

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

SADY LOBO ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA ANÁLISE DE FARINHAS
FUNCIONAIS POR LIBS**

VERSÃO CORRIGIDA

São Paulo

Data de Depósito na SPG:

01/06/2023

SADY LOBO ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA ANÁLISE DE FARINHAS
FUNCIONAIS POR LIBS**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
(Química)

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cassiana Seimi
Nomura

São Paulo

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

A447d Almeida, Sady Lobo
Desenvolvimento de métodos para análise de
farinhas funcionais por LIBS / Sady Lobo Almeida. -
São Paulo, 2023.
78 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de Química
Fundamental.
Orientador: Nomura, Cassiana Seimi

1. LIBS. 2. Calibração. 3. Análise direta. 4.
Farinhas funcionais. 5. Alimentos funcionais. I. T.
II. Nomura, Cassiana Seimi, orientador.

"Desenvolvimento de métodos para análise de farinhas
funcionais por LIBS"

SADY LOBO ALMEIDA

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências - no Programa de Química.

APROVADO(A) POR:

Profa. Dra. Cassiana Seimi Nomura
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. Alex Virgílio *(por videoconferência)*
CENA - USP

Prof. Dr. Sidnei Gonçalves da Silva *(por videoconferência)*
UFU

SÃO PAULO
25 de agosto de 2023

*Aos meus pais, Cleber e Synara
pelo amor, carinho, orientação,
ensinamentos, e apoio incansável.*

Dedico

*À profa. Dra. Cassiana Seimi Nomura
pela excelente orientação, paciência,
ensinamentos e confiança.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre ao meu lado me guiando, protegendo e me dando forças para enfrentar os desafios da vida.

Aos meus pais, Cleber e Synara, que tanto lutaram para me proporcionar uma boa educação, conforto e dignidade. Sou muito grato por todo o carinho, amor, paciência e inspiração. Às minhas irmãs, Emily e Stefany, pelo amor, carinho e por estarem sempre presentes.

À minha amada Jennifer, pelo companheirismo, amizade, carinho, paciência e amor. Por estar sempre presente me apoiando e incentivando, por toda a contribuição para o desenvolvimento desse trabalho.

À profa. Dra. Cassiana Seimi Nomura, pela confiança, disponibilidade, paciência, incentivos e excelente orientação. Por todos os incontáveis ensinamentos e conhecimentos compartilhados que foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho e para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo pela oportunidade e suporte concedido.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, em especial ao prof. Dr. Alex Virgílio e o prof. Dr. Fabio Rocha pela disponibilidade, apoio e valiosos ensinamentos.

Aos amigos que fazem ou fizeram parte do Grupo de Análises e Pesquisas em Espectrometria (GAPE) pelo apoio, discussões, reflexões, convívio, conhecimento compartilhado e sobretudo pela amizade.

Aos professores Dr. Jorge César Masini, Dr. Fabio Rodrigues e Dra. Silvia Helena Pires Serrano, pelas contribuições dadas ao comporem a banca de qualificação desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida (88882.328203/2010-01). À CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro.

Aos meus amigos Rafael, Paulinho, Ramon, Lino, Raniere, Victor e Avelino pela amizade sincera e por continuarem sempre presentes em minha vida mesmo com a distância.

À todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na realização desse trabalho e no meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Muito obrigado!

“O cientista não é o homem
que fornece as verdadeiras respostas;
é quem faz as verdadeiras perguntas.”

Claude Lévi-Strauss

RESUMO

ALMEIDA, Sady Lobo. **Desenvolvimento de métodos para a análise de farinhas funcionais por LIBS**. 2023. 78 p. Dissertação Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências (Química). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A farinha é um alimento consumido globalmente e é considerada base da alimentação humana e nutrição animal. Nos últimos anos, as chamadas farinhas funcionais têm despertado interesse, por trazer diversos benefícios à saúde. A crescente popularização, no entanto, requer um rigoroso controle de qualidade para efetivamente se conhecer a composição desses produtos e/ou identificar possíveis fraudes. Análise desse tipo de produto é normalmente realizada por métodos ópticos de análise após a decomposição ácida dessas amostras. Embora métodos de análise bem como de tratamento de amostra estejam muito bem estabelecidos, a possibilidade de realizar análises com mínima manipulação é sempre interessante. Nesse sentido, esse trabalho avaliou a viabilidade em empregar a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) nas análises de farinhas funcionais de aveia, amora, banana verde e espinafre. Os elementos investigados foram os Mg, Ca e K. Para confecção de pastilhas foram avaliados o uso de celulose e parafina como aglutinantes, sendo que o uso de 30% de parafina foi que possibilitou a confecção de uma pastilha mais homogênea e coesa com mínima diluição. As condições instrumentais otimizadas foram 20 mJ por pulso de laser, 35 μm de diâmetro de focalização, tempo de atraso 0,25 μs e 405 pulsos acumulados, monitorando-se as linhas Mg I 518,360, Ca 422,630 e K 766,530 nm. Visando à determinação quantitativa, estratégias de calibração foram avaliadas empregando materiais de referência certificados (CRM) de matrizes vegetais e material calibrante sintético com papel de filtro dopado (PFD): calibração por padrão externo (PE); padrão interno (PI), calibração multi-energia (MEC) e calibração por variação do número de pulsos (SRC). A exatidão foi avaliada por meio de análise de CRMs e por comparação por amostras analisadas por ICP OES após decomposição ácida. Dentre as estratégias de calibração, a calibração externa com PFDs apresentou melhores resultados (erros relativos < 15%), destacando-se pela sua simplicidade.

Palavras-chave: alimentos funcionais, farinhas funcionais, LIBS, calibração, análise direta.

ABSTRACT

ALMEIDA, Sady Lobo. **Method development for analysis of functional flours by LIBS**. 2023. 78 p. Masters Thesis – Postgraduate Program in Science (Chemistry). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo

Flour is a widely consumed food product and has been considered the basis of human and animal nutrition. In recent years, food known as functional flours have aroused interest, as they are associated with various health benefits. The growing popularity, however, requires strict quality control to effectively know the composition of these products and/or identify possible fraud. Analysis of this type of product is usually performed by optical analysis methods after the acidic decomposition of these samples. Although analytical methods as well as sample treatment are very well established, the possibility of carrying out analyzes with minimal manipulation is always interesting. In this sense, this work evaluated the feasibility of employing laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) in the analysis of oat, blackberry, green banana, and spinach flours. The investigated elements were Mg, Ca and K. For making pellets, the use of cellulose and paraffin as binders was evaluated, and the use of 30% paraffin allowed the production of a more homogeneous and cohesive pellet with minimal dilution. The optimized instrumental conditions were 20 mJ of energy by pulse, 35 μm of spot size, 0.25 μs of delay time and 405 accumulated pulses, monitoring the lines Mg I 280,310, Ca I 422.630 and K I 766.530 nm. Aiming at the quantitative determination, calibration strategies were evaluated using certified reference materials (CRM) of plant materials and synthetic calibrating material of doped filter paper (PFD): calibration by external standard (PE); internal standard (PI), multi-energy calibration (MEC) and slope ratio calibration (SRC). Accuracy was assessed by analyzing CRMs and by comparing samples analyzed by ICP OES after acid decomposition. Among the calibration strategies, external calibration with PFDs showed better results (relative errors < 15%), standing out for its simplicity.

Keywords: functional foods, functional flours, LIBS, calibration, direct analysis.

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

CRM	Material de Referência Certificado, em inglês <i>Certified Reference Material</i>
DPR	Desvio Padrão Relativo
ETV	Vaporização Eletrotérmica, em inglês <i>Electrothermal Vaporization</i>
F AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Chama, em inglês <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
GF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite, em inglês <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>
HR CS AAS	Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua, em inglês <i>High-Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry</i>
ICP-MS	Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente, em inglês <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado, em inglês <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer</i>
INAA	Análise por Ativação Neutrônica Instrumental, em inglês <i>Instrumental Neutronic Activation Analysis</i>
LA	Ablação a Laser, em inglês <i>Laser Ablation</i>
LASER	Em inglês <i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
LD	Limite de Detecção
LIBS	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Laser, em inglês <i>Laser Induced Breakdown Spectroscopy</i>
LQ	Limite de Quantificação
MASER	Em inglês <i>Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>

MEC	Calibração Multi-energia, em inglês <i>Multi-energy Calibration</i>
MIP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Micro-Ondas, em inglês <i>Microwave-Induced Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, em inglês <i>National Institute of Standards and Technology</i>
PE	Padrão Externo
PFD	Papel Filtro Dopado
PI	Padrão Interno
SBR	Razão Sinal-Sinal de Fundo, em inglês <i>Signal-to-Background Ratio</i>
SRC	Calibração por Variação do Número de Pulsos, em inglês <i>Slope Ratio Calibration</i>
SS GF AAS	Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, em inglês <i>Solid Sampling Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>
XRF	Fluorescência de Raios X, em inglês <i>X-ray Fluorescence</i>
YAG	Em inglês <i>Yttrium Aluminium Garnet</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema ilustrativo da configuração instrumental típica de um LIBS	26
Figura 2: Pastilhas prensadas com diferentes proporções de aveia e celulose (m/m): a. 0% celulose; b. 10% celulose; c. 20% celulose; d. 30% celulose	37
Figura 3: Pastilhas fabricadas com diferentes proporções de aveia e parafina (m/m): a. 0% parafina; b. 10% parafina; c. 20% parafina; d. 30% parafina.	37
Figura 4: Espectros de emissão da pastilha de aveia e parafina 30 % m/m por LIBS. Parâmetros energia 20 mJ, número de pulsos 405, tempo de atraso 0,50 μ s e diâmetro de focalização 65 μ m.	38
Figura 5: Esquema ilustrativo do sistema óptico de focalização do laser.....	40
Figura 6: Influência do diâmetro de focalização no sinal de emissão e SBR para (a) Mg (b) Ca e (c) K.....	41
Figura 7: Influência da energia do pulso de laser no sinal de emissão e SBR para (a) Mg, (b) Ca e (c) K.....	43
Figura 8: Evolução temporal do plasma em um sistema LIBS de nanosegundos.....	44
Figura 9: Influência do tempo de atraso no sinal de emissão e SBR para (a) Mg, (b) Ca e (c) K.....	44
Figura 10: Influência do número de pulsos no sinal de emissão e SBR para Mg (a), Ca (b) e K (c).	46
Figura 11: Curvas analíticas de calibração externa para Mg, Ca e K por LIBS utilizando CRMs.	48
Figura 12: Curvas analíticas de calibração com padrão interno de C I 247,780 para Mg, Ca e por LIBS utilizando CRMs.....	50
Figura 13: Ilustração da construção da MEC	52

Figura 14: Esquema preliminar para fabricação das pastilhas para MEC-LIBS.....	52
Figura 15: Curvas analíticas de calibração MEC-LIBS para Ca e Mg.....	53
Figura 16: Esquema de construção da SRC.....	54
Figura 17: Curvas analíticas de SRC-LIBS para farinha de amora (amostra) e SRM1515 (padrão).....	55
Figura 18: Curvas analíticas para Mg II 280,310, Mg I 517,235 e Mg I 580,360 nm, utilizando os PFDs.....	60
Figura 19: Curvas analíticas de calibração para Mg, Ca e K por LIBS, utilizando os padrões PFDs.....	61
Figura 20: Curvas analíticas de calibração com padrão interno para Mg, Ca e K por LIBS, utilizando os padrões PFDs.....	63
Figura 21: Curvas analíticas de calibração MEC-LIBS para Ca utilizando PFD.....	65
Figura 22: Curvas analíticas de calibração MEC-LIBS para Mg utilizando PFD, nas quais (a) são as curvas com todos os pontos da regressão e (b) curvas com pontos removidos.....	66
Figura 23: Curvas de calibração SRC-LIBS para Mg, Ca e K utilizando PFDs.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros de operação do ICP OES.....	33
Tabela 2: Concentração (média \pm desvio padrão, n=3) (mg kg ⁻¹) em SRM 1567a e amostras de farinha funcionais determinado por ICP OES.	35
Tabela 3: Análise univariada dos parâmetros instrumentais do LIBS para determinação da condição instrumental ideal.	39
Tabela 4: Matriz de dados para construção de curva de calibração externa para Ca I 422,630 nm por LIBS.	48
Tabela 5: Teores de Mg, Ca e K (média \pm desvio padrão, n=3) (mg kg ⁻¹) determinados em farinhas por PE-LIBS utilizando CRMs.....	49
Tabela 6: Teores de Mg, Ca e K (média \pm desvio padrão, n=3) (mg kg ⁻¹) determinados em farinhas por PI-LIBS utilizando CRMs.	51
Tabela 7: Teores de Mg e Ca determinados em SRM 3234 (média \pm desvio padrão, n=3) (mg kg ⁻¹) por MEC-LIBS.....	54
Tabela 8: Teores de Mg, Ca e K (média \pm desvio padrão, n=3) (mg kg ⁻¹) determinados em matrizes vegetais por SRC-LIBS.....	57
Tabela 9: Teores de Mg, Ca e K nos padrões de papéis dopados determinados por ICP OES após digestão ácida assistida por micro-ondas.	59
Tabela 10: Teores de Mg, Ca e K (média \pm desvio padrão, n=3) (mg kg ⁻¹) determinados em farinhas por LIBS utilizando PFDs como padrões.	61
Tabela 11: Teores de Mg, Ca e K (média \pm desvio padrão, n=3) (mg kg ⁻¹) determinados em farinhas por LIBS empregando calibração com PFDs e normalização com padrão interno.	64

Tabela 12: Teores de Mg e Ca (média \pm desvio padrão, n=3) (mg kg^{-1}) determinados em farinhas por MEC-LIBS utilizando PFDs como padrões.....	67
Tabela 13: Parâmetros das regressões lineares SRC-LIBS para Mg, Ca e K utilizando PFDs como materiais calibrantes.....	68
Tabela 14: Teores de Mg, Ca e K (média \pm desvio padrão, n=3) (mg kg^{-1}) determinados em farinhas por SRC-LIBS utilizando PFDs como padrões.	69

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1. História da farinha.....	21
2.2. Alimentos Funcionais.....	22
2.3. Determinação elementar em alimentos por técnicas espectroscópicas	24
2.4. Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS)	25
2.5. Estratégias de calibração	27
3. OBJETIVOS.....	30
4. PARTE EXPERIMENTAL	31
4.1. Instrumentação	31
4.2. Reagentes e materiais	31
4.3. Procedimento.....	32
4.3.1. Preparo inicial das amostras	32
4.3.2. Decomposição ácida assistida por micro-ondas.....	32
4.3.3. Determinação multielementar por ICP OES para estabelecimento do valor de referência.....	33
4.3.4. Fabricação das pastilhas	33
4.3.5. Fabricação dos papéis filtro dopados	34
4.3.6. Medições por LIBS	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. Estabelecimento dos valores de referência	35
5.2. Fabricação das pastilhas prensadas.....	36
5.3. Identificação e escolha das linhas de emissão espectrais.....	38
5.4. Otimização dos parâmetros instrumentais do LIBS	39
5.4.1. Otimização do diâmetro de focalização	40
5.4.2. Otimização da energia do pulso	42
5.4.3. Otimização do tempo de atraso.....	44

5.4.4. Otimização do número de pulsos	46
5.5. Avaliação de estratégias de calibração visando análise por LIBS	47
5.5.1. Calibração por padrão externo	47
5.5.2. Calibração com padrão interno.....	49
5.5.3. Calibração multi-energia.....	51
5.5.4. Calibração por variação do número de pulsos	54
5.5.5. Papéis filtro dopados	58
5.5.6. Calibração por padrão externo utilizando PFDs	59
5.5.7. Calibração com padrão interno utilizando PFDs.....	62
5.5.8. Calibração multi-energia utilizando PFDs.....	64
5.5.9. Calibração por variação do número de pulsos utilizando PFDs	67
6. CONCLUSÕES	70
7. REFERÊNCIAS.....	72

1. INTRODUÇÃO

A farinha é um alimento consumido globalmente, sendo considerada base da alimentação humana e nutrição animal. Nos últimos anos, novos tipos de farinhas que se enquadram dentro da classe de alimentos denominados funcionais têm despertado grande interesse, principalmente devido aos benefícios à saúde aos quais esses alimentos estão relacionados. Além das funções nutricionais básicas, as farinhas funcionais podem desempenhar um importante papel na redução do risco de diversas doenças, por produzirem efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde.

A crescente popularização e utilização das farinhas funcionais torna necessário o desenvolvimento de métodos de análises que permitam a determinação elementar desses alimentos, cujas informações são essenciais para a implementação de dietas além de ser parâmetros importantes para o controle de qualidade e certificar que o seu consumo é seguro para humanos e animais. Esse tipo de análise é comumente realizado por métodos espectrométricos como a espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) ou com forno de grafite (GF AAS), e a espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Em geral, essas análises requerem a conversão de amostras em solução por meio de decomposições ácidas que conta como principais desvantagens, o elevado gasto de reagentes, geração de resíduo, tempo e riscos de inserção de erros devido à elevada manipulação. Nesse sentido, métodos que possibilitem a realização de análise direta com mínima manipulação podem ser uma boa alternativa.

Um método relativamente novo, atrativo e promissor que possibilita a análise direta de amostras sólidas é a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS). Esse método apresenta como características a simplicidade, o requerimento de pouca ou nenhuma manipulação da amostra, elevada frequência analítica, capacidade multielementar, além de dispor de instrumentos portáteis possibilitando análises in situ e remota. Apesar disso, LIBS apresenta desafios que precisam ser superados para tornar-se competitivo. A realização de análises quantitativas em matrizes complexas ainda é considerada o "calcanhar de Aquiles" desse método devido aos fortes efeitos de matriz causados pelos complexos processos de interação laser-amostra. Nesse aspecto, o uso de adequadas estratégias de calibração e otimização dos parâmetros instrumentais são imperativos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. História da farinha

A farinha está presente na história do homem há milhares de anos. As primeiras evidências arqueológicas datam de 6000 anos a. c., quando nossos ancestrais descobriram que poderiam triturar sementes e grãos com simples instrumentos de pedra. As farinhas eram mais facilmente transportadas, armazenadas e convertidas em outros alimentos. Nossos antepassados levariam mais alguns milhares de anos para aprimorar o processo de moagem desses grãos, os quais eram moídos a mão em pequenas quantidades e passariam a ser processados em moinhos maiores e mais engenhosos, começando pelos Romanos, os quais foram os primeiros a triturar grandes quantidades de cereais, em especial o milho, em enormes moinhos cônicos movidos por pessoas ou animais (FLOURWORLD MUSEUM WITTENBURG, 2017).

Um grande desafio desde os primórdios da fabricação da farinha é a sua preservação, pois o processo de degradação natural acabava dificultando o transporte e o armazenamento por longos períodos. O principal motivo dessa rápida degradação natural é a oxidação das gorduras insaturadas pela ação do oxigênio molecular, conferindo ao alimento sabores, odores e colorações indesejadas, processo também conhecido como rancificação (DORMANDY, 1969). Com a modernização do processo de fabricação da farinha e a introdução do moinho de rolos em 1870, viabilizou um maior refinamento das farinhas, trazendo melhorias significativas, na cor, textura e tempo de prateleira (WILDER, 1956). As farinhas refinadas são amplamente utilizadas para melhorar atributos visuais, gustativos e aumentar o tempo de prateleira dos produtos. Entretanto, esse processo de refino, em alguns casos, acaba por remover a maioria das partes externas do grão, como a casca e o germe, ricos em ácidos graxos, vitaminas e minerais, resultando em um alimento menos nutritivo e ocasionando diversas deficiências e doenças em populações que utilizam essa farinha como a base da sua alimentação (WILDER, 1956). Uma estratégia para a remediação desse problema é o enriquecimento das farinhas refinadas, com intuito de reduzir deficiências nutricionais que afetam grande parte da população. No Brasil, as farinhas de trigo e milho, diariamente presentes na dieta de grande parte da população, são obrigatoriamente enriquecidas com ácido fólico e ferro, estratégia implementada pelo

Ministério da Saúde em 2012 para diminuir a ocorrência de má formação em bebês durante o período gestacional e prevenir anemias (ANVISA, 2021). Apesar da estratégia de enriquecimento, outros nutrientes perdidos no processo de refino dessas farinhas acabam não sendo repostos na alimentação diária do brasileiro. A busca por uma melhor qualidade de vida e dietas mais saudáveis, tem direcionado pessoas a implementar em suas dietas alimentos denominados funcionais (BIGLIARDI; GALATI, 2013).

2.2. Alimentos Funcionais

Alimentos funcionais são alimentos ou ingredientes que, além de suas funções nutricionais básicas, produzem efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde, podendo desempenhar um importante papel na redução do fator de risco a doenças (MORAES, 2006; CARDOSO, 2008). As propriedades funcionais estão diretamente relacionadas a substâncias bioativas nutrientes ou não nutrientes que possuem ações fisiológicas ou metabólicas específicas no organismo humano (ANVISA, 2021). São exemplos de substâncias bioativas não nutrientes: as isoflavonas, que possuem ação estrogênica e anticâncer, presente em soja e derivados; as catequinas, que reduzem a incidência de certos tipos de câncer, reduzem o colesterol e estimulam o sistema imunológico, presentes em cerejas, amoras entre outros; e os flavonóides, associados a ações anti-inflamatórias, antioxidantes e anticâncer, existentes em frutas cítricas, pimentão e outros alimentos (ANVISA, 2009). Os nutrientes bioativos, como as vitaminas e minerais, desempenham um importante papel em manter as funções normais do corpo, principalmente no que diz respeito a mecanismos metabólicos e são essenciais ao organismo humano (ANVISA, 2021).

