



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Química Fundamental
Programa de Pós-Graduação em Química

Tese de Doutorado

Desenvolvimento de métodos espectroanalíticos aplicados à documentoscopia, bens culturais e alimentos

Flávia de S. L. Borba

Recife
2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Química Fundamental
Programa de Pós-Graduação em Química

Desenvolvimento de métodos espectroanalíticos aplicados à documentoscopia, bens culturais e alimentos

Flávia de S. L. Borba*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFPE como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Maria Fernanda Pimentel

Co-orientador: Dr. Ricardo Saldanha Honorato

***Bolsista CNPq**

Recife

2012

Catálogo na fonte
Bibliotecária Joana D'Arc L. Salvador, CRB 4-572

Borba, Flávia de S. L.
Desenvolvimento de métodos espectroanalíticos
aplicados à documentoscopia, bens culturais e alimentos
/ Flávia de S. L. Borba. – Recife: O Autor, 2012.
135 f.: fig., graf. tab.

Orientadora: Maria Fernanda Pimentel.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de
Pernambuco. CCEN. Química Fundamental, 2012.
Inclui referências e anexo.

1. Química analítica. 2. Análise multivariada.
3. Alimentos - Análise. 4. Espectroscopia de
infravermelho. I. Pimentel, Maria Fernanda
(orientadora). II. Título.

543

(22. ed.)

FQ 2014-30

Tese submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Química.

Aprovada:

**Prof^a Maria Fernanda Pimentel
(Orientadora)**

**Departamento de Engenharia Química
Universidade Federal de Pernambuco**

Prof^a Simone da Silva Simões

**Departamento de Química
Universidade Estadual da Paraíba**

Prof^a Liliana de Fátima Bezerra Lira de Pontes

**Departamento de Química
Universidade Federal da Paraíba**

Prof^o Adriano Otávio Maldaner

**Departamento de Polícia Federal
Instituto Nacional de Criminalística**

Prof^a Ana Paula Silveira Paim

**Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco**

**Desenvolvimento de métodos espectroanalíticos aplicados à
documentoscopia, bens culturais e alimentos**

Por

Flávia de Souza Lins Borba

**Departamento de Química Fundamental
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Universidade Federal de Pernambuco
Recife-PE-Brasil
18 de Junho de 2012**

Dedico este trabalho a três pessoas que muito me ensinaram:

Prof. Arnóbio (tutor do PET durante a graduação);

Prof. Ricardo (Orientador da iniciação científica e do mestrado)

e Profa. Fernanda (Orientadora do doutorado).

Agradecimentos

À Deus, por ter me dado força nos momentos mais difíceis que passei.

Ao CNPq, pela bolsa cedida.

Aos meus pais, por terem me ajudado em todos os momentos que precisei deles.

À Fernanda Pimentel e à Ricardo Honorato, pelos ensinamentos e por terem se dedicado bastante ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos Profs. Celio Pasquini, Márcio Coelho, Roberto Kawakami, Maria Luisa Cervera e Anne-Marie pelos ensinamentos.

Ao Prof. Ricardo Longo por ter sido sempre um grande amigo.

Ao Prof. Benício (In Memoriam) e ao Prof. Anórbio por terem me ajudado durante toda a minha vida acadêmica.

Aos Professores do DQF pelos ensinamentos.

Aos funcionários do DQF Patrícia e Maurílio e à funcionária da biblioteca Joana pela gentileza no tratamento.

À Marcelo Andrade, Juliana Cortez, Carol Santos, Giani, Uliana, Rodrigo Oliveira e Viviane Khoury pelas discussões do trabalho e por todo trabalho “braçal” que eles fizeram para que eu pudesse concluir a parte experimental deste trabalho.

À Prof. Helen Koury e Roberto Araújo por cederem as pinturas e os tijolos analisadas nesta tese.

À todos que conheci em Campinas (em especial Glau) e em Valencia durante a realização deste trabalho.

À todos os amigos que conversaram comigo durante os momentos mais conturbados do doutorado.

À toda minha família, Vovô João Borba (In Memoriam), Vovó Nicinha (In Memoriam), voinha (In Memoriam), tios, tias, primos, primas e sobrinhos.

Aos integrantes do LAC, por sempre me ajudarem nos momentos necessários.

À Banca de avaliadores por terem aceitado o trabalho e por terem tido um pouco de paciência...

À todos que contribuíram diretamente e indiretamente para realização deste trabalho.

RESUMO

Esta tese é composta por três trabalhos. O primeiro trabalho trata do desenvolvimento de um método analítico não destrutivo para discriminar tintas de canetas azuis do tipo gel (3 marcas), esferográfica (5 marcas) e rollerball (2 marcas). Foram adquiridos espectros de infravermelho médio por reflectância total atenuada de círculos preenchidos com tinta em três tipos de papel A4, sendo duas marcas de papel branco (papel 1 e papel 2) e uma de papel reciclado (papel 3). O algoritmo Kennard-Stone foi utilizado para selecionar os espectros do papel 1 para compor os conjuntos de treinamento, validação e teste. Foram construídos dois modelos com a análise discriminante linear sendo um com as classes compostas pelo tipo e o outro pelas marcas das tintas. Um novo conjunto de teste composto pelos espectros obtidos no papel 2 e 3 foi utilizado para avaliar a influência do papel nas predições dos modelos. Foi obtido 100% de classificação correta em todos os conjuntos de teste, exceto na classificação por marca do papel 3, em que foi obtida 91,3% de classificação correta. Na segunda parte desta tese, a espectroscopia de emissão em plasma induzido por laser (LIBS) foi empregada para analisar sete tijolos antigos e dois fragmentos de pinturas rupestres pertencentes a dois sítios arqueológicos brasileiros, sendo um no estado do Piauí (Toca da Extrema II) e outro no estado do Rio Grande do Norte (Xique-xique). Um instrumento LIBS construído no laboratório (laser Nd:YAG, 1064 nm, 5,2 ns), contendo um policromador *echelle*, foi empregado para a aquisição dos espectros. Devido à complexidade dos espectros, a análise de componentes principais foi empregada para explorar o conjunto de dados. Os tijolos foram discriminados pelos seus teores de Ti, Zr, Sr e Fe. Estudos preliminares envolvendo uma pintura realizada sobre uma tela de madeira contendo diferentes camadas de material foram realizados para determinar a melhor energia do pulso de laser. Para cada fragmento de pintura, foram realizados 8 pulsos sucessivos em 16 locações diferentes, sendo 8 locações sobre a pintura e 8 sobre o substrato. Neste trabalho foi demonstrado que a utilização de técnicas multivariadas é indispensável devido à grande complexidade dos espectros obtidos durante estudo de profundidade de amostras arqueológicas. Finalmente, a terceira parte desta tese foi dedicada a avaliação do efeito de matriz na determinação da concentração de 20 elementos em suplemento alimentar, por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Foram adquiridas em estabelecimentos comerciais, diferentes marcas de um suplemento alimentar inicialmente designado de “Ração Humana”, cuja composição é variada, mas pode conter cereais, farelos, fibras, farinhas, linhaça, gergelim, extrato de soja, levedo de cerveja, cacau em pó, gelatina em pó e guaraná em pó. Três procedimentos de decomposição foram avaliados: (1) decomposição assistida por microondas, (2) decomposição por combustão na mufla com aditivos e (3) decomposição por combustão na mufla sem aditivos. Os melhores resultados foram obtidos com a digestão por combustão na mufla sem aditivos. Com exceção do Mo, o nível de todos os elementos determinados de forma preliminar estão em concordância com os níveis reportados em produtos destinados à nutrição previamente descritos na literatura.

Palavras-chave: Análise multivariada. Arqueometria. Análise forense. Espectroscopia na região do infravermelho. Espectroscopia de emissão em plasma induzido por laser (LIBS). espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES).

ABSTRACT

This thesis is composed of three works. The first work describes the development of a nondestructive method to discriminate different types and brands of blue pen ink, namely, ballpoint (5 brands), gel (3 brands) and rollerball (2 brands). Attenuated total reflectance infrared spectra were acquired in circular areas painted using three types of paper: two brands of A4 sulfite paper (paper 1 and paper 2) and one recycled paper (paper 3). The Kennard-Stone algorithm was employed to select the samples of paper 1 for the training, validation and test set. Two linear discriminate analysis models were built, one to classify the ink pens according to their type and another to classify according to the brand. A new test set composed of spectra obtained on paper 2 and 3 was employed to evaluate the influence of the paper on predictions using the models. A correct classification rate of 100% was obtained in the test sets, except in the classification according to brand on paper 3, where the rate achieved was 91,3%. In the second part of this thesis, laser induced breakdown spectroscopy (LIBS) was employed to analyze 7 historical bricks and two fragments of prehistoric rock wall paintings found at two Brazilian sites: one in the state of Piauí (Toca da Extrema II) and another in the state of Rio Grande do Norte (Xique-xique). A time-resolved echelle based LIBS system assembled in the laboratory (laser Nd:YAG, 1064 nm, 5.2 ns) was employed for spectral acquisition. Due to the complexity of LIBS spectra, principal component analysis (PCA) was employed to explore the spectral data set. The bricks were distinguished by the amount of Ti, Zr, Sr and Fe. Preliminary depth profile studies were carried out in surrogate samples of a multilayer painting on wood. For each fragment of wall painting, the depth profile composition was investigated by firing eight successive laser shots at each of 16 locations (8 in the area of pigment and 8 in the area of substrate). This work demonstrated that the use of multivariate techniques is compulsory due the high complexity of the spectral data obtained from depth profile studies of the archaeological samples. Finally, in the third part of this thesis, the matrix effect in the determination of the concentration of 20 elements in a food supplement was evaluated, using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). Different brands of the supplement initially denominated “Ração Humana” (“Human Ration”) were purchased. This product can be composed of cereal, bran, flour, fiber, linseed, sesame, soybean extract, yeast beer, cocoa powder, gelatin powder, guarana powder. Three digestion methods were evaluated: (1) microwave digestion, (2) dry ashing with additives and (3) dry ashing without additives. The dry ashing without additives promoted the best result. With exception of Mo, the preliminary levels of all elements determined agree with levels reported in products designated for human nutrition as described in the literature.

Keywords: Multivariate techniques. Archeometry. Forensic analysis. Infrared spectroscopy. Laser induced breakdown spectroscopy (LIBS). Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES).

Siglas e Notações

α_a	Coeficiente angular da curva de adição de analito
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
α_p	Coeficiente angular da curva analítica
ATR	Acrônimo do inglês para reflectância total atenuada
CRC	Acrônimo do inglês para célula reacional de colisão
EASI-MS	Técnica analítica <i>easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry</i>
Er	Erro relativo
FD	Função discriminante
FLE	Técnica analítica <i>filtered light examination</i>
FTIR	Acrônimo do inglês para infravermelho com transformada de Fourier
FWHM	Acrônimo do inglês para duração do pulso de laser
HR	Acrônimo do inglês para alta resolução
HPLC	Acrônimo do inglês para cromatografia líquida de alta eficiência
ICCD	Acrônimo do inglês para detector de carga acoplada intensificado
ICP	Acrônimo do inglês para plasma indutivamente acoplado
ICP-MS	Acrônimo do inglês para espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado
ICP OES	Acrônimo do inglês para espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado
LD	Limite de detecção
LDA	Método de classificação <i>Linear Discriminant Analysis</i>
LD_e	Estimativa do limite de detecção
LDMS	Técnica analítica <i>Laser desorption mass spectrometry</i>
LIBS	Acrônimo do inglês para Espectroscopia de Emissão em Plasma Induzido por Laser
LQ	Limite de quantificação
LQ_e	Estimativa limite de quantificação
m	Sensibilidade da calibração
MALDI-MS	Acrônimo do inglês para espectrometria de massa com dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz
MCP	Acrônimo do inglês para placa do microcanal

MID	Infravermelho médio
MSP	Técnica analítica <i>reflectance visible microspectrophotometry</i>
NIR	Infravermelho próximo
Nd:YAG	Fonte de laser de estado sólido constituído por Neodímio em um cristal hospedeiro contendo granada de ítrio e alumínio
PC	Acrônimo do inglês para componente principal
PCA	Acrônimo do inglês para análise de componentes principais
PD	Poder discriminatório
Q-switched	Modo para emissão de laser de maneira pulsada. Nesta tese é tratada como um parâmetro que corresponde ao intervalo de tempo entre o acionamento do flashlamp e o acionamento do Q-switched.
s_b	Desvio padrão calculado a partir de repetições do branco
SIMCA	Método de classificação <i>Soft Independent Modeling of Class Analogy</i>
SNV	Método de pré-processamento <i>Standard Normal Variate</i>
SPA	Acrônimo do inglês para algoritmo das projeções sucessivas
T1	Tijolo 1
T2	Tijolo 2
T3	Tijolo 3
T4	Tijolo 4
T5	Tijolo 5
TLC	Acrônimo do inglês para cromatografia por camada delgada
UATR	Acessório <i>Universal Attenuated Total Reflectance</i> que obtém espectros de infravermelho por ATR.
UV-VIS	Ultravioleta e visível
XRF	Acrônimo do inglês para fluorescência de Raio-X

Sumário

Apresentação	13
CAPÍTULO 1: Classificação de tintas de canetas azuis por análise discriminante linear empregando a espectroscopia no infravermelho médio	14
1.1 Introdução	15
1.2 Objetivos	22
1.3 Fundamentação teórica	23
1.3.1 Pré-processamento de dados	23
1.3.2 Métodos de reconhecimento de padrão	24
1.3.3 Algoritmo das projeções sucessivas	26
1.3.4 Espectroscopia na região do infravermelho	27
1.4 Material e métodos	29
1.4.1 Descrição das amostra	29
1.4.2 Instrumentação	30
1.4.3 Tratamento dos dados	30
1.5. Resultados e discussão	32
1.5.1 Análise dos espectros	32
1.5.2 Construção do modelo LDA e resultados das previsões obtidas com os espectros de infravermelho das tintas de canetas adquiridos sobre o papel 1	37
1.5.3 Resultados das previsões realizadas com os espectros de infravermelho das tintas de canetas adquiridos sobre o papel 2 e o papel 3	44
1.6 Conclusões e perspectivas	45
Referências	46
CAPÍTULO 2: Análise exploratória da composição de sete tijolos antigos e dois fragmentos de pinturas rupestres por espectroscopia de emissão em plasma induzida por laser	49
2.1 Introdução	50
2.2 Objetivos	56
2.3 Fundamentação teórica	57
2.3.1 LIBS	57
2.4 Procedimento experimental	59
2.4.1 Apresentação das amostras	59
2.4.1.1 Tijolos	59

2.4.1.2 Pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Toca da Extrema II	61
2.4.1.3 Pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Xique-xique	61
2.4.1.4 Pintura em madeira	62
2.4.1.5 Pigmento	62
2.4.2 Sistemas LIBS adaptados para a realização das análises	63
2.4.2.1 Sistema LIBS 1	63
2.4.2.2 Sistema LIBS 2	64
2.4.3 Experimentos	65
2.4.3.1 Análises com o sistema LIBS1	66
2.4.3.1.1 Análise dos tijolos	66
2.4.3.1.2 Análise da pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Toca da Extrema II	66
2.4.3.1.3 Análise da pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Xique-xique	67
2.4.3.2 Análises com o sistema LIBS2	68
2.4.4.2.1 Análise dos tijolos	68
2.4.4.2.2 Análise das pinturas	68
2.4.4.3.1 Análise da pintura em madeira	69
2.4.4.3.2 Análise das pinturas rupestres	69
2.4.4.3.3 Análise do pigmento	70
2.5 Resultados e discussão	71
2.5.1 Sistema LIBS 1	71
2.5.1.1 Análise dos tijolos	71
2.5.1.2 Análise da pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Toca da Extrema II	71
2.5.1.3 Análise da pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Xique-xique	72
2.5.1.4 Avaliação dos resultados obtidos com o sistema LIBS 1	72
2.5.2 Sistema LIBS 2	72
2.5.2.1 Análise dos tijolos	73
2.5.2.1.1 Teste I	73
2.5.2.1.2 Teste II	73
2.5.2.2 Análise das pinturas	75

2.5.2.2.1 Análise da pintura em madeira	75
2.5.2.2.2 Pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Toca da Extrema II	79
2.5.2.2.3 Pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Xique-xique	84
2.5.3.4 Análise do pigmento	88
2.5.3.5 Avaliação dos resultados obtidos com o sistema LIBS 2	88
2.6 Conclusões e perspectivas	89
Referências	91
	94
CAPÍTULO 3: Avaliação do efeito de matriz na determinação da concentração de vinte elementos em amostras de suplemento alimentar com ICP OES	
3.1 Introdução	95
3.2 Objetivos	101
3.3 Fundamentação teórica	102
3.3.1 Preparação da amostra	102
3.3.1.1 Ultra-som	102
3.3.1.2 Decomposição	102
3.3.1.2.1 Decomposição por radiação microondas	102
3.3.1.2.2 Decomposição por combustão na mufla	103
3.3.2 ICP OES	103
3.4 Procedimento experimental	105
3.4.1 Instrumentação	105
3.4.2 Reagentes	105
3.4.3 Identificação das amostras	106
3.4.4 Preparação das amostras	106
3.4.4.1 Decomposição assistida por radiação microondas	108
3.4.4.2 Decomposição por combustão na mufla com adição de nitrato de magnésio e óxido de magnésio	109
3.4.4.3 Decomposição por combustão na mufla	110
3.4.5 Medidas por ICP OES	111
3.4.5.1 Amostras decompostas por radiação microondas	111
3.4.5.2 Amostras decompostas por combustão na mufla com e sem adição de nitrato de magnésio e óxido de magnésio	113
3.4.5.3 Parâmetros instrumentais	115
3.4.6 Cálculos realizados	115
3.4.6.1 Sensibilidade de calibração	115

3.4.6.2 Estimativa do limite de detecção (LDe) e do limite de quantificação (LQe)	115
3.3.6.3 Erro relativo entre os coeficientes angulares das curvas analíticas e de adição de analito	116
3.5 Resultados e discussão	117
3.5.1 Seleção dos comprimentos de onda	117
3.5.2 Comparação entre os coeficientes angulares das curvas analíticas e de adição de analito	119
3.5.3 Características analíticas e concentrações das amostras	123
3.6 Conclusões e perspectivas	131
Referências	132
Anexo: Publicações decorrentes do trabalho	135

Apresentação

O trabalho descrito no Capítulo 1 refere-se ao desenvolvimento de uma metodologia analítica não destrutiva empregando a espectroscopia na região do infravermelho médio, visando aplicação em perícia química, mais especificamente na área de documentoscopia. A Análise discriminante linear foi empregada para discriminar tintas de canetas azuis do tipo gel (3 marcas), esferográfica (5 marcas) e rollerball (2 marcas). Os espectros das tintas de canetas foram adquiridos no Laboratório de Combustíveis do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco.

No Capítulo 2, é apresentado o desenvolvimento de um método utilizando a espectroscopia de emissão em plasma induzido por laser (*laser induced breakdown spectroscopy* - LIBS) análise de bens culturais. Tijolos antigos e dois fragmentos de pinturas rupestres pertencentes a dois sítios arqueológicos brasileiros, sendo um no estado do Piauí (Sítio Toca da Extrema II) e outro no estado do Rio Grande do Norte (Sítio arqueológico Xique-xique) foram analisados. Devido à complexidade dos espectros, a análise de componentes principais foi empregada para explorar o conjunto de dados. A aquisição dos espectros foi realizada durante missão de estudos (Projeto CAPES/PROCAD) por três meses não consecutivos (julho de 2008, janeiro e julho de 2009) no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (IQ-UNICAMP), sob a supervisão do Prof. Celio Pasquini.

No Capítulo 3, é detalhado o trabalho que trata da avaliação do efeito de matriz na determinação da concentração de 20 elementos em suplemento alimentar, por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Esta etapa da tese foi realizada durante o doutorado sanduíche na *Universidad de Valencia - Campus Burjassot* entre abril e setembro de 2011 (6 meses), sob a orientação da Profa. Maria Luisa Cervera Sanz.

CAPÍTULO 1

Classificação de tintas de canetas azuis por análise discriminante linear
empregando a espectroscopia no infravermelho médio

1.1 Introdução

O desenvolvimento de técnicas analíticas avançadas no combate ao crime é de fundamental importância para a sociedade contemporânea, pois podem ajudar a polícia a resolver crimes de maneira mais fácil e confiável. A interação entre a polícia e a universidade é muito importante, pois peritos podem informar aos pesquisadores os problemas mais comuns enfrentados que demandam muito tempo para serem resolvidos ou que ainda não possuem resolução. E em troca, a universidade pode desenvolver procedimentos analíticos para resolver estes. A análise de documentos questionados é uma das áreas de maior relevância na atividade pericial criminal, sendo a identificação do instrumento escrevente em documentos uma importante ferramenta na elucidação dos mais diversos crimes [1].

As tintas de caneta que compõem estes documentos são sistemas complexos constituídos por uma grande variedade de compostos químicos, sendo estes orgânicos e inorgânicos [1]. Alguns dos componentes das tintas são listados abaixo:

- 1- Corantes são agentes colorantes aromáticos;
- 2- Pigmentos são agentes colorantes que podem ser sintéticos ou naturais e orgânicos ou inorgânicos. Diferenciam-se dos corantes por estarem presentes na forma de uma suspensão;
- 3- Os solventes correspondem à parte volátil da tinta, eles têm a função de dissolver todos os compostos presentes na tinta. Muitas canetas possuem água e solventes orgânicos solúveis em água, como por exemplo, as canetas tipo gel. Entretanto também existem tintas a base unicamente de solventes orgânicos como é o caso de algumas canetas esferográficas;
- 4- As resinas são utilizadas para ajustar a viscosidade da tinta. A resina, diferentemente do solvente, não é volátil e possui a função de facilitar a interação entre a tinta e o papel;
- 5- Para permitir que a esfera da ponta da caneta role livremente, são empregados lubrificantes;
- 6- Biocidas são adicionados para evitar o crescimento de micro-organismos na tinta;

- 7- Os surfactantes possuem a função de ajustar a tensão superficial da mistura e fazem com que uma quantidade conveniente de tinta seja liberada durante a escrita;
- 8- Inibidores de corrosão preservam o metal da esfera da ponta da caneta;
- 9- Também são empregados aditivos para ajustar o pH da tinta.

A grande variedade de compostos químicos presentes na tinta dificulta a análise destes materiais. O espectro de infravermelho deste material, por exemplo, é muito complexo e de difícil interpretação, pois as bandas de absorção dos compostos orgânicos se sobrepõem.

Outra dificuldade presente na análise de documentos é que este tipo de amostra deve ser analisado preferencialmente por métodos que não comprometam sua integridade física, ou seja, que utilizem técnicas instrumentais não destrutivas. Entretanto, devido a grande complexidade deste tipo de amostra, várias metodologias destrutivas vêm sendo aplicadas ao estudo de documentos questionados [2-9]. Roux e colaboradores extraíram a tinta de caneta do papel com piridina, em seguida, empregaram a cromatografia por camada delgada (*thin-layer chromatography* - TLC) para diferenciar canetas esferográficas, sendo 49 azuis e 42 pretas [2]. Neste mesmo trabalho, eles comparam os resultados obtidos com a técnica TLC e as técnicas de *filtered light examination* (FLE); *reflectance visible microspectrophotometry* (MSP). A TLC apresentou o melhor poder de classificação individual com relação à marca e ao modelo, seguida da FLE e finalmente da MSP. A melhor classificação foi obtida com as três técnicas combinadas. Entretanto, mesmo com as três técnicas não foi possível classificar todas as canetas corretamente com relação à marca e ao modelo.

Técnicas que não requerem o preparo de amostra em muitos casos, como o infravermelho e o ultravioleta visível, também foram aplicadas na análise de documentos com metodologias destrutivas [4-8]. Zieba-Palus e Kunicki Kher empregaram a espectroscopia micro-FTIR, Raman e fluorescência de Raio-X (XRF) para distinguir 27 canetas esferográficas azuis, 23 canetas esferográficas pretas, 10 canetas géis azuis e 9 géis pretas [4]. Para a obtenção dos espectros de infravermelho, as tintas das canetas foram extraídas e colocadas para secar em um prato de vidro, em seguida a placa de vidro foi colocada na janela de KBr. As canetas esferográficas azuis foram combinadas em 351 pares possíveis. Dez pares foram distinguidos por infravermelho, mas não foram distinguidos por Raman. Dezessete pares foram distinguidos por Raman

e não foram distinguidos por infravermelho. Dezesete pares não foram distinguidos nem por infravermelho nem por Raman. Aplicando-se o XRF, foi possível diferenciar mais 14 pares, ou seja, 3 pares não foram distinguidos por nenhuma técnica. Das 253 combinações possíveis das canetas esferográficas pretas, 4 não foram distinguidas por nenhum método aplicado. Finalmente para as canetas géis, apenas um par de canetas preta e azul não foram distinguidas. Neste trabalho, foi mostrado que a utilização de uma grande quantidade de técnicas ajudou a diferenciar muitos pares de canetas.

A espectroscopia na região do ultravioleta visível também é uma técnica que não requer pré-tratamento, mas foi aplicada com uma metodologia destrutiva para análise de documentos [6-8]. Adam, Sherratt e Zholobenko utilizaram duas metodologias destrutivas para preparação das amostras [7]: na primeira a tinta foi extraída após a introdução de um tubo capilar na carga da caneta, em seguida, a tinta removida foi depositada num tubo contendo etanol; na segunda, pequenas porções de tinta foram removidas do papel cuidadosamente com uma lâmina fina e foram mergulhadas em um solvente. A Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis* - PCA) foi empregada aos espectros obtidos com as duas metodologias para identificar agrupamentos entre tintas de caneta de mesma marca. Para as duas metodologias, todas as marcas de caneta foram diferenciadas com as quatro primeiras componentes principais.

A *laser desorption mass spectrometry* é uma técnica vantajosa por causar danos mínimos às amostras. Grim, Siegel e Allison empregaram a *laser desorption mass spectrometry* para a detecção do corante violeta de metila em tintas de canetas esferográficas azuis e pretas [9]. Neste experimento, foram traçadas linhas retas em um papel com cada caneta. Em seguida, foram conduzidos dois tipos de envelhecimento natural, um controlado e outro não. As amostras também foram conduzidas a um envelhecimento artificial, a partir da irradiação com luz UV. Os espectros de massas referentes a 50 disparos de laser em uma mesma localização foram acumulados para obtenção de um espectro médio. Foram adquiridos 3 espectros médios para cada amostra. O LDMS mostrou ser uma técnica sensível para detectar tanto o corante violeta de metila quanto a degradação sofrida por este corante após o envelhecimento do documento.

