144. ARROYO, L.; TREJOS, T.; GARDINALI, P. R.; ALMIRALL, J. R. Optimization and validation of a Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry method for the routine analysis of soils and sediments. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 64, p. 16-25, 2009.

145. ARAMENDÍA, M.; RESANO, M.; VANHAECKE, F. Electrothermal vaporization–inductively coupled plasma-mass spectrometry: A versatile tool for tackling challenging samples: A critical review. **Analytica Chimica Acta,** Amsterdam, v. 648, p. 23-44, 2009.

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

147. KEMPENAERS, L.; JANSSENS, K.; JOCHUM, K. P.; VINCZE, L.; VEKEMANS, B.; SOMOGYI, A.; DRAKOPOULOS, M.; ADAMS, F. Micro-heterogeneity study of trace elements in USGS, MPI-DING and NIST glass reference materials by means of synchrotron micro-XRF. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry,** London, v. 18, p. 350-357, 2003.

148. DYBCZYŃSKI, R.; DANKO, B.; POLKOWSKA-MOTRENKO, H. Some difficult problems still existing in the preparation and certification of CRMs. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry,** Berlin, v. 370, p. 126-130, 2001.

149. MICHAUD, D.; LECLERC, R.; PROULX, É. Influence of particle size and mineral phase in the analysis of iron ore slurries by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 62, p. 1575-1581, 2007.

150. CARRANZA, J. E.; HAHN, D. W. Assessment of the upper particle size limit for quantitative analysis of aerosols using laser-induced breakdown spectroscopy. **Analytical Chemistry,** WAshington, DC, v. 74, p. 5450-5454, 2002.

151. FAYE, C. B.; AMODEO, T.; FRÉJAFON, E.; DELEPINE-GILON, N.; DUTOUQUET, C. Sampling considerations when analyzing micrometric-sized particles in a liquid jet using laser induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 91, p. 5-11, 2014.

152. VORS, E.; SALMON, L. Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) for carbon single shot analysis of micrometer-sized particles. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** Heidelberg, v. 385, p. 281-286, 2006.

153. POUZAR, M.; KRATOCHVIL, T.; KASKI, S.; KAISER, J.; KNOTEK, P.; CAPEK, L.; CERNOHORSKY, T. Effect of particle size distribution in laser-induced breakdown spectroscopy analysis of mesoporous V-SiO2 catalysts. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry,** London, v. 26, p. 2281-2288, 2011.

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

155. NUNES, L. C. **Estratégias quimiométricas para análise de plantas por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser**. 2010. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

156. LE DROGOFF, B.; MARGOT, J.; CHAKER, M.; SABSABI, M.; BARTHÉLEMY, O.; JOHNSTON, T. W.; LAVILLE, S.; VIDAL, F.; VON KAENEL, Y. Temporal characterization of femtosecond laser pulses induced plasma for spectrochemical analysis of aluminum alloys. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 56, p. 987-1002, 2001.

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

158. BROWN, D. J.; BRICKLEMYER, R. S.; MILLER, P. R. Validation requirements for diffuse reflectance soil characterization models with a case study of VNIR soil C prediction in Montana. **Geoderma,** Amsterdam, v. 129, p. 251-267, 2005.

159. TAN, P. N.; STEINBACH, M.; KUMAR, V. **Introduction to data mining.** Reading, MA: Addison Wesley, 2005.

160. MAO, X. L.; BORISOV, O. V.; RUSSO, R. E. Enhancements in laser ablation inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry based on laser properties and ambient environment. **Spectrochimica Acta Part B,** Oxford, v. 53, p. 731-739, 1998.

161. SDORRA, W.; BRUST, J.; NIEMAX, K. Basic investigations for laser microanalysis: IV. The dependence on the laser wavelength in laser ablation. **Microchimica Acta,** Heidelberg, v. 108, p. 1-10, 1992.

162. MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. **Principles of plant nutrition.** Dordrecht: Kluwer Academic, 2001.