O cálcio, considerado um mineral essencial à saúde humana, pode ser encontrado em concentrações significativas em verduras de folhas escuras como o espinafre, amêndoas e frutas secas (BONJOUR, 2009). É um importante nutriente constituinte dos ossos e dentes, regulador das funções nervosas e musculares, e responsável por ajudar no transporte de nutrientes através das membranas celulares (SOETAN, 2010). O magnésio é também um importante constituinte dos dentes e ossos, sua deficiência está relacionada a desordens físicas e mentais, calcificação das artérias, colesterol elevado, pressão alta, derrames e infartos. Vegetais verdes,

soja, gérmen de trigo, nozes, grãos e sementes são os principais alimentos fontes de Mg e devem estar presentes aos hábitos alimentares para evitar seu déficit (CAMPBELL, 2001). O potássio é um outro exemplo de nutriente bioativo, desempenha importante papel na contração muscular, condução do impulso nervoso, equilíbrio acidobásico corporal e pressão osmótica dos fluídos corporais. O potássio pode ser encontrado principalmente em frutas e vegetais e sua deficiência está relacionada a fraqueza muscular, confusão mental, dores de cabeça, arritmias cardíacas e dificuldades na motilidade gastrointestinal (SOETAN, 2010).

As farinhas obtidas a partir de alimentos funcionais ou simplesmente farinhas funcionais, são produtos alimentícios promissores, tanto no âmbito do enriquecimento de farinhas comuns, quanto no preparo de novos alimentos, principalmente devido à grande gama de benefícios à saúde que esses produtos podem proporcionar. A utilização das farinhas funcionais na fabricação dos diversos alimentos permite aos produtores criarem produtos específicos para o tratamento ou prevenção de determinadas doenças, ou ainda melhorarem as características químicas e nutricionais dos produtos já estabelecidos, como é o caso dos pães funcionais que possuem maiores teores de vitaminas e minerais (LOBANOV , 2018). Uma outra aplicação das farinhas funcionais é na suplementação de Ca para intolerantes a lactose e/ou vegetarianos, que pode ser feita inserindo a farinha de espinafre em preparos de sucos, sopas e outros. A farinha de espinafre apresenta em média 0,9% m/m de Ca em sua composição, o que faz com que apenas 115g de farinha seja suficiente para suprir a ingestão diária de cálcio recomendada para um adulto (1000 mg) (ANVISA, 2005).

De acordo com a ANVISA (2019), as alegações de propriedades funcionais devem ser baseadas em estudos científicos e ensaios clínicos que demonstrem de forma consistente a veracidade dos efeitos benéficos à saúde associada a esses alimentos. De forma geral, os alimentos ditos como funcionais devem ser comprovadamente seguros para o consumo humano, devendo ser consumidos como parte de uma dieta usual e balanceada, respeitando-se sempre as recomendações do fabricante e os limites máximos de consumo (CARDOSO, 2008).

2.3. Determinação elementar em alimentos por técnicas espectroscópicas

Informações sobre a composição elementar em alimentos é extremamente importante tanto para os consumidores quanto para os profissionais da saúde, pois os dados obtidos permitem a correta implementação desses alimentos na dieta humana, determinam a sua segurança alimentar e são parâmetros importantes para o seu controle de qualidade. Os minerais contidos nos alimentos são fundamentais na nutrição humana, necessários para a manutenção de diversas funções corporais e decisivos para o seu desenvolvimento, entretanto alguns deles podem ser nocivos à saúde mesmo em baixas concentrações (MARKIEWICZ-KESZYCKA, 2017). Os alimentos contêm diversos minerais em sua composição e são classificados em macro e microelementos dependendo de sua concentração, no primeiro grupo estão os elementos Ca, Mg, Cl, S, P, C, K e Na, no segundo grupo estão os microelementos, presentes normalmente em concentrações abaixo de 50 ppm, são eles: Fe, Cu, I, Co, Mn, Zn, Cr, Ni, Si, F, Mo e Se classificados como elementos essenciais, Al, B e Sn classificados como não-tóxicos e não-nutritivos e os elementos tóxicos Hg, Pb, As, Cd e Sb (RUZIK, 2012).

Diversas técnicas analíticas são utilizadas para análise de alimentos, dentre elas destacam-se as espectroquímicas, devido a sua alta seletividade e sensibilidade. Os principais métodos espectroscópicos empregados para a determinação elementar em alimentos são: a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) e a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) (KORN, 2008). Os alimentos em geral são considerados matrizes complexas e normalmente requerem uma extensiva etapa de preparo de amostras, normalmente envolvendo dissoluções ácidas, e/ou regimes de extração antes de serem introduzidas nos equipamentos que conduzirão a análise, essas etapas normalmente envolvem quantidades significativas de reagentes, geram resíduos, são caras e consomem muito tempo (KORN, 2008). Entretanto, os recorrentes avanços nas últimas décadas tem melhorado significativamente os métodos de preparo de amostras, dentre elas pode-se citar a digestão ácida assistida por micro-ondas, que possibilita tempos de digestão mais curtos e uma quantidade menor de reagentes agressivos para atingir uma digestão completa (KORN, 2008; Wang, 2004).

Ainda assim, a possibilidade de minimizar a manipulação da amostra parece ser vantajosa. É o caso dos métodos de análises diretas, que necessitam de pouco ou nenhum tratamento prévio da amostra, reduzindo consideravelmente o tempo gasto para análise; geram menos resíduos e apresentam menores riscos aos analistas, por dispensarem o uso de reagente tóxicos ou corrosivos; requerem pequena quantidade de amostra; e, em alguns casos, a possibilidade da miniaturização e portabilidade de instrumentos, viabilizando análise em campo (KRUG, 2010; PASQUINI, 2007). Dentre os métodos analíticos que possibilitam a análise direta de sólidos, destacam-se a espectrometria de fluorescência de raios X (XRF), muito utilizada em laboratórios de metalurgia ou análises geológicas; análise por ativação neutrônica instrumental (INAA); a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite e amostragem direta de sólidos (SS GF AAS); e ICP OES e a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) que podem ser combinadas com dispositivos de introdução de amostras sólidas como a ablação por laser (LA) e vaporização eletrotérmica (ETV) para possibilitar análises diretas (KORN, 2008). Um método analítico relativamente novo e que vem atraindo a atenção da comunidade científica mundial por se mostrar promissora no âmbito de análise direta é a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS).

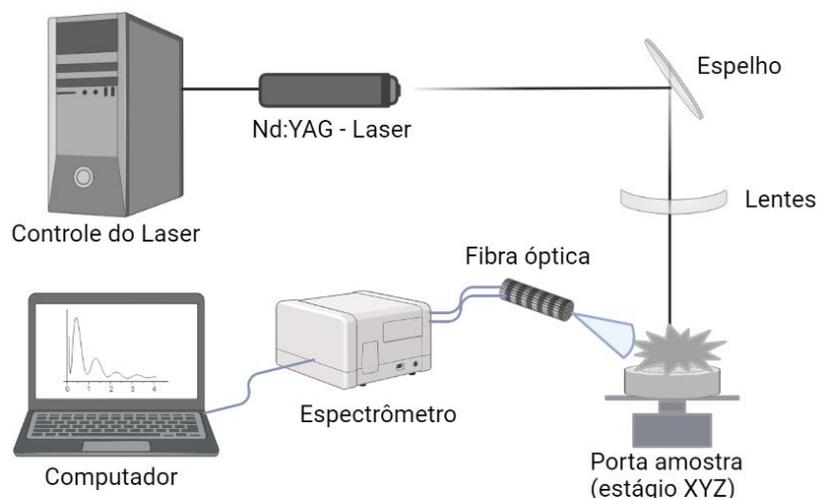
2.4. Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS)

Os primórdios da LIBS estão relacionados com os fundamentos teóricos da emissão estimulada, proposta por Albert Einstein em 1917. Embasados nesses fundamentos, Charles Townes e Arthur Schawlow desenvolveram estudos sobre a amplificação de ondas eletromagnéticas e criaram em 1958 o que chamaram de *microwave amplification by stimulated emission of radiation* (MASER), considerada a tecnologia precursora para o desenvolvimento do primeiro laser (acrônimo inglês para *light amplification by stimulated emission of radiation*). Dois anos depois, Theodore Maiman construiu o primeiro laser, utilizando um bastão de rubi coberto com camadas de prata no interior de uma lâmpada, onde um dos lados permitia a passagem da radiação. Nesse mesmo período, vários outros lasers foram desenvolvidos utilizando diversos materiais e dentre eles destacou-se o produzido com o íon Nd^{3+} imerso em uma solução de granada de ítrio-alumínio (Nd:YAG), pois apresentava maior estabilidade e resistência. Logo após a invenção do laser, Brech e Cruz publicaram o

primeiro relatório sobre a indução de um plasma sobre a amostra gerado por laser, o qual teve o seu primeiro uso analítico para a análise espectrofotométrica de superfícies por Debras-Guedon e Liodec em 1963. Os primeiros instrumentos comerciais que exploravam a LIBS foram comercializados na década de 70, entretanto, o alto custo dos equipamentos e o baixo desempenho analítico resultaram num rápido declínio do interesse científico e comercial. Foi apenas na década de 80, com o desenvolvimento de lasers mais baratos, robustos e compactos que o interesse por LIBS voltou a florescer. O avanço tecnológico dos componentes ópticos e eletrônicos permitiu a miniaturização da instrumentação, possibilitando a realização de análises em campo e o desenvolvimento da análise direta em diversas aplicações (RADZIEMSKI & CREMERS, 2013; COSTA, 2019; SILVESTRE, 2017).

LIBS consiste em uma fonte de laser focalizada por lentes que emite pulsos de alta energia diretamente na amostra, produzindo um plasma em altas temperaturas (10.000-20.000 K). O plasma é composto por uma mistura de átomos, íons, moléculas e elétrons provenientes do material analisado. Esse material é excitado para níveis de maior energia e ao retornar ao estado fundamental emite radiação em comprimentos de onda característicos dos elementos presentes na amostra. Parte dessa radiação emitida é coletada por um sistema óptico conectado a um espectrômetro, onde será separada em diversos comprimentos de onda e direcionada para um detector, como demonstrado na Figura 1 (COSTA, 2019; MARKIEWICZ-KESZYCKA, 2017).

Figura 1: Esquema ilustrativo da configuração instrumental típica de um LIBS



Criado com: BioRender.com

LIBS apresenta aspectos muito desejados em âmbitos analíticos: é um equipamento com estrutura operacional simples e versátil, requer pouca ou nenhuma manipulação da amostra, apresenta elevada frequência analítica, é pouco destrutiva (análise requer poucos μg de amostra), possui caráter multielementar e pode ser um equipamento portátil e, portanto, ser utilizado em análises em campo e monitoramento a distância (COSTA, 2019). Ela tem sido bastante explorada nos últimos dez anos, demonstrando um crescente avanço em diversas áreas de aplicações como: agricultura, ambiental, biológica, farmacêutica, forense, metalúrgica, resíduos eletrônicos e em destaque a área de alimentos, na qual tem se mostrado uma ferramenta promissora no estudo de uma ampla variedade de aspectos composicionais (COSTA, 2019; SEZER, 2017). Pesquisas recentes mostram que existe um crescente interesse da utilização da LIBS na análise de alimentos, principalmente devido a sua versatilidade e às diversas vantagens que esse método oferece, demonstrando grande capacidade na análise componentes (macro e microelementos), contaminantes e na detecção de adulterantes (SEZER, 2017).

Assim como qualquer método analítico, a LIBS também apresenta dificuldades. A maior delas é, sem dúvida, a realização de análises quantitativas em matrizes complexas, devido principalmente aos fenômenos de interação do laser com a amostra, que envolve complexos processos ainda não completamente entendidos e que usualmente acarretam fortes efeitos de matriz (PASQUINI, 2017; SEZER, 2007). A pequena massa requerida para análise, a heterogeneidade intrínseca das amostras sólidas e os efeitos de matriz relacionados aos complexos processos da interação laser e matéria, tornam as análises quantitativas por LIBS o seu “calcanhar de Aquiles”. Entretanto, esses desafios podem ser contornados por meio da otimização dos parâmetros instrumentais, tais como a energia do pulso de laser, tempo de atraso, diâmetro de focalização e número de pulsos; correta escolha dos materiais calibrantes; e uso de estratégias de calibração adequadas.

2.5. Estratégias de calibração

As estratégias de calibração são baseadas em relações matemáticas entre a concentração/quantidade do analito e a resposta do instrumento. Usualmente as calibrações envolvem um ou mais padrões analíticos e suas respectivas respostas instrumentais, que são utilizadas para a construção de um modelo preditivo que tem

como objetivo a determinação de quantidades desconhecidas do analito em uma amostra. (CARTER, 2018). Existem diversas estratégias de calibrações, dentre elas as clássicas, como a calibração com padrão externo, padrão interno, adição de padrão e compatibilização de matriz. Dentre estas, a calibração por padrão externo (PE) é uma das mais utilizadas nas análises espectroquímicas instrumentais por ser um método simples, que se baseia na comparação dos sinais analíticos dos padrões de calibração e da amostra. Esta estratégia de calibração possui essa denominação pois os padrões utilizados são externos à amostra e assume-se que efeitos de matriz são inexistentes ou que possuem baixíssimo impacto no sinal analítico. (CARTER, 2018; SKOOG, 2002).

Em métodos de análise direta, como o LIBS, é comum o uso de materiais de referência certificado (CRM) de matriz para a construção da curva de calibração. Entretanto, como há necessidade de ter ao menos 3 CRMs, essa estratégia, muitas vezes, é inviabilizada. Somado a isso, os pronunciados efeitos de matriz inviabilizam a utilização dessa estratégia.

Uma alternativa interessante que visa contornar os efeitos matriz e melhorar a precisão e exatidão do método é a realização da calibração por adição de padrão, que é muito aplicada a análises por LIBS. Ela se baseia na adição de quantidades crescentes de analito na matriz da amostra, o que a torna trabalhosa com gasto de elevadas quantidades de amostra (CARTER, 2018; BABOS, 2019; COSTA, 2021). É comum também a calibração por compatibilização de matriz no qual adiciona-se concomitantes sobre as soluções ou padrão de calibração.

Outra forma é o preparo de materiais sintéticos, por exemplo, por meio de adição de analitos em algum suporte sólido. Dentre essas estratégias destacam-se polímeros impregnados com Ba, Cd, Cr e Pb para a análise de brinquedos (GODOI, 2009); uso de cápsulas multivitamínicas misturadas com celulose em diferentes proporções visando à determinação de macro e micronutrientes nos suplementos (CARVALHO, 2010); uso da cerâmica impregnada com Cd e Pb nas análises de solos e sedimentos por SS-GF AAS (PORCIONATO, 2010); e o uso de papel de filtro impregnado com massas crescentes de Cu e Zn como material para calibração de SS-GF AAS para análises de plantas (NOMURA, 2008).

A calibração por padrão interno (PI) também é muito empregada em métodos analíticos multi elementares. Ela é baseada na normalização do sinal do analito na amostra, nos padrões e no branco, pelo sinal do padrão interno escolhido. Utiliza-se então a razão do sinal analito/padrão interno para construção da curva de calibração. O padrão interno escolhido idealmente deve sofrer os mesmos processos que o analito durante a análise instrumental.

Uma estratégia de calibração apresentada mais recentemente é a calibração multi-energia MEC (*do inglês*, multi-energy calibration), que vem sendo aplicado com êxito na espectrometria de absorção e emissão atômica (VIRGÍLIO, 2017). Diferente dos métodos tradicionais de calibração que usam diferentes concentrações do analito em uma região específica do espectro, a MEC utiliza as respostas instrumentais obtidas em diferentes regiões do espectro de apenas um padrão analítico (BABOS, 2018). Um dos principais atrativos da MEC é a preparação de apenas duas soluções, uma contendo uma mistura de amostra e padrão (S1) e a outra contendo amostra e branco (S2). A concentração desconhecida do analito na amostra pode ser determinada por meio de uma regressão linear construída com os sinais analíticos de S1 no eixo x e S2 no eixo y em diferentes comprimentos de onda (BABOS, 2018; VIRGÍLIO, 2017).

Outra nova estratégia é a calibração por variação do número de pulsos SRC (*do inglês Slope Ratio Calibration*) que se destaca pela sua simplicidade, necessitando apenas de um padrão de calibração. Foi recentemente aplicada com sucesso na determinação elementar quantitativa de materiais de origem vegetal (NUNES, 2019) e amostras de lodo (THIENGO, 2023) por LIBS. A SRC é baseada na proporcionalidade entre o sinal de emissão dos analitos e a quantidade de massa ablada da amostra. O aumento do número de pulsos acumulados resulta em uma maior massa ablada da amostra e, conseqüentemente, em um maior sinal de emissão dos analitos. Esse método requer a construção de dois modelos lineares, um para amostra e outro para o padrão. Os modelos são construídos pela variação do número de pulsos (eixo x) e o sinal dos analitos (no eixo y). As concentrações desconhecidas dos analitos são determinadas pela razão dos coeficientes angulares dos modelos lineares da amostra e padrão.

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar a aplicabilidade do LIBS na determinação quantitativa direta de macro elementos em farinhas funcionais. Para isso, foi avaliada a influência das condições instrumentais na aquisição do sinal analítico bem como avaliar diferentes estratégias de calibração, tais como a calibração por padrão externo, calibração com padrão interno, calibração multi-energia e calibração por variação do número de pulsos empregando materiais de referência certificados de matriz assim como papel de filtro impregnado com os analitos. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos por métodos clássicos de análise envolvendo decomposição ácida seguida da quantificação por ICP OES.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Instrumentação

As pesagens dos materiais foram feitas em balança analítica (Mettler Toledo, São Paulo, Brasil). O procedimento de secagem foi realizado em estufa modelo 317M-TIMER (Quimis, Diadema, Brasil). Um moinho criogênico modelo MA 775 (Marconi, Piracicaba, Brasil) foi empregado para a moagem dos materiais.

A decomposição ácida dos materiais foi realizada em forno micro-ondas de alta pressão (UltraWave Single Reaction Chamber Microwave Digestion System (MILESTONE)). As determinações elementares dos materiais submetidos a decomposição ácida assistida por micro-ondas foram realizadas por um espectrômetro de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES, ICAP 7400, Dual optical emission spectrometer, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Foi utilizado um espectrômetro de emissão ótica com plasma induzido por laser, modelo J200 Tandem (Applied Spectra, EUA) com laser operando no comprimento de onda de 266 nm, com feixe de 4 mm de diâmetro, energia máxima de 25 mJ por pulso com duração de 6 ns e capacidade de operar com taxa de repetição de até 10 Hz. As medidas de emissão foram obtidas por um espectrômetro com seis canais CCD (Applied Spectra, Fremont, EUA) com cobertura espectral de 186,132 a 1044,359 nm e um tempo fixo de integração de 1,05 ms. Para o preparo das pastilhas prensadas foi utilizada uma prensa hidráulica automática com controle de tempo e pressão (X-Press 3635, Spex Sampleprep, Reino Unido).

4.2. Reagentes e materiais

Quatro amostras de farinhas funcionais foram adquiridas em lojas da cidade de São Paulo: amora, aveia, banana verde e espinafre. Uma balança analítica foi utilizada para pesagem dos materiais e reagentes. Durante os procedimentos foram utilizadas pipetas de volume variável modelo Reserach Plus (Eppendorf, Alemanha). Para a digestão ácida assistida por micro-ondas dos materiais foram utilizados HNO_3 e H_2O_2 (Merck, Alemanha). As soluções provenientes da digestão foram armazenadas em tubos de falcon de 15 mL (Sarstedt, Alemanha). As soluções analíticas de calibração para uso no ICP OES foram preparadas pela diluição de soluções estoque

mono elementares 1000 mg L⁻¹ de Ca, Mg, K, P, S, Mn, Fe, Cu, Mo, Zn, e Se (Merck, Alemanha; Specsol, Brazil). As soluções foram preparadas empregando-se água deionizada proveniente de sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, EUA). O material SRM 1567a (farinha de trigo) foi utilizado para validação do método por ICP OES.

Para o preparo das pastilhas prensadas foram utilizados dois aglutinantes de alta pureza: Celulose pulverizada (3642 Cellulose Binder, Spex SamplePrep PrepAid™, EUA) e parafina (3646 Paraffin Binder, Spex SamplePrep PrepAid™, EUA). Os CRMs SRM 1573a folhas de tomateiro, SRM 1515 folhas de macieira, SRM 1547 folhas de pessegueiro, SRM 1575a folhas de pinheiro e SRM 3234 farinha de soja (NIST, EUA) foram utilizados para a avaliação das estratégias de calibração do método LIBS.