Cada técnica possui vantagens e desvantagens na análise de documentos. A HPLC, por exemplo, é vantajosa na análise de misturas complexas porque promove a separação dos constituintes. Entretanto, é uma técnica destrutiva e só é eficiente na determinação de alguns componentes. A técnica de infravermelho por reflectância total atenuada (*attenuated total reflectance* - ATR) é não destrutiva, mas uma limitação é a sobreposição das bandas de absorção da tinta com as bandas de absorção do papel [5].

A espectroscopia de massas tem sido utilizada para a datação das tintas, que é muito útil para constatar adulterações realizadas algum tempo depois do documento ser gerado. Esta datação baseia-se na degradação dos corantes, que começa a ocorrer depois que a tinta entra em contato com o papel. A espectrometria de massa com dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz (*matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry* - MALDI-MS) [10] mostrou ser eficiente na determinação dos corantes violeta de metila e violeta de etila. A desvantagem desta técnica é que dependendo da energia do laser o documento pode sofrer grande degradação. Neste contexto, a técnica EASI-MS (*easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry*) é bastante vantajosa porque a dessorção/ionização do analito não é causada por exposição a uma fonte de radiação, mas sim por um spray composto por microgotas carregadas do solvente [11]. Entretanto, mesmo assim são gerados danos mínimos, especificamente por pequenos espalhamentos de tinta no documento.

Mazella e Buzzini aplicaram a espectroscopia Raman para diferenciar 36 tintas de caneta gel azul. Foram utilizadas duas fontes de laser 514,5 e 830 nm [12]. Sendo o poder discriminatório (PD) igual à razão entre o número de pares discriminados e o número de pares possíveis, foi calculado o PD com o emprego de cada fonte e também com os lasers combinados. O maior PD (0,68) foi obtido com a utilização dos dois lasers combinados. Para os lasers 514,5 e 830 nm, o DP foi igual a 0,62 e 0,55 respectivamente. Os valores de PD indicam que a metodologia aplicada está distante dos 100% de classificação correta. Este trabalho evidencia a dificuldade em se classificar as tintas por inspeção visual dos espectros.

As unidades de polícia brasileiras comumente empregam as técnicas de espectrofotometria no visível por reflectância, ou imagens no visível geradas com a aplicação de fontes na região UV ou infravermelho ou, empregando, em geral, equipamentos VSC (*Video Spectral Comparator*), da Foster e Freeman.

Equipamentos como VSC-4 e VSC2000 se baseiam em fluorescência por luz ultravioleta. Drexler e Smith [13] motivados pela dificuldade financeira de alguns laboratórios de comprar os equipamentos VSC®, muito empregados em análises documentoscópicas, construíram um sistema composto por componentes comerciais disponíveis e obtiveram resultados comparáveis com o equipamento da empresa Foster e Freeman. O sistema desenvolvido, assim como os equipamentos VSC®, se baseia na fluorescência, gerada por luz ultravioleta para a comparação das tintas. Este trabalho descreve que das 18 de canetas testadas 14 pares não foram distinguidas nem pelo sistema construído, nem pelo VSC-4. Deste modo, a diferenciação das tintas foi realizada por inspeção visual.

Bojko e colaboradores [14] testaram o potencial da técnica de infravermelho por imagem com transformada de Fourier (*Fourier transform infrared* - FTIR) e reflectância total atenuada para diferenciar linhas de interseção. A utilização de imagens espectrais é vantajosa porque se obtém simultaneamente informação espacial e espectral da amostra. Foram obtidos bons resultados para linhas de interseção de canetas esferográficas e impressões a laser, mas resultados insatisfatórios para impressoras ink-jet, e canetas do tipo gel e roller ball. De acordo com os autores os resultados foram insatisfatórios devido à natureza destas tintas, que são absorvidas pelo papel, impossibilitando a obtenção da imagem das mesmas.

Devido à complexidade das tintas, trabalhos defendem a utilização de mais de uma técnica na análise de documentos questionados [2,4]. A necessidade da utilização de mais de uma técnica é justificada pela grande complexidade dos espectros. Entretanto, isso não tem garantido resultados confiáveis, pois há casos em que as tintas são diferentes, mas as técnicas não são capazes de diferenciá-las. Estes resultados evidenciam a dificuldade de se trabalhar com este tipo de amostra, que é na verdade uma mistura complexa.

A quimiometria é uma poderosa ferramenta empregada para se trabalhar com espectros complexos. As técnicas quimiométricas são capazes de extrair dos espectros a informação química relevante sendo então indispensáveis quando os espectros possuem um grande número de variáveis e sobreposição de sinais analíticos. Outra vantagem da utilização das técnicas quimiométricas é promover uma análise independente da inspeção visual. Técnicas quimiométricas de classificação como Modelagem

Independente e Flexível por Analogia de Classe (*Soft Independent Modeling of Class Analogy* - SIMCA) [15,16] e Análise Discriminante Linear (*Linear Discriminant Analysis* - LDA) têm demonstrado ser bastante promissoras [3,6,17-19] na análise de documentos questionados. Contudo, trabalhos envolvendo técnicas de infravermelho e análise multivariada aplicada à análise de documentos são escassos na literatura [3,20].

A espectroscopia visível foi empregada juntamente com técnicas multivariadas para discriminar 50 canetas esferográficas azuis [6]. Neste trabalho tintas de 5 marcas de canetas e 10 canetas por marca foram dissolvidas em etanol para obtenção dos valores de absorbância no intervalo de 400-750 nm. Foram empregados: análise de cluster; análise de componentes principais; e análise discriminante para tratar os dados. A análise de cluster diminuiu o número de variáveis inicial de 351 para 20. Em seguida foi aplicada a PCA para detectar anomalias e excluí-las do modelo. As três primeiras componentes principais foram utilizadas como as variáveis da análise discriminante, reduzindo o número de variáveis de 20 para 3. Foi obtido 100% de classificação correta para a análise discriminante. Este trabalho mostrou a potencialidade da utilização de técnicas de classificação multivariada para discriminar tintas de canetas.

Wang e colaboradores empregaram a espectroscopia no infravermelho para distinguir 108 tintas de canetas esferográficas azuis [20]. A classificação foi realizada a partir do coeficiente de correlação entre dois espectros, que é calculado a partir do valor da absorbância a uma dada frequência. A comparação espectral foi realizada no intervalo contínuo de 4.000 a 700 cm^{-1} . Espectros com altos coeficientes de correlação são classificados no mesmo subgrupo por serem considerados similares. A partir desta metodologia as 108 tintas de caneta foram divididas em 35 subgrupos de acordo com a similaridade.

Kher e colaboradores [3] utilizaram a cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography* - HPLC) e a espectroscopia no infravermelho por reflectância total atenuada para obtenção de espectros em 8 marcas de canetas esferográficas azuis. No caso da HPLC, quatro comprimentos de onda (254, 279, 370 e 400 nm) foram analisados individualmente ou em combinação para avaliar a separação entre as canetas com PCA e a classificação com o LDA. Os melhores resultados foram obtidos com a utilização dos quatro comprimentos de onda, diferenciando 96,4% dos pares com a PCA e com 97,9% de classificação correta com a LDA. Para o tratamento

dos espectros no infravermelho, foram realizados dois tipos de seleção de variáveis antes de se empregar LDA. Um com os escores da PCA e outro utilizando os escores e a matriz residual como variáveis da LDA. Dois modelos diferentes de LDA foram processados para cada caso. O melhor resultado foi obtido quando utilizaram os escores e os resíduos como variáveis da LDA, apresentando 62,5% de classificação correta para as canetas esferográficas. A porcentagem de classificação correta dos espectros de infravermelho foi muito pequena. Isto pode ter ocorrido porque as variáveis selecionadas não foram eficientes para discriminar as amostras apropriadamente.

A seleção de variáveis é uma das etapas mais importantes durante uma classificação. O conjunto de variáveis selecionadas deve ser capaz ao mesmo tempo de discriminar amostras de classes diferentes e identificar amostras pertencentes a cada classe.

Pontes e colaboradores demonstraram o emprego do método de classificação LDA juntamente com o algoritmo das projeções sucessivas (*Successive Projections Algorithm* - SPA) para seleção de variáveis (SPA-LDA) [21] em espectros de UV-VIS para classificar óleos vegetais [22] e cafés [23]. Apenas uma amostra foi classificada incorretamente (soja como canola), no trabalho envolvendo óleos vegetais de milho, soja, canola e girassol. No trabalho com os cafés foi avaliada a classificação de acordo com o tipo (cafeinado e descafeinado) e estado de conservação (vencido e não vencido) e foi encontrada 100% de classificação correta para as 175 amostras analisadas. O SPA-LDA também foi utilizado em espectros NIR para diferenciar amostras de óleo diesel com alto ou baixo teor de enxofre, em que 78,8% das amostras do conjunto de teste foram classificadas corretamente [24]. Silva e colaboradores aplicaram o SPA-LDA a espectros NIR e MID para detectar adulteração em combustível e obtiveram 84,4% de classificação correta [25]. Estes trabalhos mostram que o SPA-LDA apresentou um bom desempenho na maior parte das aplicações avaliadas.

1.2 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver um método analítico não-destrutivo para discriminar tintas de canetas azuis empregando a espectroscopia na região do infravermelho médio pode ser empregada juntamente com técnicas quimiométricas. Os objetivos específicos foram:

- Estudar a dependência dos espectros de infravermelho médio com o papel, já que nos espectros por ATR ocorrem sobreposições das bandas das tintas com o papel;
- Avaliar se as diferentes classes formam agrupamentos ou sobreposições no gráfico dos escores da PCA;
- Empregar o algoritmo SPA para selecionar as variáveis mais importantes para diferenciar as classes;
- Avaliar o potencial do SPA-LDA para classificação de tintas de caneta com respeito ao tipo e à marca.

1.3 Fundamentação teórica

1.3.1 Pré-processamento de dados

O objetivo do pré-processamento de dados é preparar o espectro para a aplicação de técnicas quimiométricas. Isto consiste na manipulação matemática para remover ou reduzir variações que são irrelevantes e poderiam prejudicar a análise. Efeitos como interferências, espalhamento, interação molecular são possíveis fontes de variações indesejadas. Considerando, obviamente, a natureza química dos dados, qualquer técnica de pré-processamento pode ser empregada antes de submeter os dados a técnicas quimiométricas. Por exemplo, o *Standard Normal Variate* (SNV) [26] pode ser utilizado para corrigir efeitos de espalhamento nos espectros, a derivada pelo algoritmo Savitzky-Golay [27] pode ser empregada para corrigir a linha de base espectral e suavizar o espectro, a normalização pode ser utilizada para deixar os dados na mesma escala. No mesmo conjunto de dados, pode-se fazer a opção de aplicar um ou mais de um tipo de pré-processamento. O importante é determinar qual ou quais as técnicas de pré-processamento produzem os melhores resultados após a aplicação de técnicas quimiométricas. Em trabalhos de classificação supervisionada, deve-se buscar o pré-processamento que constrói modelos com maior percentual de classificação correta. Em trabalhos empregando análise de componentes principais, o pré-processamento ideal é aquele no qual, há maior discriminação entre classes no gráfico dos escores.

O SNV consiste numa transformação espectral que pode ser representada pela equação abaixo:

$$SNV_{corr} = \frac{\sum_{i=1}^p (x_i - x_M)}{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p (x_i - x_M)^2}{p - 1}}} \quad (1.1)$$

em que SNV_{corr} são os valores corrigidos para os p comprimentos de onda, x_i é o valor do sinal analítico no comprimento de onda i e x_M é o valor médio de todos os p sinais analíticos [26].

A derivada pelo método Savitzky-Golay é um método que tem o objetivo de corrigir a linha de base espectral e ainda melhorar a resolução. No entanto, o cálculo da derivada aumenta o ruído do espectro, por isso é importante suavizar o espectro. O

algoritmo Savitzky-Golay deriva e simultaneamente suaviza os espectros [27]. Na normalização, os sinais analíticos são divididos por uma constante para deixar os dados na mesma escala [15].

1.3.2 Métodos de reconhecimento de padrão

Os métodos de reconhecimento de padrão buscam diferenças e similaridades entre amostras em um conjunto de dados. Particularmente, em análises químicas o número de variáveis e de amostras presente no conjunto de dados é em geral muito grande, dificultando a identificação de padrões por inspeção visual. Isso justifica a necessidade da utilização de métodos estatísticos para o reconhecimento de padrões em conjunto de dados químicos [15,16,28].

Existem dois tipos de métodos de reconhecimento de padrões: os supervisionados e os não supervisionados. Nos métodos não supervisionados, se buscam agrupamentos naturais entre as amostras, isto é, a informação da classe da amostra não é imposta para se buscar similaridades entre amostras de mesma classe e diferença entre amostras de diferentes classes. Já nos métodos supervisionados, a informação da classe é imposta para buscar diferenças e similaridades entre as amostras. Neste caso, são construídos modelos com parte das amostras enquanto que o restante das amostras é utilizado para realizar testes de previsão para avaliar a classificação das amostras.

Métodos não supervisionados

Um dos métodos de reconhecimento de padrão mais utilizado é a PCA [15,16,28]. A PCA envolve a álgebra de combinação linear, que é simples de ser computada e é tratável analiticamente. Uma das vantagens da PCA é a diminuição da dimensionalidade do problema, de forma que a variabilidade dos dados seja representada em poucos fatores. Ela pode ser utilizada para o reconhecimento de padrões (estrutura da matriz de dados), detecção de anomalias, seleção de variáveis e etc.

Na PCA, as componentes principais (*Principal Component* - PC) são escritas como uma combinação linear das variáveis originais. As PC dão origem a um novo eixo de coordenadas ortogonais que descrevem a variabilidade dos dados em ordem decrescente. A primeira componente principal (PC1) indica a direção de maior variabilidade dos dados, a segunda componente principal (PC2) indica a direção da segunda maior variabilidade dos dados e assim sucessivamente. Sendo assim, a maior parte da variância dos dados é explicada pelas primeiras PC's, dispensando a necessidade de se analisar todas as PC's e diminuindo, portanto, a dimensionalidade do modelo. As projeções dos objetos neste novo sistema de eixos são vetores denominadas escores ($\mathbf{t}_i$). Os coeficientes da combinação linear são vetores denominados pesos ($\mathbf{p}_i$) e determinam a influência de cada variável original sobre uma determinada componente. Na análise de componentes principais a matriz de dados ($\mathbf{X}$) pode ser escrita como [16,28]:

$$\mathbf{X} = \mathbf{t}_1\mathbf{p}'_1 + \mathbf{t}_2\mathbf{p}'_2 + \dots + \mathbf{t}_i\mathbf{p}'_i, \quad (1.2)$$

Métodos supervisionados

Os métodos de reconhecimento de padrão supervisionado buscam construir uma vizinhança entre as classes, isto é limitar o espaço N -dimensional para cada classe, em que N é igual ao número de variáveis. O objetivo destes métodos é classificar as amostras de acordo com sua localização no espaço. Dentre os métodos mais utilizados o SIMCA e o LDA merecem destaque.

A LDA é um método de classificação supervisionada que calcula o quadrado da distância de Mahalanobis entre a amostra que se deseja classificar e o centro de todas as classes presentes no modelo [16,22,23,28]. A amostra então é atribuída à classe que possui o menor valor para o quadrado da distância de Mahalanobis. A distância Mahalanobis pode ser definida como [28]:

$$r^2 = (\mathbf{x} - \boldsymbol{\mu})^t \boldsymbol{\Sigma}^{-1} (\mathbf{x} - \boldsymbol{\mu}), \quad (1.3)$$

em que $\mathbf{x} = (x_1, x_2, x_3 \dots x_i)$ é a intensidade espectral medida em i comprimentos de onda de uma amostra que se deseja classificar; $\boldsymbol{\mu}$ é o centro da j -ésima classe, isto é, é o valor médio da classe; e $\boldsymbol{\Sigma}$ é a matriz de covariância.

Na LDA é determinado o centro para cada classe e é construída uma vizinhança entre dois centros. Enquanto a PCA seleciona a direção em que há maior variação do conjunto de dados, a LDA busca a direção que melhor discrimina as amostras de acordo com a classe [28]. As novas variáveis recebem o nome de função discriminante e compõem uma combinação linear das variáveis originais. O número de variáveis geradas é igual $k-1$, em que k é o número de classes da matriz de dados.

1.3.3 Algoritmo das projeções sucessivas

O SPA foi originalmente desenvolvido para selecionar variáveis para aplicação em calibração multivariada [29,30]. Inicialmente, o SPA foi aplicado a dados espectrofotométricos de UV-VIS em complexos de Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} com 4-(2-piridilazo) resorcinol em amostras contendo intervalos de concentração entre 0,02-0,5 mg L^{-1} [29]. As variáveis selecionadas pelo SPA apresentaram erro médio quadrático de previsão do conjunto de teste de 0,02 mg L^{-1} , que é comparável com resultados obtidos com o algoritmo genético. Trabalhos posteriores aplicaram o SPA para calibração em dados de UV-VIS, FTIR, NIR, espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (*inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy* - ICP-AES) [31-36]. Pontes e colaboradores, realizaram uma implementação para aplicar o SPA a problemas de classificação [21].

O SPA consiste em selecionar variáveis que apresentam mínima colinearidade entre si. Para isso são fornecidas as matrizes correspondentes aos conjuntos de treinamento ($K_C \times J$), validação ($K_V \times J$) e teste ($K_T \times J$) em que K_C , K_V e K_T representam o número de amostras de cada conjunto e J o número de variáveis que deve ser igual em todos os conjuntos. O número mínimo (N1) e o número máximo (N2) de variáveis também são fornecidos ao SPA.

Para cada variável é executado o seguinte procedimento: é calculada a projeção do vetor coluna em um subespaço ortogonal. Depois é calculada a projeção de todos os vetores neste subespaço e o vetor com maior projeção é guardado. Este procedimento é repetido até o número de vetores armazenados ser igual a N2. Ao final deste procedimento existirão J conjunto de dados com N2 variáveis, em que se for considerado que o conjunto de dados pode ser formado por uma quantidade qualquer de

variáveis entre 1 e N_2 , serão obtidas $J \times N_2$ conjuntos de dados [21]. Para decidir o melhor conjunto de variáveis no contexto de classificação, foi desenvolvida uma função de custo, que é uma razão em que o numerador é o quadrado da distância Mahalanobis entre uma amostra e o centro da sua classe, e o denominador é o quadrado da distância Mahalanobis entre a mesma amostra e o centro da classe “errada” mais próxima. Assim a função de custo representa o risco de uma amostra ser classificada em uma classe “errada” [21]. A idéia em se trabalhar com as projeções está no fato de que as maiores projeções indicarão os vetores que são menos colineares e assim a informação contida no grupo de variáveis selecionado não será redundante. A função de custo indica qual o conjunto de vetores pouco colineares possui o melhor poder de predição [21].

1.3.4 Espectroscopia na região do infravermelho

A radiação infravermelha é responsável por transições moleculares entre estados energéticos vibracionais e rotacionais. Apenas moléculas que sofrem variação do momento de dipolo podem absorver a radiação infravermelha, pois esta é a condição para que ocorra a interação entre a molécula e o campo elétrico alternado. Como resultado desta interação, há alteração nos movimentos vibracionais e/ou rotacionais nas moléculas. As vibrações podem ser por estiramento ou por deformação angular [37].

A espectroscopia na região do infravermelho é dividida em três partes, infravermelho próximo ($12.800 - 4.000 \text{ cm}^{-1}$), médio ($4.000 - 200 \text{ cm}^{-1}$) e distante ($200 - 10 \text{ cm}^{-1}$) [37]. Destas, as regiões do infravermelho médio e próximo são as mais utilizadas para aplicações analíticas qualitativas e quantitativas. Na região do infravermelho médio são observadas bandas devido a transições fundamentais, que correspondem às transições entre o nível de energia fundamental ($v = 0$) e o primeiro nível excitado ($v = 1$).

Os equipamentos disponíveis permitem medidas de absorção, emissão e reflectância e permitem medidas em amostras sólidas, líquidas e gasosas bem como de suas misturas complexas. Espectrômetros que empregam transformada de Fourier estão sendo bastante utilizados para medidas de absorção da radiação infravermelha. Algumas das vantagens destes equipamentos são: permitem medidas quantitativas e qualitativas; ótimas relações sinal/ruído, que são resultado das pequenas atenuações sofridas pela

radiação devido à utilização de poucos elementos ópticos e nenhuma fenda; alta resolução; rápida obtenção dos espectros. Isto é possível porque estes equipamentos empregam a espectroscopia no domínio do tempo, que registra dados de intensidade em função do tempo. A informação contida num espectro no domínio do tempo é a mesma contida num espectro no domínio das frequências, em que a conversão entre estes é dada através de cálculos numéricos [37].

Dentre as técnicas para aquisição de espectros no infravermelho médio, a reflectância total atenuada (*attenuated total reflectance* - ATR) se destaca na análise de amostras sólidas como, polímeros, borracha, papel e etc. No ATR, o feixe de radiação passa de um material mais denso para outro menos denso, como resultado ocorre uma reflexão. Esta reflexão é total quando o feixe incide por um ângulo crítico. Antes da reflexão ocorrer, o feixe penetra um pouco no material menos denso. Durante a penetração ocorre a absorção do feixe em específicos comprimentos de onda e devido a isso, o feixe sofre uma atenuação [37].

1.4 Material e métodos

1.4.1 Descrição das amostras

A Figura 1.1 ilustra a divisão das classes das tintas de canetas empregadas neste trabalho. Um conjunto de dados representativo foi composto por canetas azuis dos tipos esferográficas (5 marcas), géis (3 marcas) e rollerball (2 marcas). Para cada marca foram adquiridas 10 canetas, sendo 5 do mesmo lote e 5 de lotes diferentes. Também foram adquiridos três tipos de papel: 2 marcas de papel A4 branco (papel 1 e papel 2) e uma marca de papel A4 reciclado (papel 3).

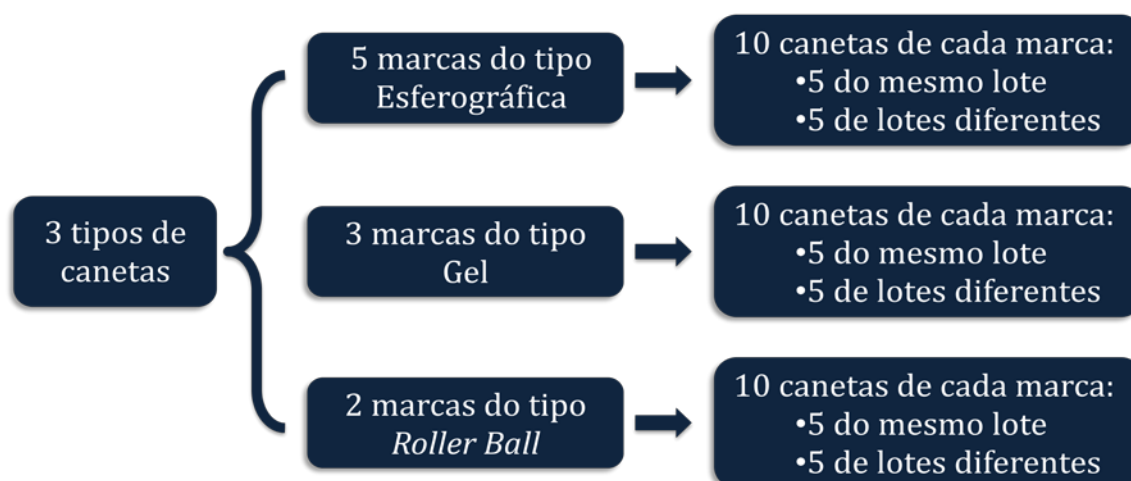


Figura 1.1: Fluxograma indicando a divisão das classes das tintas de caneta

Neste trabalho, pretendeu-se desenvolver uma metodologia independente do tipo de papel. Foi construído um modelo LDA com os espectros coletados a partir de círculos com raio aproximado de 1 cm preenchidos com tinta de caneta sobre o papel 1. Posteriormente empregou-se o modelo LDA construído com o papel 1 para realizar testes de previsão com o papel 2 e papel 3.

Para a construção do modelo, cada caneta foi empregada para preencher 5 círculos. Foram pintados vários círculos, para que o modelo contivesse grande variabilidade do papel e das tintas das canetas. Em cada círculo, foram adquiridos 2 espectros, resultando em 100 espectros por caneta.

Foram adquiridos mil espectros apenas do papel 1 para a obtenção de um espectro médio. Os espectros adquiridos nos círculos preenchidos de tinta foram

subtraídos do espectro médio obtido apenas do papel. Esta foi uma aproximação realizada para a obtenção de um espectro com maior informação da tinta.

Para os testes com o papel 2 e 3, foram escolhidas aleatoriamente três canetas de cada marca. Para cada caneta foi pintado um círculo preenchido de tinta e foram adquiridos 5 espectros para cada registro. Foram adquiridos mil espectros do papel 2 e do papel 3. O espectro médio do papel 2 foi subtraído dos espectros adquiridos nos círculos pintados no papel 2. Foi repetido o mesmo procedimento com os espectros adquiridos no papel 3.

1.4.2 Instrumentação

Os espectros no infravermelho médio com transformada de Fourier foram adquiridos empregando o equipamento Spectrum400 da PerkinElmer com o acessório UATR (*Universal Attenuated Total Reflectance*). O acessório UATR é composto por uma ponteira de diamante e o feixe infravermelho realiza uma reflexão. Os espectros foram adquiridos entre 650 e 4.000 cm^{-1} , com resolução igual 4 cm^{-1} . Para diminuir o ruído, cada espectro adquirido era a média de 16 espectros.

1.4.3 Tratamento dos dados

Foi testada a previsão do método quanto ao tipo da caneta (esferográfica, gel e rollerball) e quanto às marcas das canetas. Para isso foram construídos dois modelos empregando LDA: um com relação ao tipo de caneta, contendo 3 classes diferentes (esferográfica, gel e rollerball) e outro com relação à marca possuindo 10 classes diferentes (5 marcas esferográficas, 3 marcas gel, 2 marcas rollerball).

Os espectros obtidos das canetas (já subtraídos do espectro médio do papel) foram pré-processados. Para determinar o pré-processamento mais adequado, foram testados vários pré-processamentos, a saber, SNV, suavização Savitzky-Golay, derivada Savitzky-Golay (janela com 3, 15 e 21 pontos, polinômio de segunda ordem) e normalização pela faixa. Em seguida, foi avaliado o gráfico dos escores de cada PCA com o objetivo de selecionar o pré-processamento que mais caracterizasse a presença de agrupamentos com relação ao tipo ou à marca das canetas.