ANEXOS

Anexo A – Artigo publicado no periódico *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy;*

Anexo B – Artigo publicado no periódico *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy;*

Anexo C – Artigo publicado no periódico *Analytica Chimica Acta.*

Anexo A

Spectrochimica Acta Part B 105 (2015) 130–135

Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/sab

Influence of particle size distribution on the analysis of pellets of plant materials by laser-induced breakdown spectroscopy ☆

Gabriel Gustinelli Arantes de Carvalho [a], Dário Santos Jr. [b], Marcos da Silva Gomes [a], Lidiane Cristina Nunes [a], Marcelo Braga Bueno Guerra [a], Francisco José Krug [a,*]

[a] NAPTISA Research Support Center "Technology and Innovation for a Sustainable Agriculture", Center for Nuclear Energy in Agriculture, University of São Paulo, Av. Centenário 303, 13416-000 Piracicaba, SP, Brazil

[b] Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de São Paulo, Rua Prof. Artur Riedel, 275, 09972-270 Diadema, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 27 May 2014
Accepted 30 August 2014
Available online 16 October 2014

Keywords:
Laser-induced breakdown spectroscopy
LIBS
Plant material
Particle size distribution
Pellet

ABSTRACT

Pellets of sieved plant materials (150, 106, 75, 53 and 20 μm sieve apertures) were prepared and analyzed by laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), and the results for Ca, K, Mg, P, B and Mn were discussed as a function of particle size distribution. This parameter is of key importance for appropriate test sample presentation in the form of pressed pellets for quantitative analysis by LIBS. Experiments were carried out with a Q-switched Nd:YAG laser at 1064 nm, and a spectrometer with Echelle optics and an intensified charge-coupled device. Results indicated that smaller particles yielded up to 50% emission signal intensities' enhancement and attained better measurements' precision (site-to-site variation). Moreover, matrix effects were reduced by analyzing pellets prepared from <75 μm sieved fractions (mean particle size = 32 μm; d_{95} = 102 μm) and by using a 50 J cm^{-2} laser fluence (220 mJ per pulse; 750 μm laser spot size). The preparation of pellets from laboratory samples with monomodal particle size distributions, where most particles were smaller than 100 μm, was decisive for improving analyte micro-homogeneity within the test samples and for attaining lower coefficients of variation of measurements, typically lower than 10% (n = 10 sites per pellet; 20 laser pulses per site).

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) is an attractive and powerful tool for direct solid analysis of agricultural, environmental and industrial samples due to its inherent analytical capabilities for fast and simultaneous multielemental determinations [1]. LIBS presents appropriate analytical figures of merit aiming at the quantitative determination of P, K, Ca, Mg, B, Cu, Fe, Mn, Zn [2] and Si [3] in pellets of plant materials. Although the use of matrix-matched standards has been recommended [4], the establishment of boundary conditions for quantitative analysis is still necessary, mainly to compensate the variations in laser–sample interactions in different matrices [2].

Particle size distribution of ground leaves is a key parameter for appropriate test sample presentation in the form of pressed pellets [2,5]. In fact, there are some indications that matrix effects can be reduced by analyzing pellets prepared from particles smaller than 75 μm [2,5]. The particle decomposition and vaporization, as well as the analyte atomization and excitation efficiencies within laser-induced plasmas, are generally favored when smaller particles are ablated. There is an inverse relationship between particle size and sensitivity of the calibration curve, with the slope increasing as the particle size decreases [6,7].

The effect of particle size on the analysis of aerosol by LIBS has been exploited elsewhere [8]. While the analysis of aerosols dates back to some of the earliest LIBS contributions, the complex nature of the physical processes involved in the laser–particle interactions is not well understood [8,9]. In general, there is an upper particle size limit beyond which the particle is not completely vaporized, thus decreasing the relationship between the particle size and emission line intensity [6,10,11]. The upper size limit depends on the particle composition and on the experimental conditions (e.g., laser fluence and plasma volume), being often smaller than 10 μm [12] for attaining complete particle vaporization as well as quantitative analyte diffusion into laser-induced plasma.

Particle size distribution critically affects the performance of microanalytical methods [13] because the small mass of the test portion (e.g. 0.001–10 mg) may not represent the bulk sample composition, leading to imprecise and inaccurate results [13–15]. This holds true also for electrothermal vaporization inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ETV-ICP OES) [16], laser ablation ICP OES (LA-ICP OES) [17], LA-ICP mass spectrometry (LA-ICP-MS) [18], solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry (SS-GFAAS) [19], and micro-energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry (μ-EDXRF) [20,21].