Para a confecção do padrão de calibração sintético foram usados papéis de filtro qualitativos de 0,8 g e 125 mm de diâmetro (Fitec Filtros, Jandira, São Paulo) que foram impregnados com soluções preparadas com Mg(NO₃)₂, Ca(NO₃)₂ e KNO₃ (Merck, Alemanha).

4.3. Procedimento

4.3.1. Preparo inicial das amostras

As amostras de farinhas funcionais foram inicialmente transferidas das suas embalagens comerciais para recipientes plásticos previamente descontaminados e posteriormente foram secas à 70°C até massa constante em estufa. Em seguida, as amostras foram submetidas a um processo de moagem com auxílio de um moinho criogênico com programa de 20 Hz de oscilação, 5 min de pré-congelamento, 3 ciclos de 2 minutos de moagem e 1 min de congelamento entre moagens.

4.3.2. Decomposição ácida assistida por micro-ondas

As amostras de farinhas funcionais e o CRM SRM1567a foram submetidos ao processo de decomposição ácida assistida por micro-ondas para posterior determinação multielementar por ICP OES. Para o procedimento de digestão, foram pesados 250 mg dos materiais (em triplicata) e a eles foram adicionados 6 mL de HNO₃ 20% (v v⁻¹) e 2 mL de H₂O₂ 30% (v v⁻¹). As misturas foram transferidas para

frascos fechados de TFM® e foram submetidas ao seguinte programa de aquecimento no forno de micro-ondas: (1) temperatura ambiente até 120°C em 5 min, (2) 120°C por 2 min, (3) 120-230°C em 5 min e (4) 230°C por 15 min. Após resfriamento, as misturas foram transferidas para tubos de Falcon e avolumadas para 14 mL.

4.3.3. Determinação multielementar por ICP OES para estabelecimento do valor de referência

Para a análise por ICP OES, primeiramente foram construídas curvas de calibração por meio da diluição de soluções padrão estoque dos seguintes íons em meio a 1% de HNO₃ v/v nas faixas: 1,5-300,0 mg/L para K⁺, 0,5-100,0 mg/L para Ca²⁺, 0,25-50 mg/L para Mg²⁺, P⁵⁺ e S⁶⁺, 0,05-10,00 mg/L para Fe³⁺, 5,0-100,0 µg/L para Zn²⁺ e Mn²⁺, 1,0-200,0 µg/L para Cu²⁺ e 0,5-100 µ/L para Mo⁶⁺. Os valores de referência das amostras foram determinados por ICP OES, após passarem pelo procedimento de decomposição ácida assistida por micro-ondas. As linhas de emissão (nm) monitoradas e o modo de visão radial ou axial foram: Mg (II) 285.213 (radial), K (I) 769.896 (radial), Ca (I) 422.673 (radial), P (I) 213.618 (radial), S (I) 182.034 (radial), Mn (II) 257.610 (radial), Fe (II) 259.940 (radial) e Zn (I) 213.856 (axial).

Tabela 1: Parâmetros de operação do ICP OES

Potência de radiofrequência	1,20 kW
Vazão do gás do plasma	12,0 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	0,5 L min ⁻¹
Taxa de nebulização	0,6 L min ⁻¹
Vazão da amostra	1,5 L min ⁻¹
Número de replicatas	3

4.3.4. Fabricação das pastilhas

Para a fabricação das pastilhas a serem analisadas por LIBS foram pesadas misturas de material e aglutinante. Parafina e celulose foram individualmente testados como aglutinantes e misturados em diferentes proporções à amostra. A massa de 500 mg da mistura foi mantida constante e variou-se a massa de amostra (500, 450, 400 e 350 mg) e a massa de aglutinante (0, 50, 100 e 150 mg). As misturas foram homogeneizadas com o auxílio de almofariz e pistilo, e foram submetidas a uma

pressão de 8 ton/cm² durante 3 minutos utilizando uma prensa hidráulica. As pastilhas apresentaram dimensões próximas de 13 mm de diâmetro e 3 mm de espessura.

4.3.5. Fabricação dos papéis filtro dopados

O material calibrante sintético foi fabricado utilizando papéis filtro e uma solução de dopagem contendo íons de Mg, Ca e K. A solução estoque foi preparada pela dissolução dos sais Mg(NO₃)₂, Ca(NO₃)₂ e KNO₃ em HNO₃ 2% (v v⁻¹), partindo dessa solução foram feitas diluições e um branco contendo apenas a solução de HNO₃ 2% (v v⁻¹). Os papéis filtros foram então dopados com 1 mL das soluções preparadas pela diluição da solução estoque e posteriormente foram secos em estufa a 60°C até a massa constante. Após secagem, os papéis dopados foram moídos em moinho criogênico. Para confirmar suas concentrações reais devido à higroscopicidade, os papéis dopados foram analisados por ICP OES (item 4.3.3). Para análise por LIBS, papel de filtro impregnado foi prensado em forma de pastilha com auxílio de uma prensa hidráulica a uma pressão de 8 ton cm² durante 3 minutos.

4.3.6. Medições por LIBS

O procedimento para as análises em LIBS foi iniciado com a inserção das amostras e/ou padrões na câmara ablação equipada com motores de estágios XYZ para efetuar a movimentação destas em relação ao feixe de laser fixo. As medidas de LIBS foram realizadas com velocidade de deslocamento horizontal de 0,15 mm s⁻¹ e uma taxa de repetição de 10 Hz no modo de pulsos em linha (raster), neste modo o sistema dispara continuamente uma série de pulsos de laser ao longo de um caminho de tamanho pré-definido, de modo que o espectro de emissão obtido é um acumulado de medidas resultante da soma das intensidades de emissão de cada pulso. As medidas foram realizadas em triplicata, logo três linhas de ablação paralelas entre si foram criadas na superfície das pastilhas. As medidas se baseiam nas áreas dos picos após subtração do sinal de fundo.

A amostra de farinha de aveia foi utilizada para a realização de estudos preliminares para avaliar o comportamento dos materiais nas análises por LIBS. Os parâmetros instrumentais utilizados foram: diâmetro de focalização de 65 µm, energia de 20 mJ por pulso, tempo de atraso de 0,50 µs e 405 pulsos (por replicata). Os espectros obtidos foram analisados utilizando o software Clarity (Applied Spectra,

EUA) e a base de dados do NIST para identificação das linhas de emissão atômicas (I) e iônicas (II), integração do sinal analítico e processamento de dados. O software OriginPro versão 2022b (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) foi utilizado para tratamento de dados, construção de gráficos e regressão linear.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estabelecimento dos valores de referência

Os valores de referência dos analitos foram estabelecidos após decomposição ácida e análise por ICP OES. Os resultados obtidos para as amostras bem como para o SRM 1567a estão apresentados na Tabela 2. Os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com as equações 1 e 2, nas quais S_b representa o desvio padrão do branco e S a sensibilidade do método. O erro relativo foi calculado pela equação 3, no qual \bar{x} representa a média das replicatas e x_v o valor verdadeiro ou referência.

$$\text{Equação 1: } LD = 3 \frac{S_b}{S}$$

$$\text{Equação 2: } LQ = 10 \frac{S_b}{S}$$

$$\text{Equação 3: } \textit{Erro relativo} (\%) = 100 * \frac{(\bar{x} - x_v)}{x_v}$$

Tabela 2: Concentração (média \pm desvio padrão, n=3) (mg kg^{-1}) em SRM 1567a e amostras de farinha funcionais determinado por ICP OES.

SRM 1567a						
Elemento	Certificado	Encontrado	Erro(%)	DPR(%)	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Mg	400 \pm 20	392 \pm 10	2	3	3,1	10,3
K	1330 \pm 30	1314 \pm 44	1	3	253,7	845,7
Ca	191 \pm 4	189 \pm 9	1	0	5,2	17,5
P	1340 \pm 60	1340 \pm 32	0	0	12,2	40,6
S	1650 \pm 20	1568 \pm 42	5	3	53,8	179,3
Mn	9,4 \pm 0,9	9,0 \pm 0,2	4	2	0,5	1,5
Fe	14,1 \pm 0,5	14,0 \pm 0,3	1	2	4,1	13,7
Zn	11,6 \pm 0,4	12,4 \pm 0,4	7	3	41,6	138,6

Continuação da Tabela 2

Farinhas funcionais				
Elemento	Aveia	Espinafre	Amora	Banana
Mg	1567 ± 91	4509 ± 159	1059 ± 79	1331 ± 35
K	4027 ± 245	24127 ± 912	6798 ± 347	23333 ± 644
Ca	596 ± 41	8813 ± 304	1052 ± 102	649 ± 20
P	4681 ± 385	3695 ± 139	1485 ± 84	1292 ± 31
S	2441 ± 239	3366 ± 123	907 ± 30	483 ± 12
Mn	46,8 ± 3,2	77,3 ± 2,7	66,2 ± 4,8	71,4 ± 2,5
Fe	70,6 ± 25,5	773,9 ± 24,5	25,5 ± 4,2	54,1 ± 1,7
Zn	44,2 ± 12,1	45,3 ± 1,8	14,0 ± 0,6	11,5 ± 0,4

O CRM foi analisado por ICP OES com intuito de verificar a exatidão e precisão do método. Pela análise da Tabela 2, verifica-se que os erros relativos obtidos são inferiores a 10% e um *test-t* student com nível de confiança de 95% indica que para todos os elementos analisados, os valores certificados e os obtidos pelo método são estatisticamente similares. Pode-se concluir que o método é preciso e exato para determinar os elementos estudados, portanto, pode-se estabelecer valores de referência para as amostras de farinhas funcionais.

5.2. Fabricação das pastilhas prensadas

O pastilhamento das amostras para análise em LIBS é um procedimento normalmente utilizado, pois resulta em superfícies amostrais mais regulares que contribuem para a repetibilidade das análises. Todavia, nem todos os materiais são capazes de formar pastilhas coesas e robustas o suficiente para suportar a incidência do laser. Uma solução para isso é misturar aglutinantes às amostras visando aumentar a coesão das pastilhas tornando-as menos quebradiças frente aos pulsos de laser. Visando avaliar o melhor aglutinante e a melhor proporção aglutinante-amostra, pastilhas de aveia contendo diversas proporções de aglutinantes (celulose e parafina) foram avaliadas. Na Figura 2 e Figura 3 estão apresentadas imagens das pastilhas de aveia confeccionadas na ausência de aglutinante e na presença de diferentes proporções de celulose (Figura 2) e parafina (Figura 3).

Figura 2: Pastilhas prensadas com diferentes proporções de aveia e celulose (m/m): a. 0% celulose; b. 10% celulose; c. 20% celulose; d. 30% celulose .

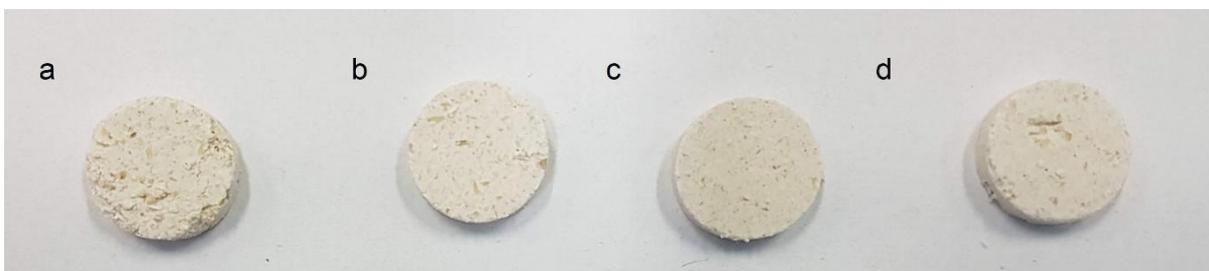
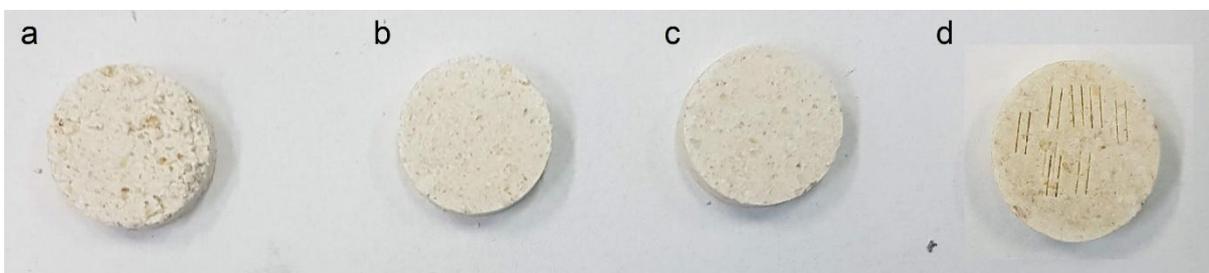


Figura 3: Pastilhas fabricadas com diferentes proporções de aveia e parafina (m/m): a. 0% parafina; b. 10% parafina; c. 20% parafina; d. 30% parafina.



Observa-se que a pastilha de aveia sem aglutinante apresenta uma superfície bastante irregular e quebradiça. Com aumento do teor de celulose, a pastilha passa a apresentar uma superfície mais homogênea, entretanto não o suficiente para gerar uma cratera homogênea na área incidida pelo laser, mesmo quando 30% m/m de celulose foi usado (Figura 2d). O resultado foi uma área de ablação irregular e pedaços da superfície próximos aos pulsos de laser ausentes, indicando a ocorrência de projeção de partes do material. O uso de maiores proporções de celulose foi descartado para evitar a excessiva diluição da amostra e consequentemente perda de sensibilidade.

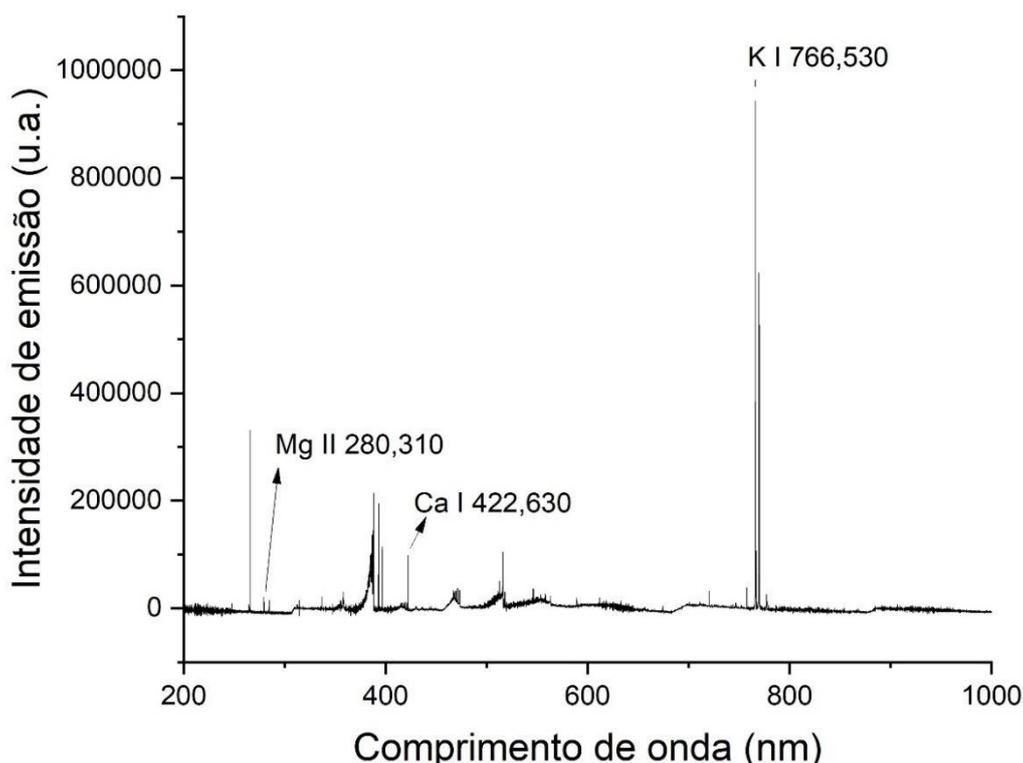
O uso da parafina como aglutinante, no entanto, gerou melhores resultados. As imagens das pastilhas de aveia na ausência e na presença de diferentes proporções de parafina (10-30% m/m) estão apresentadas na Figura 3. Visualmente, observa-se pastilhas mais resistentes e coesas, mesmo empregando apenas 10% de parafina (Figura 3b). Entretanto, ao submeter as pastilhas às análises por LIBS, o uso de 30% m/m de parafina mostrou uma pastilha mais resistente gerando áreas de

ablação com contornos mais bem definidas e, portanto, homogêneas. Por esse motivo, o uso de 30% m/m de parafina foi selecionado para as análises subsequentes.

5.3. Identificação e escolha das linhas de emissão espectrais

A análise por LIBS gera um espectro muito rico em informações, contendo diversas linhas de emissões características dos elementos presentes no material analisado. Um mesmo elemento pode apresentar várias linhas de emissão com diferentes intensidades entre si e a escolha da linha de emissão mais intensa é preferida, por possibilitar maior sensibilidade, característica importante na quantificação do analito presentes em baixas concentrações. Diante disso, estudos preliminares utilizando a amostra de aveia foram conduzidos utilizando o LIBS com o objetivo de identificar qualitativamente os elementos com base em suas linhas de emissão características, assim como verificar as linhas que possuíam maior intensidade de emissão e, portanto, maior sensibilidade.

Figura 4: Espectros de emissão da pastilha de aveia e parafina 30 % m/m por LIBS. Parâmetros energia 20 mJ, número de pulsos 405, tempo de atraso 0,50 μ s e diâmetro de focalização 65 μ m.



O software Clarity juntamente com a base de dados do NIST identificou diversas linhas de emissão dos diversos elementos, entretanto, muitas delas tinham baixa intensidade e se confundiam com a linha base ou eram inconclusivas devido a sobreposição das linhas espectrais. As linhas de emissão identificadas na Figura 4 dos elementos Mg, Ca e K foram escolhidas devido sua alta intensidade, elevada razão sinal ruído, fácil identificação e sem evidências de interferência espectral. Esse comportamento era esperado em razão desses elementos serem majoritários nesse tipo de amostra. As linhas de emissão Mg II 280,310, Ca I 422,630 e K I 766,530 serão monitoradas para a otimização dos parâmetros instrumentais e análises quantitativas. Além dos sinais de emissão apresentados na Figura 4, as linhas Mg II 279,617, Mg I 285,280, Mg I 517,239, Mg I 518,360, Ca II 393,339, Ca II 396,796, Ca I 612,179 Ca I 616,148 e K 770,050 nm foram identificadas, mas não estão apresentadas.

5.4. Otimização dos parâmetros instrumentais do LIBS

Nessa etapa, os parâmetros instrumentais energia do laser, número de pulsos, tempo de atraso e diâmetro de focalização foram otimizados utilizando uma análise univariada, na qual um dos parâmetros sofre variações, enquanto os demais permanecem constantes, visando à obtenção de maiores valores do sinal de emissão dos analitos assim como da razão sinal-sinal de fundo, *do inglês* Signal to Background Ratio (SBR). Para esse estudo as linhas de emissão Mg II 280,310, Ca I 422,630 e K I 766,530 nm foram monitoradas. Essa otimização tem o objetivo de obter um único conjunto de parâmetros que possa ser empregado nas análises futuras das amostras de farinhas funcionais. A Tabela 3 exibe as etapas da otimização univariada proposta.

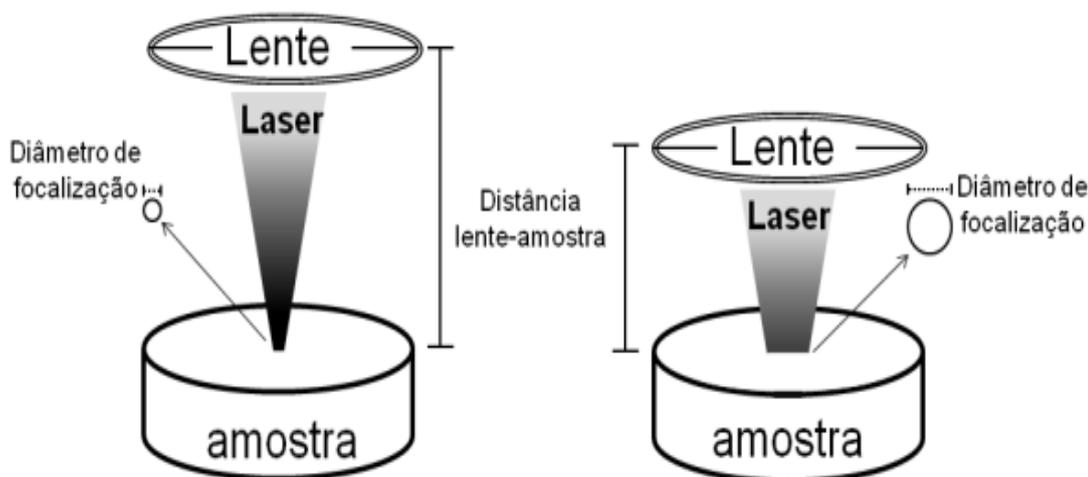
Tabela 3: Análise univariada dos parâmetros instrumentais do LIBS para determinação da condição instrumental ideal.