Foi realizada uma PCA para cada classe nos espectros pré-processados para avaliar a presença de outliers. Em seguida, procedeu-se a seleção das amostras para compor os conjuntos de treinamento (60% das amostras), validação (20% das amostras) e teste (20% das amostras) da LDA. O algoritmo Kennard Stone foi utilizado para selecionar estes conjuntos [38].

Os espectros de infravermelho adquiridos contêm 3.351 variáveis. Esta grande quantidade de variáveis impossibilita a aplicação direta do LDA, pois o LDA não pode ser aplicado quando o número de variáveis é muito maior do que o número de amostras. Além disso, as variáveis não podem ser colineares. O algoritmo *Successive Projections Algorithm* (SPA) foi utilizado para selecionar as variáveis de forma a melhor discriminar as classes. Após realizar a seleção de variáveis, a LDA foi aplicada aos dados.

A subtração dos espectros, os pré-processamentos e a PCA foram executados no The Unscrambler® v9.7. O algoritmo KS e o SPA-LDA foram executados no Matlab® 7.7.

1.5. Resultados e discussão

1.5.1 Análise dos espectros

A maioria das bandas presentes no espectro do papel é devido à celulose [39]: bandas de estiramento C-H entre $3.000\text{--}2.900\text{ cm}^{-1}$; banda de estiramento O-H perto de 3.330 cm^{-1} ; deformação angular C-H entre 1.500 e 1.300 cm^{-1} ; e estiramento C-O em 1.030 cm^{-1} , aproximadamente. Além das bandas da celulose, o espectro do papel pode apresentar bandas referentes à aditivos, como por exemplo o carbonato de cálcio que absorve em 1.430 , 875 e 712 cm^{-1} [40].

Os espectros do papel puro e da tinta no papel são muito similares (Figura 1.2, 1.3 e 1.4), indicando que o espectro registrado é pouco dependente da tinta. Isto porque a tinta é absorvida pela fibra do papel e o espectro resultante é a soma entre o papel e a tinta. Por inspeção visual é difícil tanto diferenciar os espectros dos papéis quanto os espectros referentes às tintas.

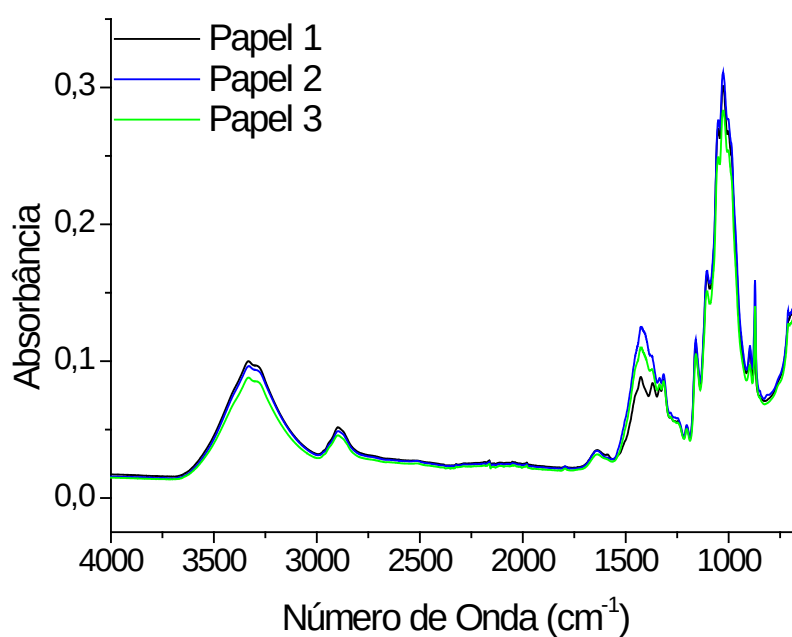


Figura 1.2: Espectros médios de infravermelho do papel 1, papel 2 e papel 3.

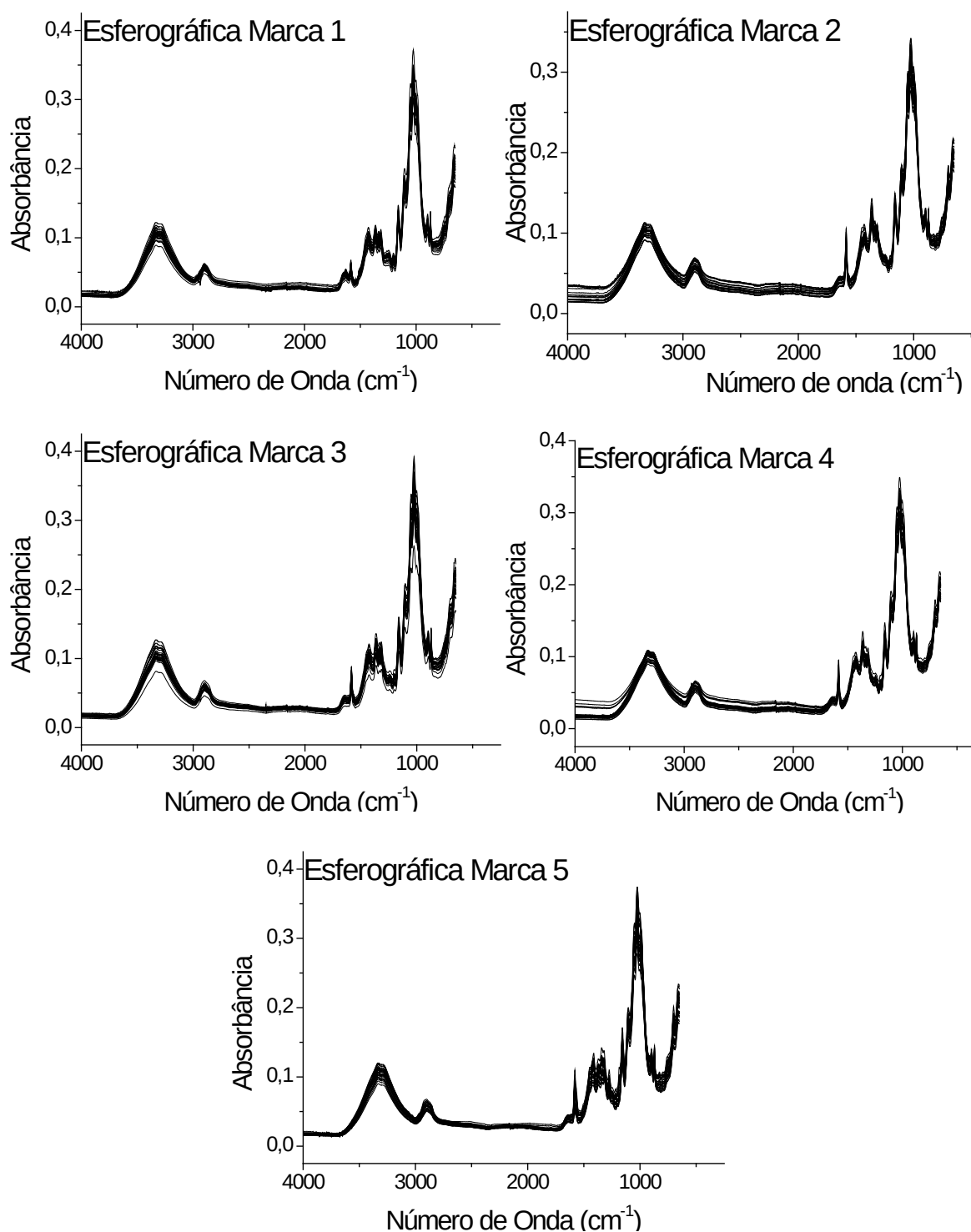


Figura 1.3: Espectros de infravermelho adquiridos em círculos preenchidos com tinta das canetas esferográficas.

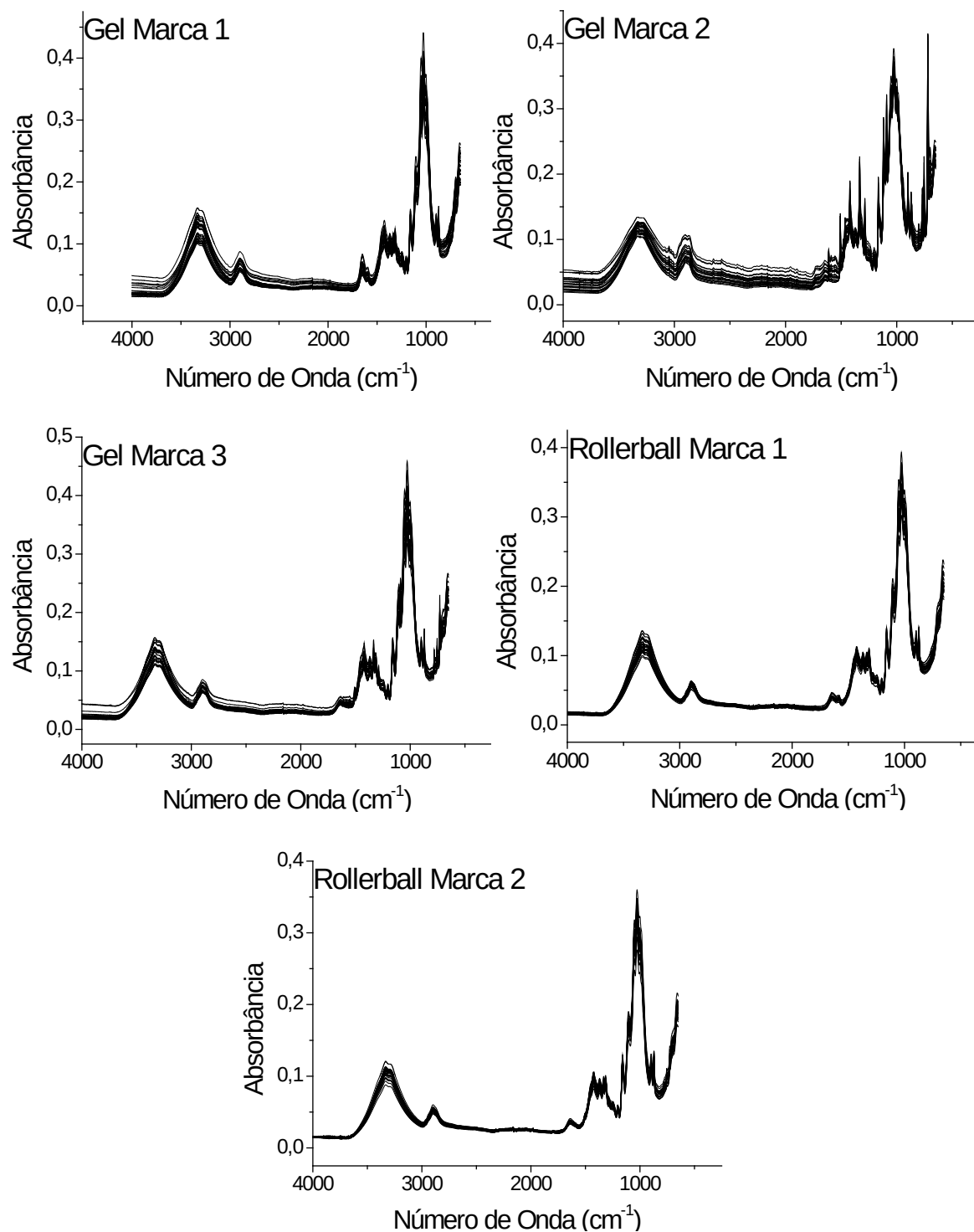


Figura 1.4: Espectros de infravermelho adquiridos em círculos preenchidos com tinta das canetas gel e rollerball.

A Figura 1.5 ilustra os espectros médios brutos obtidos para a caneta esferográfica marca 4 nos três tipos de papel. Os espectros adquiridos nos três papeis são muito similares, mas se diferenciam na região entre 1.500 e 1.300 cm^{-1} . No restante do espectro, ocorrem pequenas diferenças de intensidades. Esta figura justifica a

importância de se desenvolver uma metodologia independente do papel, pois espectros da mesma caneta podem ser classificados incorretamente devido à influência do papel.

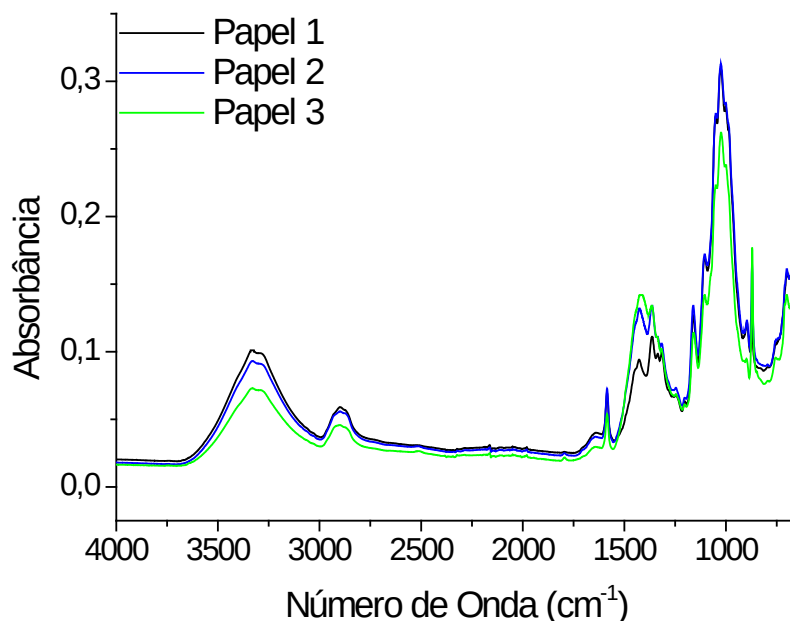


Figura 1.5: Espectro médio de infravermelho da caneta esferográfica marca 4 nos três tipos de papel.

O pré-processamento adequado para o tratamento espectral foi determinado por Silva [41]. A melhor separação entre as classes foi obtida quando os espectros adquiridos das tintas (já subtraídos do espectro médio do papel) foram pré-processados pelos seguintes métodos, na seguinte ordem: SNV, derivada pelo método Savitzky-Golay com polinômio de segunda ordem e janela de 21 pontos, e normalização pela faixa [41].

Os modelos das PCA realizados por tipo de caneta indicaram a presença de outliers na matriz de dados. Os espectros que apresentaram altos resíduos e leverage foram excluídos do banco de dados. A quantidade de espectros utilizados no conjunto de treinamento, teste e validação para os modelos LDA com as classes compostas por tipo e marca de canetas também são mostrados na Tabela 1.1.

Tabela 1.1: Número de espectros nos conjuntos de treinamento, validação e teste para cada classe.

Classe		Papel 1			Papel 2	Papel 3
Tipo	Marca	Treinamento	Validação	Teste	Teste	Teste
Esferográfica		299	100	100	74	68
	1	60	20	20	15	15
	2	60	20	20	14	15
	3	59	20	20	15	15
	4	60	20	20	15	12
	5	60	20	20	15	11
Gel		175	58	58	45	41
	1	60	20	20	15	15
	2	55	18	18	15	13
	3	60	20	20	15	13
Rollerball		115	39	39	27	29
	1	57	19	19	15	14
	2	60	19	19	12	15

O gráfico dos escores ($PC1 \times PC2 \times PC3$) da PCA realizada com os espectros pré-processados adquiridos no papel 1 é ilustrado na Figura 1.6. As três primeiras componentes explicaram 73% da variância dos dados. Não há uma separação clara entre as classes. A classe esferográfica apresenta uma tendência de formar dois grupos, em que um é formado pelas marcas 1, 2, 3 e 4 e o outro grupo é formado pela marca 5. As classes gel e rollerball apresentaram uma grande sobreposição.

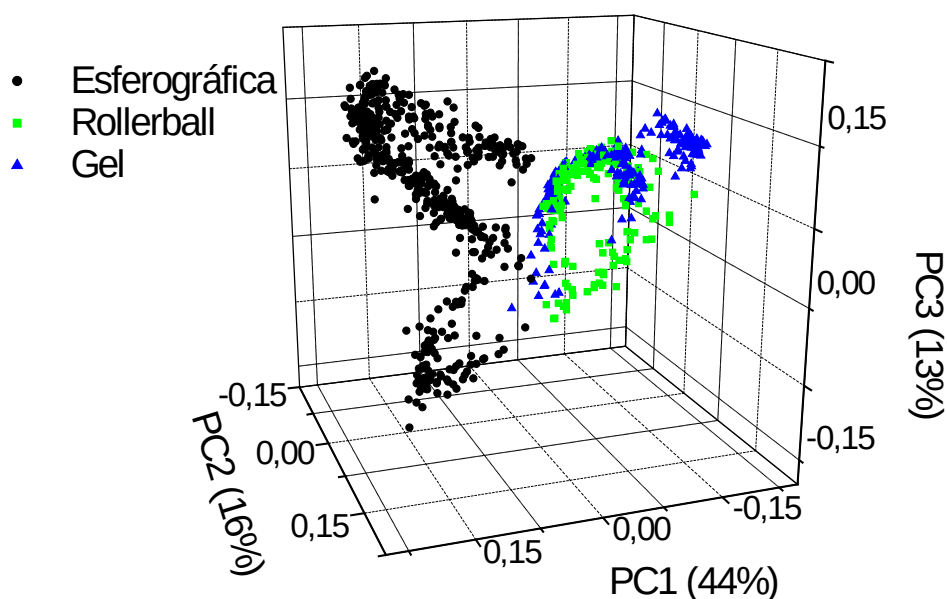


Figura 1.6: Gráfico dos escores da PCA realizada com os espectros pré-processados.

1.5.2 Construção do modelo LDA e resultados das previsões obtidas com os espectros de infravermelho das tintas de canetas adquiridos sobre o papel 1

A Figura 1.7 ilustra os gráficos do custo da validação da LDA com relação ao tipo e à marca das canetas. Os menores custos foram obtidos quando 17 e 39 variáveis foram selecionadas nas validações por tipo e marca, respectivamente. O aumento da quantidade de variáveis selecionadas é resultado do aumento da complexidade do problema que ocorre quando se tenta distinguir as canetas por marca.

A Figura 1.8 ilustra a localização das 17 variáveis selecionadas no espectro médio pré-processado para cada tipo de caneta. Todas as 17 variáveis se localizam na região entre 1.700 e 600 cm^{-1} . Nesta região há absorção de grande parte dos compostos orgânicos que compõem a tinta, como por exemplo, os corantes que possuem muitos anéis aromáticos. Os espectros médios pré-processados são bastante diferentes, evidenciando a diferença de composição em cada tipo de tinta.

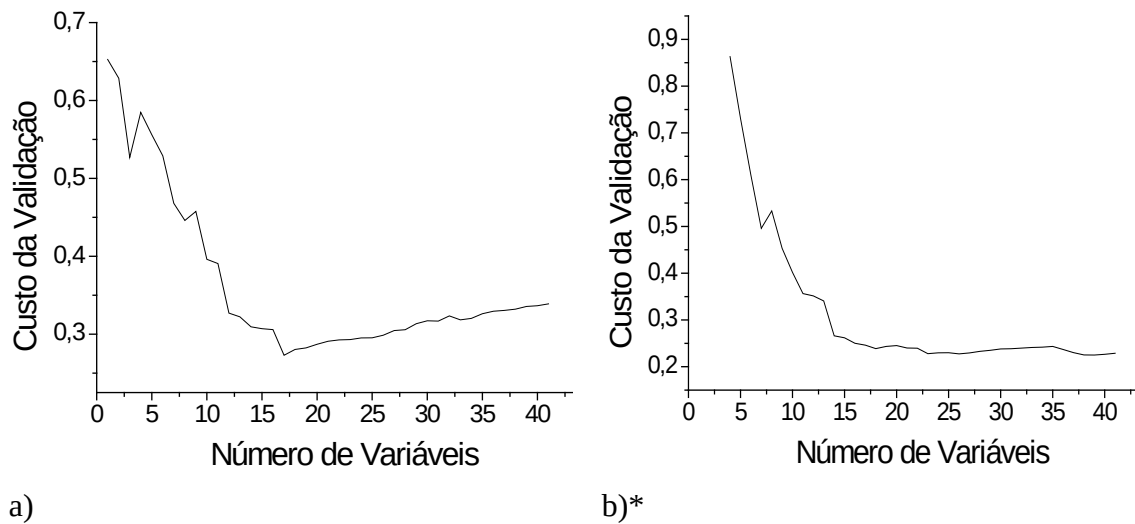


Figura 1.7: Gráfico da função de custo da validação em função do número de variáveis selecionadas pelo SPA. Classes da LDA sendo compostas por: a) Tipo de caneta, menor custo com 17 variáveis; b) Marca da caneta, menor custo com 39 variáveis.

* Para melhor visualização da variação do custo, foram excluídos do gráfico os pontos referentes a 1, 2 e 3 variáveis, pois possuíam custos muito altos.

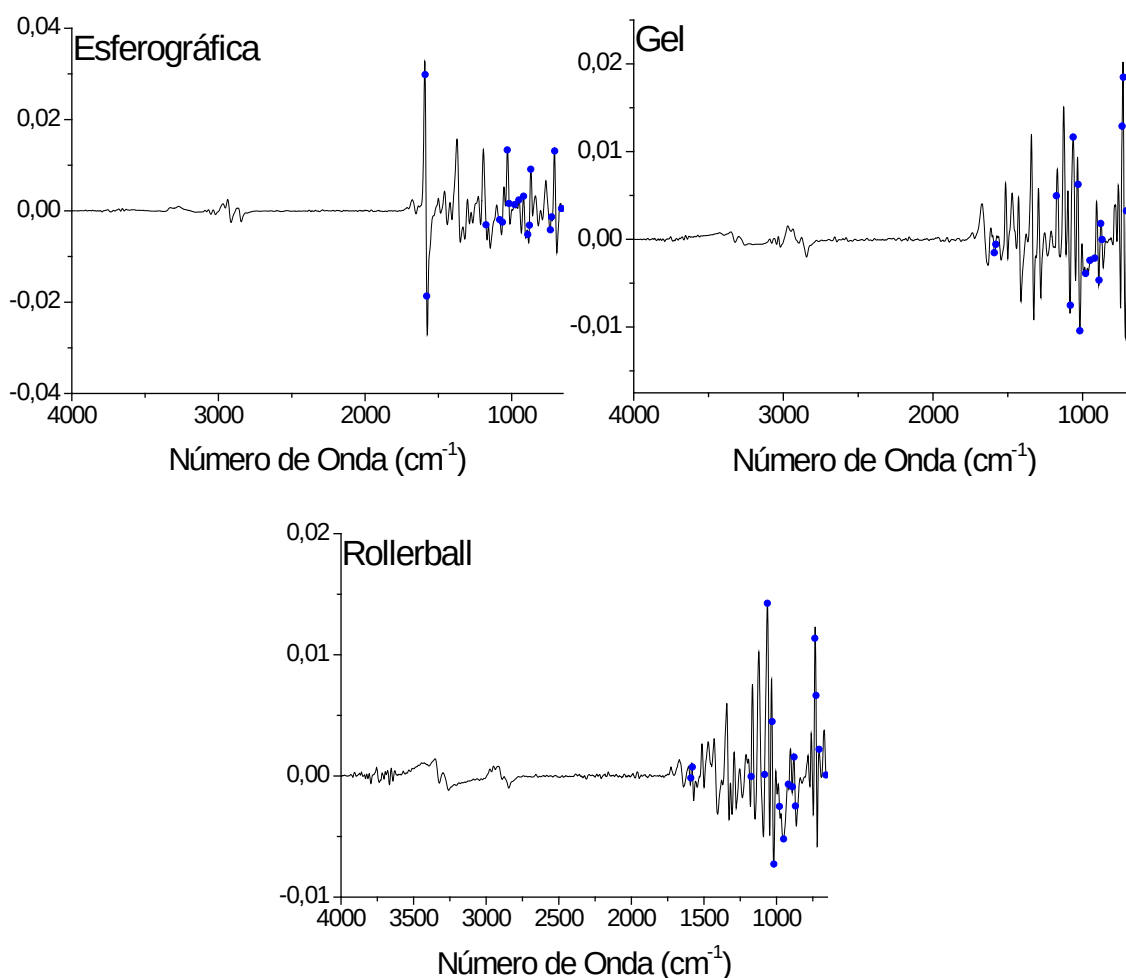


Figura 1.8: Espectros médios pré-processados por tipo de caneta com as 17 variáveis selecionadas pelo SPA-LDA. Pré-processamentos empregados: 1) SNV; 2) derivada pelo método Savitzky-Golay com polinômio de segunda ordem e janela de 21 pontos; 3) normalização pela faixa.

A Figura 1.9 e a Figura 1.10 apresentam os espectros médios pré-processados de cada marca de caneta e também as variáveis selecionadas pelo SPA-LDA. Os espectros médios pré-processados das canetas esferográficas de marca 2 e 4 são muito parecidos, indicando que estas canetas podem ter composições similares. O restante das canetas apresentam espectros bastante diferentes.

A maior parte das variáveis selecionadas localiza-se na região entre 1.700 e 600 cm^{-1} . Entretanto, também foram selecionadas variáveis em 3.756, 2.925, 2.912, 2.157 cm^{-1} . Com exceção da região 2.157 cm^{-1} , a qual não parece ser visualmente importante, todas as regiões selecionadas apresentam diferentes regiões de absorção em cada marca de caneta.

A LDA gera um número de funções discriminantes (FD) igual ao número de classes total das amostras menos 1. Sendo assim, nos modelos LDA para os tipos e para as marcas foram geradas 2 e 9 funções discriminantes, respectivamente. Foi obtido 100% de classificação correta para o conjunto de teste em ambos os modelos LDA construídos. A Figura 1.11 ilustra os gráficos dos escores das LDA com as classes compostas por tipo e por marca das canetas.

Na Figura 1.11a, há uma clara separação entre as três classes distintas. Entretanto, duas amostras da classe Rollerball foram classificadas na classe gel. Estas amostras foram selecionadas pelo algoritmo Kennard-Stone para compor o conjunto de treinamento e validação, sendo, portanto amostras externas. Contudo estes erros não comprometem o desempenho do LDA que classificou corretamente todas as amostras presentes no conjunto de teste.

Na Figura 1.11b, estão ilustrados os escores das três primeiras funções discriminantes. Apenas os agrupamentos formados pela caneta esferográfica marca 5 e gel marca 2, se diferenciam do restante. As outras marcas apresentam agrupamento muito próximo. Não há discriminação entre todas as classes nesta figura, porque a discriminação ocorre ao longo das 9 funções que não podem ser representadas graficamente.