☆ This article is dedicated to Jim Holcombe, in recognition of his academic, mentoring and scientific achievements, and his service to the spectroscopic community.

* Corresponding author. Fax: +55 19 34294774.
E-mail address: fjkrug@cena.usp.br (F.J. Krug).

http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2014.09.001
0584-8547/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Anexo B

Spectrochimica Acta Part B 74–75 (2012) 162–168

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/sab

Effects of laser focusing and fluence on the analysis of pellets of plant materials by laser-induced breakdown spectroscopy

Gabriel Gustinelli Arantes de Carvalho [a], Dario Santos Junior [b], Lidiane Cristina Nunes [a], Marcos da Silva Gomes [c], Flavio de Oliveira Leme [a], Francisco José Krug [a,*]

[a] Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Av. Centenário 303, 13416-000 Piracicaba, SP, Brazil
[b] Universidade Federal de São Paulo — UNIFESP, Campus Diadema, Rua Prof. Artur Riedel 275, 09972-270 Diadema, SP, Brazil
[c] Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luís, km 235, 13565-905 São Carlos, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 25 November 2011
Accepted 16 June 2012
Available online 26 June 2012

Keywords:
Laser-induced breakdown spectroscopy
LIBS
Plant material
Laser focusing
Fluence

ABSTRACT

The effects of laser focusing and fluence on LIBS analysis of pellets of plant leaves was evaluated. A Q-switched Nd:YAG laser (5 ns, 10 Hz, 1064 nm) was used and the emission signals were collected by lenses into an optical fiber coupled to a spectrometer with Echelle optics and ICCD. Data were acquired from the accumulation of 20 laser pulses at 2.0 μs delay and 5.0 μs integration time gate. The emission signal intensities increased with both laser fluence and spot size. Higher sensitivities for Ca, K, Mg, P, Al, B, Cu, Fe, Mn, and Zn determinations were observed for fluences in the range from 25 to 60 J cm^{-2}. Coefficients of variation of site-to-site measurements were generally lower than 10% (n = 30 sites, 20 laser pulses/site) for a fluence of 50 J cm^{-2} and 750 μm spot size. For most elements, there is an indication that accuracy is improved with higher fluences.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The determination of macro- and micronutrients in plant leaves is of key importance for the evaluation of nutritional status of plants, optimization of crop production and evaluation of fertilizer requirements [1,2].

In the last four years laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) has been evaluated in the authors' laboratory as an alternative to wet acid digestions based methods aiming at the determinations of four macronutrients (P, K, Ca and Mg) and five micronutrients (B, Fe, Cu, Mn and Zn). The analyses of plants were carried out in the form of pressed pellets (test samples) prepared from dried, ground and comminuted plant leaves (laboratory samples) [1].

The first two contributions [3,4] reported preliminary investigations, where leaves of different plant species were analyzed. The laboratory samples were comminuted by cryogenic grinding, and certified reference materials were used for building the calibration curves. Pellets were interrogated with 5 ns pulses from a Nd:YAG laser at 1064 nm by choosing the most appropriate lens-to-sample distance (LTSD) and pulse energy through univariate experiments. Chemometrics methods exploiting neuro-genetic algorithms were performed in order to optimize operational parameters (i.e. delay and integration time gate, number of accumulated laser pulses, pulse energy and LTSD) aiming at the simultaneous multi-elemental determinations [1,5], as well as calibration models based on multivariate and univariate approaches [1,6]. It was demonstrated that LIBS can fit for the intended purpose for the analysis of pellets of plant materials for the determination of macro- (P, K, Ca, Mg) and micro- (B, Cu, Fe, Mn, Zn) nutrients [1].

Validations of methods as well as establishment of boundary conditions for reducing matrix effects are however still necessary. In spite of the advantages of LIBS, difficulties have been noted for quantitative analysis, which were mainly attributed to variations in laser–sample interactions involving different matrices [4,6]. These drawbacks are related to variations in particle size distributions and particles composition, which might affect the laser ablation process (e.g. vaporization rate and atomization/excitation efficiencies) [6]. Recently, it was demonstrated that these shortcomings can be minimized by choosing calibration and validation samples with similar physical and chemical characteristics [1].