Etapa	Diâmetro de focalização (µm)	Energia por pulso (mJ)	Tempo de atraso (µs)	Número de pulsos
I	35 - 100	20	0,5	405
II	65	5 - 20	0,5	405
III	65	20	0,25 - 1	405
IV	65	20	0,5	135 - 405

5.4.1. Otimização do diâmetro de focalização

Em LIBS, o feixe de laser pulsado pode ser direcionado por espelhos e é focalizado à superfície da amostra com o auxílio de uma lente convergente. A distância entre a amostra e a lente pode alterar o diâmetro de focalização e, portanto, modificar a massa ablada e a fluência, definida como sendo a razão da quantidade de energia por unidade de área irradiada pelo laser (COSTA, 2019). A diminuição da distância entre amostra e a lente aumenta a largura do feixe de laser e, portanto, aumenta a área amostrada na superfície da amostra (Figura 5). Por outro lado, o aumento da área amostrada afeta negativamente a fluência do laser, ou seja, um maior diâmetro de focalização diminui a energia por área irradiada. Para avaliar o efeito do diâmetro de focalização, esse parâmetro foi variado de 35 a 100 μm e foram monitorados a área integrada do sinal de emissão e a razão sinal-sinal de fundo.

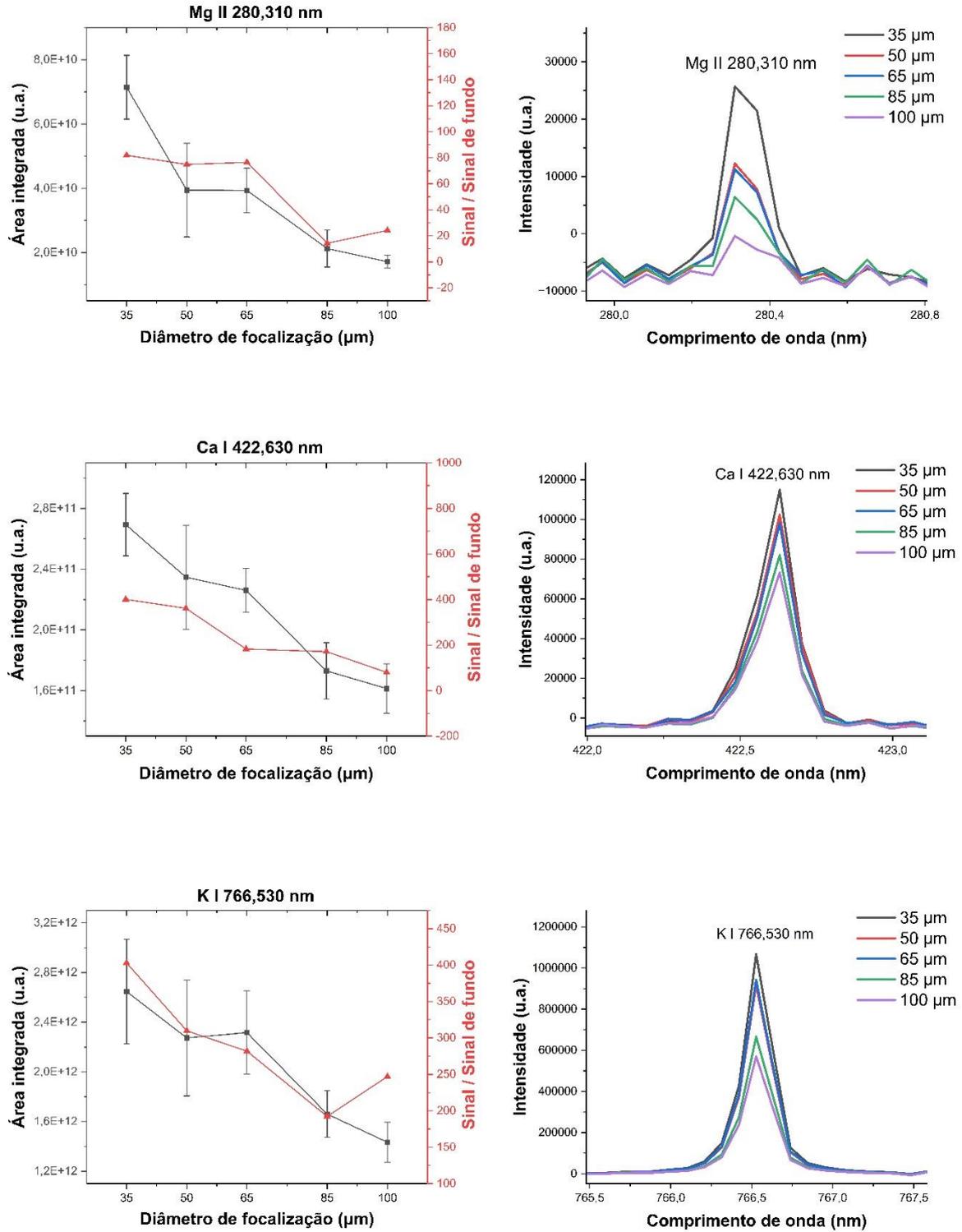
Figura 5: Esquema ilustrativo do sistema óptico de focalização do laser.



Fonte: SILVESTRE, 2017.

A Figura 6 exibe os gráficos de área integrada de emissão, SBR e os espectros para diferentes valores de diâmetro de focalização, os quais seguem um mesmo comportamento.

Figura 6: Influência do diâmetro de focalização no sinal de emissão e SBR para Mg Ca e K.



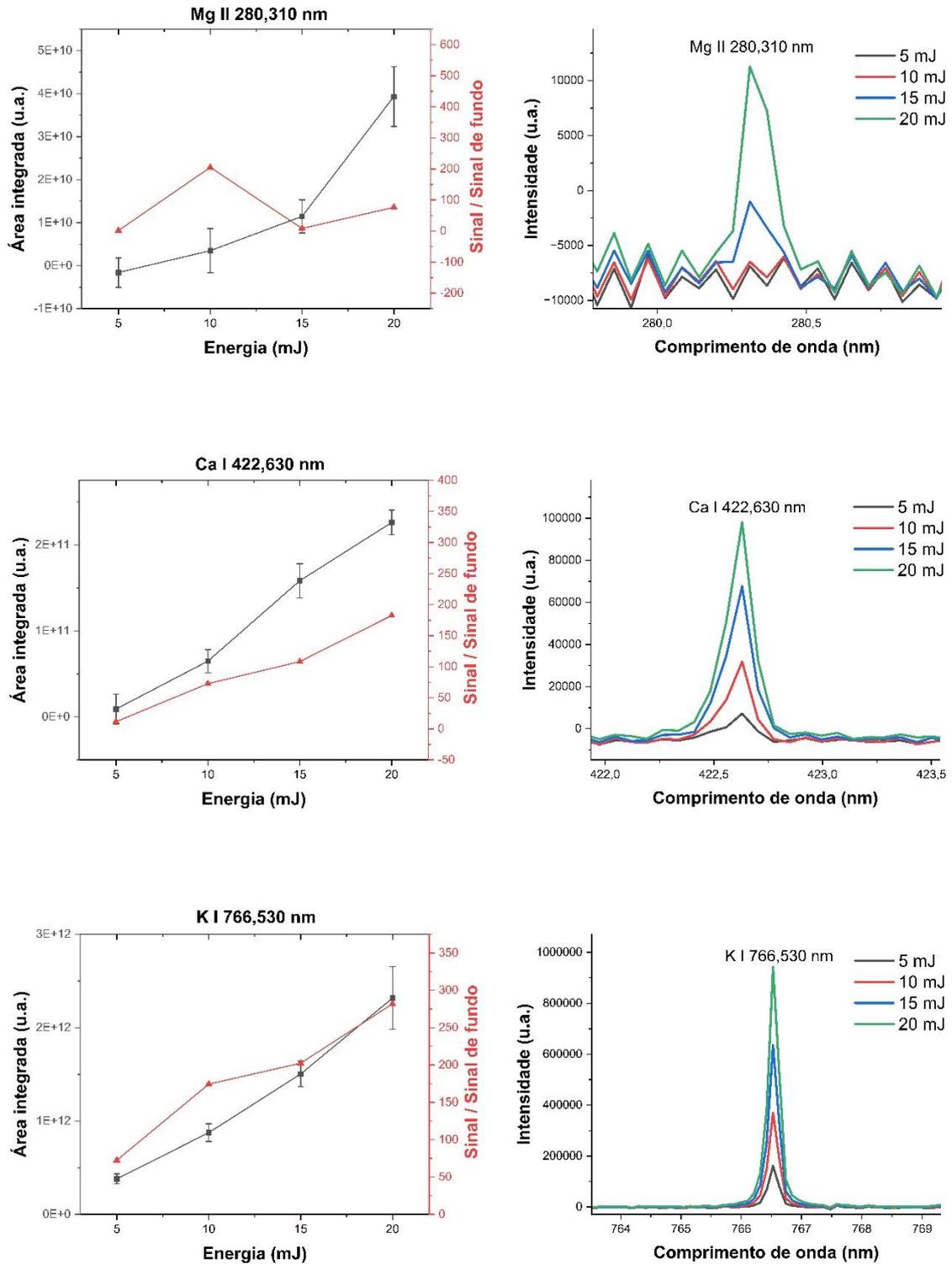
Para o menor valor de diâmetro de focalização, 35 μm , observa-se maiores valores de sinal de emissão e razão sinal-sinal de fundo para as linhas de Ca, Mg e K estudadas. Esse comportamento era esperado, já que um menor valor de diâmetro de focalização possui uma maior fluência do laser, que por consequência gera um plasma mais energético e capaz de atomizar e excitar um maior número de espécies. Portanto, o diâmetro de focalização de 35 μm foi escolhido como condição experimental otimizada.

5.4.2. Otimização da energia do pulso

A energia por pulso de laser é um parâmetro que se relaciona diretamente com a formação do plasma e os fenômenos de dissociação, atomização, ionização e excitação das espécies. Mudanças nesse parâmetro afetam a quantidade de massa ablada, as características do plasma resultante e as intensidades relativas dos sinais de emissão (CREMERS; CHINNI, 2009). Como já discutido, um plasma mais energético aumenta o número de espécies que emitem radiação e, portanto, tem-se um aumento dos valores de área integrada

Para a otimização da energia do laser, esse parâmetro foi variado de 5 a 20 mJ por pulso e foram monitorados a área integrada do sinal de emissão e os valores de SBR. É possível notar, pela Figura 7, que o aumento da energia por pulso do laser resulta em um aumento significativo tanto na área integrada do sinal de emissão quanto no SBR, os quais tiveram comportamentos similares. Devido as observações, a energia de 20 mJ pulso foi selecionada como condição otimizada.

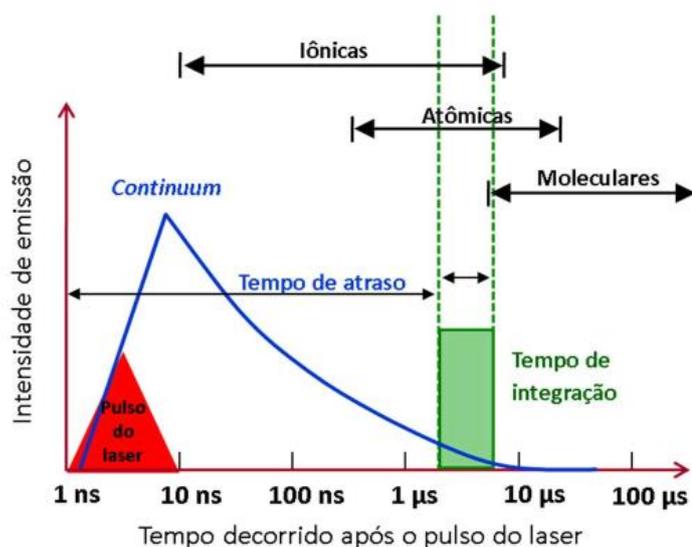
Figura 7: Influência da energia do pulso de laser no sinal de emissão e SBR para Mg, Ca e K.



5.4.3. Otimização do tempo de atraso

O tempo decorrido entre a incidência do laser na amostra para formar o plasma e aquisição dos sinais de emissão é entendido como tempo de atraso (CARVALHO, 2020). Quando o laser interage com a amostra, ocorre imediatamente a emissão do *continuum*, que é a “luz branca” emitida pelo plasma que decai ao longo do tempo (CREMERS; CHINNI, 2009). Se a aquisição do sinal é feita enquanto ainda há emissão do *continuum*, o sinal analítico medido será sobre-estimado (Figura 8). Os sinais de emissão devem ser registrados após o decaimento do *continuum*, para garantir a medição da intensidade de emissão apenas do analito no qual aumento da razão sinal-sinal de fundo é observado (CARVALHO, 2020; CREMERS; CHINNI, 2009). O efeito do tempo de atraso sobre o sinal analítico foi avaliado variando-se o tempo entre 0,25 μs a 1,00 μs .

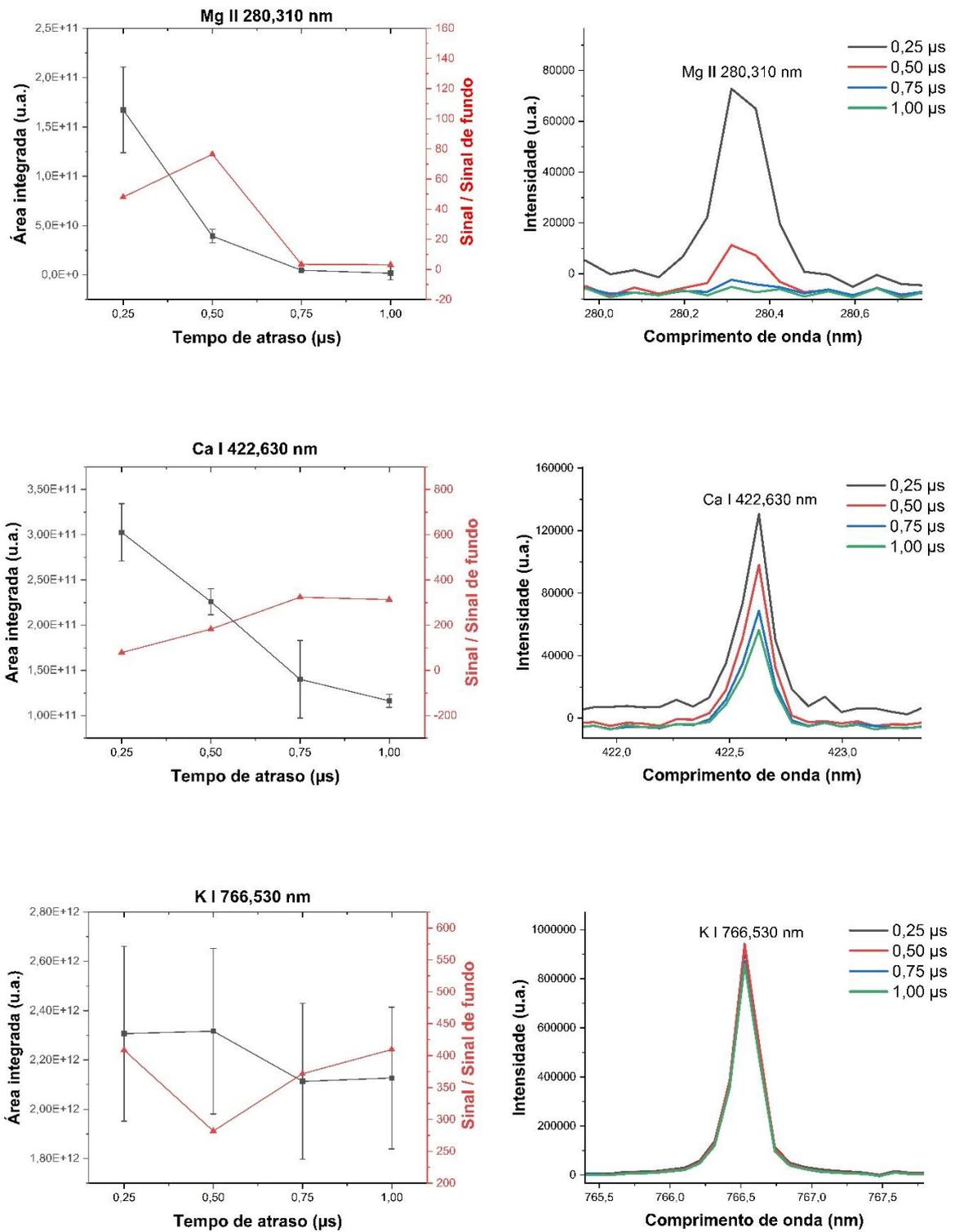
Figura 8: Evolução temporal do plasma em um sistema LIBS de nanosegundos.



Fonte: Carvalho (2020)

Observa-se na Figura 9 que o Mg, Ca e K exibem um comportamento relativamente semelhante. Em menores valores de tempo de atraso os sinais de emissão dos analitos são maiores, entretanto, o sinal de fundo nessa condição também é elevado, justamente pelo fato desse curto tempo ser influenciado pelo *continuum*. Para o K I 766,530 nm, tem-se valores muito próximos de área integrada para todas as condições de tempo de atraso. Diante das considerações, escolheu-se o tempo de atraso de 0,25 μs .

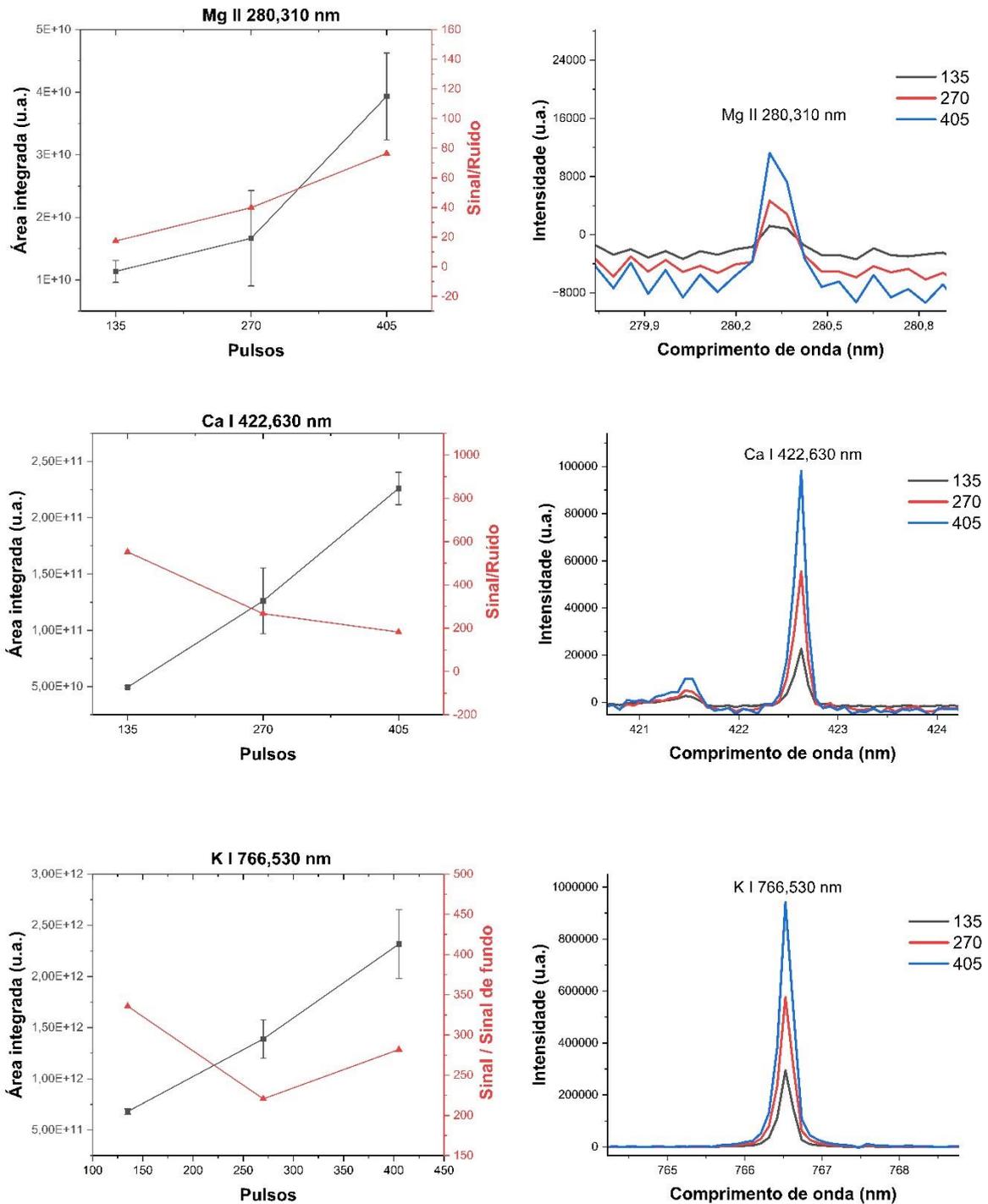
Figura 9: Influência do tempo de atraso no sinal de emissão e SBR para Mg, Ca e K.



5.4.4. Otimização do número de pulsos

A Figura 10 exibe a influência da variação do número de pulsos no sinal de emissão e razão sinal ruído para Mg, Ca e K.