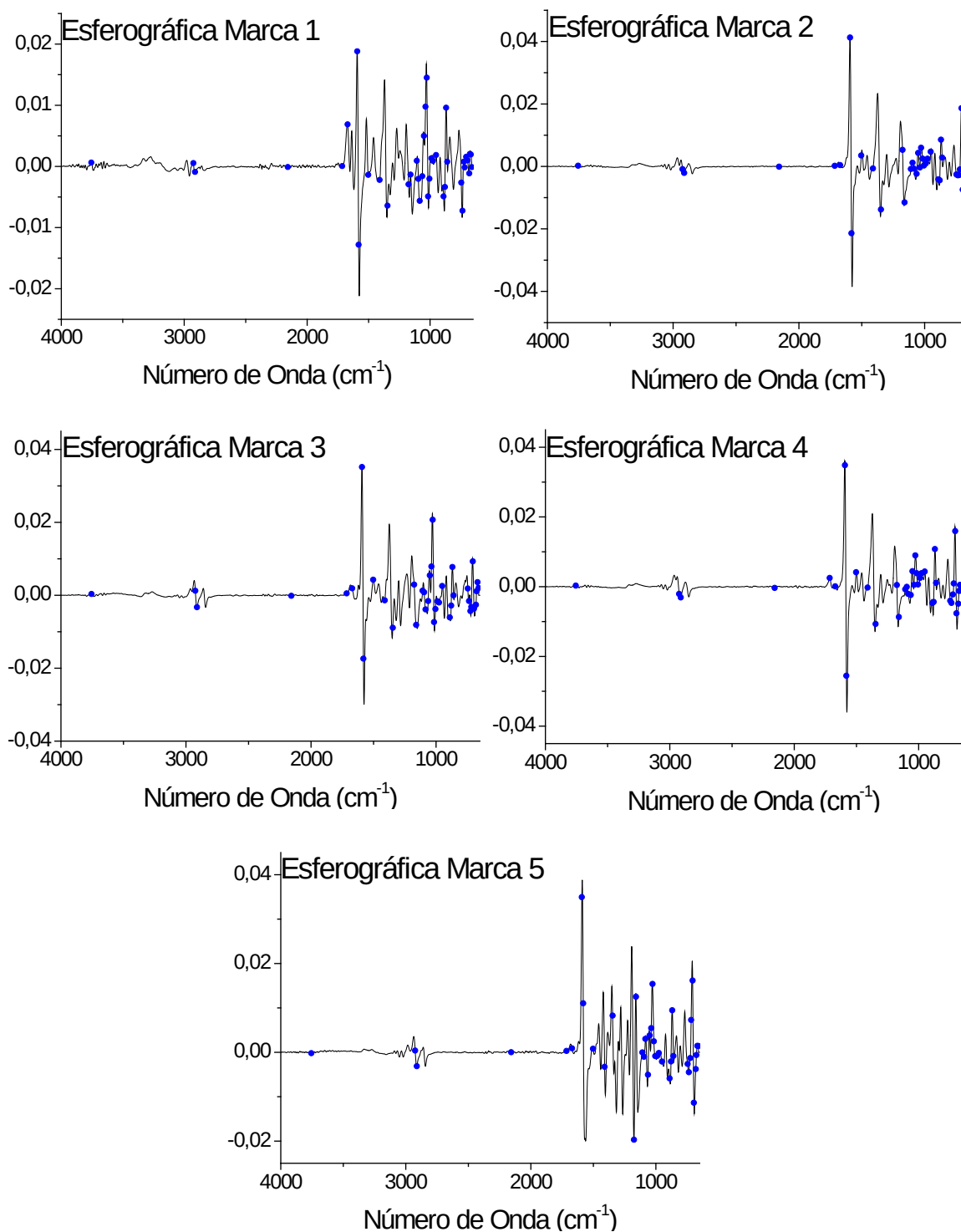


Figura 1.9: Espectros médios pré-processados (SNV, derivada pelo método Savitzky-Golay com polinômio de segunda ordem e janela de 21 pontos e normalização pela faixa) por marca das canetas esferográficas com as 39 variáveis selecionadas pelo SPALDA.

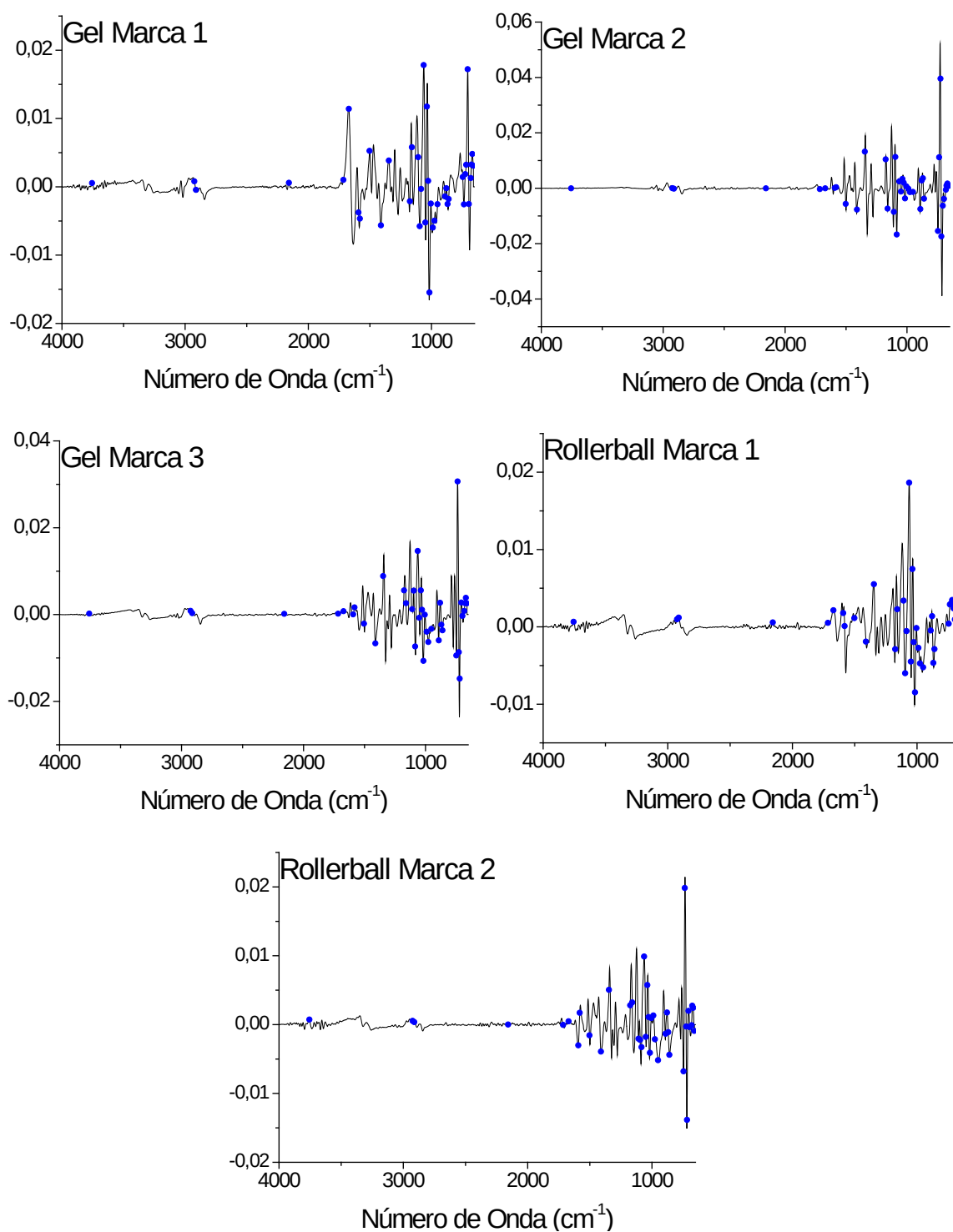
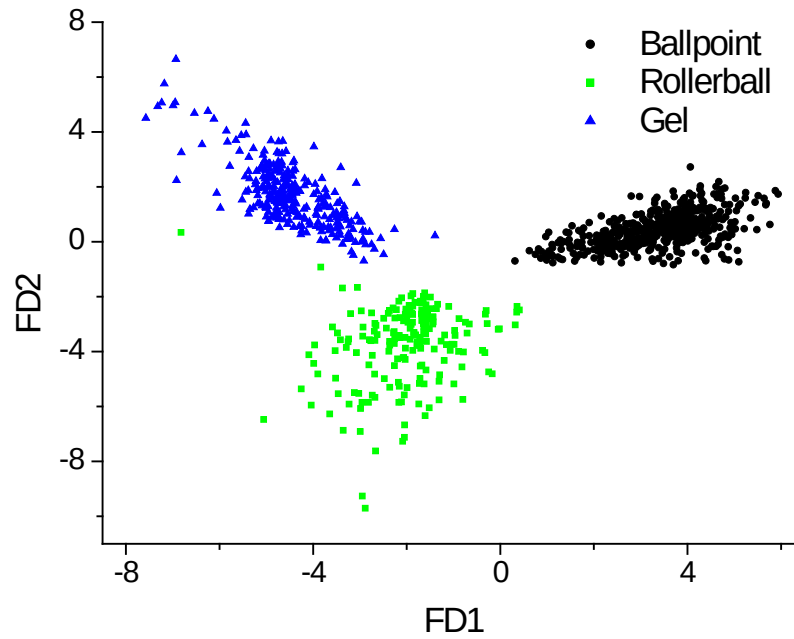
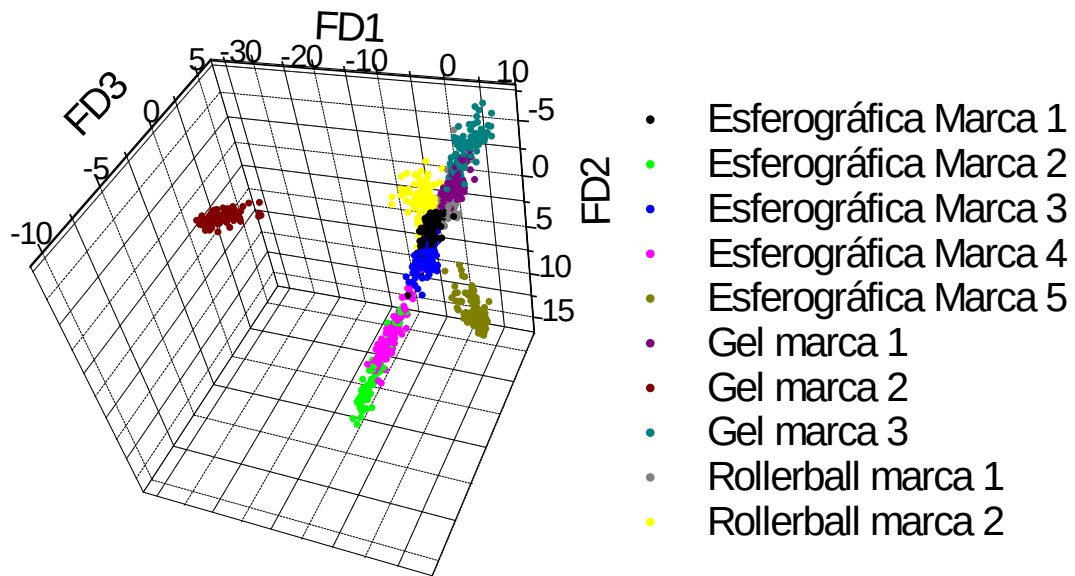


Figura 1.10: Espectros médios pré-processados (SNV, derivada pelo método Savitzky-Golay com polinômio de segunda ordem e janela de 21 pontos, normalização pela faixa) por marca das canetas géis e rollerball com as 39 variáveis selecionadas pelo SPA-LDA.



a)



b)

Figura 1.11: Gráfico dos escores com todas as amostras a) $FD1 \times FD2$ da LDA com relação ao tipo da caneta; b) $FD1 \times FD2 \times FD3$ da LDA com relação à marca da caneta.

1.5.3 Resultados das previsões realizadas com os espectros de infravermelho das tintas de canetas adquiridos sobre o papel 2 e o papel 3

Nos testes com papel diferente, foi obtido 100% de classificação correta para o papel 2 tanto para o tipo quanto para as marcas. Nos testes com o papel 3 foi obtido 100% e 91,3% de classificação correta para os tipos e marcas, respectivamente. Os erros de classificação ocorreram para as canetas esferográficas, em que 12 espectros da marca 2 foram classificadas como da marca 4. A similaridade entre os espectros pré-processados destas duas marcas podem ter influenciado este resultado.

1.6 Conclusões e perspectivas

O gráfico dos escores da PCA aplicada não apresentou uma separação clara entre as diferentes classes.

O algoritmo SPA selecionou 17 e 39 variáveis para classificar as amostras por tipo e por marca, respectivamente.

Para o papel 1, ambos os modelos LDA compostos por tipos e por marcas das canetas obtiveram 100% de classificação correta para o conjunto de teste.

As predições com os espectros da tinta de caneta adquiridos no papel 2 geraram 100% de classificação correta para tipo e marca. Enquanto que os testes realizados com o papel 3 geraram 100% de classificação correta para o tipo e 91,3% de classificação correta por marca. Os erros ocorreram porque 12 canetas esferográficas da marca 2 foram classificadas como esferográficas da marca 4.

Portanto, a espectroscopia na região do infravermelho com reflexão total atenuada associada a SPA-LDA mostrou ser um método eficiente para discriminar tintas de canetas azuis. Isto é importante nas investigações de documentos questionados, pois a existência de duas tintas de caneta diferentes no mesmo texto pode ser uma evidencia de recobertura, retoque ou emendas que são tipos fraudes que ocorrem em documentos.

Em trabalhos futuros, pretende-se:

- Aplicar a metodologia descrita para outras marcas de canetas dos tipos esferográfica, gel e rollerball. Pretende-se também, empregar a metodologia para classificar diferentes tintas de canetas pretas e toners;
- Desenvolver métodos empregando imagens hiperespectrais no infravermelho para diferenciar marcas de canetas. A utilização de imagem hiperespectral é vantajosa porque se obtém simultaneamente informação espacial e espectral da amostra. Além disso, permite analisar áreas bem menores que a atingida por sondas comuns de ATR, fazendo com que esta seja bem mais adequada para a análise de documentos em casos reais, os quais possuem muitas vezes escritos ou impressos com dimensões mínimas.

Referências

- [1] R. L. Brunelle, K. R. Crawford, *Advances in the Forensic Analysis and Dating of Writing Ink*, Charles C Thomas, Springfield (2003).
- [2] C. Roux, M. Novotnyb, I. Evansc, C. Lennardd, *Forensic Sci Int* 101 (1999) 167.
- [3] A. Kher, M. Mulholland, E. Green, B. Reedy, *Vib Spectrosc* 40 (2006) 270.
- [4] J. Zieba-Paulus, M. Kunicki, *Forensic Sci Int* 158 (2006) 164.
- [5] G. S. Kemp, R. N. Totty, *Forensic Sci Int* 22 (1983) 75.
- [6] N. C. Thanasoulis, N. A. Parisi, N. P. Evmiridis, *Forensic Sci Int*, 138 (2003) 75.
- [7] N. C. Thanasoulis, N. A. Parisi, N. P. Evmiridis, *Forensic Sci Int* 138 (2003) 75.
- [8] C. D. Adam, S. L. Sherratt, V. L. Zholobenko, *Forensic Sci Int* 174 (2008) 16.
- [9] D. Grim, J. Siegel, J. Allison, *Forensic Sci Int* 46 (2001) 1265.
- [10] J. Siegel, J. Allison, D. Mohr, J. Dun, *Talanta* 67 (2005) 425.
- [11] P. M. Lalli, G. B. Sanvido, J. S. Garcia, R. Haddad, R. G. Cosso, D. R. J. Maia, J. J. Zacca, A. O. Maldaner, M. N. Eberlin, *Analyst* 135 (2010) 745.
- [12] W. D. Mazzella, P. Buzzini, *Forensic Sci Int* 152 (2005) 241.
- [13] S. G. Drexler, G. Smith, *Journal of the Society of Questioned Document Examiners* (2002) 20.
- [14] K. Bojko, C. Roux, B. J. Reedy, *J Forensic Sci* 53 (2008) 1459.
- [15] K. R. Beebe, R. J. Pell, M. B. Seasholtz, *Chemometrics: a practical guide*, John Wiley & Sons, New York (1998).
- [16] Kim H. Esbensen, *Multivariate data analysis in practice: an introduction to multivariate data analysis and experimental design*, Camo Process AS, Oslo

- (2002).
- [17] J. A. Denman, I. M. Kempson, W. M. Skinner, K. P. Kirkbride, *Forensic Sci Int* 175 (2008) 123.
- [18] A. Kher, M. Mulholland, B. Reedy, P. Maynard, *Appl Spectrosc* 55 (2001) 1192.
- [19] W. J. Egan, S. L. Morgan, E. G. Bartick, R. A. Merrill, J. H. Taylor III, *Anal Bioanal Chem* 376 (2003) 1279.
- [20] J. Wang, G. Luo, S. Sun, Z. Wang, Y. Wang, *J Forensic Sci* 46 (2001) 1093.
- [21] M. J. C. Pontes, R. K. H. Galvão, M. C. U. Araújo, P. N. T. Moreira, O. D. P. Neto, G. E. José, T. C. B. Saldanha, *Chemom Intell Lab Syst* 78 (2005) 11.
- [22] F. F. Gambarra-Neto, G. Marino, M. C. U. Araújo, R. K. H. Galvão, M. J. C. Pontes, E. P. Medeiros, R. S. Lima, *Talanta* 77 (2009) 1660.
- [23] U. T. C. P. Souto, M. J. C. Pontes, E. C. Silva, R. K. H. Galvão, M. C. U. Araújo, F. A. C. Sanches, F. A. S. Cunha, M. S. R. Oliveira, *Food Chem* 119 (2010) 368.
- [24] E. D. T. Moreira, M. J. C. Pontes, R. K. H. Galvão, M. C. U. Araújo, *Talanta* 79 (2009) 1260.
- [25] A. C. Silva, L. F. B. L. Pontes, M. F. Pimentel, M. J. C. Pontes, *Talanta* 93 (2012) 129.
- [26] R. J. Barnes, M. S. Dhanoa, S. J. Lister, *Appl Spectrosc* 43 (1989) 772.
- [27] A. Savitzky, M. J. E. Golay, *Anal Chem* 8 (1964) 1627.
- [28] B. G. M. Vandeginste, S. M. Deming, Y. Michotte, L. Kaufman, *Data Handling in science and Technology, Chemometrics: A text book*, Elsevier Science B.V., Amsterdam (2003).
- [29] M. C. U. Araújo, T. C. B. Saldanha, R. K. H. Galvão, T. Yoneyama, H. C. Chame, V. Visani, *Chemom Intell Lab Syst* 57 (2001) 65.

- [30] R. K. H. Galvão, M. C. U. Araújo, in: B. Walczak (Eds), R. T. Ferré, S. Brown, *Comprehensive Chemometrics: Chemical and Biochemical Data Analysis*, Vol 3, Elsevier, Oxford (2009) p. 233-283.
- [31] R. K. H. Galvão, M. F. Pimentel, M. C. U. Araújo, T. Yoneyama, V. Visani, *Anal Chim Acta* 443 (2001) 107.
- [32] M. C. Breitzkreitz, I. M. Raimundo JR., J. J. R. Rohwedder, C. Pasquini, H. A. Dantas Filho; G. E. José, M. C. U. Araújo, *Analyst* 128 (2003) 1204.
- [33] H. A. Dantas Filho, R. K. H. Galvão, M. C. U. Araújo, E. C. Silva, T. C. Saldanha, B. G. E. José, C. Pasquini, I. M. Raimundo JR., J. J. R. Rohwedder, *Chemom Intell Lab Syst* 72 (2004) 83.
- [34] H. A. Dantas Filho, E. S. O. N. Souza, V. Visani, S. R. R. C. Barros, T. C. B. Saldanha, M. C. U. Araújo, R. K. H. Galvão, *J Braz Chem Soc* 16 (2005) 58.
- [35] F. A. Honorato, R. K. H. Galvão, M. F. Pimentel, B. Barros Neto, M. C. U. Araújo, F. R. Carvalho, *Chemom Intell Lab Syst* 76 (2005) 65.
- [36] F. V. C. Vasconcelos, P. F. B. Souza Jr., M. F. Pimentel, M. J. C. Pontes, C. F. Pereira, *Anal Chim Acta* 716 (2012) 101.
- [37] D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª edição, Bookman, Porto Alegre (2002).
- [38] R. W. Kennard, L. A. Stone, *Technometrics* 11 (1969) 137.
- [39] B. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, Wiley, Chichester (2004) p. 179.
- [40] Comunicação pessoal com Celio Pasquini.
- [41] C. S. Silva, Monografia de graduação, Departamento de Química Fundamental CCEN, UFPE, Recife-PE (2011).

CAPÍTULO 2

Análise exploratória da composição de sete tijolos antigos e dois fragmentos de pinturas rupestres por espectroscopia de emissão em plasma induzida por laser

2.1 Introdução

A arqueologia é a ciência que investiga aspectos das sociedades passadas a partir da análise de materiais (objetos metálicos, objetos cerâmicos, vidros, pigmentos e etc.) que indicam evidência de vida humana antepassada [1,2].

Estudos sobre a composição de objetos metálicos, cerâmicos e vítreos podem revelar tanto técnicas de manufatura utilizadas para a confecção destes materiais como informações acerca das necessidades dos povos antigos. Em particular, o estudo da composição de tijolos antigos é importante em trabalhos de restaurações de construções históricas. Isto porque, os tijolos originais devem ser substituídos por tijolos de composição compatível para evitar danos à estrutura histórica [1].

O estudo dos pigmentos provenientes de pinturas rupestres, também chamado de estudo iconográfico, pode revelar tanto aspectos diretos como indiretos de sociedades passadas. Os aspectos diretos podem ser a presença da fauna e da flora, vestimentas e arquiteturas, enquanto que os aspectos indiretos podem ser a evidência de rituais religiosos e classe social [2].

A atribuição formal da arte rupestre às sociedades pré-históricas ocorreu no Brasil no século XVI [3]. Na Europa, essa atribuição ocorreu séculos depois, pois era inaceitável ideologicamente a diferença cultural entre as populações históricas e pré-históricas. No Brasil, o Parque Nacional Serra da Capivara, merece grande destaque por possuir uma grande quantidade de sítios arqueológicos. O parque é localizado no estado do Piauí e ocupa uma área de cerca de cento e trinta mil hectares [4].

A reconstrução de costumes vividos por povos há vários séculos envolve um trabalho multidisciplinar, pois além da interpretação do significado das pinturas é importante determinar a composição dos pigmentos utilizados. A determinação da composição irá revelar onde o pigmento era encontrado e se algum tipo de tratamento era realizado antes da pintura.

Técnicas analíticas têm sido aplicadas ao estudo da composição de materiais arqueológicos, como, espectrometria de fluorescência de raio-X [5,6] e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (*inductively coupled plasma optical emission spectrometry* - ICP OES) [7]. A fluorescência de raio-X tem a vantagem de ser não destrutiva, mas tem a limitação de só detectar elementos com

número atômico maior do que oito [8]. O ICPOES promove uma análise multielementar, mas é uma técnica destrutiva.

Poucos trabalhos na literatura empregaram a espectroscopia de emissão em plasma induzida por laser (*laser induced breakdown spectroscopy* - LIBS) para a análise de bens culturais [2,5,9-19]. Esta técnica se baseia na utilização de uma fonte de laser para promover a formação de um plasma e excitação das espécies presentes. A radiação emitida por átomos e íons é coletada por lentes ou fibras óticas e medida por um detector. Durante o processo, ocorre a vaporização de uma pequena quantidade de amostra (cerca de microgramas).

A LIBS promove uma análise multielementar e rápida, pois não há necessidade de preparação da amostra e após aplicar um pulso de laser, o espectro de emissão é adquirido após poucos segundos. Esta técnica é considerada quase não-destrutiva, já que a análise pode ser realizada *in situ* e a quantidade de material vaporizado é muito pequena. Pulsos consecutivos na mesma locação permitem a utilização do LIBS para o estudo de materiais que possuem camadas de profundidade com diferentes composições. Esta aplicação é mais evidente na análise de pinturas em que se pode determinar a composição de cada pigmento separadamente.

Anglos [11] publicou um trabalho de revisão sobre a aplicação de LIBS em arte e arqueologia. Este trabalho relata: 1) identificação de pigmentos em obras de arte, em manuscritos e em pinturas rupestres; 2) análise de camadas de diferentes profundidades; 3) análise de incrustações em cerâmicas; 4) identificações de metais utilizados em moedas; 5) aplicações em bioarqueologia.

A determinação da composição elementar de ossos pode revelar hábitos alimentícios, deficiências nutricionais e até problemas patológicos [20]. Galiova e colaboradores empregaram a técnica de LIBS para medir a distribuição de Sr, Ba, Fe, P, Ca, Mg e Na em diferentes partes do dente canino de um animal [20]. Foi observado que a intensidade do ferro é maior nas regiões mais internas do osso.

Mendes e colaboradores [9] simularam uma pintura aplicando uma camada fina (aproximadamente 400 μm) de cola de coelho (material muito utilizado em obras de arte) em folhas de politereftalato de etileno (PET). As folhas de PET foram escolhidas devido a sua homogeneidade padrão com boa resistência mecânica e densidade

constante. Pulsos consecutivos com energia de 115 mJ foram aplicados na mesma localização e a análise dos espectros revelou que a camada de cola de coelho era atravessada após 150 pulsos. Este resultado foi reproduzido em outras localidades indicando uma possibilidade da utilização deste laser para a remoção controlada de material.

Peças de pinturas preparadas em laboratório também foram utilizadas para o estudo de camadas [18,19] e para otimizar as condições de operação do LIBS para posteriores medidas numa pintura a óleo do século XVIII que foi sujeita a uma restauração parcial [10]. Foram selecionadas poucas localidades na região original e na região restaurada nas quais foram realizados 2 pulsos com energia igual a 5 mJ em cada localização. Os espectros de ambas as regiões foram claramente diferenciados pela presença de Pb (chumbo branco) na região original e de Ti (titânio branco) na região restaurada. Este resultado sugere que a restauração tenha sido realizada no XIX, pois o pigmento encontrado na região restaurada só começou a ser comercializado no início do século XIX.

Anglos [11] propôs um trabalho onde a característica de análise pontual do LIBS foi empregada para a obtenção de espectros de incrustações brancas e pretas presentes em uma cerâmica. A análise dos espectros revelou que a incrustação branca é rica em cálcio e a preta em ferro, silício e alumínio.