The main parameters affecting LIBS analysis of plant materials are laser intrinsic properties (e.g. wavelength, pulse duration, repetition rate, pulse energy), test sample presentation (e.g. micro-homogeneity, particle size distribution, porosity, density for the case of pellets), surrounding atmosphere (gas composition and pressure), optical design (laser focusing and collecting optics), and strategies for gathering the emission measurements (delay time, integration time gate and emission lines selection) [7,8]. For each application the experimental conditions should be carefully selected towards appropriate sensitivities, detection limits and measurements precision.

For a given laser wavelength and pulse duration, both pulse energy and LTSD affect the laser fluence and irradiance. Effects caused by

* Corresponding author.
E-mail address: fjkrug@cena.usp.br (F.J. Krug).

0584-8547/$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.sab.2012.06.012

Anexo C

Analytica Chimica Acta 876 (2015) 26–38

Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Direct determination of the nutrient profile in plant materials by femtosecond laser-induced breakdown spectroscopy

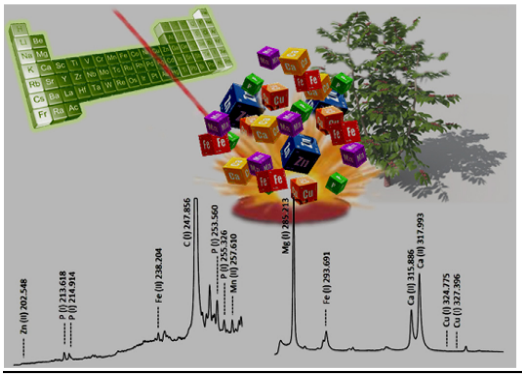
Gabriel Gustinelli Arantes de Carvalho [a], Javier Moros [b], Dário Santos Jr. [c], Francisco José Krug [a], J. Javier Laserna [b,*]

[a] University of São Paulo, NAPTISA Research Support Center "Technology and Innovation for a Sustainable Agriculture", Center for Nuclear Energy in Agriculture, Av. Centenário 303, 13416-000 Piracicaba, SP, Brazil
[b] Universidad de Málaga, Departamento de Química Analítica, E-29071 Málaga, Spain
[c] Federal University of São Paulo, Diadema, SP, Brazil

HIGHLIGHTS

- Mass fractions of nutrients in plant materials are quantified by fs- and ns-LIBS.
- Performance of univariate and multivariate modeling approaches has been compared.
- PLS models solve the non-linear relations between emissions and mass fractions.
- fs-LIBS-PLS accurately quantifies nutrient contents whatever the material matrix.
- Accuracy errors below 20% for predictions on future unknown samples are expected.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 December 2014
Received in revised form 6 March 2015
Accepted 12 March 2015
Available online 18 March 2015

Keywords:
Femtosecond laser-induced breakdown spectroscopy
Nanosecond laser-induced breakdown spectroscopy
Laser wavelength
Plant materials
Nutrients
Multivariate calibration

ABSTRACT

Femtosecond laser-induced breakdown spectroscopy (fs-LIBS) has been used for the first time for quantitative determination of nutrients in plant materials from different crops. A highly heterogeneous population of 31 samples, previously analyzed by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy, covering a wide range of matrices was interrogated. To tackle the analysis, laser-induced plasmas under argon atmosphere of pellets prepared from sieved cryogenically ground leaves were studied. Predictive functions based on univariate and multivariate modeling of optical emissions associated to macro- (Ca, Mg, and P) and micronutrients (Cu, Fe, Mn and Zn) were designed. Hierarchical cluster analysis was performed to select representative calibration (n_{cal} = 17) and validation (n_{val} = 14) datasets. The predictive performance of calibration functions over fs-LIBS data was compared with that attained on spectral information from nanosecond LIBS (ns-LIBS) operating at different wavelengths (1064 nm, 532 nm, and 266 nm). Findings established higher accuracy and less uncertainty on mass fractions quantification from fs-LIBS, whatever the modeling approach. Quality coefficients below 20% for the accuracy error on mass fractions' prediction in unknown samples, and residual predictive deviations in general above 5, were obtained. In contrast, only multivariate modeling satisfactorily handled the

* Corresponding author. Tel.: +34 952 13 1881; fax: +34 952 13 1881.
E-mail address: laserna@uma.es (J. J. Laserna).

http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.03.018
0003-2670/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.