Figura 10: Influência do número de pulsos no sinal de emissão e SBR para Mg, Ca e K.



Como o modo de análise utilizado nesse trabalho foi o de pulsos em linha e manteve-se sempre constante a taxa de repetição (20 Hz), a variação do número de pulsos resulta no aumento do caminho de ablação, logo é possível analisar o efeito do número de pulsos de laser na intensidade dos sinais obtidos. Para isso, o número de pulsos foi variado de 135 a 405, visando a escolha da melhor condição experimental. Em geral, quanto maior o número de pulsos, maior o sinal analítico, uma vez que maior massa da amostra é ablada e pelo mesmo motivo, a precisão tende a ser maior. Analisando a Figura 10 conclui-se que a condição de 405 pulsos, apresenta os melhores valores de área integrada e SBR, sendo esta condição a escolhida.

5.4.5. Parâmetros instrumentais otimizados

Os parâmetros instrumentais do LIBS obtidos após o estudo de otimização foram: 20 mJ por pulso de laser, 35 μm de diâmetro de focalização, tempo de atraso 0,25 μs e 405 pulsos acumulados, monitorando-se as linhas Mg II 280,310, Ca 422,630 e K 766,530 nm.

5.5. Avaliação de estratégias de calibração visando análise por LIBS

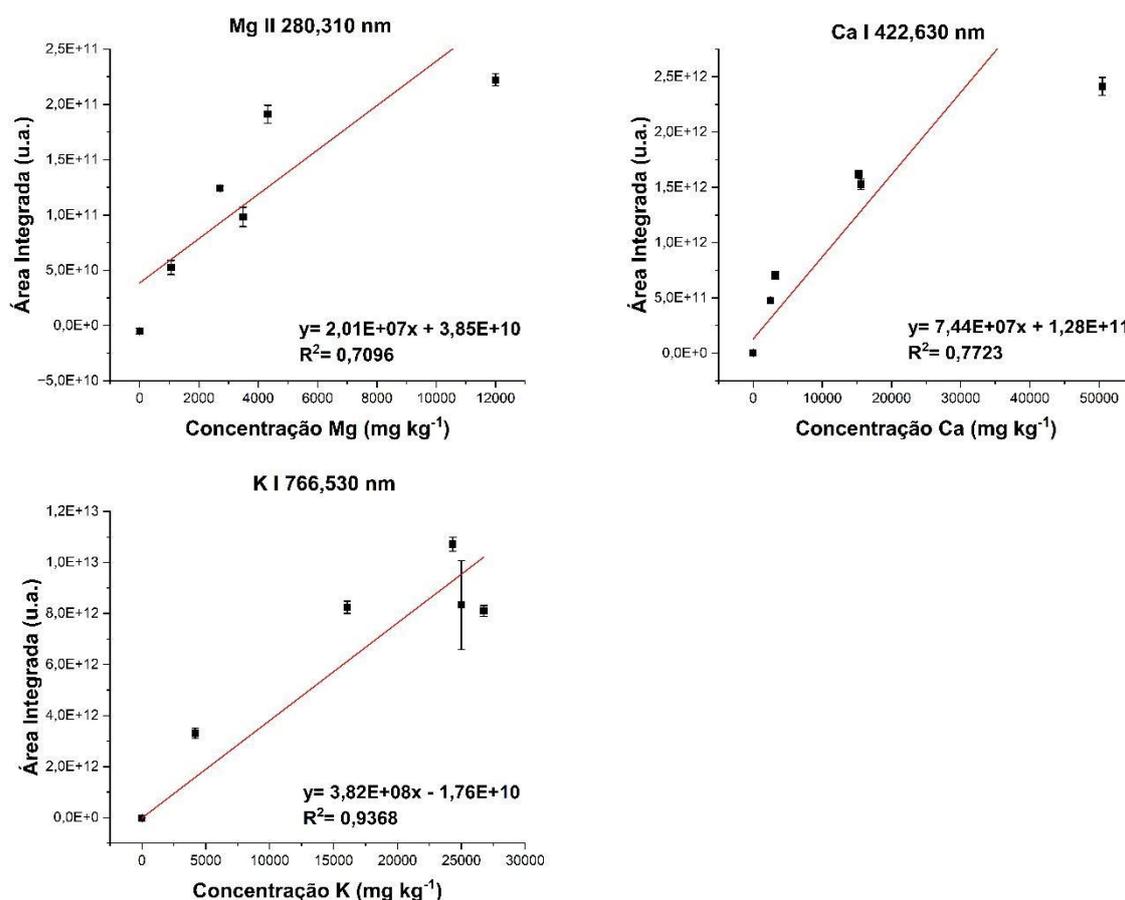
5.5.1. Calibração por padrão externo

Uma das principais estratégias de calibração aplicada a LIBS é a calibração externa, que se baseia no uso de CRMs. Os CRMs a serem utilizados nas calibrações devem apresentar matrizes semelhantes à da amostra e faixa de concentração na mesma grandeza. As curvas são construídas para cada elemento estudado e utilizam os valores de referência de cada material e os respectivos valores de emissão obtidos pelo método LIBS. A Tabela 4 exemplifica a matriz de dados utilizada para construção da curva analítica por padrão externo para quantificação de Ca. As curvas foram construídas utilizando pastilhas dos CRMs: SRM 1573a, SRM 1515, SRM 1547, SRM 1575a e SRM 3234 com 30 % m/m de parafina e uma pastilha branco contendo 100% parafina.

Tabela 4: Matriz de dados para construção de curva de calibração externa para Ca I 422,630 nm por LIBS.

Padrão	Certificado (mg kg ⁻¹)	Área integrada Ca I 422,630 nm	Desvio padrão Área integrada
Parafina	0	4,12 x 10 ⁹	7,69 x 10 ⁹
SRM 1575a	2500 ± 100	4,77 x 10 ¹¹	9,98 x 10 ⁹
SRM 1515	3191 ± 56	7,06 x 10 ¹¹	3,59 x 10 ¹⁰
SRM 3234	15250 ± 100	1,62 x 10 ¹²	3,46 x 10 ¹⁰
SRM 1547	15590 ± 160	1,53 x 10 ¹²	4,58 x 10 ¹⁰
SRM 1573a	50450 ± 550	2,41 x 10 ¹²	8,09 x 10 ¹⁰

Figura 11: Curvas analíticas de calibração externa para Mg, Ca e K por LIBS utilizando CRMs.



Ao observar as curvas de calibração na Figura 11, nota-se baixos valores de coeficiente determinação (R^2) e baixa correlação das variáveis x e y, indicando falta

de ajuste dos dados ao modelo estatístico linear. Além disso, todas as curvas apresentam altos valores de resíduo e, em reflexo disso, a maioria das concentrações determinadas pelo modelo têm baixa exatidão (Tabela 5). O valor de Mg para amostra de aveia não pode ser determinado devido o valor de coeficiente linear ser maior que o sinal emissão obtido, resultando em uma concentração negativa. Com exceção dos valores determinados de Ca para amostra de banana verde e K para amostra de aveia, o modelo falha em determinar com exatidão os demais teores de Ca, Mg e K nas amostras, indicando a ocorrência de fortes efeitos de matriz que estão normalmente associados a eficiência do processo de ablação e/ou atomização. É possível inferir que a estratégia de calibração externa com uso de CRMs é, em geral, incapaz de determinar com exatidão os elementos estudados nas amostras de farinha funcional por LIBS.

Tabela 5: Teores de Mg, Ca e K (média \pm desvio padrão, n=3) (mg kg⁻¹) determinados em farinhas por PE-LIBS utilizando CRMs.

		Amora	Aveia	Banana V	Espinafre
Mg	Referência	1059 \pm 79	1567 \pm 91	1331 \pm 35	4509 \pm 159
	Encontrado	83 \pm 254	-	1104 \pm 398	3505 \pm 1230
	Erro (%)	-92	-	-17	-22
Ca	Referência	1052 \pm 102	596 \pm 41	649 \pm 20	8813 \pm 304
	Encontrado	517 \pm 31	248 \pm 17	639 \pm 100	2126 \pm 153
	Erro (%)	-51	-58	-2	-76
K	Referência	6798 \pm 347	4027 \pm 245	23333 \pm 644	24127 \pm 912
	Encontrado	7989 \pm 415	4201 \pm 345	14875 \pm 1356	18040 \pm 150
	Erro (%)	+18	+4	-36	-25

5.5.2. Calibração com padrão interno

A falta de exatidão ocasionada pela ocorrência de efeitos de matriz é um problema enfrentado pela vasta maioria das técnicas analíticas, LIBS em especial sofre de fortes efeitos de matriz relacionados aos diferentes comportamentos de ablação entre as amostras e os padrões utilizados para quantificação (CHIRINOS, 2017). A calibração por padrão interno é uma estratégia muito utilizada para em métodos de ablação por laser para corrigir flutuações, interferências físicas e compensar efeitos de matriz. Essa abordagem utiliza um ou mais comprimentos de onda de um elemento que inicialmente não está presente na amostra ou um elemento majoritário da matriz, que não terá seu comportamento afetado por pequenas

variações nas condições de análise. O sinal resposta monitorado por essa estratégia passa a ser razão entre o sinal do analito e o do padrão interno selecionado.

Como as amostras estudadas são ricas em carbono e este é, portanto, um elemento majoritário da matriz, a linha C I 247,780 nm foi escolhida como padrão interno e foi monitorada juntamente com os sinais dos analitos Mg II 280,310, Ca I 422,630 e K 766,530 nm. Assim como na calibração por padrão externo foram utilizados os CRMs SRM 1573a, SRM 1515, SRM 1547, SRM 1575a e SRM 3234 com 30 % m/m de parafina e uma pastilha branco contendo 100% parafina.

Figura 12: Curvas analíticas de calibração com padrão interno de C I 247,780 para Mg, Ca e K por LIBS utilizando CRMs.

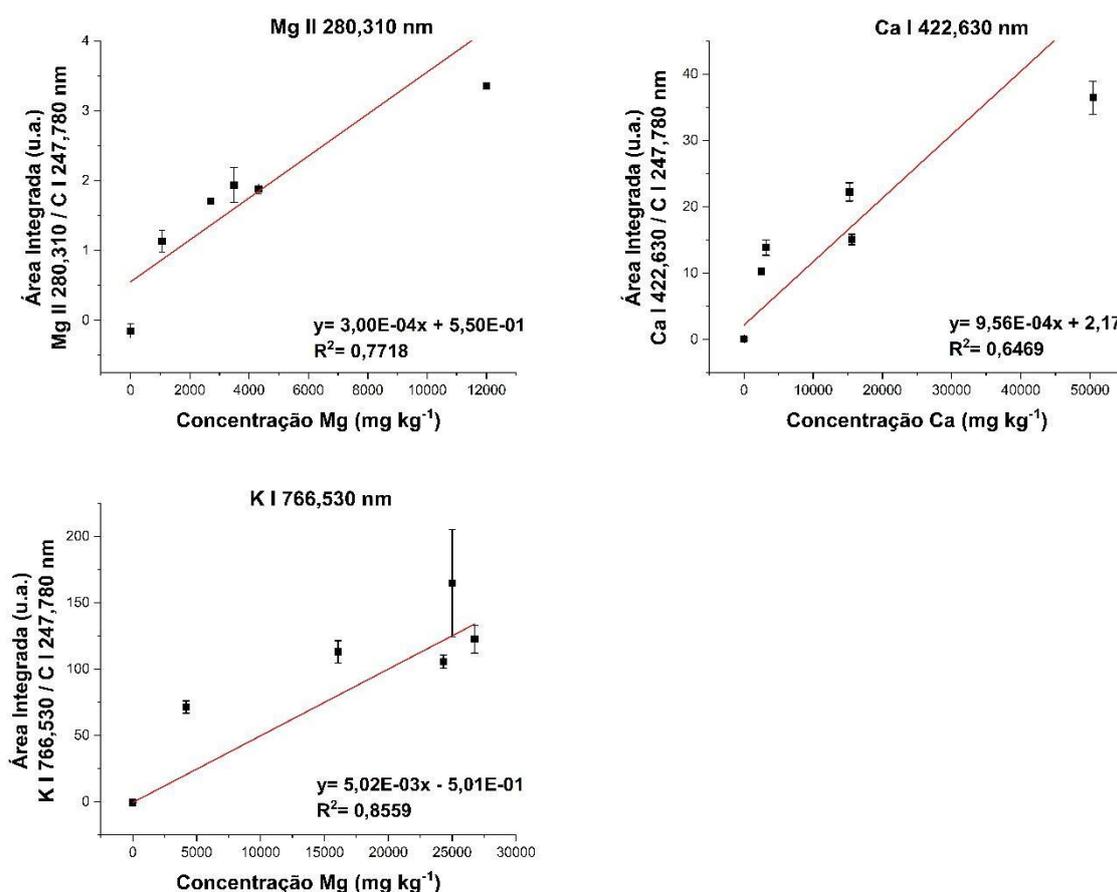


Tabela 6: Teores de Mg, Ca e K (média \pm desvio padrão, n=3) (mg kg⁻¹) determinados em farinhas por PI-LIBS utilizando CRMs.

		Amora	Aveia	Banana V	Espinafre
Mg	Referência	1059 \pm 79	1567 \pm 91	1331 \pm 35	4509 \pm 159
	Encontrado	3748 \pm 1241	2973 \pm 816	4106 \pm 885	7460 \pm 1108
	Erro (%)	254	90	208	65
Ca	Referência	1052 \pm 102	596 \pm 41	649 \pm 20	8813 \pm 304
	Encontrado	11907 \pm 2242	9575 \pm 1810	9433 \pm 3439	27905 \pm 5673
	Erro (%)	1032	1506	1353	217
K	Referência	6798 \pm 347	4027 \pm 245	23333 \pm 644	24127 \pm 912
	Encontrado	24872 \pm 1823	16142 \pm 3904	34154 \pm 11794	42222 \pm 9945
	Erro (%)	266	301	46	75

Os resultados encontrados pelo uso do padrão interno C I 247,780 exibem erros relativos muito superiores aos encontrados pelo padrão externo, não havendo um único valor determinado que exibisse exatidão satisfatória. Os resultados dispostos na

Tabela 6 eram esperados devido aos baixos valores de R² e altos valores de resíduo (Figura 12), mais uma vez indicando que o modelo encontrado não se ajusta bem aos dados. A estratégia de calibração por padrão interno se mostrou ineficaz para resolver os problemas de matriz inerentes ao método LIBS, mostrando-se incapaz de determinar os elementos estudados nas farinhas funcionais.

Além do forte efeito de matriz, destaca-se como desvantagem das calibrações por PE e PI a necessidade de se ter disponível ao menos 3 CRMs de composição matricial similar, porém com teor de analitos distintos, fato que não é simples. Nesse caso, uma estratégia de calibração que requeira uso de apenas um CRM seria vantajoso. É o caso da calibração multi energia, discutido a seguir (item 5.5.3)

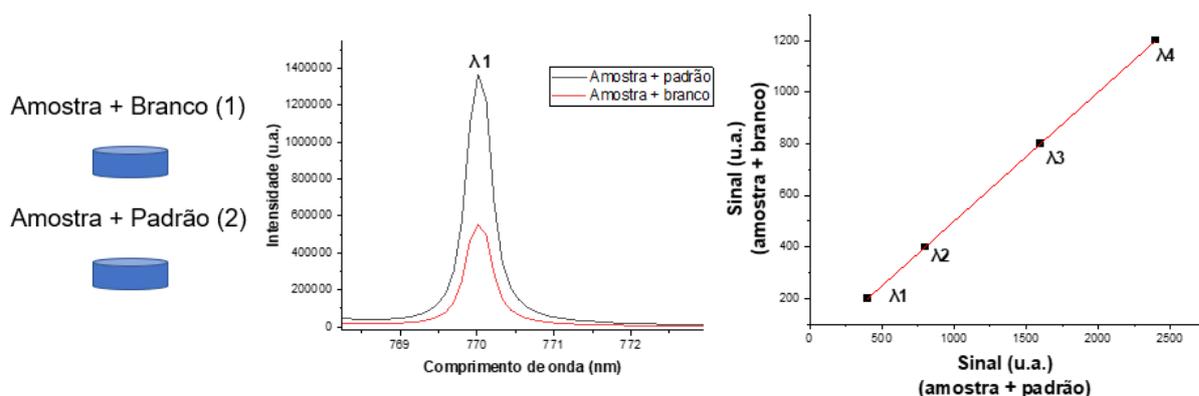
5.5.3. Calibração multi-energia

A calibração multi-energia é uma estratégia que tem sido empregada com sucesso em métodos como a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS FAAS), a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES) e ICP OES (BABOS, 2018). A MEC se baseia no uso de um único padrão de concentração fixa e na capacidade de alguns elementos de produzir sinais analíticos em diferentes comprimentos de onda. Essa calibração

necessita de duas subamostras, uma composta pela amostra mais um padrão (1) e a outra composta por amostra mais o branco (2). A curva analítica é construída por meio dos sinais obtidos da pastilha (1) versus pastilha (2) em diferentes energias de transição, como exemplificado pela Figura 13 abaixo. As concentrações são determinadas de acordo com a equação 4, θ é o coeficiente angular da reta.

$$\text{Equação 4: } C_{\text{amostra}} = \frac{C_{\text{padrão}} \times \theta}{(1-\theta)}$$

Figura 13: Ilustração da construção da MEC



Para esse estudo de quantificação utilizando o MEC as amostras de farinhas não foram utilizadas, ao invés disso esse método foi testado apenas com CRMs para avaliar sua viabilidade. Essa escolha foi tomada devido essa calibração necessitar de um preparo de amostras considerável, envolvendo duas pastilhas para cada amostra estudada e o preparo não ser algo tão trivial, já que é necessário buscar materiais sólidos adequados para serem usados como padrão e branco o que pode acarretar uma mistura com matrizes distintas.

O estudo preliminar consistiu em utilizar o SRM 3234 como amostra, o SRM 1573a como padrão, celulose como branco e parafina na concentração 30% m/m como aglutinante, como mostra o esquema da Figura 14.

Figura 14: Esquema preliminar para fabricação das pastilhas para MEC-LIBS

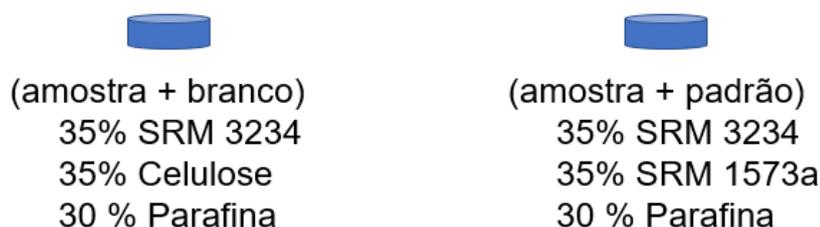
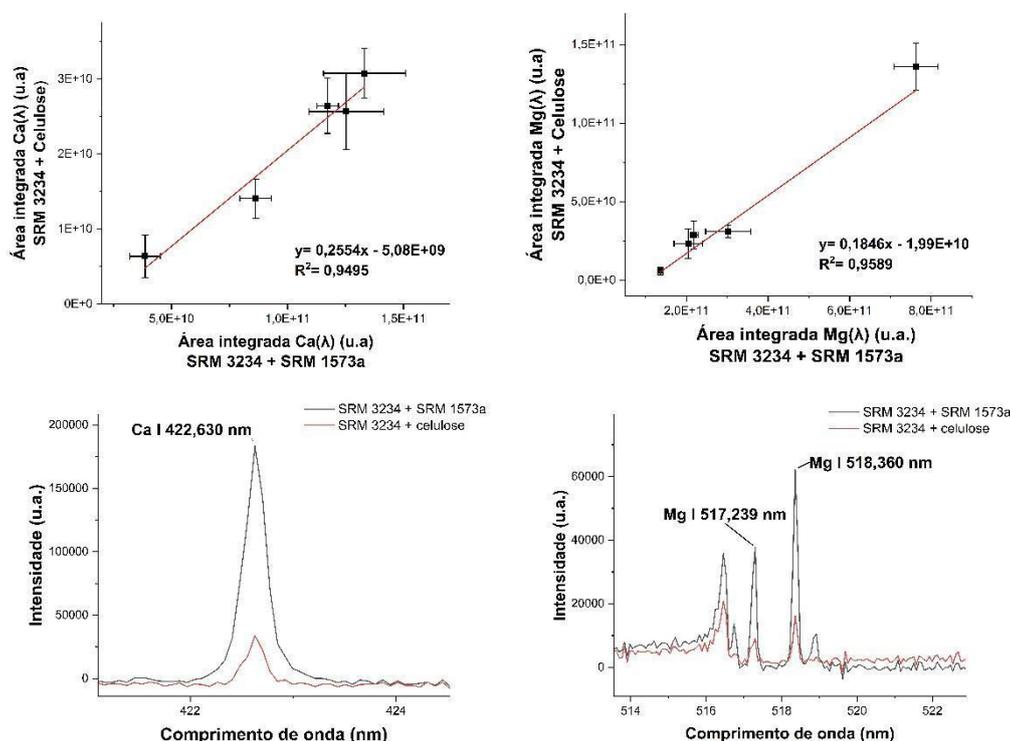


Figura 15: Curvas analíticas de calibração MEC-LIBS para Ca e Mg.