A técnica LIBS também permite a análise de materiais submersos em água. Esta aplicação se baseia na realização do pulso duplo de LIBS e foi demonstrado por Giacomo e colaboradores na análise de materiais metálicos [21]. No pulso duplo, o primeiro pulso de laser gera uma pluma e o segundo pulso provoca a ablação do material e excita o microplasma dentro da pluma. O espectro de emissão coletado é caracterizado por ser bastante intenso, que é resultado de uma pressão relativamente baixa dentro da pluma. Lazic e colaboradores determinaram as condições de medidas para uma análise por LIBS para a obtenção do melhor sinal em medidas de ferro, ligas baseada em cobre, metais preciosos, mármore e madeira submersos em água [22]. O objetivo desse trabalho foi aplicar a técnica de LIBS na identificação de materiais de valor presentes no fundo do mar devido às batalhas navais e aos acidentes ocorridos com navios. Foram obtidos resultados satisfatórios nas análises qualitativas dos materiais, com exceção da madeira, e todos os materiais foram reconhecidos. Também

foram determinados os intervalos espectrais para distinguir peças de mármore de rochas calcárias, bem como realizada uma análise quantitativa em amostras de bronze.

Equipamentos remotos para medidas LIBS têm sido construídos para a análise *in situ* de tijolos de construções históricas [23]. A idéia desse trabalho foi utilizar resultados de LIBS para compor um banco de dados sobre o estado de conservação de tijolos históricos. Redes neurais artificiais foram aplicadas aos espectros de LIBS para prever as composições dos tijolos. As composições previstas foram comparadas com as obtidas pela técnica de ICP OES. Os autores consideraram que foram obtidos resultados satisfatórios para elementos pesados, entretanto os elementos leves (P e S) apresentaram resultados insatisfatórios devido a sinais de baixa intensidade.

O trabalho de Brysbaert e colaboradores [2] apresenta o estudo de 23 amostras provenientes de escavações realizadas em *Palaikastro*, Tebas e *Tell el-Dab'a*, contendo pigmentos azul, vermelho, amarelo, laranja, preto, cinza e verde. Os elementos presentes foram detectados por LIBS e a maior parte dos pigmentos foi identificada. Foram detectados dois tipos de pigmentos azuis. O primeiro é originário de *Tell el-Dab'a* e de Tebas e foi identificado pela presença de cobre, silício e cálcio na amostra (azul egípcio; $\text{CuCaSi}_4\text{O}_{10}$). O pigmento da amostra de *Palaikastro* não foi identificado, mas a análise de LIBS detectou a presença de ferro e cobre em combinação com outros elementos como magnésio. Devido à presença destes elementos foi suposto que o pigmento azul pode ser de um mineral chamado *glaucophane* ($\text{Na}_2[(\text{Mg}, \text{Fe}^{2+})_3\text{Al}_2]\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$). Não foram encontrados trabalhos que utilizam LIBS aplicados à pinturas rupestres.

Trabalhos envolvendo LIBS e técnicas quimiométricas também são descritos na literatura. Duchêne e colaboradores [24] aplicaram a modelagem independente e flexível por analogia de classe (*Soft Independent Modeling of Class Analogy* - SIMCA) e modelos de análise discriminante pelos mínimos quadrados parciais (*Partial Least-Squares Discriminant Analysis* - PLS-DA) para classificar 30 pigmentos comerciais tradicionalmente utilizados em muros. O SIMCA e o PLS-DA classificaram corretamente 81% e 99% das amostras analisadas, respectivamente. LIBS e fluorescência de Raio-X foram empregados juntamente com técnicas quimiométricas (análise discriminante, análise de componentes principais e SIMCA) para identificar o local de origem de materiais utilizados em construções históricas [25]. Neste trabalho, a

LIBS demonstrou ser uma técnica rápida e eficiente para identificação da origem das amostras.

Nesta tese, foram desenvolvidas metodologias empregando LIBS para a análise de tijolos pertencentes a diferentes séculos e países de origem; e pinturas rupestres. A análise de materiais arqueológicos é um grande desafio à química analítica, pois envolve muitas peculiaridades:

- Técnicas que necessitam preparação de amostras devem ser evitadas em análises de pinturas rupestres, pois estas amostras não devem ser danificadas por serem consideradas patrimônio cultural. O emprego da LIBS nestes casos é bastante indicado, pois dependendo da energia do laser os danos são mínimos;
- Na análise das pinturas, a técnica empregada deve permitir a determinação da composição de cada camada do material. Trabalhos na literatura descrevem a utilização da LIBS para realizar estudo de profundidade [26-28]. Entretanto, estes trabalhos relatam o estudo de profundidade em materiais simples, como por exemplo ligas metálicas e outros que não possuem muitos elementos em sua composição. Em materiais arqueológicos, os espectros obtidos são muito complexos dificultando a análise por inspeção visual. Este problema foi contornado com o emprego da Análise de Componentes Principais, que foi eficiente para apontar similaridades e diferenças entre os espectros e identificar cada camada;
- Por promover uma análise pontual (devido à pequena quantidade de material vaporizado), os espectros de LIBS nem sempre são representativos da amostra. Por isso, medidas de LIBS em materiais que não possuem composição uniforme em toda a extensão, como é o caso de tijolos, devem ser bem planejados. Neste trabalho, foram realizadas somas das intensidades espectrais para a obtenção de espectros representativos da amostra;
- Devido à grande complexidade dos espectros dos tijolos, técnicas quimiométricas foram aplicadas para identificar diferenças de composição com relação ao século e local de origem;
- Amostras com superfície não plana ou tamanho irregular tornam as medidas empregando LIBS um pouco complicadas, pois o feixe do laser deve ser focado

exatamente na superfície da amostra. Para garantir isso, foi proposto um sistema simples composto por dois lasers apontadores.

2.2 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver metodologias analíticas para a análise de materiais arqueológicos empregando LIBS. Os objetivos específicos foram:

- Adaptar um sistema LIBS eficiente para a realização das medidas das amostras;
- Ajustar as condições de medidas do LIBS para a obtenção de espectros confiáveis;
- Utilizar ferramentas quimiométricas para facilitar a interpretação dos espectros de LIBS, visto que cada espectro contém quase 27 mil variáveis;
- Fazer uma análise exploratória da composição das amostras dos tijolos a fim de discriminar os tijolos;
- Utilizar a LIBS para identificar diferentes camadas em pinturas;
- Identificar a composição dos pigmentos das pinturas rupestres.

2.3 Fundamentação teórica

2.3.1 LIBS

Nos experimentos empregando LIBS em materiais sólidos, o laser é pulsado sobre a superfície da amostra provocando a vaporização de parte do material. A quantidade de material vaporizado depende principalmente da energia do pulso do laser, em que quanto menor a energia do pulso, menor será a quantidade de material ablado [29].

Na Figura 2.1, é ilustrada a sequência de eventos que ocorrem nos experimento utilizando LIBS [29]. Inicialmente há formação de elétrons livres (a e b). Em seguida, há quebra das ligações moleculares para a formação de íons e átomos (c). As espécies atômicas atingem o estado excitado para em seguida emitirem radiação (d). Esta radiação emitida é utilizada para compor o espectro LIBS. Por fim, a amostra utilizada vai apresentar um pequeno dano que é resultado da vaporização de parte do material (f).

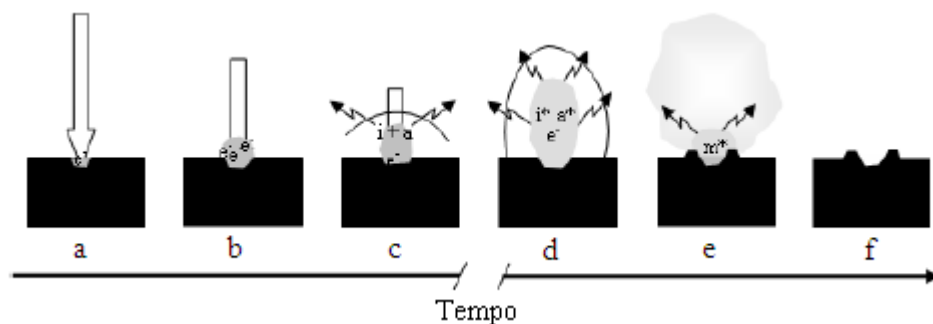


Figura 2.1: Sequência de eventos que ocorre quando um laser é pulsado sobre a superfície de um sólido. Figura modificada da referência [29].

Nos primeiros instantes de formação do microplasma, não é recomendável iniciar a medição do espectro. Isto porque durante os primeiros instantes os níveis de energia das espécies deixam de ser discretos para ser contínuo, causando um alargamento nos picos do espectro, como pode ser observado na Figura 2.2. Após alguns nanossegundos, o microplasma começa a ser resfriado e os picos começam a ficar mais definidos.

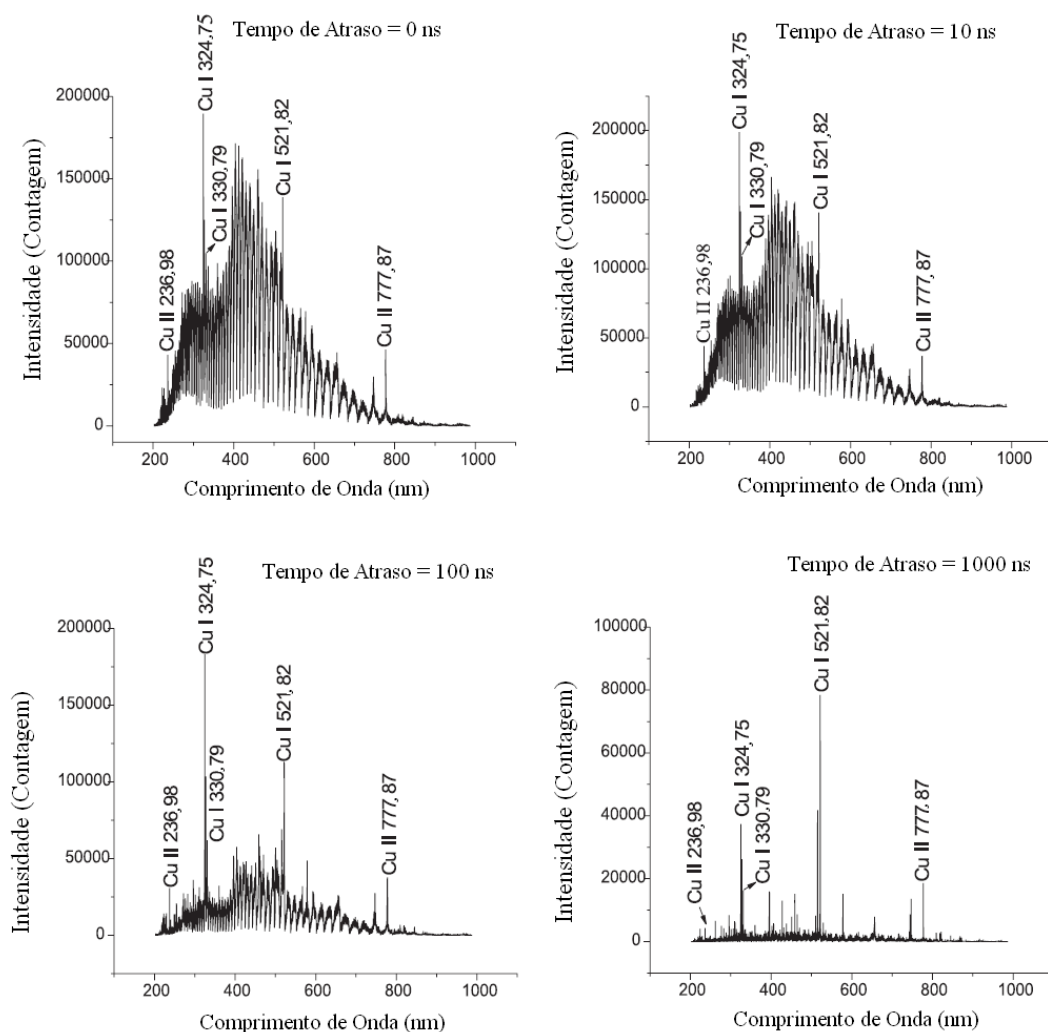


Figura 2.2: Espectros de uma superfície de cobre adquiridos com diferentes tempos de atraso. Figura modificada da referência [29].

A fonte de laser mais utilizada em experimentos empregando LIBS é o Nd:YAG que é um laser de estado sólido constituído por Neodímio em um cristal hospedeiro contendo granada de ítrio e alumínio [8]. Uma das vantagens do laser Nd:YAG é a alta potência radiante de emissão, que é importante para que o microplasma seja formado em altas temperaturas.

Devido ao fato do espectro de LIBS ser composto por muitas raia de emissão, há a necessidade de um sistema com alta resolução espectral. O policromador echelle tem sido bastante utilizado em LIBS por possuir esta característica [8].

Detecores de carga acoplada intensificados são bastante utilizados, pois possuem alta sensibilidade, alta velocidade de resposta e por proporcionar um espectro resolvido no tempo.

2.4 Procedimento experimental

2.4.1 Apresentação das amostras

Neste trabalho, a técnica de LIBS foi empregada ao estudo de sete tijolos de diferentes séculos, duas pinturas rupestres, uma pintura realizada sobre a madeira e o pó do pigmento que foi coletado a partir de uma pintura rupestre.

2.4.1.1 Tijolos

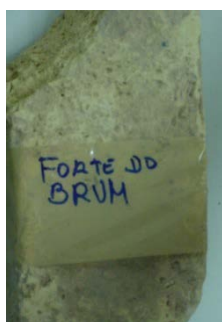
Todos os tijolos estudados datam da época da colonização em que Portugal e a Holanda exerciam domínio sobre o território pernambucano. As características dos tijolos são descritos na Tabela 2.1 e os tijolos são ilustrados na Figura 2.1.

Tabela 2.1: Características dos tijolos

Tijolo	Quantidade	Origem (País)	Século	Local em que o tijolo foi coletado
T1	1	Holandês	XVII	Forte do Brum, PE
T2	1	Holandês	XVII	Forte do Brum, PE
T3	1	Português	XVIII	Convento Santo Antonio, PE
T4	3	Português	XIX	Casa de Câmara e Cadeia, PE
T5	1	Brasileiro	XX	Casa de Câmara e Cadeia, PE

Como ilustrado na Tabela 2.1, foram estudados dois tipos de tijolos holandeses. Estes tijolos são diferenciados visualmente, em que o Tijolo 1 é amarelo e o Tijolo 2 é vermelho. Os tijolos holandeses se diferenciam dos tijolos portugueses e dos tijolos brasileiros por possuírem menor dimensão. O Tijolo 1 e o Tijolo 2 medem aproximadamente 14,5×8,0×3,6 e 17,0×8,0×3,5 cm, respectivamente. Sabe-se que tijolos holandeses eram trazidos para o Brasil e em troca, os holandeses levavam o ouro brasileiro.

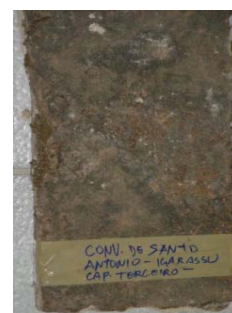
Os tijolos portugueses do século XIX possuem dimensões variadas, porém se diferenciam dos demais por sua maior dimensão. O tijolo de maior dimensão chega a medir aproximadamente 38,0×18,0×7,0 cm, enquanto que os dois menores medem aproximadamente 32,5×17,2×6,5 cm. O tijolo português do século XVIII possui medidas de aproximadamente 37,0×18,7×4,0 cm. O tijolo brasileiro mede aproximadamente 23,8×10,5×6,1 cm.



a)



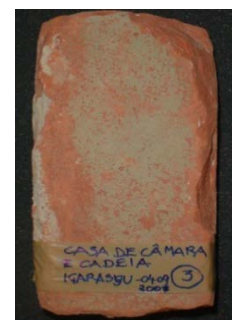
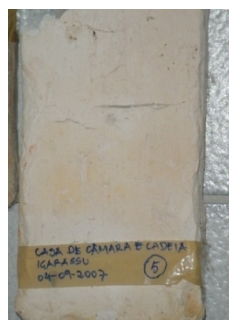
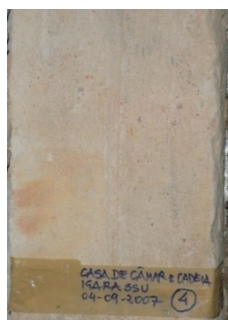
b)



c)



d)



e)

Figura 2.3: Foto dos tijolos estudados: a) T1, b) T2, c) T3, d) T4, e) T5. Os tijolos T1 e T2 foram coletados no Forte do Brum. O tijolo T3 foi coletado no convento de Santo Antônio. O tijolo T5 e os três tijolos T4 foram coletado na Casa de Câmara e Cadeia.

Muitos tijolos utilizados em construções históricas no estado de Pernambuco possuem origem desconhecida. A ideia deste trabalho é avaliar o potencial da LIBS diferenciar tijolos que possuem origem conhecida para em trabalhos futuros empregar a estratégia desenvolvida para a identificação de tijolos de origem desconhecida.

2.4.1.2 Pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Toca da Extrema II

A Figura 2.4a ilustra a pintura realizada em um fragmento de rocha que mede aproximadamente 20 cm de comprimento. A Figura 2.4b ilustra a face contrária à da pintura do mesmo fragmento, que é bastante rugosa e apresenta várias incrustações. Este fragmento de rocha foi encontrado durante uma escavação no sítio arqueológico Toca da Extrema II que fica localizado no Parque arqueológico da Serra da Capivara (Piauí).



Figura 2.4: Pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Toca da Extrema II, localizado no Parque Nacional Serra da Capivara (PI) a) face da pintura; b) face contrária à da pintura.

2.4.1.3 Pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Xique-xique

A Pintura rupestre ilustrada na Figura 2.5 é proveniente do sítio arqueológico Xique-xique, localizado no estado do Rio Grande do Norte, na região do Seridó. Este fragmento de rocha é bem menor do que a pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Toca da Extrema II, medindo aproximadamente 5 cm. Acredita-se que ele se desprende da parede da caverna e caiu, pois foi encontrado no chão e na parede existe uma região fraturada de tamanho e formato igual ao da rocha. Diferentemente da pintura proveniente do Parque Nacional Serra da Capivara, este fragmento não apresenta incrustações na face contrária a da pintura.

Devido a um pré-tratamento de amostra realizado nesta rocha para medidas de microscopia eletrônica de varredura acoplado à fluorescência de raio-X, havia uma camada de carbono depositada sobre a superfície.



Figura 2.5: Pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Xique-xique, localizado na região do Seridó (RN).

2.4.1.4 Pintura em madeira

A Figura 2.6 ilustra uma peça que foi pintada com o objetivo de se estudar as camadas da pintura. As regiões numeradas indicam os locais onde o laser foi pulsado: (1) nesta região só há uma camada de material, que corresponde a base (cola de coelho e carbonato); (2) duas camadas, sendo a primeira (superficial) composta pelo bolo armênio e a segunda (profunda) composta pela base; (3) três camadas, folha de ouro na primeira camada, bolo armênio na segunda camada e a base na terceira camada; (4) quatro camadas, tinta vermelha na primeira camada, folha de ouro na segunda camada, bolo armênio na terceira camada e base na quarta camada.



Figura 2.6: Pintura realizada sobre uma tela de madeira

2.4.1.5 Pigmento

Uma amostra do pó do pigmento de uma pintura rupestre foi encontrada no chão de uma caverna localizada no sítio arqueológico Xique-xique (Figura 2.7).

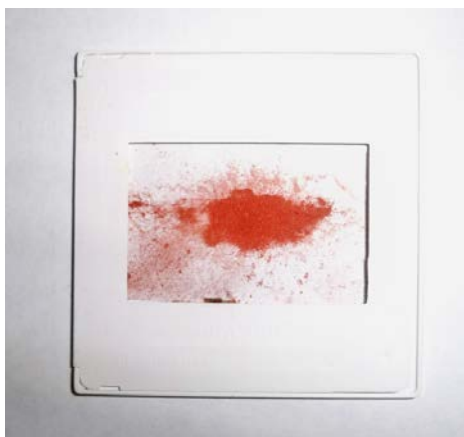


Figura 2.7: Amostra do pó do pigmento coletado de uma pintura rupestre preso em uma fita adesiva.

2.4.2 Sistemas LIBS adaptados para a realização das análises

As medidas de LIBS foram realizadas no Instituto de Química/UNICAMP. Um sistema LIBS construído em laboratório com policromador echelle, laser pulsado Nd:YAG (20 Hz, 1064 nm, FWHM 5,2 ns, e energia máxima do pulso de 120 mJ) e detector ICCD foi utilizado para aquisição dos espectros.

A radiação emitida pelo plasma foi coletada por uma lente biconvexa de quartzo, com foco de 10 cm, acoplado com uma fibra ótica de 50 μm de diâmetro (Ceram Optec), conectada a um espectrômetro echelle (Mechelle 5000, *Andor Tehnology*) para detecção por uma câmera ICCD (iStar DH734, *Andor Technology*). Os sinais emitidos foram identificados utilizando o NIST *Atomic Spectra library* [31].

2.4.2.1 Sistema LIBS 1

A Figura 2.8 ilustra o primeiro sistema LIBS montado para realizar as análises dos tijolos e das pinturas rupestres. Nota-se a presença de um apontador que foi utilizado para indicar o local em que ocorreria a formação do plasma. Antes de pulsar o laser, o suporte do apontador foi posicionado no local indicado pela fita crepe. Em seguida, a amostra era posicionada de forma que a ponta do apontador ficasse em contato com a superfície da amostra. Posteriormente, a fibra ótica do coletor era conectada no laser de alinhamento para alinhar a lente do coletor com o local de

formação do plasma. Após alinhar a lente do coletor, a fibra ótica era recolocada no policromador echelle. Finalmente, o apontador era retirado para se aplicar o pulso de laser, de forma que o pulso não o atingisse. Todo o procedimento era repetido para aplicar o próximo pulso de laser.

O uso do apontador era necessário nas medidas das amostras de superfície irregular (tijolos e a pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Toca da Extrema II) para garantir que a radiação emitida estava sendo coletada corretamente.

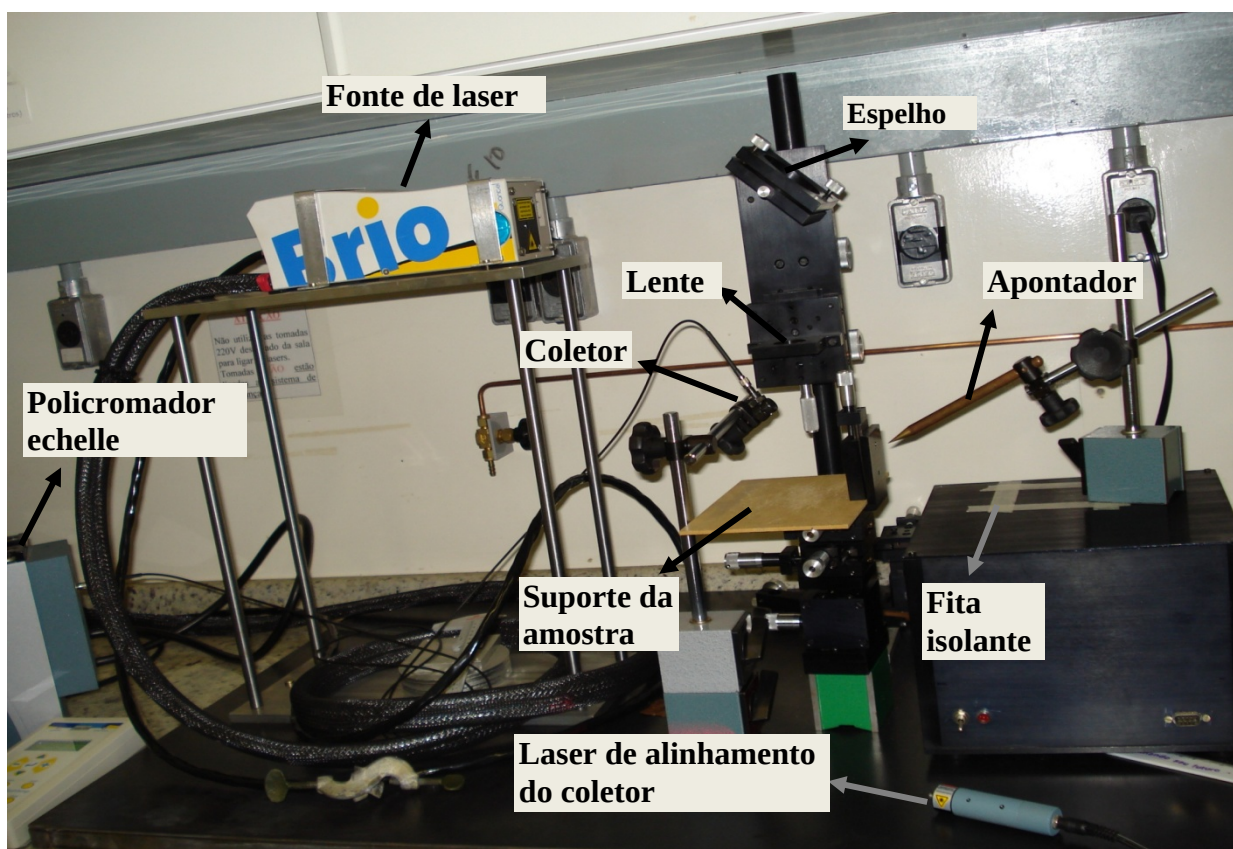


Figura 2.8: Sistema LIBS 1

2.4.2.2 Sistema LIBS 2

A Figura 2.9 apresenta o segundo sistema LIBS montado para análise. A diferença deste novo sistema para o anterior é a utilização de dois lasers apontadores, no lugar do apontador. Os dois lasers apontadores foram alinhados de forma que os dois feixes se interceptassem no local de formação do plasma. Posteriormente, os dois lasers apontadores foram alinhados com o coletor de radiação. Depois de alinhados, tanto os

lasers apontadores como o coletor de radiação foram mantidos fixos até o final das medidas.