As linhas utilizadas para construção das curvas de calibrações foram:

- Mg: Mg II 279,617, Mg II 280,310, Mg I 285,280, Mg I 517,239 e Mg I 518,360 nm.
- Ca: Ca II 393,339, Ca II 396,796, Ca I 422,630, Ca I 612,179 e Ca I 616,148 nm.

Não foi possível utilizar o MEC para quantificar K devido ao método necessitar de pelo menos 3 linhas de emissão por elemento, mas só foram identificadas duas linhas de potássio: K I 766,530 e K I 770,050 nm no espectro. Observando os espectros da Figura 15 verifica-se que, como esperado, o sinal da pastilha contendo SRM 3234 e SRM 1573a é superior a pastilha de SRM3234 e celulose, e que as linhas de emissão

para as duas pastilhas se encontram na mesma região do espectro. As curvas de calibração da Figura 15 mostram um comportamento linear aceitável dos dados quando se trata de análise direta de sólidos, exibindo para ambos R^2 próximos de 0,95. Todavia, os resultados mostrados na

Tabela 6 indicam baixa exatidão para quantificação de Ca, devido ao alto valor de erro relativo obtido. Em comparação, a quantificação de Mg por MEC exibiu um valor mais próximo do real, e desvio padrão relativo inferior a 20%. Uma notável desvantagem do método é a necessidade da existência de ao menos 3 linhas de emissão livres de interferência espectral, impossibilitando nesse caso a quantificação de K. Um método que necessite de apenas uma linha de emissão para quantificação elementar é claramente vantajoso.

Tabela 7: Teores de Mg e Ca determinados em SRM 3234 (média \pm desvio padrão, n=3) (mg kg⁻¹) por MEC-LIBS

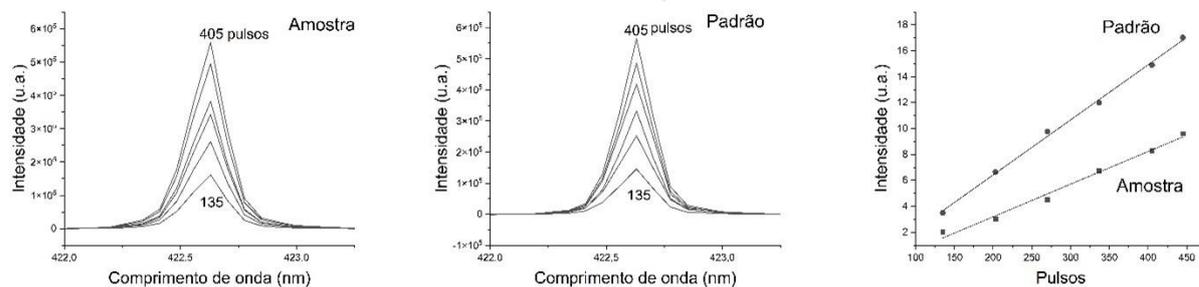
	Mg	Ca
Certificado	3487 \pm 60	3191 \pm 56
Encontrado	4107 \pm 737	11452 \pm 1672
Erro relativo (%)	18	259
DPR (%)	18	15

5.5.4. Calibração por variação do número de pulsos

A SRC é uma recente estratégia de calibração que requer apenas 1 padrão de calibração com faixa de concentração similar e um comprimento de onda de emissão para realização de medidas quantitativas. Esse método é baseado na proporcionalidade entre a intensidade de emissão (I) dos analitos e a quantidade de massa ablada que aumenta com número de pulsos (Np) (NUNES, 2019). As concentrações dos analitos são determinadas pela razão das inclinações de I vs Np (Figura 16) de um padrão e da amostra teste de acordo com a Equação 5, onde $\theta_{amostra}$ representa o coeficiente angular da reta da amostra e $\theta_{padrão}$ o coeficiente angular da reta do padrão.

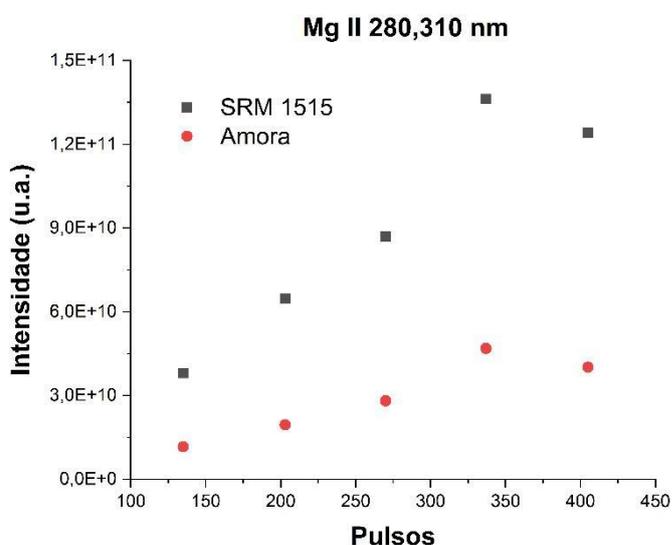
$$\text{Equação 5: } C_{amostra} = C_{padrão} \frac{\theta_{amostra}}{\theta_{padrão}}$$

Figura 16: Esquema de construção da SRC.



Para o estudo da viabilidade da SRC-LIBS, foram utilizados os números de pulsos: 135, 203, 270, 337 e 405 para todas as amostras e padrões. Para cada amostra, os 5 CRMs (SRM 1573a, SRM 1515, SRM 1547, SRM 1575a e SRM 3234) foram testados como padrão, com o objetivo de determinar qual seria o melhor para viabilizar a determinação quantitativa de Mg, Ca e K nas amostras de farinhas funcionais.

Figura 17: Curvas analíticas de SRC-LIBS para farinha de amora (amostra) e SRM1515 (padrão).



Ao construir as curvas analíticas, em alguns casos, percebeu-se perda de linearidade quando 405 pulsos foram usados (Figura 17), e por esse motivo, o ponto referente a esse número de pulso foi excluído de forma a manter a faixa linear de trabalho. A perda da linearidade observada pode ser atribuída a efeitos de auto-absorção e blindagem do plasma (CARVALHO, 2020). A incidência do laser na amostra sólida leva à formação de uma “nuvem” de material que é gerada pelos pulsos

de laser na superfície da amostra dentro da câmara de ablação, que se torna mais densa conforme o laser é incidido, passando a absorver ou espalhar a radiação das espécies que deveria ser captada pelas fibras ópticas e levadas ao detector. Como resultado, o sinal de emissão das espécies de interesse é diminuído levando à perda de linearidade. A blindagem do plasma, por sua vez, acontece quando a densidade de elétrons atinge um valor crítico, fazendo com que o plasma se torne opaco ao feixe de laser e acabe absorvendo ou espalhando pulsos de laser subsequentes. O resultado é a diminuição da área ablada e perda de intensidade do sinal de emissão. Para evitar perdas de linearidade devido aos fenômenos discutidos, optou-se por diminuir a quantidade de pulsos para os futuros experimentos.

Analisando a Tabela 8 é possível verificar que nenhum padrão foi capaz de determinar com exatidão todos os elementos nas diferentes amostras. Entretanto, foi observado que algumas combinações específicas de amostra e padrão conseguiram produzir resultados com exatidão aceitáveis, apresentando erros relativos inferiores a 15%, como é o caso dos teores de Mg na amostra de amora determinada pelos padrões SRM 1515, SRM 1547 e 1575a. Apesar dos CRMs utilizados possuírem matrizes semelhantes, estes ainda apresentam diferenças significativas em sua composição e, além disso, as faixas de concentração são bastante distintas. A similaridade da matriz e a faixa de concentração do padrão são fatores que apresentam grande influência na exatidão do método SRC, o que explica a variabilidade dos resultados obtidos com o uso dos diferentes padrões.

Tabela 8: Teores de Mg, Ca e K (média ± desvio padrão, n=3) (mg kg⁻¹) determinados em matrizes vegetais por SRC-LIBS.

Amostra	Padrão	Mg	Ca	K	Amostra	Padrão	Mg	Ca	K
Amora	SRM 1515	936 ± 78	3150 ± 46	5720 ± 654	Espinafre	SRM 1515	1992 ± 45	8674 ± 241	13664 ± 697
	SRM 1547	933 ± 85	3419 ± 213	6286 ± 647		SRM 1547	1985 ± 70	9413 ± 622	15019 ± 407
	SRM 1575a	992 ± 179	1838 ± 97	3677 ± 255		SRM 1575a	2105 ± 275	5057 ± 223	8823 ± 781
	SRM 3234	1865 ± 305	1530 ± 58	9298 ± 3268		SRM 3234	3951 ± 357	4210 ± 81	21928 ± 5976
	SRM 1573a	1820 ± 185	6663 ± 251	9291 ± 925		SRM 1573a	3867 ± 38	18345 ± 767	22221 ± 1196
Valores de referência		1059 ± 79	1052 ± 102	6798 ± 347	Valores de referência		4509 ± 159	8813 ± 304	24127 ± 912
Amostra	Padrão	Mg	Ca	K	Amostra	Padrão	Mg	Ca	K
Banana V.	SRM 1515	1252 ± 244	3425 ± 262	10165 ± 1040	Aveia	SRM 1515	509 ± 77	2008 ± 307	3097 ± 709
	SRM 1547	1245 ± 224	3725 ± 458	11776 ± 1003		SRM 1547	509 ± 86	2172 ± 294	3395 ± 703
	SRM 1575a	1302 ± 126	2000 ± 218	6900 ± 547		SRM 1575a	544 ± 147	1172 ± 196	2001 ± 474
	SRM 3234	2457 ± 300	1662 ± 117	17381 ± 5909		SRM 3234	1017 ± 230	980 ± 189	5048 ± 2158
	SRM 1573a	2430 ± 465	7252 ± 719	17416 ± 1587		SRM 1573a	989 ± 147	4242 ± 619	5038 ± 1149
Valores de referência		1331 ± 35	649 ± 20	23333 ± 644	Valores de referência		1567 ± 91	596 ± 41	4027 ± 245

5.5.5. Papéis filtro dopados

Até o momento, a utilização dos CRMs como padrões de calibração mostrou-se, em grande parte, inviável para quantificação dos elementos Mg, Ca e K em farinhas funcionais, confirmando a existência de fortes efeitos de matriz nos métodos utilizados. Um fato notável após a tentativa de calibração por padrão externo é que os diferentes materiais de calibração não exibiram uma boa relação linear ao serem construídas curvas de calibração. Em outros termos, esperava-se que ao analisar padrões de matriz similares que possuíssem diferentes teores de um analito, fosse obtido um sinal de emissão diretamente proporcional a essa diferença, entretanto, isso não foi obtido para nenhum elemento. Esse fato implica que, apesar da similaridade entre as matrizes dos CRMs escolhidos, as suas diferenças ainda são suficientes para causar fortes efeitos de matriz que não puderam ser contornados, mesmo com o uso de diferentes estratégias de calibração. Diante disso, surge a necessidade de eliminar as diferenças de matriz entre os materiais calibrantes, e assim possibilitar a quantificação desses analitos por LIBS.

Perante o exposto, pensou-se na possibilidade de fabricar materiais calibrantes sintéticos com matriz idêntica entre eles e que possuíssem matriz similar às amostras. Esse procedimento de fabricação de materiais calibrantes sólidos foi previamente proposto por membros do grupo para calibração e análise direta de sólidos por GF-AAS (NOMURA; INTIMA; OLIVEIRA; RUFFINI; KRUG, 2008). Em seu trabalho, os autores propõem a fabricação de padrões sólidos utilizando filtros de papéis dopados com soluções contendo concentrações conhecidas de Cu e Zn.

Nesse trabalho, foi proposto a fabricação de papéis filtro dopados (PFD) com os elementos Mg, Ca e K, os quais serão utilizados como padrões de calibração. A escolha desse material está também relacionada ao fato de que os papéis são basicamente obtidos a partir de materiais vegetais, por meio da extração e utilização da lignina e celulose, componentes majoritários das paredes celulares vegetais (VERVERIS, 2003). Isso atende a premissa de que a matriz dos materiais calibrantes deve ser similar ao das amostras de farinhas funcionais estudadas.

O procedimento para fabricação dos materiais calibrantes seguido foi semelhante ao descrito por Nomura (2008), apenas mudando os analitos dopados e

acrescentando uma etapa de moagem criogênica e prensagem para formar as pastilhas. O material fabricado foi analisado por ICP OES para confirmar a concentração dos elementos devido os sais utilizados serem higroscópicos. A Tabela 9 exibe as concentrações calculadas no preparo e as determinadas por ICP OES.

Tabela 9: Teores de Mg, Ca e K nos padrões de papéis dopados determinados por ICP OES após digestão ácida assistida por micro-ondas.

Padrão	Preparado (mg kg ⁻¹)			Encontrado (mg kg ⁻¹)		
	Mg	K	Ca	Mg	K	Ca
Branco	0	0	0	97 ± 1	>LD	119 ± 2
1	2000	7333	4000	1365 ± 4	7599 ± 25	3083 ± 12
2	4000	14667	8000	2511 ± 5	14586 ± 16	5702 ± 24
3	6000	22000	12000	3572 ± 24	21320 ± 122	8144 ± 26
4	8000	29333	16000	4522 ± 16	27094 ± 110	10403 ± 31
5	12000	44000	24000	6166 ± 36	37221 ± 121	14383 ± 55

Como esperado, os resultados exibidos na Tabela 9 apresentam concentrações determinadas por ICP OES inferiores às calculadas no preparo devido à presença de umidade nesses sais. Entretanto, para o branco que é constituído apenas por papel filtro e uma solução de HNO₃ 2% (v v⁻¹), observa-se a presença dos elementos Mg e Ca em concentrações significantes e diferentes de zero. Como esses elementos não foram adicionados a esse padrão, acredita-se que já estavam presentes nos papéis filtros utilizados, muito provavelmente provenientes do processo de fabricação, pois não são papéis filtro quantitativos. A presença de Mg e Ca nos papéis filtro anterior à dopagem não impactou no método, pois o valor real total desses elementos foi determinado pela técnica de referência e foram levados em consideração para a construção das curvas analíticas.

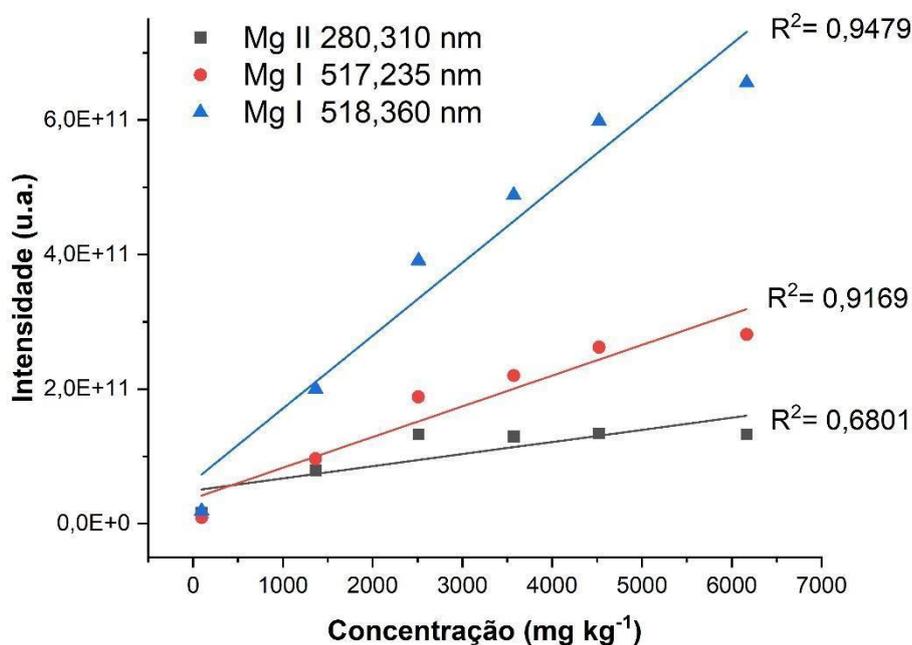
5.5.6. Calibração por padrão externo utilizando PFDs

Para a construção das curvas de calibração empregando PFDs, utilizaram-se 6 padrões contendo diferentes concentrações de Mg, Ca e K. Para isso, realizaram-se medidas por LIBS utilizando os parâmetros instrumentais otimizados, com exceção

do número de pulsos que foi reduzido de 405 para 351, para evitar os fenômenos de blindagem e auto-absorção já discutidos.

Durante as análises iniciais dos PFDs, verificou-se que os sinais de emissão ótica para Mg II 280,310 apresentavam baixas intensidades e comportamento pouco linear. Decidiu-se avaliar outras linhas de emissão para o Mg que apresentaram maior sensibilidade (Figura 18).

Figura 18: Curvas analíticas para Mg II 280,310, Mg I 517,235 e Mg I 518,360 nm, utilizando os PFDs.



A Figura 18 demonstra claramente que a linha Mg I 518,360 nm possui maior sensibilidade e maior coeficiente de determinação dentre as linhas comparadas, inferindo em um melhor ajuste do modelo linear estatístico. Diante dos fatos, optou-se por trabalhar com a linha Mg I 518,360 nm para as determinações desse elemento.

Foram então construídas as curvas analíticas utilizando os PFDs para Mg, Ca e K (Figura 19). Observa-se que as curvas analíticas construídas com os padrões de PFDs apresentam em todos os casos R² superiores, menores valores de resíduo e um melhor comportamento linear, quando comparadas as curvas construídas com CRMs. Resultados promissores, pois os PFDs têm um custo muito inferior aos CRMs,

são relativamente fáceis de fabricar e sofrem de menores efeitos de matriz quando analisados por LIBS.

Figura 19: Curvas analíticas de calibração para Mg, Ca e K por LIBS, utilizando os padrões PFDs

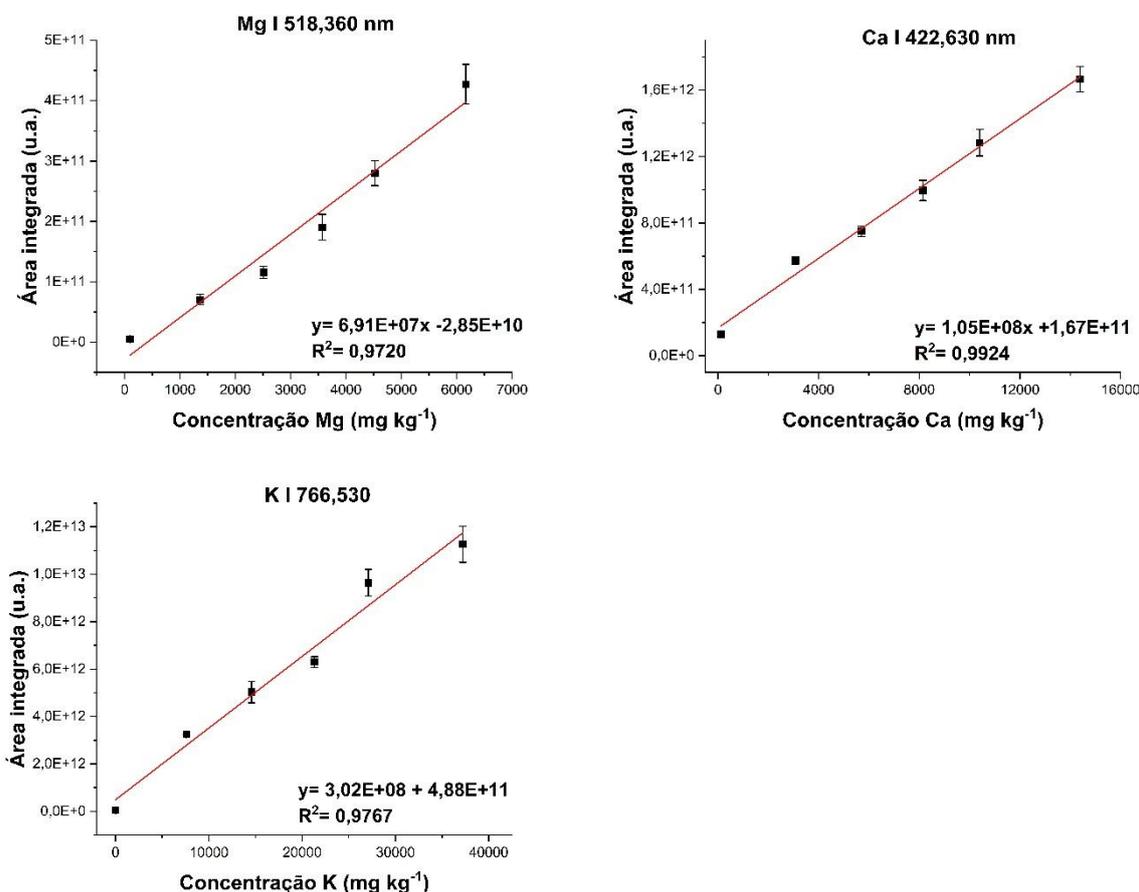


Tabela 10: Teores de Mg, Ca e K (média ± desvio padrão, n=3) (mg kg⁻¹) determinados em farinhas por LIBS utilizando PFDs como padrões.