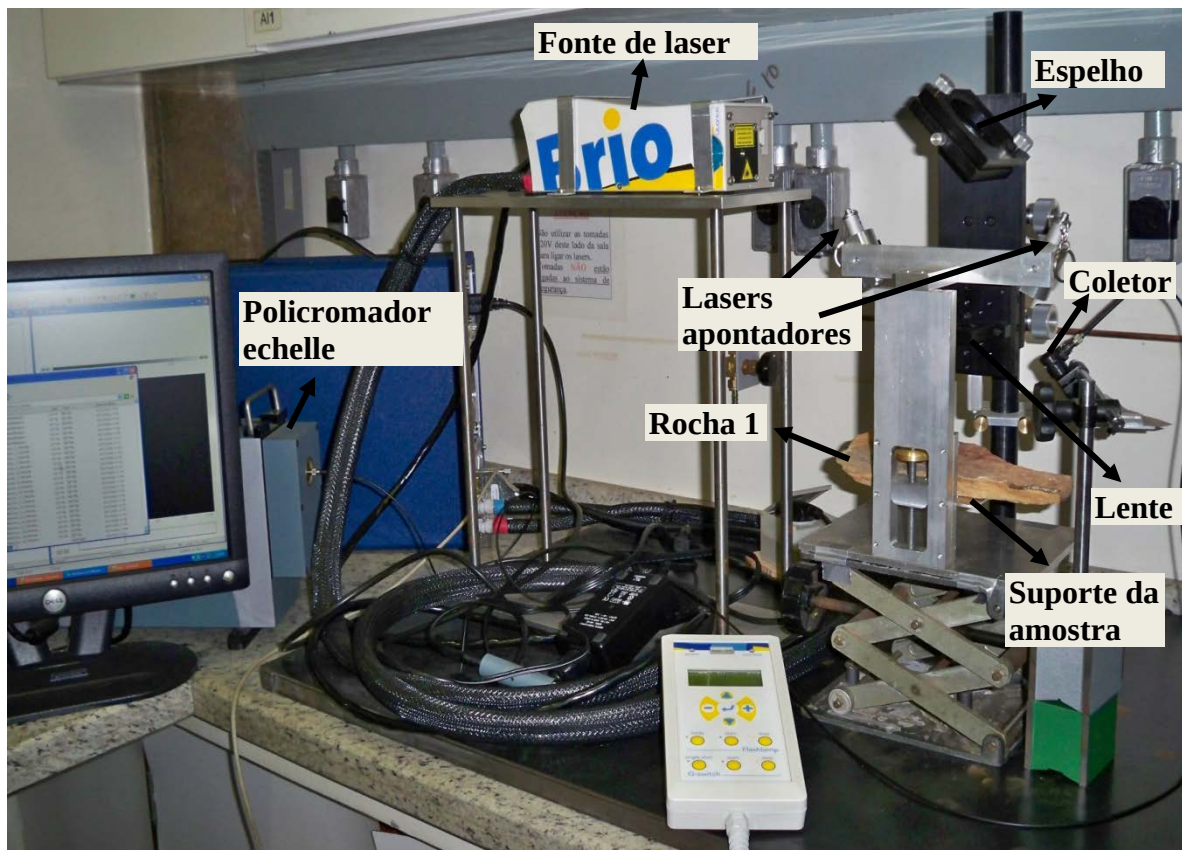


Figura 2.9: Sistema LIBS 2

O Sistema LIBS 2 é mais vantajoso do que o Sistema LIBS 1, pois dispensa a etapa de alinhamento do coletor de radiação com o local de formação do plasma, tornando as medidas mais rápidas.

2.4.3 Experimentos

Foram realizadas medidas com os dois sistemas LIBS montados. Após as medidas, os espectros obtidos foram pré-processados com SNV (detalhado na seção 1.3.1) e em seguida foi realizada uma análise de componentes principais (detalhada na seção 1.3.2) em todos os conjuntos de dados. Todo o tratamento de dados foi realizado com o software *The Unscrambler* versão 9.7.

2.4.3.1 Análises com o sistema LIBS1

Utilizando o sistema LIBS1, foram realizadas medidas com os tijolos e com as pinturas rupestres.

2.4.3.1.1 Análise dos tijolos

Foram escolhidas 10 locações em cada tijolo e foi realizado um pulso de laser em cada locação. As condições das medidas foram as seguintes: tempo de integração igual a 10 μ s; tempo de atraso igual a 1 μ s; ganho da placa do microcanal (*Microchannel Plate* - MCP) igual a 100; energia de cada pulso 110 mJ; lente focal de 10 cm.

Os espectros de emissão foram pré-processados utilizando SNV, a fim de remover efeitos de espalhamento dos dados espectrais. Em seguida foi realizada uma análise de componentes principais com o objetivo de observar a presença de agrupamentos.

2.4.3.1.2 Análise da pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Toca da Extrema II

No experimento do item 2.4.3.1 não se conhecia o valor da energia do pulso do laser, isto porque o laser utilizado não havia sido calibrado. Por isso não foi possível utilizar valores de energia comparáveis com os valores utilizados em artigos da literatura nestes experimentos. Entretanto era possível aumentar ou diminuir a energia do laser alterando-se o tempo de atraso de um parâmetro denominado *Q-switched*. A variação deste parâmetro provoca alteração no tamanho e na forma do feixe de laser [30].

A fim de evitar danos à amostra por não se saber o valor da energia do pulso de laser foram realizados alguns testes na face da rocha contrária à face da pintura. As superfícies da face que contem a pintura e da face que não contém a pintura são bastante diferentes, pois a face que não contem a pintura é bastante rugosa, escura e apresenta várias incrustações (Figura 2.4).

Sabendo que valores altos do *Q-switched* correspondem a energias menores, os testes foram iniciados com valores altos de *Q-switched* para determinar a energia mínima que um pulso de laser deveria possuir para gerar espectros confiáveis. É importante determinar a energia mínima, porque quanto menor a energia do pulso do laser, menor será o dano causado pelo pulso. Além disso, menores energias permitem o estudo de camadas das pinturas, pois a quantidade de material ablado é menor.

As medidas foram realizados dois testes com tempo de atraso igual a 2 μ s, tempo de integração igual a 1 μ s e ganho do MCP igual a 255:

- Teste 1, com o *Q-switched* igual a 300 μ s, foram aplicados 102 pulsos na mesma localização para avaliar o dano causado à amostra. Realizou-se uma comparação entre os espectros relativos aos pulsos 1, 101 e 102;
- Teste 2, o *Q-switched* foi alterado para 250 μ s para aumentar a energia do pulso. Comparou-se o espectro do primeiro pulso com o espectro do décimo primeiro pulso.

Também foram aplicados pulsos sobre a superfície da face da rocha que contem a pintura. Nesta parte do trabalho foi avaliado quantos pulsos deveriam ser aplicados para que a camada da pintura fosse atravessada. As condições dos testes foram: tempo de atraso igual a 2 μ s; tempo de integração igual a 1 μ s; ganho do MCP igual a 255; o *Q-switched* foi testado com 250 e 300 μ s.

Após determinar o valor do *Q-switched* adequado, foram realizados pulsos em 9 localidades na região contendo o pigmento e em 9 localidades na região sem o pigmento. Em cada localização foram realizados cinco pulsos.

2.4.3.1.3 Análise da pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Xique-xique

As condições de medidas determinadas nos testes realizados com a pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Toca da Extrema II foram utilizadas para realizar as medidas com a pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Xique-xique.

Na pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Xique-xique foram escolhidas 5 locações sobre a pintura e 5 locações sobre o substrato. Em cada locação foram realizados quatro pulsos.

2.4.3.2 Análises com o sistema LIBS2

O sistema LIBS2 foi empregado para medidas dos tijolos, das pinturas rupestres, da pintura na madeira e do pigmento em pó.

2.4.4.2.1 Análise dos tijolos

As condições das medidas foram as mesmas utilizadas na seção 2.4.3.1.1. Foram realizados dois testes diferentes.

Teste I: Foram escolhidas 10 locações em cada tijolo e em cada locação foram realizados 10 pulsos de laser. Os 10 espectros obtidos em cada locação foram somados para a obtenção de um novo espectro. A vantagem em se somar 10 espectros está no fato de se obter um espectro mais representativo da amostra, já que a técnica de LIBS promove uma análise pontual.

Teste II: Foram escolhidas 100 locações em cada tijolo e em cada locação foi realizado um pulso. Os espectros obtidos em cada dez locações foram somados para a obtenção de um novo espectro.

2.4.4.2.2 Análise das pinturas

Foram realizadas medidas com o sistema LIBS 2 nos seguintes materiais: pintura na madeira (Figura 2.6); pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Toca da Extrema II (Figura 2.4), pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Xique-xique (Figura 2.5); pigmento proveniente de uma pintura rupestre (Figura 2.7).

O laser foi calibrado antes da realização das medidas de LIBS nestes experimentos. Os valores iniciais da energia foram escolhidos em concordância com

trabalhos de pinturas em fragmentos de rocha citados literatura que são da ordem de 2 a 15 mJ [11,32,33].

As condições de análise foram as seguintes: ganho do MCP igual a 150, duração do pulso igual a 5,2 ns, tempo de atraso igual a 500 ns, tempo de integração igual a 1 μ s e comprimento de onda igual a 1.064 nm.

2.4.4.3.1 Análise da pintura em madeira

A análise da pintura na madeira foi útil para determinar a melhor energia para realizar um estudo de profundidade. Este trabalho preliminar foi importante para poupar as pinturas rupestres destes testes, que causariam danos à sua estrutura.

A fim de decidir a melhor energia do pulso para se realizar as medidas de LIBS variou-se a energia nos seguintes valores, 20,3 mJ (*Q-switched* 300 μ s), 12,3 mJ (*Q-switched* 320 μ s) e 5,36 mJ (*Q-switched* 340 μ s). Para cada energia foram realizados dois pulsos em três locações diferentes nas regiões 1, 2 e 3 (Figura 2.6) e cinco pulsos em três locações diferentes na região 4.

Os espectros de emissão obtidos para cada energia foram pré-processados com SNV para em seguida realizar uma análise de componentes principais. A melhor energia foi escolhida a partir da análise do gráfico dos escores da PCA e dos espectros. Após selecionar a melhor energia, foi realizada uma replicata das medidas para saber se os novos resultados eram comparáveis com os obtidos anteriormente.

2.4.4.3.2 Análise das pinturas rupestres

As condições de medidas foram as seguintes: ganho do MCP igual a 150, duração do pulso igual a 5,2 ns, tempo de atraso igual a 500 ns, tempo de integração igual a 1 μ s, comprimento de onda igual a 1.064 nm e energia igual a 20,3 mJ. Foram realizados oito pulsos consecutivos de laser em 16 locações, sendo 8 na região do pigmento e 8 na região do substrato.

2.4.4.3.3 Análise do pigmento

O pó do pigmento da pintura (Figura 2.7) foi preso em uma fita adesiva para a realização das medidas de LIBS. Apenas o espectro do primeiro pulso foi salvo, pois este é o espectro em que há menor contaminação pelo material da fita isolante.

Após o primeiro pulso foram realizados outros pulsos até se observar que a fita adesiva havia sido atravessada pelo pulso de laser. Este procedimento foi realizado para “marcar” o local em que já havia sido realizado um pulso de laser e evitar outra amostragem no mesmo local.

Foram coletados espectros em 20 locações diferentes. Foram realizados pulsos sobre a fita adesiva a fim de avaliar o branco da amostra.

2.5 Resultados e discussão

2.5.1 Sistema LIBS 1

O Sistema LIBS 1 não mostrou ser eficiente na medida de amostras com superfícies irregulares. Isto porque antes de cada medida era necessário alinhar o coletor de radiação com o local de formação do plasma para que a radiação emitida fosse coletada corretamente. Consequentemente, o tempo requerido para a realização das medidas era muito grande.

2.5.1.1 Análise dos tijolos

A partir da análise dos gráficos dos escores não foi possível identificar agrupamentos. Isto pode ser explicado pelo fato de que o LIBS consiste numa análise pontual, pois a quantidade de material abalado em cada medida é muito pequena para representar a amostra. Assim, em análises com LIBS é recomendado que se faça médias espectrais de vários pulsos para se obter um espectro que represente melhor a amostra.

2.5.1.2 Análise da pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Toca da Extrema II

- Testes sobre a face da rocha que não contem a pintura

Teste 1: O dano causado pelo pulso de laser foi quase imperceptível (por inspeção visual). Isto pode ser explicado devido ao fato de que a energia poderia estar muito baixa para danificar a amostra.

Comparando-se os espectros relativos aos pulsos 1, 101 e 102 percebeu-se que os espectros eram muito diferentes entre si, indicando que a energia do pulso do laser está tão baixa que a radiação coletada é insuficiente para gerar um espectro confiável.

Teste 2: Mesmo aumentando a energia, o dano causado à superfície era muito pequeno. A análise dos espectros do primeiro e do décimo primeiro pulso de laser revelou que estes espectros eram muito diferentes.

- Testes sobre a face da rocha que contem a pintura

Utilizando um *Q-switched* igual a 250 μ s, foi observado, que o primeiro pulso já atravessava a pintura, indicando que a energia do pulso do laser está alta demais. Por isso foi decidido aumentar o *Q-switched* para 300 μ s.

Com o *Q-switched* em 300 μ s, foi observado que a camada do pigmento era atravessada após o terceiro pulso de laser. Este resultado foi satisfatório, pois a partir dos espectros de cada pulso era possível se realizar um estudo das camadas da pintura.

Um problema encontrado com *Q-switched* de 300 μ s, foi o fato do espectro ter apresentado intensidade muito baixa. Apesar disso, o *Q-switched* foi mantido em 300 μ s, pois um aumento na energia do pulso não seria vantajoso para o estudo das camadas da pintura.

Os espectros obtidos com este protocolo apresentaram um ruído muito alto. Isto pode ser explicado pelo fato de se ter utilizado o valor máximo para o ganho do MCP e por isso o ruído foi superestimado. Assim, considerou-se que os resultados foram insatisfatórios.

2.5.1.3 Análise da pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Xique-xique

As medidas realizadas não geraram espectros confiáveis, pois o ganho do MCP estava muito alto.

2.5.1.4 Avaliação dos resultados obtidos com o sistema LIBS 1

Todos os resultados obtidos foram considerados inadequados.

2.5.2 Sistema LIBS 2

O sistema LIBS 2 mostrou-se eficaz, pois o tempo requerido para a realização das medidas diminuiu bastante. Diferente do Sistema LIBS 1, não era necessário alinhar o coletor de radiação com o local de formação do plasma antes da realização de cada medida.

2.5.2.1 Análise dos tijolos

2.5.2.1.1 Teste I

A análise de componentes principais não revelou a presença de padrões. Isto provavelmente ocorreu porque as somas espectrais foram realizadas sobre a mesma locação, por isso as características do material ablado em todos os pulsos eram praticamente as mesmas. Assim, os espectros das somas obtidos na mesma locação não foram considerados representativos da amostra.

2.5.2.1.2 Teste II

O gráfico dos escores $PC1 \times PC2$ é ilustrado na Figura 2.10, em que $PC1$ e $PC2$ explicam, respectivamente, 68% e 12% da variância dos dados. Também é possível observar que os grupos dos tijolos apresentam uma tendência de separação ao longo de $PC1$ e de $PC2$.

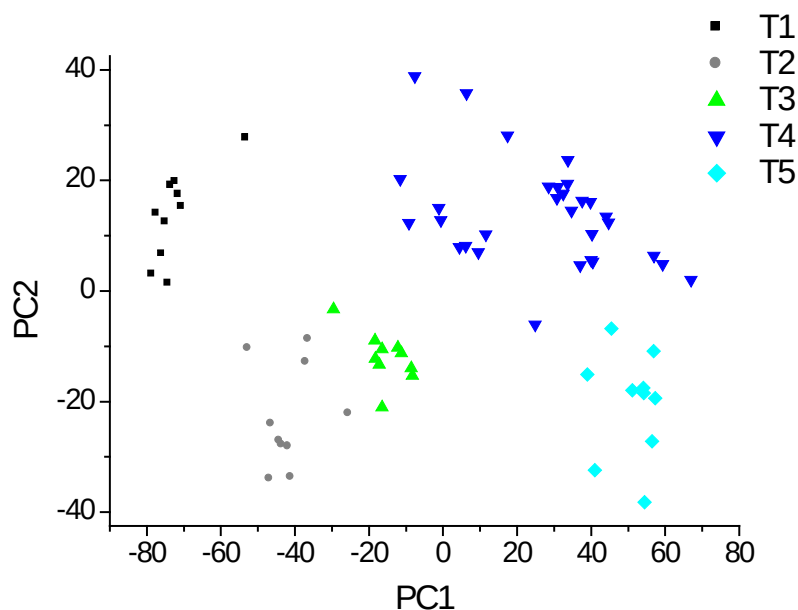


Figura 2.10: Gráfico dos escores ($PC1 \times PC2$) da PCA com os espectros LIBS dos tijolos pré-processados com SNV (Teste II da seção 2.4.4.2.1).

A Figura 2.11 ilustra o gráfico dos pesos com relação à primeira componente. Os picos deste gráfico representam os comprimentos de onda de emissão que exercem maior influência sobre a primeira PC. Foram realizadas atribuições dos comprimentos de onda dos picos de maiores intensidades no gráfico dos pesos, a fim de se determinar

as espécies químicas que emitem neste comprimento de onda. As atribuições dos picos dos pesos revelaram que PC1 é composta positivamente por raias de Si, Al e Ti e composta negativamente por Ca e Mg. A PC2 é composta por raias de Sr e Zr (com sinais mais positivos) e Fe, Si e Mg (com sinais mais negativos).

Fazendo-se um estudo comparativo entre o gráfico dos escores (PC1×PC2) e o gráfico dos pesos de PC1 e PC2 para cada grupo de tijolos, pode-se concluir que:

- T1 foi discriminado do restante dos tijolos possivelmente devido às maiores quantidades de Ca, Mg presentes nesta amostra;

- T2 e T3 apesar de terem formado agrupamentos próximos, foram diferenciados provavelmente pelas maiores quantidades de Ca e Mg presentes no T2;

- T4 e T5 também formaram agrupamentos próximos, mas foram diferenciados provavelmente pela maior quantidade de Sr e Zr no T4 e pela maior quantidade de Fe, Mg e Si presentes no T5;

- Ao longo de PC1, pode-se observar uma tendência com relação à região de fabricação dos tijolos, em que da esquerda para a direita se observa a ordem: tijolos holandeses; tijolos portugueses; e tijolo brasileiro. Além disso, também se pode observar uma tendência relacionada com a ordem cronológica de fabricação dos tijolos. Isto porque os tijolos do século XVII estão na região mais negativa de PC1, em seguida está o tijolo do século XVIII que é seguido pelos tijolos do século XIX e o tijolo do século XX.

Com este trabalho, todos os tijolos foram diferenciados a partir da sua composição. Estes resultados só foram alcançados devido às somas espectrais que foram importantes para a obtenção de um espectro representativo da amostra, e devido à utilização de técnicas quimiométricas que permitiu a diminuição da dimensionalidade do sistema. Estes resultados indicaram que o emprego do LIBS juntamente com técnicas quimiométricas pode ser utilizado para diferenciar materiais que possuem muitos constituintes.

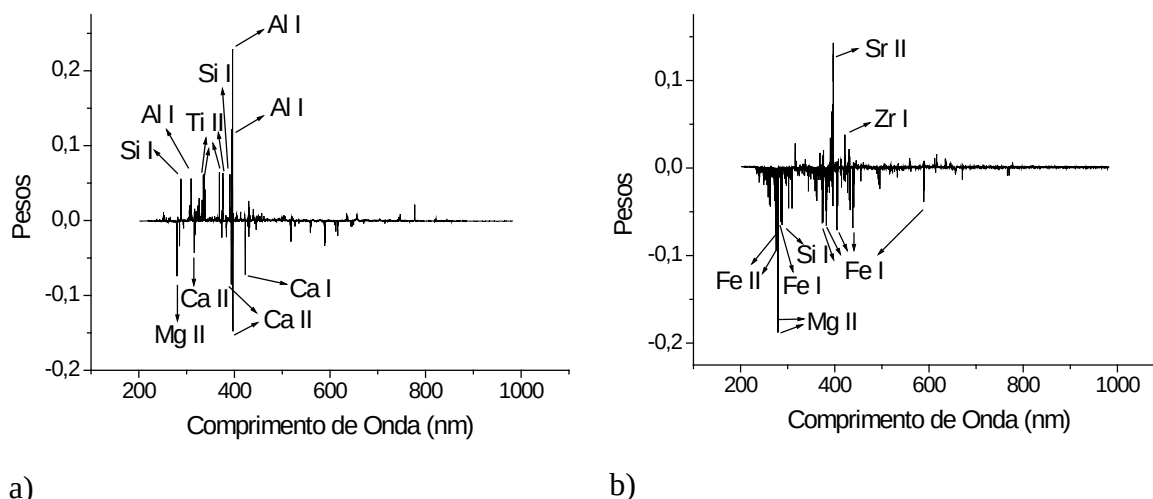


Figura 2.11: Gráfico dos pesos da PCA com os espectros LIBS dos tijolos pré-processados com SNV (Teste II da seção 2.4.4.2.1), a) PC1 e b) PC2.

2.5.2.2 Análise das pinturas

2.5.2.2.1 Análise da pintura em madeira

Os pulsos de laser nas regiões 1, 2, 3 e 4 para as energias 20,3, 12,3 e 5,36 mJ revelaram visualmente que:

- Nas regiões 1, 2 e 3 foi observada a existência de um ponto branco após a realização de dois pulsos na mesma locação. Este ponto branco corresponde à camada da base da pintura;
- Na região 4, o segundo pulso na mesma locação revelou a presença de uma camada dourada, evidenciando a existência da folha de ouro abaixo da camada de tinta vermelha. A camada branca foi alcançada após aplicar três pulsos na mesma locação;

A Figura 2.12 ilustra o gráfico dos escores das três primeiras componentes da PCA realizada com os espectros LIBS, pré-processados com SNV, das regiões 1, 2, 3 e 4 da pintura em madeira com energia igual a 20,3 e 12,3 mJ.

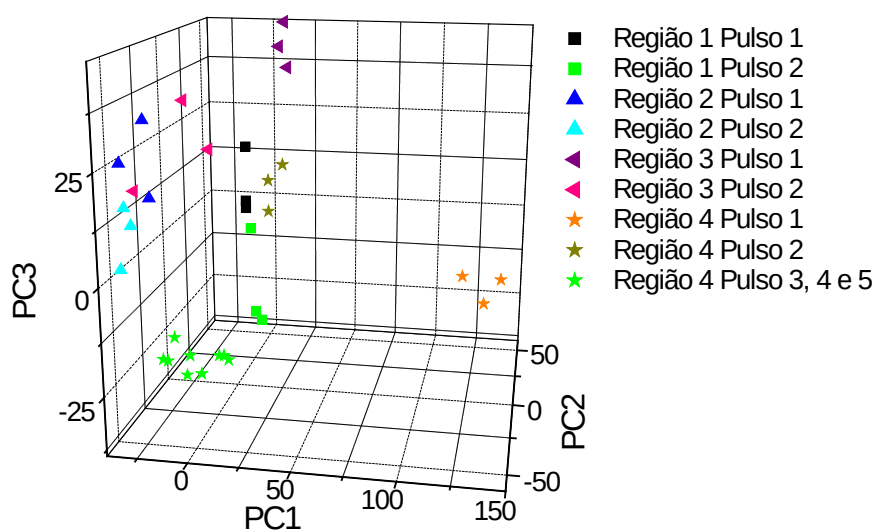
Nestes gráficos pode-se observar que o pulso 1 da região 3 e o pulso 1 da região 4 formam agrupamentos distantes do restante dos grupos. Isto ocorreu porque os espectros dos primeiros pulsos das regiões 3 e 4 refletem a composição da tinta dourada

e da tinta vermelha, respectivamente. Enquanto que o restante dos pulsos refletem a composição da região 1 e da região 2 (base e bolo, respectivamente).

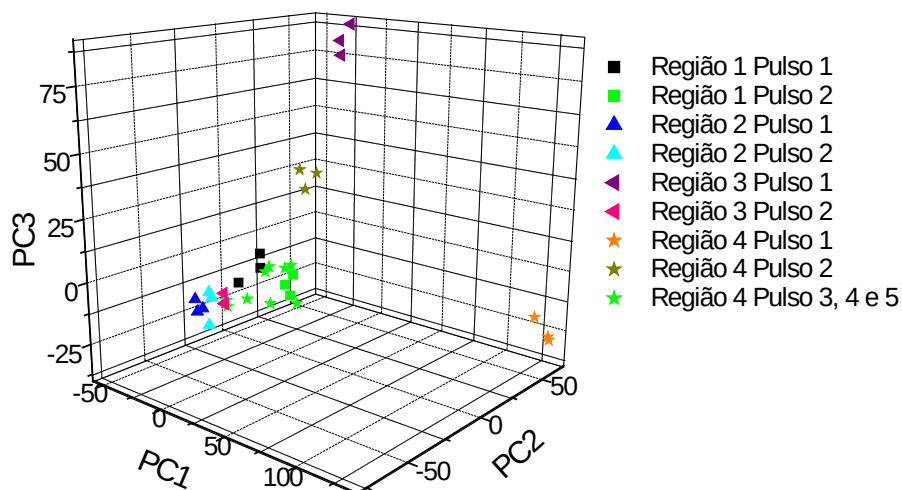
Comparando-se os dois gráfico da Figura 2.12 pode-se concluir que os agrupamentos formados pelos primeiros pulsos na região 3 e na região 4 são melhores discriminados no gráfico obtido com energia igual a 12,3 mJ. Isto porque como a energia é menor, a quantidade de amostra ablada é consequentemente menor, sendo assim, o material ablado no primeiro pulso é composto majoritariamente pela primeira camada de tinta. Enquanto que o material ablado com pulso de 20,3 mJ deve ser composto por uma mistura de duas camadas de tinta.

Ainda na Figura 2.12b pode-se observar que o grupo do segundo pulso na região 4 também forma um agrupamento discriminado. Isto ocorreu porque o espectro referente a este pulso é composto possivelmente pela camada tinta vermelha e pela folha de ouro, sendo, portanto diferente do bolo e da base. Isto reafirma que a energia igual a 12,3 mJ é mais indicada para tratar as camadas da pintura. Devido a esta observação decidiu-se diminuir a energia para 5,36 mJ e avaliar os resultados.

A Figura 2.13 ilustra o gráfico dos escores $PC1 \times PC2 \times PC3$ da PCA realizada com os espectros LIBS, pré-processados com SNV, das regiões 1, 2, 3 e 4 da pintura em madeira com energia igual a 5,36 mJ. Neste gráfico, os primeiros pulsos da região 4 não formam agrupamentos bem discriminados como nos gráficos da Figura 2.12. Isto ocorreu porque a energia utilizada é baixa demais para gerar espectros confiáveis, por isso os espectros gerados com esta energia são bastante ruidosos como pode ser observado na Figura 2.14.



a)



b)

Figura 2.12: Gráfico dos escores ($PC1 \times PC2 \times PC3$) da PCA com os espectros LIBS da pintura em madeira pré-processados com SNV, obtidos nas regiões 1, 2, 3 e 4. Com energia do laser igual a: a) 20,3 mJ; b) 12,3 mJ.