		Amora	Aveia	Banana	Espinafre
Mg	Referência	1059 ± 79	1567 ± 91	1331 ± 35	4509 ± 159
	Encontrado	1166 ± 88	1493 ± 225	1416 ± 53	3713 ± 18
	Erro (%)	10	-5	6	-18
Ca	Referência	1052 ± 102	596 ± 41	649 ± 20	8813 ± 304
	Encontrado	1326 ± 333	775 ± 591	1117 ± 53	7502 ± 607
	Erro (%)	26	30	72	-15
K	Referência	6798 ± 347	4027 ± 245	23333 ± 644	24127 ± 912
	Encontrado	7692 ± 1593	5005 ± 765	18635 ± 2260	26173 ± 967
	Erro (%)	13	24	-20	8

A Tabela 10 apresenta a quantificação dos elementos Mg, Ca e K nas amostras de farinhas funcionais por LIBS utilizando os PFDs como padrões para construção das curvas de calibração. Avaliando os dados dispostos na Tabela 10, percebe-se uma melhoria significativa de exatidão do método para a maioria dos resultados encontrados quando comparados aos métodos anteriormente utilizados. Destacam-se principalmente os teores determinados de Mg para as amostras de amora, aveia e banana, e K para amostra de espinafre, os quais exibiram erros relativos iguais ou inferiores a 10%. Outros resultados como o de K determinado para amora, Ca e Mg para espinafre também estão relativamente próximos aos valores reais, considerando os desafios da análise direta de sólidos. No entanto, existem valores de erro relativo elevados, principalmente para o elemento Ca determinado nas amostras. Isso indica que ainda existem efeitos de matriz significativos que estão afetando a exatidão do método, entretanto, menos severos. A utilização de outras estratégias de calibração utilizando PFDs como materiais calibrantes foram avaliadas e estão apresentados a seguir.

5.5.7. Calibração com padrão interno utilizando PFDs

Nessa etapa, o elemento C também foi utilizado como padrão interno e sua linha C I 247,780 nm foi monitorada, de modo que o sinal resposta utilizado foi a razão entre o sinal do analito e o do padrão interno selecionado. Os 6 padrões de PFDs fabricados com diferentes concentrações de Mg, Ca e K foram utilizados para a construção das curvas analíticas dispostas na Figura 20.

Analisando os gráficos apresentados na Figura 20, observa-se que em todos os casos as curvas analíticas construídas utilizando os PFDs como padrões de calibração apresentam R^2 maiores e as variáveis x e y estão mais bem correlacionadas. Um comportamento perceptível para os gráficos da Figura 20, são os altos valores de desvio padrão para o sinal de emissão óptica nos últimos dois pontos das curvas, possivelmente devido a diferença significativa de concentração e a diferença no mecanismo de atomização entre o padrão interno e o analito.

A Tabela 11 apresenta os resultados de concentração para Mg, Ca e K determinados por PI-LIBS utilizando os PFDs como padrões calibração. As concentrações determinadas para Mg nas amostras de amora, aveia e banana, e K

para a amostra de banana foram os mais próximos dos valores de referência, apresentando erros inferiores/igual a 13%. De modo geral a exatidão dos resultados obtidos pela calibração com padrão interno são inferiores aos obtidos pela calibração externa. Isso mostra que a normalização utilizando C I 247,780 nm não foi eficiente para contornar os efeitos de matriz encontrados. Um possível motivo para isso é que a linha utilizada possua alguma interferência espectral que não foi reportada pelo software utilizado. Uma possível solução seria utilizar outra linha de emissão de C. O banco de dados do NIST reporta o C I 165,73 nm como a linha de emissão de C mais intensa, entretanto essa linha de emissão atômica não pode ser observada devido a instrumentação utilizada ter cobertura espectral entre 186,132 e 1044,359 nm. Uma outra linha de emissão também muito intensa é a C I 193,10 nm, porém, não foi encontrado um pico diferenciável da linha base nessa região.

Figura 20: Curvas analíticas de calibração com padrão interno para Mg, Ca e K por LIBS, utilizando os padrões PFDs.

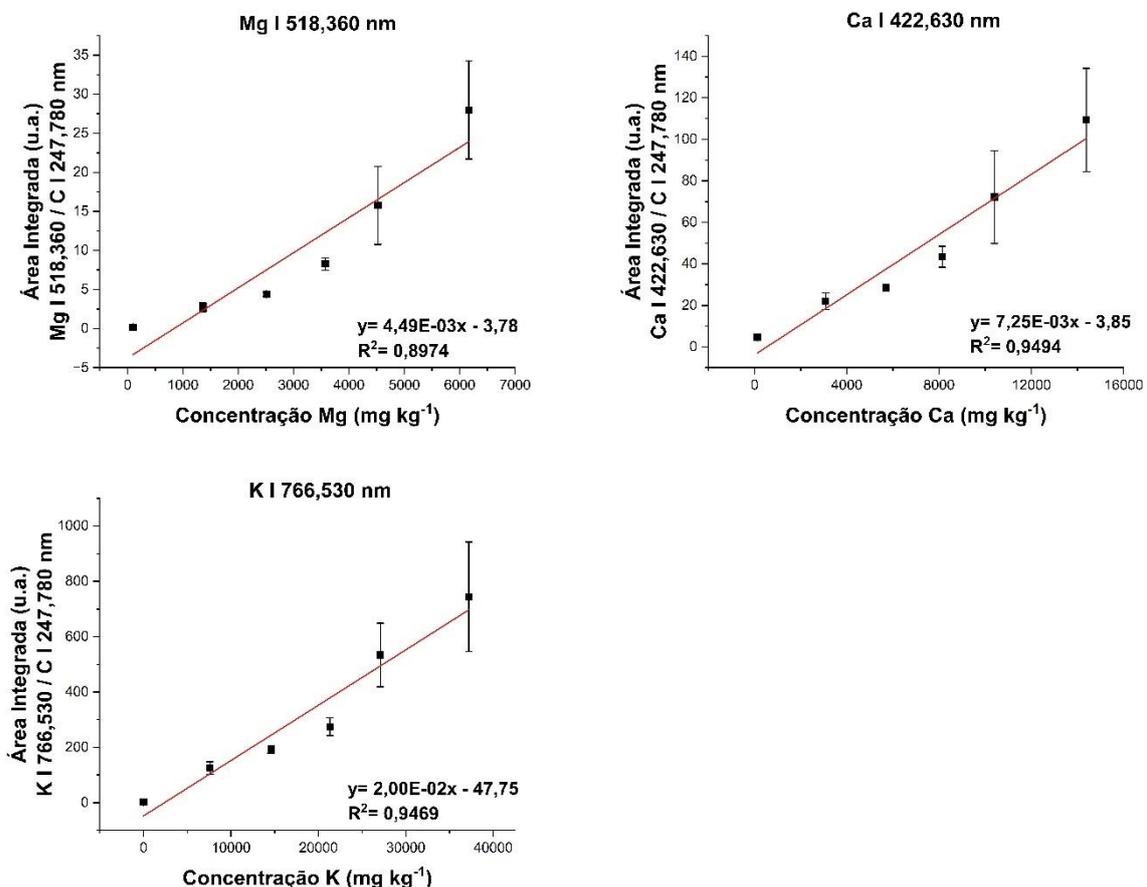


Tabela 11: Teores de Mg, Ca e K (média \pm desvio padrão, n=3) (mg kg⁻¹) determinados em farinhas por LIBS empregando calibração com PFDs e normalização com padrão interno.

		Amora	Aveia	Banana	Espinafre
Mg	Referência	1059 \pm 79	1567 \pm 91	1331 \pm 35	4509 \pm 159
	Encontrado	1141 \pm 13	1370 \pm 127	1237 \pm 8	1994 \pm 131
	Erro (%)	8	-13	-7	-56
Ca	Referência	1052 \pm 102	596 \pm 41	649 \pm 20	8813 \pm 304
	Encontrado	1625 \pm 41	1618 \pm 262	1538 \pm 31	3525 \pm 484
	Erro (%)	54	171	137	-60
K	Referência	6798 \pm 347	4027 \pm 245	23333 \pm 644	24127 \pm 912
	Encontrado	6018 \pm 382	5600 \pm 773	10230 \pm 792	11960 \pm 1448
	Erro (%)	-11	39	-56	50

5.5.8. Calibração multi-energia utilizando PFDs

Nessa etapa a calibração multi-energia foi avaliada utilizando-se o padrão 3 de PFD como material calibrante para construção das curvas analíticas. O padrão 3 foi escolhido por apresentar concentrações intermediárias de Mg, Ca e K e foi utilizado para as 4 amostras de farinhas funcionais. As pastilhas foram construídas de modo que a pastilha (1) contivesse 35% amostra, 35% celulose e 30% parafina; pastilha (2) contém 35% amostra, 35% padrão 3 PFD e 30% parafina. As linhas de emissão utilizadas para construção das curvas de calibrações foram:

- Mg: Mg II 279,617, Mg II 280,310, Mg I 285,280, Mg I 517,239 e Mg I 518,360 nm.
- Ca: Ca II 393,339, Ca II 396,796, Ca I 422,630, Ca I 612,179 e Ca I 616,148 nm.

A Figura 21 e Figura 22 apresentam as curvas analíticas para Ca e Mg, respectivamente, determinados pelo método MEC-LIBS utilizando PFD como material calibrante. As curvas de Ca na Figura 21 apresentam comportamento linear, baixos valores de resíduo e R² superiores a 0,96. Além disso, nenhum ponto da curva (linha de emissão) se destacou por estar muito longe da reta de regressão, informação que para o método MEC pode ser traduzida como ausência de interferência espectral (COSTA, 2021). Entretanto, para as curvas de Mg (Figura 22 a) foram observados

altos valores de desvio padrão para as variáveis x e y, comportamento não linear e R^2 muito inferiores. Visando uma melhora na regressão linear, para todos os casos foram removidos pontos (linhas de emissão) das curvas de modo a melhorar o comportamento linear, aumentar os R^2 e resolver as possíveis interferências espectrais observadas. As linhas removidas foram: amora Mg I 517,239 e Mg I 518,360 nm; aveia Mg II 279,617 e Mg II 280,310 nm; banana Mg I 517,239 nm; espinafre Mg II 285,280 Mg I 517,239nm. O resultado dessas mudanças está exposto na Figura 22 b, que apresenta as curvas analíticas de Mg que foram utilizadas para quantificação. Observa-se que, para cada amostra, diferentes linhas de emissão tiveram de ser removidas em busca de um comportamento linear. Caso essas linhas de emissão de fato apresentassem interferência espectral, elas deveriam apresentar o mesmo comportamento entre as amostras, o que não foi verificado. Conclui-se que nesse caso, o método MEC falha em identificar interferências espectrais semelhantes entre as amostras e mostra-se susceptível a efeitos de matriz.

Figura 21: Curvas analíticas de calibração MEC-LIBS para Ca utilizando PFD.

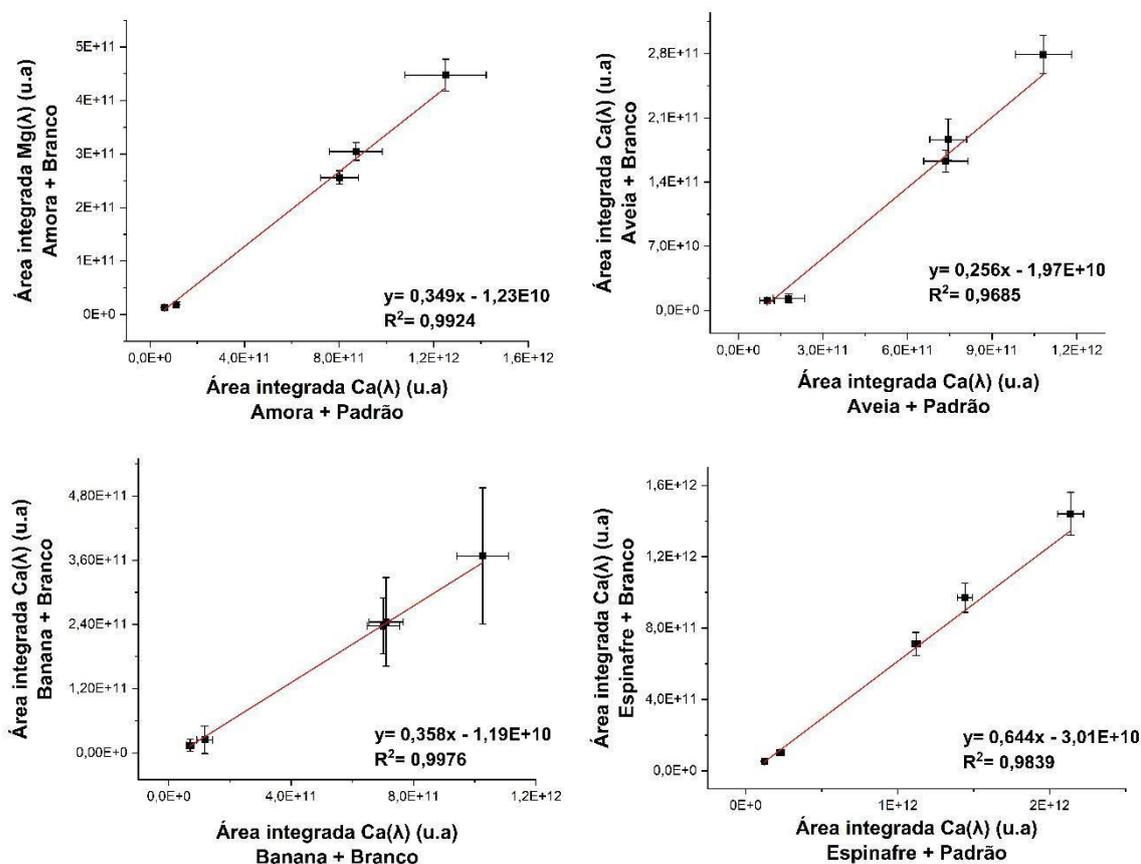


Figura 22: Curvas analíticas de calibração MEC-LIBS para Mg utilizando PFD, nas quais (a) são as curvas com todos os pontos da regressão e (b), as curvas com pontos removidos.

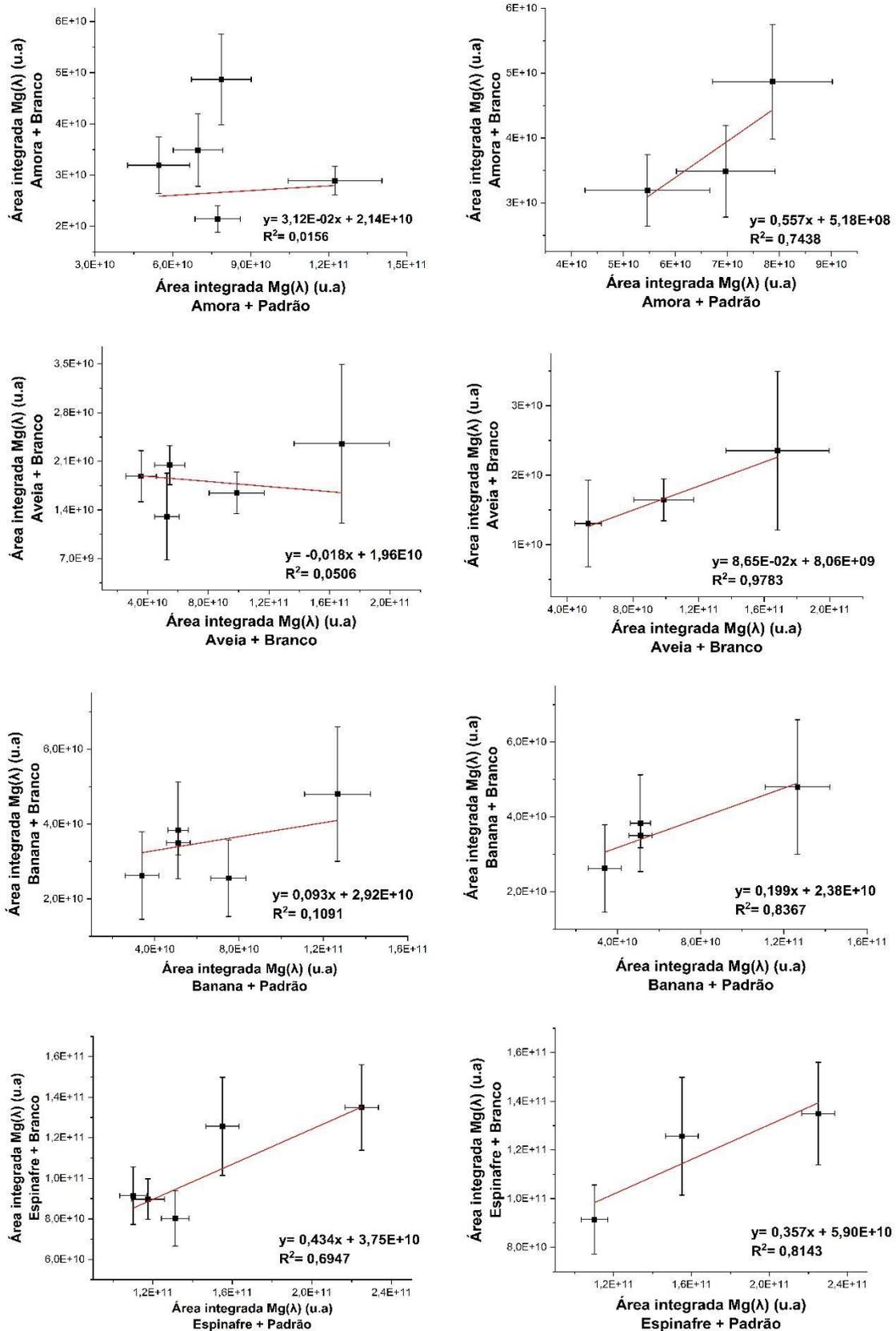


Tabela 12: Teores de Mg e Ca (média \pm desvio padrão, n=3) (mg kg⁻¹) determinados em farinhas por MEC-LIBS utilizando PFDs como padrões.

		Amora	Aveia	Banana	Espinafre
Mg	Referência	1059 \pm 79	1567 \pm 91	1331 \pm 35	4509 \pm 159
	Encontrado	-	336 \pm 55	905 \pm 348	2266 \pm 1605
	Erro (%)	-	-78	-32	-50
Ca	Referência	1052 \pm 102	596 \pm 41	649 \pm 20	8813 \pm 304
	Encontrado	4366 \pm 205	2802 \pm 439	4541 \pm 198	14732 \pm 3083
	Erro (%)	315	370	600	67

Avaliando os resultados expostos na Tabela 12, verifica-se que nenhum valor determinado pelo método MEC-LIBS utilizando os PFDs está sequer próximo aos valores de referência. O teor de Mg na amostra de amora não foi determinado devido ao baixo coeficiente de determinação, mesmo após remoção dos pontos. O menor erro relativo obtido foi de 32%, indicando baixíssima exatidão do método proposto. Mesmo para o elemento Ca, que apresentou curvas analíticas bem mais aceitáveis em comparação com as curvas de calibração do Mg, foram obtidos valores de erro relativos elevados. Como conclusão, o método proposto falhou em contornar efeitos de matriz e não exibiu sucesso em indicar as possíveis interferências espectrais. Resultados não esperados, já que a estratégia de calibração MEC é um método que envolve compatibilização de matriz, onde amostra e padrão se encontram numa mesma solução.

5.5.9. Calibração por variação do número de pulsos utilizando PFDs

A calibração por variação do número de pulsos (SRC) foi avaliada nessa etapa utilizando o padrão 3 PFD. Os números de pulsos de laser utilizados foram: 135, 189, 243, 297 e 351. A Figura 23 e a Tabela 13 apresentam as curvas de calibração e os parâmetros da regressão linear para o método proposto.

Avaliando os gráficos da Figura 23 e os parâmetros da Tabela 13, se observa que todas as curvas apresentam comportamento linear, em geral apresentam baixos valores de resíduos e uma boa correlação das variáveis x e y. Não foi observado perda de linearidade nos últimos pontos das curvas, indicando que a redução da quantidade de pulsos de fato evitou os problemas de blindagem do plasma e auto-absorção.

Figura 23: Curvas analíticas de calibração SRC-LIBS para Mg, Ca e K utilizando PFDs.