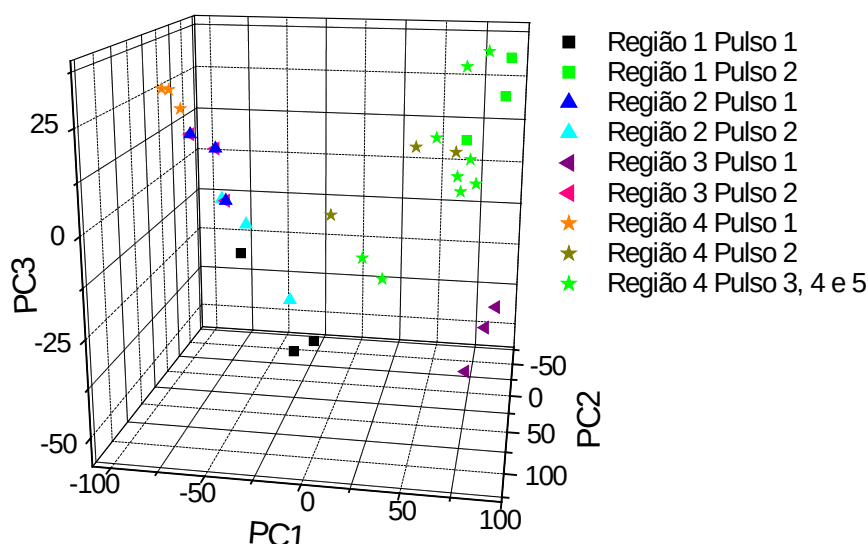


Figura 2.13: Gráfico dos escores ($PC1 \times PC2 \times PC3$) da PCA com os espectros LIBS da pintura em madeira pré-processados com SNV, obtidos nas regiões 1, 2, 3 e 4 com energia do laser igual a 5,36 mJ.

Apesar da energia igual a 12,3 mJ ter apresentado uma melhor discriminação no gráfico dos escores, optou-se por trabalhar com a energia igual a 20,3 mJ. Isto porque os espectros obtidos com a energia igual a 20,3 mJ são mais intensos do que os espectros obtidos com a energia igual a 12,3 mJ (ver Figura 2.14).

A energia de 20,3 mJ é maior do que a energia utilizada em trabalhos da literatura [11,32,33]. Esta diferença pode ser explicada pelo fato de que os lasers utilizados na literatura são lasers com comprimentos de onda iguais a 532 nm e 266 nm. Estes lasers possuem maior eficiência de ablação, que é a quantidade de massa removida por unidade de energia cedida [29, 34].

Foi realizada uma replicata das medidas com energia do laser igual a 20,3 mJ, e foi observado que os resultados eram reproduzidos em novas medidas.

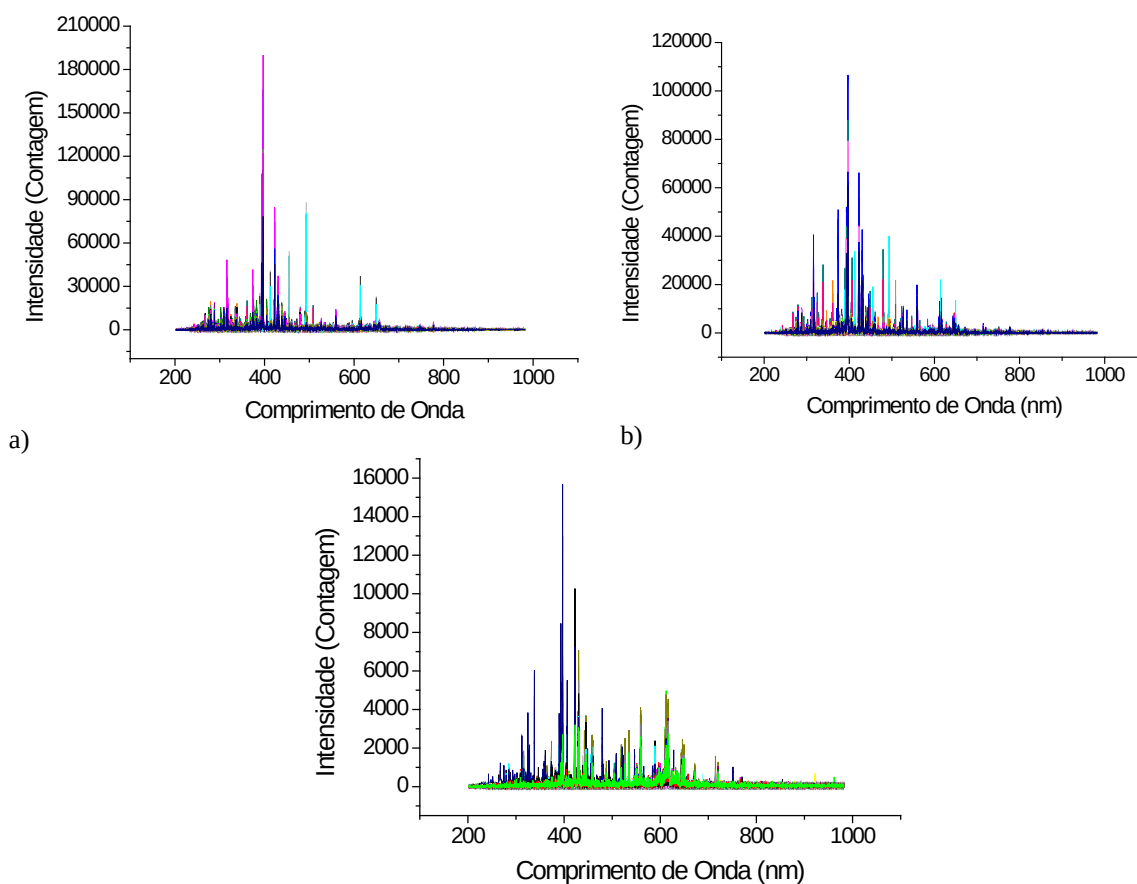


Figura 2.14: Espectros obtidos nas regiões 1, 2, 3 e 4 para as energias: a) 20,3 mJ, b) 12,3 mJ e c) 5,36 mJ.

2.5.2.2.2 Pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Toca da Extrema II

Por inspeção visual, percebeu-se que a camada de pigmento era atravessada após o terceiro ou quarto pulso realizados na mesma locação. A fim de completar 8 pulsos em cada locação, foram realizados mais quatro ou cinco pulsos após atravessar a camada da pintura.

A Figura 2.15 ilustra o gráfico dos escores ($PC1 \times PC2$), no qual $PC1$ e $PC2$ explicam respectivamente 37 e 20% da variância dos dados. Nesta figura, foram atribuídas cores diferentes aos pulsos realizados, a fim de facilitar o estudo das camadas da pintura:

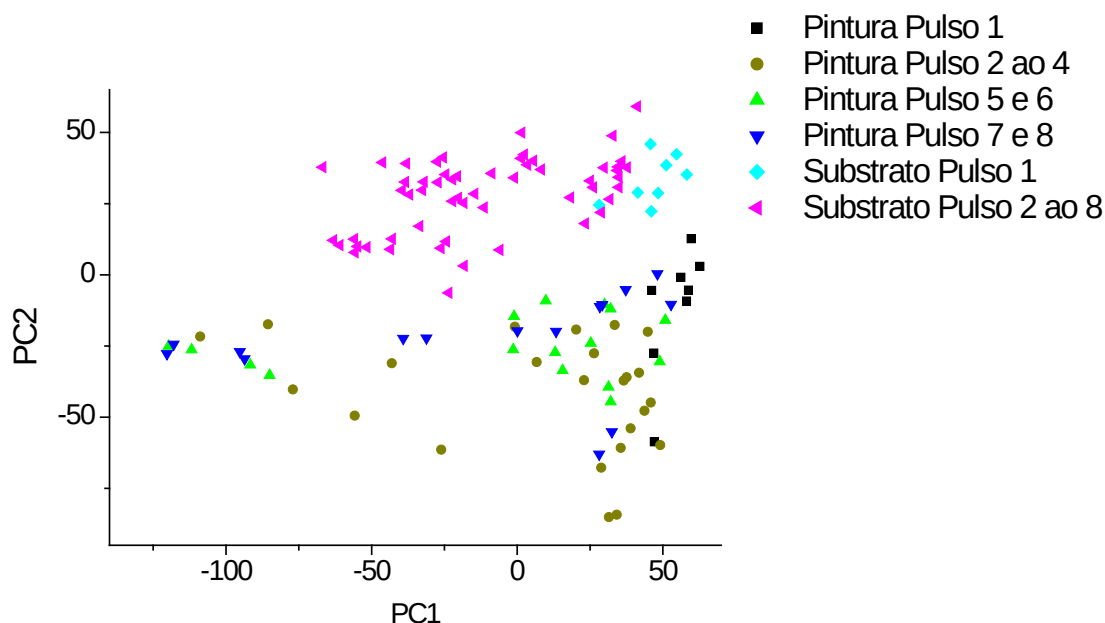


Figura 2.15: Gráfico dos escores (PC1×PC2) da PCA com os espectros dos oito pulsos da pintura pré-histórica proveniente do sítio arqueológico Toca da Extrema II.

No gráfico da Figura 2.15 observa-se que há uma separação entre a região da pintura e do substrato ao longo de PC2, em que a informação da pintura está presente na região negativa de PC2. É possível observar uma tendência dos pulsos das camadas mais profundas da pintura se aproximar da região positiva de PC2. Isto coincide com o observado, pois após os sétimos e oitavos pulsos o substrato já era bastante visível. Os primeiros pulsos realizados sobre o substrato e sobre a pintura possuem uma tendência de formar agrupamentos próximos, localizados à direita de PC1. Esta camada corresponde às impurezas depositadas ao longo dos séculos.

Ainda na Figura 2.15, os pontos que possuem os valores mais negativos em PC1 são pulsos pertencentes a apenas duas localidades diferentes. Isto deve ter ocorrido porque a técnica de LIBS promove uma análise pontual e estas localidades possuem composição diferente das demais analisadas. Os pontos que representam as localidades do substrato também apresentam grande dispersão ao longo da PC1, indicando que há variação da composição nas diferentes localidades.

Foi realizada uma nova PCA apenas com os espectros dos três primeiros pulsos, pois nestes espectros há mais informação da pintura. A Figura 2.16 ilustra o gráfico dos escores da PC1×PC2 com os dados dos três primeiros pulsos, em que a primeira e a segunda componente explicam 34% e 31% da variabilidade dos dados. Neste gráfico, a

primeira componente discrimina os pulsos realizados sobre a pintura dos realizados sobre o substrato. A região negativa de PC1 é composta pela informação da pintura, os escores mais negativos possuem maior informação do pigmento. Pode-se observar também que os primeiros pulsos realizados sobre o substrato e sobre a pintura formam agrupamento próximo e estão localizados em valores mais positivos de PC2.

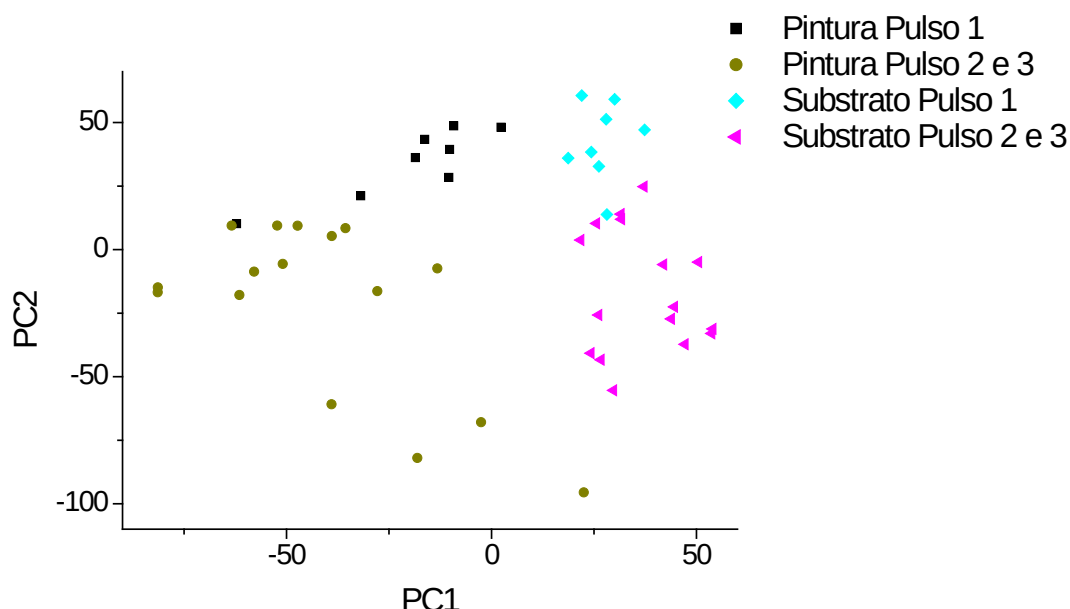


Figura 2.16: Gráfico dos escores (PC1×PC2) da PCA realizada com os três primeiros pulsos da pintura pré-histórica proveniente do sítio arqueológico Toca da Extrema II.

O gráfico dos pesos é ilustrado na Figura 2.17. PC1 é composto negativamente por raia de ferro e positivamente por raia de cálcio, silício e titânio. Indicando que as regiões da pintura e do substrato podem ser distinguidas pela grande quantidade de ferro na pintura e cálcio, silício e titânio no substrato. PC2 é composta negativamente por titânio e positivamente por cálcio. Assim, a primeira camada de impurezas que está recobrando a pintura e o substrato é composta principalmente por cálcio. A presença de cálcio é visível, pois o fragmento de rocha apresenta uma camada branca. Rochas compostas por cálcio, como é o caso, sofrem alterações bastante interessantes: o carbonato de cálcio do substrato pode ser neutralizado pelo ácido presente na chuva ou no solo; ou mais possivelmente, o enxofre presente no carvão queimado forma óxido de enxofre que adere à superfície do substrato e pode ser transformado quimicamente ou pela ação de bactérias na forma de sulfato, que posteriormente se converte em CaSO_4 [35]. A literatura relata que havia muitas fogueiras em várias regiões da Serra da Capivara [4].

Devido a utilização da PCA, foi possível identificar 3 camadas diferentes (impureza, tinta e rocha) na pintura rupestre, bem como diferenciá-las. A PCA também foi utilizada para indicar quais os espectros que possuem maior informação da tinta, pois a camada de pintura é irregular e cada localização é composta por uma espessura de tinta diferente. Os espectros selecionados foram os que possuíam os escores mais negativos em PC1.

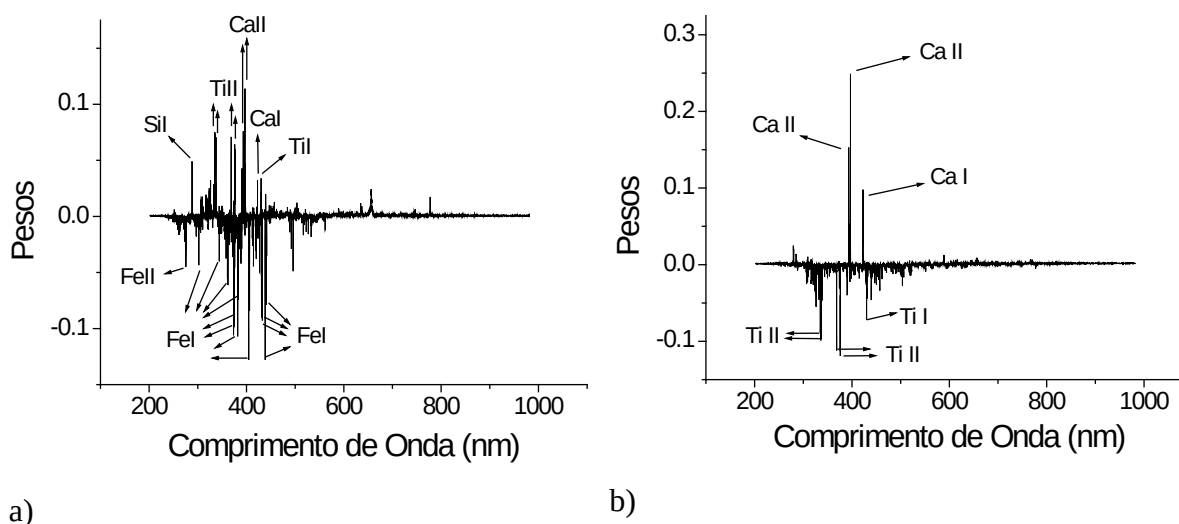


Figura 2.17: Gráfico dos pesos da PCA realizada com os três primeiros pulsos na pintura pré-histórica proveniente do sítio arqueológico Toca da Extrema II (a) PC1 and (b) PC2.

A análise das faixas 258-264 nm, 271-275 nm, 293-302 nm e 321-323 nm, que são regiões características de ferro, confirmaram a presença deste elemento na pintura [2]. Isto indicou a presença do pigmento ocre vermelho, que é baseado na hematita (Fe_2O_3) e era o material de cor vermelha disponível para realizar pinturas durante a pré-história [2]. Os outros elementos encontrados foram Al, Ca, Mg, Mn, Si e Ti. Os espectros mostraram fortes emissões de cálcio nas raías 422,67 nm e 396,84 nm. A presença de cálcio nas pinturas pode ser resultado da mistura do pigmento com óxido de cálcio ou de rituais envolvendo ossos.

A Figura 2.18 ilustra um dos espectros que foi utilizado na determinação dos elementos presentes na tinta da pintura rupestre. A região ampliada corresponde à faixa entre 258-264 nm, que é uma região característica do ferro. Esta figura reflete a importância do emprego da PCA na análise espectral de uma amostra complexa, pois até as regiões espectrais de baixa intensidade são importantes na análise.

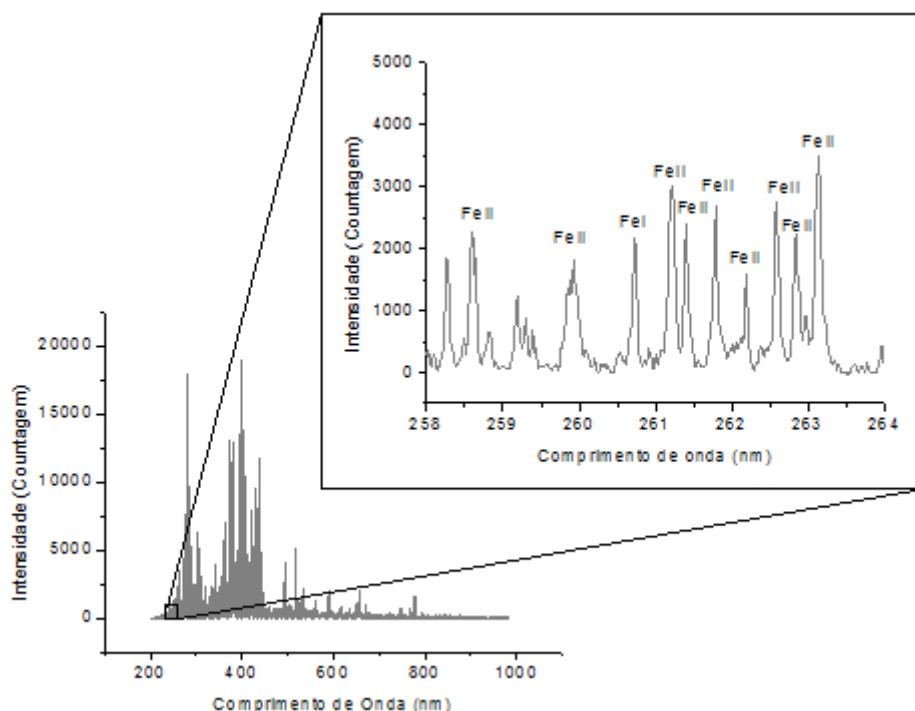


Figura 2.18: Espectro do segundo pulso realizado na pintura rupestre oriunda do sítio arqueológico Toca da Extrema II.

A Figura 2.19 ilustra o gráfico dos escores PC1×PC2 da PCA realizada com os espectros LIBS dos três primeiros pulsos das 16 locações selecionadas sobre a pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Toca da Extrema II e a média espectral dos pulsos realizados sobre a amostra do pigmento em pó. Nesta figura, os escores do pigmento em pó formam um agrupamento separado dos escores da rocha da pintura rupestre. Isto indica que a composição destas duas amostras é bastante diferente. Este resultado era esperado, pois o pigmento em pó foi encontrado no sítio arqueológico Xique-xique.

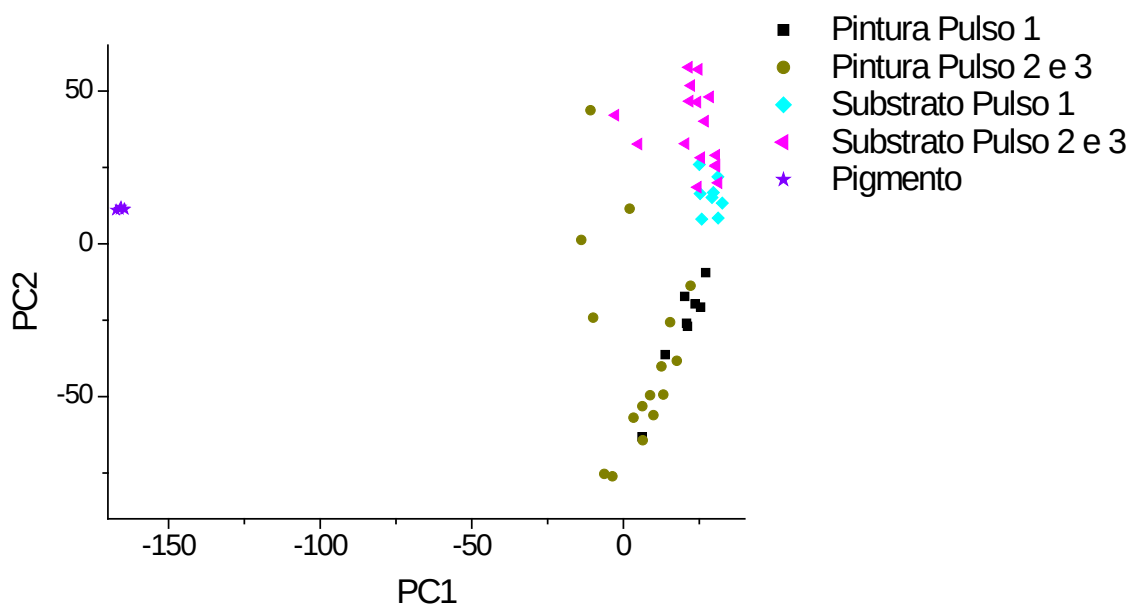


Figura 2.19: Gráfico dos escores (PC1×PC2) da PCA realizada com a média espectral do pigmento em pó e os espectros dos três primeiros pulsos realizados na pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Toca da Extrema II.

2.5.2.2.3 Pintura rupestre proveniente do sítio arqueológico Xique-xique

A inspeção visual da camada da pintura revelou que após o primeiro ou o segundo pulso era possível observar uma pequena cratera indicando que a camada de pintura havia sido atravessada. Porém o substrato só pôde ser visualizado após a realização do quarto pulso. Após a camada de pintura ser atravessada, foram realizados mais quatro pulsos a fim de completar oito pulsos em cada locação.

A Figura 2.20 ilustra o gráfico dos escores PC1×PC2 da PCA com os oito pulsos consecutivos em cada locação. A PC1 e PC2 explicam respectivamente, 31 e 15% da variabilidade dos dados. A discriminação entre rocha e pintura ocorre ao longo de PC1, exceto para os primeiros pulsos. Os segundos, terceiros e quartos pulsos consecutivos realizados sobre a pintura possuem escores negativos em PC1. Isto confirma a observação (visual) de que a camada da pintura foi atravessada após o quarto pulso. Os primeiros pulsos realizados sobre a pintura e sobre o substrato apresentaram escores positivos em PC1, indicando que possuem composição similar a do substrato da rocha. Isto pode ser devido à processos geológicos como o vento que pode ter depositado uma camada de impureza com composição parecida com a do substrato.

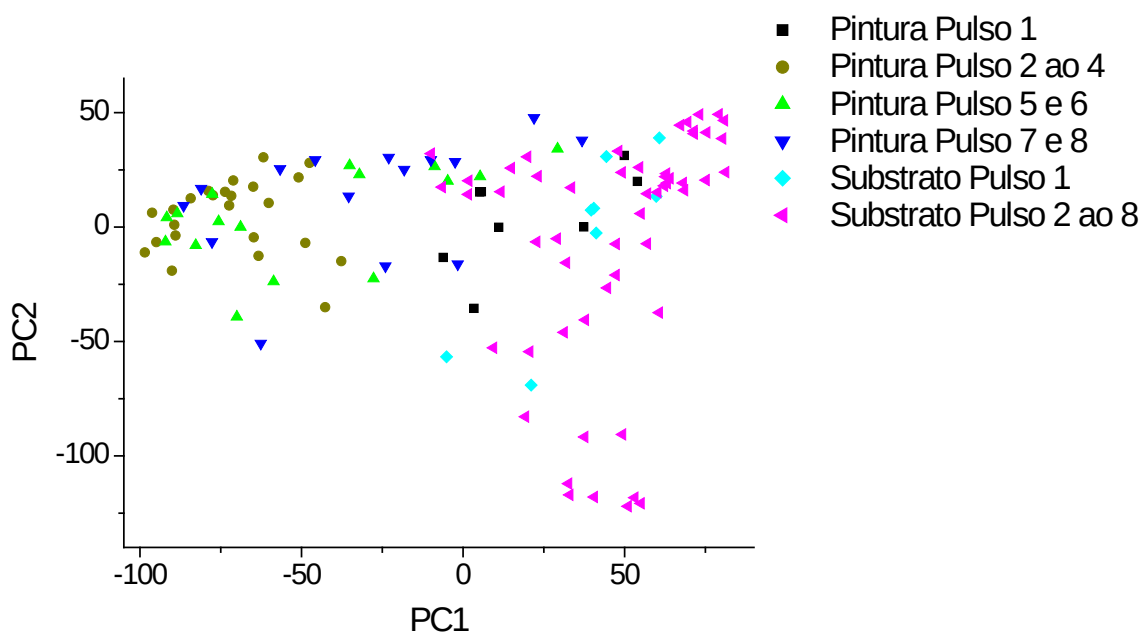


Figura 2.20: Gráfico dos escores (PC1×PC2) da PCA com os espectros dos oito pulsos da pintura pré-histórica proveniente do sítio arqueológico Xique-xique.