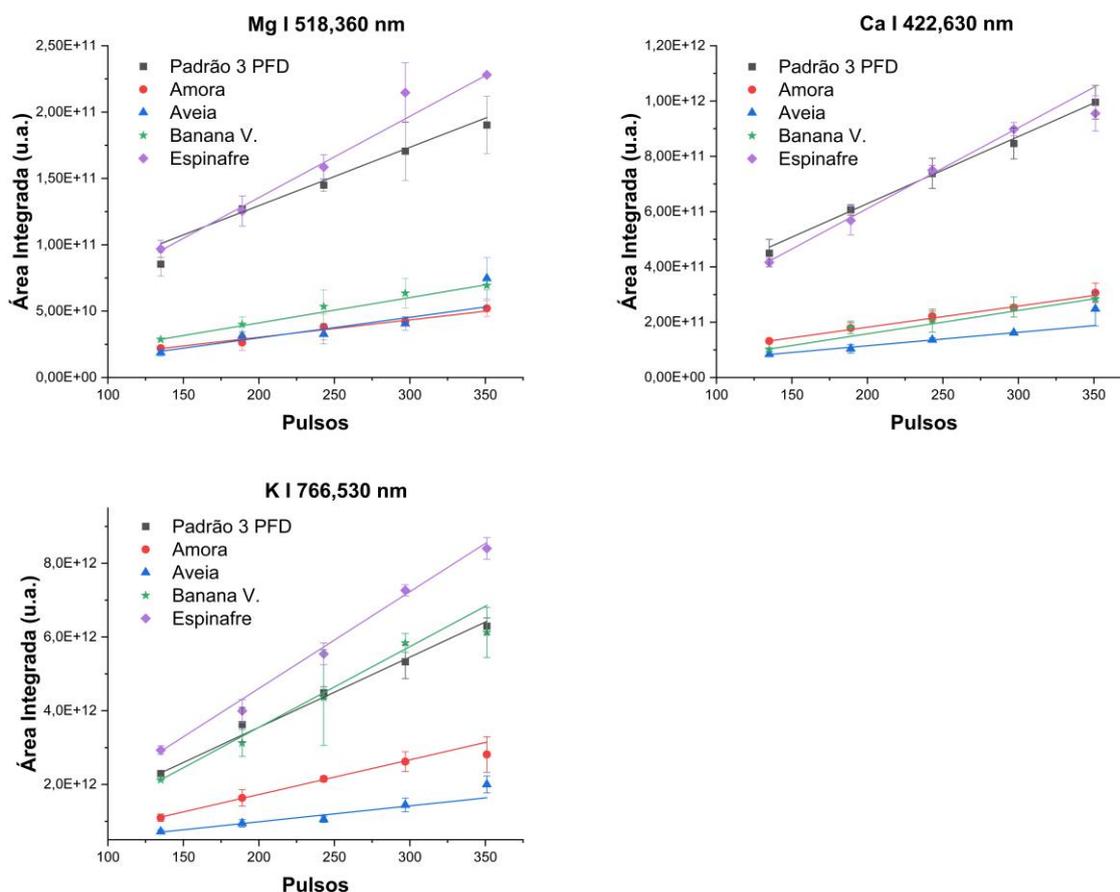


Tabela 13: Parâmetros das regressões lineares SRC-LIBS para Mg, Ca e K utilizando PFDs como materiais calibrantes

Elemento	Parâmetro	Amostra				
		Padrão	Amora	Aveia	Banana V.	Espinafre
Mg	Intercepto	$4,15 \times 10^{10}$	$4,17 \times 10^9$	$-1,19 \times 10^9$	$2,97 \times 10^9$	$1,30 \times 10^{10}$
	Inclinação	$4,40 \times 10^8$	$1,31 \times 10^8$	$1,55 \times 10^8$	$1,91 \times 10^8$	$6,13 \times 10^8$
	R ²	0,9071	0,9894	0,8654	0,9977	0,9981
Ca	Intercepto	$1,44 \times 10^{11}$	$2,90 \times 10^{10}$	$1,77 \times 10^{10}$	$-1,08 \times 10^{10}$	$2,62 \times 10^{10}$
	Inclinação	$2,42 \times 10^9$	$7,64 \times 10^8$	$4,85 \times 10^8$	$8,43 \times 10^8$	$2,92 \times 10^9$
	R ²	0,9949	0,9967	0,9875	0,9952	0,9923
K	Intercepto	$-2,61 \times 10^{11}$	$-1,58 \times 10^{11}$	$1,23 \times 10^{11}$	$-8,32 \times 10^{11}$	$-6,44 \times 10^{11}$
	Inclinação	$1,90 \times 10^{10}$	$9,42 \times 10^9$	$4,32 \times 10^9$	$2,19 \times 10^{10}$	$2,62 \times 10^{10}$
	R ²	0,9968	0,9929	0,9099	0,9929	0,9964

Os resultados encontrados na Tabela 14 mostram erros relativos inferiores ou iguais a 11% para os teores de Mg determinado nas quatro amostras, Ca na amostra de espinafre e K na mostra de banana verde. Nesses casos específicos, confirma-se que o modelo é viável para quantificação desses elementos nas amostras estudadas.

Entretanto, o modelo falha em determinar com exatidão os demais teores dispostos na Tabela 14. Um dos possíveis motivos para a baixa exatidão em alguns casos pode ser a diferença de concentração dos elementos entre amostra e padrão, já que um dos requisitos para a viabilidade da SRC é que o padrão e amostra tenham concentrações próximas. Como as amostras trabalhadas possuem muitas vezes teores elementares bastante distintos, em alguns casos o padrão e amostra possuem valores significativamente distintos. Isso pode ser facilmente observado na Tabela 14 quando comparamos a concentração de Ca do padrão 3 de PFD ($8144 \pm 26 \text{ mg kg}^{-1}$) com as concentrações de referência de Ca presentes nas amostras. A amostra de espinafre que apresenta concentração de Ca extremamente próxima ao padrão foi quantificada com sucesso pelo método com baixíssimo erro relativo de -2%, já as demais não puderam ser quantificadas pelo método. Apesar das amostras de farinhas funcionais apresentarem similaridades devido sua origem vegetal, elas ainda possuem entre si uma composição muito diferente, tornando difícil o desenvolvimento de uma metodologia que abranja todas as amostras.

Tabela 14: Teores de Mg, Ca e K (média \pm desvio padrão, n=3) (mg kg^{-1}) determinados em farinhas por SRC-LIBS utilizando PFDs como padrões.

		Amora	Aveia	Banana	Espinafre
Mg	Referência	1059 \pm 79	1567 \pm 91	1331 \pm 35	4509 \pm 159
	Encontrado	1071 \pm 153	1710 \pm 446	1480 \pm 152	4958 \pm 404
	Erro (%)	+1	+9	+11	+10
Ca	Referência	1052 \pm 102	596 \pm 41	649 \pm 20	8813 \pm 304
	Encontrado	2583 \pm 614	2354 \pm 746	2693 \pm 276	8605 \pm 602
	Erro r.(%)	+145	+295	+315	-2
K	Referência	6798 \pm 347	4027 \pm 245	23333 \pm 644	24127 \pm 912
	Encontrado	9804 \pm 2827	6735 \pm 1281	23649 \pm 3480	31258 \pm 1147
	Erro (%)	+44	+67	+1	+29

Pode-se concluir que a estratégia de calibração por variação do número de pulsos é viável para medições quantitativas de Mg, Ca e K por LIBS em amostras de farinhas funcionais utilizando padrões de PFD, desde que os padrões possuam faixa de concentração do analito similar às amostras.

6. CONCLUSÕES

As amostras de farinhas funcionais foram prensadas em forma de pastilhas e analisadas pelo sistema comercial LIBS J200 tandem. O uso de aglutinante no pastilhamento foi imprescindível para a obtenção de pastilhas coesas e não quebradiças. A parafina na concentração 30% m/m foi escolhida como melhor aglutinante. Linhas de emissão dos elementos Mg, Ca e K puderam ser identificados nos espectros gerados por LIBS e foram utilizadas para a otimização univariada dos parâmetros instrumentais. Os parâmetros otimizados foram: diâmetro de focalização 35 μm , energia do pulso 20 mJ, tempo de atraso 0,25 μs e número de pulsos 405.

Para a determinação quantitativa dos elementos Mg, Ca e K por LIBS, os métodos de calibração por PE, PI, MEC e SRC foram avaliados primeiramente utilizando CRMs de origem vegetal como padrões de calibração. As curvas de calibração por PE exibiram R^2 inferiores a 0,80 para Mg e Ca, valores altos de resíduo e baixa correlação das variáveis x e y, fazendo com que partes dos resultados obtidos fossem inexatos e confirmando a existência de efeitos de matriz. O uso da linha de emissão de carbono como padrão interno não alterou significativamente o comportamento das curvas de calibração e em todos os casos aumentou o erro relativo obtido, não se mostrando capaz de diminuir os efeitos de matriz. O teste realizado para a calibração MEC utilizando o SRM 3234 e SRM 1573a demonstrou certo potencial e, portanto, decidiu-se seguir com a análise das farinhas funcionais. A SRC se mostrou promissora em alguns casos e foi possível perceber que a escolha do material calibrante tem grande impacto na exatidão do método. Além disso, para a SRC foi necessário diminuir o número de pulsos trabalhados pois em alguns casos houve perda de linearidade.

Os padrões de PFDs fabricados foram utilizados como materiais calibrantes e as estratégias de calibração foram reavaliadas. As curvas analíticas construídas utilizando os métodos de PE e PI com PFDS apresentaram melhoras significativas nos parâmetros da regressão linear, resultando em uma melhora expressiva na exatidão dos resultados, principalmente a calibração por PE, mostrando-se viável para a maioria das determinações (erros relativos < 15%). A calibração MEC falhou em determinar quantitativamente os teores de Mg e Ca nas amostras, apresentando erros relativos superiores a 30%. Além disso, o método foi incapaz de determinar K, pois

requer ao menos 3 linhas de emissão para construção da curva analítica. A calibração SRC se mostrou novamente promissora diante da maioria dos resultados obtidos, entretanto, a correta escolha do material calibrante e de sua faixa de concentração são imprescindíveis para tornar viável o uso da SRC. Por fim, os PFDs se mostraram promissores, pois além dos resultados superiores aos CRMs, esses materiais possuem um custo muito inferior e um preparo simples.

7. REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para avaliação de alegação de propriedade funcional e de saúde para substâncias bioativas presentes em alimentos e suplementos alimentares. Guia nº 55/2021 – versão 1, 25 de nov. de 2021. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6358888/Guia+55_2021_vers%C3%A3o+1+de+25+11+2021.pdf/3e7d36b7-c14f-4feb-8028-041fb2fe78ac>. Acesso em: 20 jan. 2022.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Perguntas e respostas: Enriquecimento de farinha de trigo e de milho com ferro e ácido fólico. 3. ed. Brasília, 11 de jan. 2021. Disponível em: < <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/alimentos/perguntas-e-respostas-arquivos/enriquecimento-de-farinhas-de-trigo-e-de-milho.pdf>>. Acesso em: 04 abr. 2021.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alegações de propriedades funcional aprovadas. 11 de jan. de 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/alegacoes-de-propriedade-funcional-aprovadas_anvisa.pdf> Acesso em: 04 abr. 2021.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Biblioteca Virtual em Saúde: Alimentos funcionais. 2009. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/dicas/220_alimentos_funcionais.html> . Acesso em: 05 abr. 2021.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada-RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Disponível em:<https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0269_22_09_2005.html> Acessado em: 28 jan. 2023.

BABOS, Diego Victor; BARROS, Ariane Isis; NÓBREGA, Joaquim Araújo; et al. Calibration strategies to overcome matrix effects in laser-induced breakdown spectroscopy: Direct calcium and phosphorus determination in solid mineral supplements. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 155, p. 90–98, 2019

BABOS, Diego Victor; VIRGILIO, Alex; COSTA, Vinícius Câmara; DONATI, George Luis; PEREIRA-FILHO, Edenir Rodrigues. Multi-energy calibration (MEC) applied to laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). **Journal Of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 33, n. 10, p. 1753-1762, ago. 2018. Royal Society of Chemistry (RSC).

BIGLIARDI, Barbara; GALATI, Francesco. Innovation trends in the food industry: the case of functional foods. **Trends In Food Science & Technology**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 118-129, jun. 2013. Elsevier BV.

BONJOUR, Jean-Philippe; GUÉGUEN, Léon; PALACIOS, Cristina; et al. Minerals and vitamins in bone health: the potential value of dietary enhancement. **British Journal of Nutrition**, v. 101, n. 11, p. 1581–1596, 2009.

CAMPBELL, J.D. Lifestyle, minerals and health. **Medical Hypotheses**, v. 57, n. 5, p. 521–531, 2001.

CARDOSO, A. L.; OLIVEIRA, G. G. Alimentos Funcionais. *Jornal Eletrônico da Empresa Junior de Consultoria em Nutrição*, n. 5, Jun, p. 3-6. 2008.

CARVALHO, A. C. C. Development of methods for analyzing geological materials by Laser-Induced Breakdown Spectrometry. 2020. 89 p. Tese de Doutorado – Programa de PósGraduação em Ciências (Química). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ARANTES DE CARVALHO, Gabriel Gustinelli; NUNES, Lidiane Cristina; FLORÊNCIO DE SOUZA, Paulino; et al. Evaluation of laser induced breakdown spectrometry for the determination of macro and micronutrients in pharmaceutical tablets. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 6, p. 803, 2010.

COSTA, V. C.; AUGUSTO, A. S.; CASTRO, J. P.; MACHADO, R. C.; ANDRADE, D. F.; BABOS, D. V.; SPERANÇA, M. A.; GAMELA, R. R.; PEREIRA-FILHO, E. R. Laser Induced-Breakdown Spectroscopy (Libs): Histórico, Fundamentos, Aplicações E Potencialidades. **Química Nova**, v. 42, n. 5, p. 527–545, 2019.

COSTA, Vinicius; BABOS, Diego; CASTRO, Jeyne; et al. Calibration Strategies Applied to Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: A Critical Review of Advances and Challenges. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2021.

CARTER, Jake A.; BARROS, Ariane I.; NÓBREGA, Joaquim A.; DONATI, George L.. Traditional Calibration Methods in Atomic Spectrometry and New Calibration Strategies for Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **Frontiers In Chemistry**, 13 nov. 2018. Frontiers Media SA.

CREMERS, David A.; CHINNI, Rosemarie C.. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy—Capabilities and Limitations. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 44, n. 6, p. 457-506, 2 nov. 2009. Informa UK Limited.

D.A. Skoog, F.J. Holler e T.A. Nieman. Princípios de Análise Instrumental, 5ª Ed, Bookman, Porto Alegre, 836 pp, 2002.

DORMANDY, T.L. BIOLOGICAL RANCIDIFICATION. *The Lancet*, London, v. 294, n. 7622, p. 684-688, set. 1969. Elsevier BV.

FROM WILD GRASS TO THE INDUSTRIAL MILL: The history of flour. Flourworld Museum Wittenburg, 2017. Disponível em: <<https://flour-art-museum.de/english/background-and-culture/history-of-flour.php>>. Acesso em: 02 abr. 2021.

GODOI, Quienly; SANTOS, Dario; NUNES, Lidiane C.; et al. Preliminary studies of laser-induced breakdown spectrometry for the determination of Ba, Cd, Cr and Pb in toys. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 64, n. 6, p. 573–581, 2009.

HIGUERA, Julymar; SILVA, Ana Beatriz; NOGUEIRA, Ana Rita. Multi-Energy Calibration: a practical method for determination of macro and micronutrients in meat by ICP OES. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [S.L.], v. 0, n. 0, p. 1-7, 2019. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20190171>.

KORN, Maria das Graças Andrade; MORTE, Elane Santos da Boa; SANTOS, Daniele Cristina Muniz Batista dos; CASTRO, Jacira Teixeira; BARBOSA, José Tiago Pereira; TEIXEIRA, Alete Paixão; FERNANDES, Andrea Pires; WELZ, Bernhard; SANTOS, Wagna Piler Carvalho dos; SANTOS, Eduardo Batista Guimarães Nunes dos. Sample Preparation for the Determination of Metals in Food Samples Using Spectroanalytical Methods—A Review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, n. 2, p. 67-92, fev. 2008. Informa UK Limited.

KRUG, F. J.; Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar, 1a ed. revisada, Piracicaba, 2010.

LOBANOV, Vladimir G.; SLEPOKUROVA, Yuliya I.; ZHARKOVA, Irina M.; KOLEVA, Tat'yana N.; ROSLYAKOV, Yuriy F.; KRASTEVA, Ana P. Economic effect of innovative flour-based functional foods production. **Foods and Raw Materials**, v. 6, n. 2, p. 474–482, 2018. DOI: 10.21603/2308-4057-2018-2-474-482.

MARKIEWICZ-KESZYCKA, Maria; CAMA-MONCUNILL, Xavier; CASADO-GAVALDA, Maria P.; DIXIT, Yash; CAMA-MONCUNILL, Raquel; CULLEN, Patrick J.; SULLIVAN, Carl. Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) for food analysis: a review. **Trends In Food Science & Technology**, v. 65, p. 80-93, jul. 2017. Elsevier BV.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122. 2006.

NOMURA, Cassiana S.; INTIMA, Danielle P.; OLIVEIRA, Pedro V.; et al. Feasibility of using solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry for preparation of spiked filter papers with Cu and Zn as standards for direct solid analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 4, p. 1135–1137, 2008.

NUNES, Lidiane C.; ROCHA, Fábio R. P.; KRUG, Francisco J. Slope ratio calibration for analysis of plant leaves by laser-induced breakdown spectroscopy. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 34, n. 11, p. 2314–2324, 2019.

PASQUINI, Celio; CORTEZ, Juliana; SILVA, Lucas M. C.; et al. Laser Induced Breakdown Spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 3, p. 463–512, 2007.

PORCIONATO, Rodrigo; INTIMA, Danielle Polidorio; NOMURA, Cassiana Seimi. Preparation of ceramics spiked with cadmium and lead as synthetic calibrating material. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 49-53, 2010.

RADZIEMSKI, Leon; CREMERS, David. A brief history of laser-induced breakdown spectroscopy: From the concept of atoms to LIBS 2012. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 87, p. 3–10, 2013.

RUZIK, Lena. Speciation of challenging elements in food by atomic spectrometry. **Talanta**, v. 93, p. 18-31, maio 2012. Elsevier BV.

SANTOS, Giselaíne A.; CARVALHO, Alexandrina A. C.; OLIVEIRA, Aline P.; NAOZUKA, Juliana; MATTA, Fernanda V.; FELIPE-SOTELO, Mónica; WARD, Neil I.; CORRÊA, Nádia C. F.; NOMURA, Cassiana S.. Bioaccessibility of Essential Elements in Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Pulp. **Acs Food Science & Technology**, v. 1, n. 5, p. 874-883, 21 maio 2021. American Chemical Society (ACS).

SEZER, Banu; BILGE, Gonca; BOYACI, Ismail Hakki. Capabilities and limitations of LIBS in food analysis. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 97, p. 345-353, dez. 2017. Elsevier BV.

SILVRESTRE, Daniel Menezes. Avaliação dos parâmetros na análise direta de madeira por LIBS. 2017. 122p. Tese de (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências (Química). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SOETAN, K.O.; OLAIYA, C.O.; OYEWOLE, O. E.. The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: a review. **African Journal Of Food Science**, Ibadan, v. 4, n. 5, p. 200-222, 12 fev. 2010.

THIENGO, Fernanda Ferreira; DE CARVALHO ELIAS, Aline; LUZ, Maciel Santos; et al. Evaluation of calibration approaches for quantitative analysis of sludge by laser induced breakdown spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 38, n. 1, p. 131–141, 2023.

VIRGILIO, Alex; GONÇALVES, Daniel A.; MCSWEENEY, Tina; et al. Multi-energy calibration applied to atomic spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 982, p. 31–36, 2017.

WANG, Tiebang. Inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Analytical Instrumentation Handbook, Third Edition*, p. 57–74, 2004.

WILDER, Russell M.. A BRIEF HISTORY OF THE ENRICHMENT OF FLOUR AND BREAD. Journal Of The American Medical Association, v. 162, n. 17, p. 1539, 22 dez. 1956. American Medical Association (AMA).

Anexo 1: Súmula Curricular

DADOS PESSOAIS

Nome: Sady Lobo Almeida

Local e data de nascimento: Iguatu, CE, 28 de março de 1993.

EDUCAÇÃO

- Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. **Mestre em Ciências** (Química Analítica). Título: Desenvolvimento de métodos para a análise de farinhas funcionais por LIBS. Orientadora: Cassiana Seimi Nomura. Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, processo: 88882.328203/2010-01 – 2023.
- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil. Bacharel em Química com Habilitação em Química Industrial. 2011-2016.

HISTÓRICO PROFISSIONAL

- Analista de laboratório II. Danone. 2016-2020.
- Estagiário (graduação). EMBRAPA - UFC. 2016.
- Estagiário (químico). Tc Scientific. 2014.
- Iniciação científica. LEQA – UFC. 2011-2013.

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO

- **ALMEIDA, S. L.**; ELIAS, A. C.; NAOZUKA, J.; VIRGÍLIO, A.; ROCHA, F. R.; NOMURA, C. S. Determination of Ca, Mg, K, and Mo in plant materials by laser-induced breakdown spectroscopy. 20º ENQA/8º CIAQA, Bento Gonçalves, RS, 2022.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

- 20º Encontro Nacional de Química Analítica. Bento Gonçalves, Brasil, 2022.

ATIVIDADES ACADÊMICAS

- Monitora da disciplina QFL 1212 (Química Analítica II), sob supervisão do Prof(a). Thiago Regis Longo Cesar da Paixão, Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE). IQ/USP. 1º semestre de 2021.
- Monitora da disciplina QFL 1313 (Química Analítica III), sob supervisão do Prof(a). Cassiana Seimi Nomura, Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE). IQ/USP. 1º semestre de 2022.