Os grupos formados pelos quintos, sextos, sétimos e oitavos pulsos consecutivos apresentam grande dispersão em PC1, possuindo escores tanto positivos como negativos nesta componente. Isto porque a pintura rupestre possui uma camada de tinta de espessura irregular. Assim, existem localidades em que a camada de tinta é atravessada com uma quantidade menor de pulsos consecutivos.

A Figura 2.21 apresenta o gráfico dos escores de PC1×PC2 da PCA que foi realizada com os espectros referentes aos três primeiros pulsos em cada localização. Nesta figura, a PC1 explica 38% da variância e PC2 explica 13% da variância. Nesta figura, todos os segundos e terceiros pulsos consecutivos realizados na região da pintura possuem escores negativos em PC1.

O gráfico dos pesos é ilustrado na Figura 2.22, no qual a primeira componente é composta por raias de Fe I (atômico) com sinal negativo e por raias de silício, alumínio e magnésio com sinal positivo. Mais uma vez foi identificado o pigmento ocre vermelho devido a presença de ferro.

Os três espectros com escores mais negativos em PC1 revelaram ainda a presença de Al, Ca, Fe, Mg, Mn, Ti e Si.

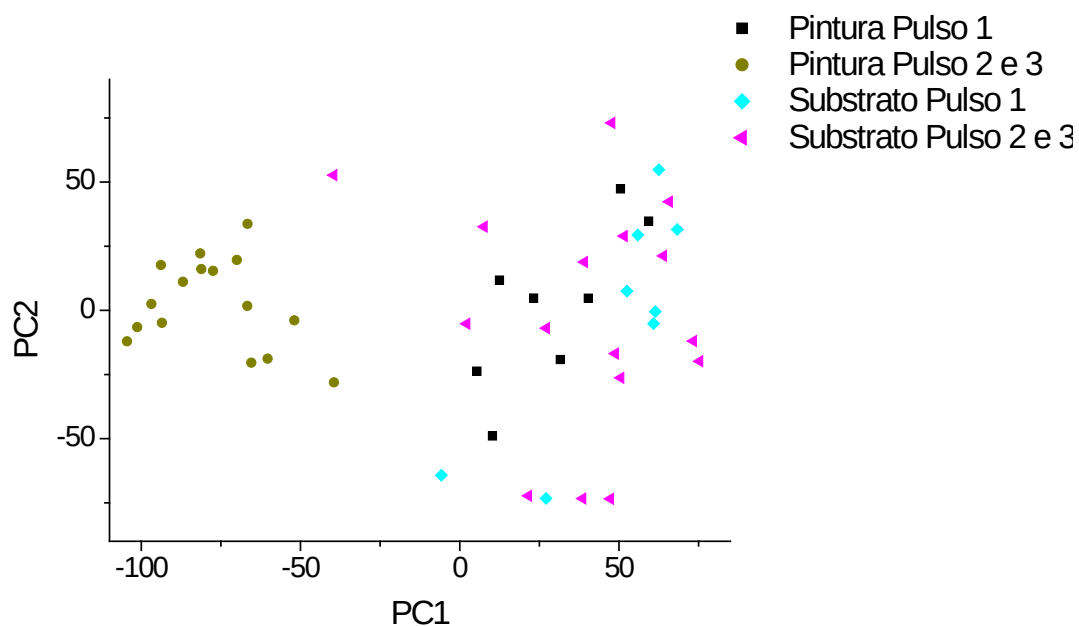


Figura 2.21: Gráfico dos escores (PC1×PC2) da PCA com os espectros dos três primeiros pulsos consecutivos da pintura pré-histórica proveniente do sítio arqueológico Xique-xique.

A Figura 2.23 ilustra o gráfico dos escores PC1×PC2 da PCA realizada com os espectros LIBS dos três primeiros pulsos disparados na pintura rupestre mais a média espectral dos pulsos realizados sobre a amostra do pigmento em pó. Os espectros do pigmento em pó formam agrupamento com escores negativos em PC1, indicando que a composição do pigmento em pó é similar à composição da pintura da rocha. Isto já era esperado, pois o pigmento em pó também foi encontrado no sítio arqueológico Xique-xique.

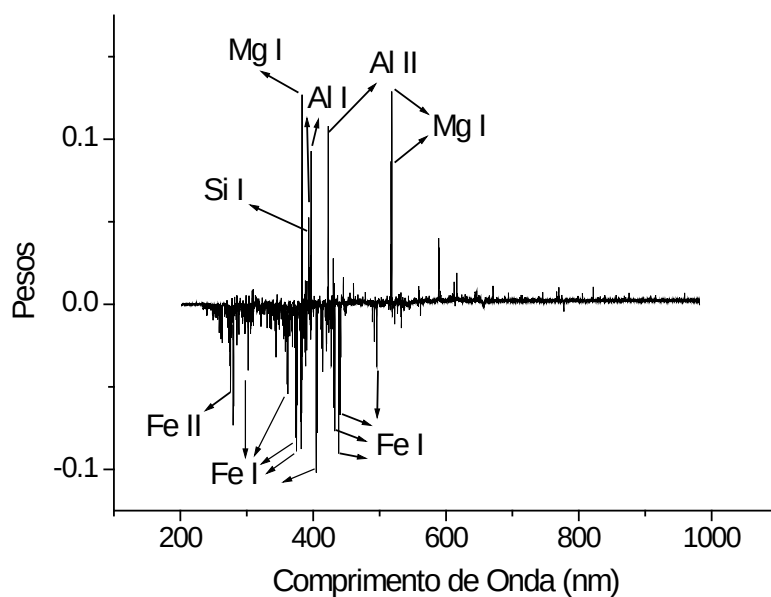


Figura 2.22: Gráfico dos pesos da PCA realizada com os três primeiros pulsos na pintura pré-histórica proveniente do sítio arqueológico Xique-xique.

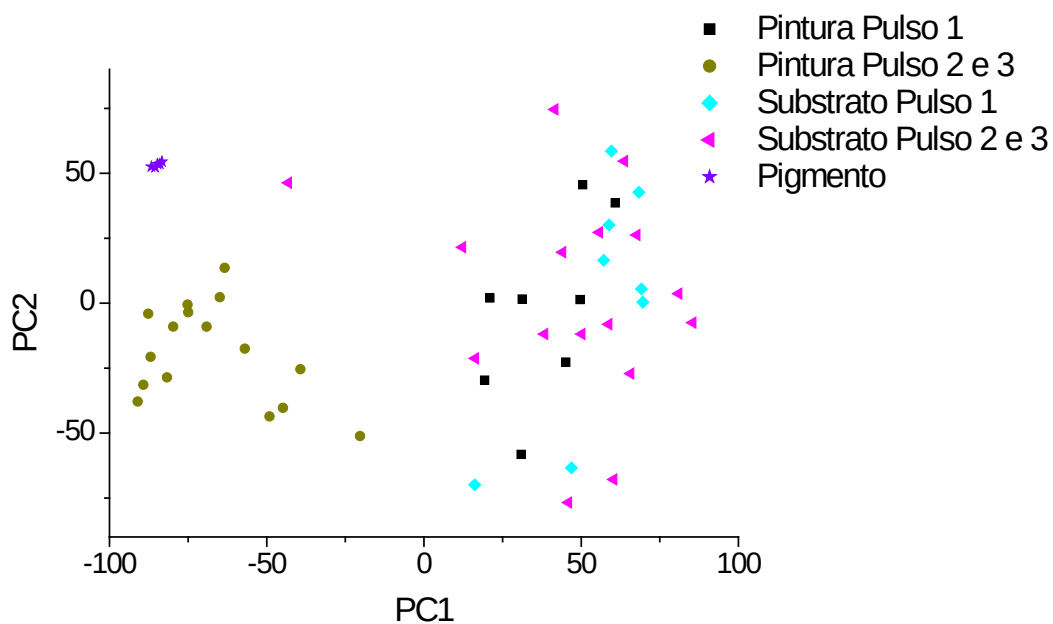


Figura 2.23: Gráfico dos escores (PC1×PC2) da PCA com os espectros dos três primeiros pulsos consecutivos da pintura pré-histórica proveniente do sítio arqueológico Xique-xique.

2.5.3.4 Análise do pigmento

Não foi possível obter o espectro da fita adesiva, pois a energia utilizada era pequena demais para haver formação do plasma. Sendo assim, não foi possível analisar o branco da amostra. Os espectros médios do pigmento foram analisados e foi revelada a presença de Ca, Fe, Mg, Mn, Ti e Si.

2.5.3.5 Avaliação dos resultados obtidos com o sistema LIBS 2

As metodologias aplicadas foram consideradas apropriadas para a análise das amostras.

2.6 Conclusões e perspectivas

Neste trabalho foi descrita uma metodologia semi-destrutiva para análise de materiais complexos com formatos irregulares e possuindo camadas de profundidade com diferentes composições.

Os dois lasers apontadores (Sistema LIBS 2) possibilitaram a realização de medidas rápidas e eficientes em amostras de superfície irregular.

A média espectral sobre 100 locações diferentes forneceu os espectros médios mais representativos dos tijolos.

O emprego de técnicas quimiométricas nos espectros de LIBS possibilitou:

- Tratar espectros muito complexos devido a presença de muitas raías de emissão;
- Revelar uma tendência de agrupamento dos tijolos e discrimina-los de acordo com o teor de titânio, zircônio, estrôncio e ferro presente em cada conjunto de tijolos;
- Determinar que pulsos de 20,3 mJ podem ser empregados nas pinturas rupestres analisadas para obtenção de espectros confiáveis e sem causar grandes danos às amostras;
- Identificar a presença de uma camada de impureza depositada acima da pintura nos fragmentos de pinturas rupestres analisados. A deposição de cálcio no fragmento proveniente do sítio arqueológico Toca da Extrema II deve ter sido resultado de uma transformação química comum em rochas compostas por cálcio. A impureza depositada sobre o fragmento do sítio arqueológico Xique-xique possui composição igual à do substrato, indicando que a deposição pode ser devida a processos geológicos;
- Indicar que a maior diferença entre os espectros obtidos sobre a pintura e substrato é devido a raías de ferro presentes nos espectros da pintura. Isto indicou que o pigmento utilizado é o ocre vermelho, que era o material de cor vermelha disponível para realizar pinturas durante a pre-história;
- Identificar os três espectros mais característicos da camada de pintura. A análise destes espectros revelou que os fragmentos analisados são compostos por Fe, Al, Ca, Mg, Mn, Si e Ti.

Como propostas futuras, pretende-se:

- Empregar o laser Nd:YAG com comprimento de onda igual a 532 nm e 266 nm, para avaliar a possibilidade de se obter espectros informativos com menores danos à estrutura da amostra. Neste contexto, pretende-se também diminuir a energia do laser, pois estes lasers possuem maior eficiência de ablação permitindo a obtenção de espectros apropriados com energias inferiores;
- Otimizar parâmetros como tempo de atraso e tempo de integração para obtenção de espectros mais informativos.

Referências

- [1] K. Elert, G. Cultrone, C. R. Navarro, E. S. Pardo, *J Cult Heritage* 4 (2003) 91.
- [2] A. Brysbaert, K. Melessanaki, D. Anglos, *J Archaeol Sc* 33 (2006) 1095.
- [3] A. M. Pessis, *FUMDHAMentos V* (2007) 01.
- [4] N. Guidon, *FUMDHAMentos V* (2007) 77.
- [5] G. Martin, *FUMDHAMentos V* (2007) 06
- [6] A. Giakoumaki, K. Melessanaki, D. Anglos, *Anal Bioanal Chem* 387 (2007) 749.
- [7] B. Gratuze, M. Blet-Lemarquand, J. N. Barrandon, *J Radioanal Nuclear Chem* 247 (2001) 645; S. M. M. Young, P. Budd, R. Haggerty, A. M. Pollard, *Archaeometry* 39 (1997) 379.
- [8] D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª edição, Bookman, Porto Alegre (2002).
- [9] N. F. C. Mendes, I. Osticioli, J. Striova, A. Sansonetti, M. Becucci, E. Castellucci, *J Mol Struc* 924 (2009) 420.
- [10] I. Osticioli, M. Wolf, D. Anglos, *Appl Spectrosc* 62 (2008) 1242.
- [11] D. Anglos, *Appl Spectrosc* 55 (2001) 186A.
- [12] I. Borgia, L. M. F. Burgio, M. Corsi, R. Fantoni, V. Palleschi, A. Salvetti, M. C. Scuarcialupi, E. Tognoni, *J Cult Heritage* 1 (2000) S281.
- [13] P. Maravelaki-Kalaitzaki, D. Anglos, V. Kilikoglou, V. Zafiropulos, *Spectrochim Acta, Part B* 56 (2001) 887.
- [14] P. Maravelaki-Kalaitzaki, M. Mateo, S. C. Ferrence, P. P. Betancourt, D. Anglos, *Appl Surf Sci* 197 (2002) 156.
- [15] F. Colao, R. Fantoni, V. Lazic, V. Spizzichino, *Spectrochim Acta, Part B* 57 (2002) 1219.
- [16] M. Corsi, G. Cristoforetti, M. Giuffrida, M. Hidalgo, S. Legnaioli, L. Masotti, V. Palleschi, A. Salvetti, E. Tognoni, C. Vallebona, A. Zanini, *Microchim Acta* 152

- (2005) 105.
- [17] A. J. López, G. Nicola's, M. P. Mateo, V. Piñón, M. J. Tobar, A. Ramil, *Spectrochim Acta, Part B* 60 (2005) 1149.
- [18] M. Oujja, A. Vila, E. Rebollar, J. F. García, M. Castillejo, *Spectrochim Acta, Part B* 60 (2005) 1140.
- [19] D. Anglos, S. Couris, C. Fotakis, *Appl Spectrosc* 51 (1997) 1025.
- [20] M. Galiova, J. Kaiser, K. Novotný, T. Vaculovič, M. N. Fišáková, J. Svoboda, J. J. Laserna, *2nd North American Symposium on Laser-Induced Breakdown Spectroscopy* (2009) 67.
- [21] A. Giacomo, M. Dell'Aglío, F. Colao, R. Fantoni, *Spectrochim Acta, Part B* 59 (2004) 1431; A. Giacomo, M. Dell'Aglío, F. Colao, R. Fantoni, V. Lazic, *Appl Surf Sci* 247 (2005) 157.
- [22] V. Lazic, F. Colao, R. Fantoni, V. Spizzicchino, *Spectrochim Acta, Part B* 60 (2005) 1014.
- [23] J. Novotný, *5th Int. Conf. on LIBS* (2008) 72; K. Novotný, J. Kaiser, J. Novotný, G. Vitkov, R. Malina, D. Prochazka, V. Kanicky, V. Otruba, M. Liska, *2nd North American Symposium on Laser-Induced Breakdown Spectroscopy* (2009) 108.
- [24] S. Duchêne, V. Detalle, R. Bruder, J. B. Sirven, *Curr Anal Chem* 6 (2010) 60.
- [25] F. Colao, R. Fantoni, P. Ortiz, M. A. Vazquez, J. M. Martin, R. Ortiz, N. Idris, *Spectrochim Acta, Part B* 65 (2010) 688.
- [26] J. A. Perez-Serradilla, A. Jurado-López, M. D. Luque de Castro, *Talanta* 71 (2007) 97.
- [27] K. A. Tereszchuk, J. M. Vadillo, J. J. Laserna, *Spectrochim Acta, Part B* 64 (2009) 378.
- [28] P. Pouli, K. Melessanaki, A. Giakoumaki, V. Argyropoulos, D. Anglos, *Spectrochim Acta, Part B* 60 (2005) 1163.
- [29] C. Pasquini, J. Cortez, L. M. C. Silva, F. B. Gonzaga, *J Braz Chem Soc* 18 (2007)

463.

- [30] J. Cortez, Dissertação de mestrado, *Construção e avaliação de um instrumento para espectroscopia de emissão em plasma induzido por laser (LIBS): aplicação em ligas metálicas*, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas-SP (2007).
- [31] NIST Atomic Spectra Database,
http://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines_form.html, acessado em Junho de 2010.
- [31] A. Brysbaert, K. Melessanaki, D. Anglos, *J Archaeol Sci* 33 (2006) 1095.
- [32] J. Anzano, R-J. Lasheras, E. Cunya, B. Bonilla, J. M. Beguería, Casas-González, *J Anal Lett* 42 (2009) 1509.
- [33] O. Barthélemy, J. Margot, M. Chaker, M. Sabsabi, F. Vidal, T. W. Johnston, S. Laville, B. Le Drogoff, *Spectrochim Acta, Part B* 60 (2005) 905; L. Fornarini, V. Spizzichino, F. Colao, R. Fantoni, V. Lazic, *Anal Bioanal Chem* 385 (2006) 272.
- [34] J. B. Lambert, *Traces of the past Unraveling the secrets of Archaeology Through Chemistry*, Helix Books, Massachusetts (1998) p. 28.

CAPÍTULO 3

Avaliação do efeito de matriz na determinação da concentração de vinte elementos em amostras de suplemento alimentar com ICP OES

3.1 Introdução

Suplementos alimentares provenientes, principalmente de fontes vegetais, estão sendo cada vez mais utilizados em muitos países [1]. Muitos procuram suplementos botânicos com a promessa de consumir produtos constituídos majoritariamente por matérias-primas vegetais contendo principalmente Ca, Mg, Mn, Ni, Cu e Zn, que são elementos importantes para a saúde humana. Entretanto, estes produtos podem ser prejudiciais à saúde, caso os limites diários sejam ultrapassados [1]. Outro perigo é a possível presença de metais pesados nestes produtos, a qual já foi comprovada em muitos estudos [2-6]. A presença de metais pode ser resultado de uma contaminação por agrotóxico durante o cultivo [7], processamento e armazenamento [1]. É muito importante também investigar a presença de elementos como As, Cd, Hg e Pb devido ao alto potencial tóxico, a alta biodisponibilidade e a eventual adição destes compostos durante a fabricação destes produtos.

Dolan e colaboradores [6] determinaram a concentração de As, Cd, Hg e Pb em suplementos alimentares empregando decomposição por radiação microondas e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado com alta resolução (*high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry* - HR ICP-MS). Neste trabalho foram encontradas concentrações de Cd e As abaixo do valor mínimo permitido em todos os produtos analisados. Apenas uma amostra de suplemento alimentar apresentou concentração de Hg acima da permitida. Finalmente, onze amostras apresentaram concentrações de Pb, acima dos níveis toleráveis.

Avula e colaboradores [1] desenvolveram e validaram um método para analisar 21 elementos em 21 suplementos alimentares e 11 amostras de plantas utilizando a espectrometria de massas por plasma indutivamente acoplado (*inductively coupled plasma mass spectrometry* - ICP-MS) com célula reacional de colisão (*collision reaction cell* - CRC). O elemento mais abundante foi o K seguido por Na, Mg, Al, Ca, Mn, e Fe, enquanto que V, Cr, Co, Ni, Se, Cd, Hg e Pb apresentaram baixas concentrações na maior parte das amostras.

García-Rico e colaboradores empregaram decomposição por radiação microondas e espectroscopia de absorção atômica para investigar a presença de Cu, Zn, Cd e Hg em 24 amostras de suplementos alimentares [8]. As concentrações encontradas

apresentaram valores abaixo do máximo permitido para a estimativa de ingestão diária. Em alguns produtos, os valores chegaram a 10% dos níveis toleráveis para o Pb.

A identificação ou quantificação dos elementos presentes em uma amostra normalmente é realizada por três métodos espectrométricos: espectrometria óptica, espectrometria de massa e espectrometria de raios-X [9]. Cada técnica possui vantagens e desvantagens, e a escolha vai depender do tipo de amostra, quantidade de amostra requerida para análise, disponibilidade instrumental, faixa de concentração do analito, analito que se pretende determinar, custo da análise, entre outros [9].

Na espectrometria óptica, há necessidade de atomizar a amostra para a análise, em seguida é realizada a medida de absorção, emissão ou fluorescência das partículas atômicas. Dentre as fontes de emissão, a fonte de plasma é muito vantajosa devido às altas temperaturas atingidas que diminui a interferência entre os elementos.

A espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (*inductively coupled plasma optical emission spectrometry* - ICP OES) é uma técnica muito utilizada na análise de alimentos [10-19], pois é multielementar, possui alta sensibilidade, baixos limites de detecção, baixo ruído e baixa radiação de fundo. A existência de muitas linhas espectrais é vantajosa porque se pode analisar cada raia para escolher aquela com melhor limite de detecção. Entretanto, espectros contendo muitas raias podem conter sobreposições espectrais, nestes casos, é importante conhecer quais elementos estão presentes na amostra.

As concentrações de Al, B, Ba, Ca, Cl, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, S, Si, Sr e Z foram determinadas por ICP OES em semente e mesocarpo de babaçu, semente de sapucaia, polpa de coco, polpa e semente de cupuaçu, e semente de acaju [10]. Foram obtidas concordâncias com materiais de referência no nível de 95% de confiança através do teste *t*. Apenas a quantidade de Mn na semente de babaçu ultrapassou os limites recomendados de ingestão diária. Os limites de quantificação foram da ordem de 0,00072 e 0,0532 mg L⁻¹ e o desvio padrão relativo variou entre 1,0 e 6,7%.

A ICP OES também foi utilizada para determinação do nível de boro em 16 amostras de avelãs originárias de diferentes regiões da Turquia [11]. O material de referencia SRM-1573 foi utilizado para avaliar a exatidão do método, obtendo-se resultados satisfatórios. Este trabalho revelou que as avelãs analisadas são importantes

fontes naturais de boro para a nutrição humana. As regiões que apresentaram maior e menor concentração de boro foram Mincane (20,6 - 22,2 mg kg⁻¹) e Kalinkara (13,8 - 14,1 mg kg⁻¹), respectivamente.

Em geral, a análise por ICP OES requer que as amostras estejam no estado líquido. Amostras sólidas devem ser convertidas em soluções através de processos físicos e químicos para a análise. Muitos métodos de preparo de amostra são descritos na literatura, a escolha do método vai depender principalmente da natureza da amostra e dos elementos que se deseja determinar. É importante que o método adotado não possua risco de contaminação; não envolva etapas de adição de reagentes contendo elementos que se deseja determinar, nem perda de amostra por volatilização ou adsorção; exija pouca manipulação; e seja rápido [20].

Materiais que são de origem orgânica também precisam passar por um processo de decomposição antes de se realizar medidas analíticas, pois os efeitos de matriz podem gerar resultados inexatos. Em geral, a decomposição ocorre a partir da oxidação da matriz, em que o carbono é convertido em CO₂, o hidrogênio em H₂O e nitrogênio em N₂ ou óxidos de nitrogênio. Muitos métodos de decomposição são descritos na literatura, como decomposição por combustão, por via úmida, por radiação microondas e por irradiação com ondas ultravioletas [20]. Nesta tese, foram abordadas a decomposição por combustão na mufla e por microondas.

A extração assistida por microondas está sendo cada vez mais utilizada por promover um aquecimento mais rápido e homogêneo do que as técnicas que envolvem combustão. Além disso, ocorre em recipientes fechados evitando risco de contaminação e perdas por volatilização. Entretanto, a literatura indica que este método deve ser empregado com grande cautela para medidas quantitativas, pois a interação entre a matriz e o analito deve ser avaliada [20].

A decomposição por combustão na mufla é uma das técnicas mais antigas, mas ainda vem sendo empregada devido à grande simplicidade. A fração orgânica é queimada em atmosfera ambiente restando um resíduo inorgânico não volátil. Uma desvantagem desta técnica é a possível perda por volatilização que pode ser evitada ou diminuída com a adição de aditivos [20].

Na decomposição por via úmida, é realizado o aquecimento da amostra em ácidos, na presença ou não de peróxido de hidrogênio. Comparando com a decomposição por via seca, a via úmida é vantajosa por ser realizada em temperaturas menores, evitando grandes perdas por volatilização. Entretanto, a via úmida apresenta a desvantagem de requerer maiores cuidados, devido a toxicidade, nocividade, etc. dos reagentes, havendo, inclusive, a necessidade de ser conduzida em capela, havendo também perigo de explosão [20].

Outro método bastante utilizado é a decomposição por radiação ultravioleta [20]. O processo é iniciado com a absorção de radiação ultravioleta (UV), em seguida, ocorre a excitação das moléculas que absorveram a radiação. Como resultado da excitação, pode ocorrer a cisão homolítica das ligações químicas, gerando radicais livres que são muito reativos e possuem potencial oxidante. Algumas vantagens são: não requer a utilização de ácidos concentrados, o que dispensa a necessidade de diluição para análise e diminui os riscos de contaminação; há pequenas perdas por volatilização, pois, em geral, a decomposição ocorre em baixas temperaturas, cerca de 60 a 80°C. Como desvantagem, pode-se citar: tempos longos de irradiação, podendo chegar a algumas horas; requer amostras líquidas; e é pouco eficiente quando a fração orgânica presente na amostra é muito alta [20].

Trabalhos na literatura mostram que parâmetros como: tipo de ácido ou mistura de ácidos; volume e concentração do ácido; tipo de decomposição, bem como, tempo de decomposição e temperatura de aquecimento devem ser otimizados [14]. Em muitos trabalhos, a decomposição por microondas é apontada como a mais eficiente [15].

Métodos de decomposição por via seca, por via úmida e por radiação microondas foram comparados para a análise de frutas secas originárias da Turquia empregando ICP OES [16]. Neste trabalho foi feita a determinação de Ba, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn, Al, Fe e Sr. Todas as frutas apresentaram valores aceitáveis para consumo nutricional e não foram encontrados níveis tóxicos dos elementos analisados. A decomposição por radiação microondas apresentou os melhores resultados no ensaio de recuperação, além disso, foi apontado como o método mais rápido e simples.

A ICP OES foi empregada para determinação de Ca, K, Mg e Na em sementes de soja e de girassol [17]. As amostras foram maceradas com um almofariz de ágata. Em seguida, foi pesada no reator do microondas, 0,5 g da massa moída e foram

adicionados 3 mL de HNO_3 e 1,5 mL de H_2O_2 . A programação do microondas foi a seguinte: 5 min a 100 W, 3 min a 0 W, 3 min a 250 W, 5 min a 0 W, 3 min a 450 W, 3 min a 0 W, 3 min a 450 W, 5 min a 0 W e 3 min a 500 W. O programa da decomposição foi repetido três vezes para obtenção de melhores resultados de decomposição. Foram obtidos limites de detecção entre 0,01 e 0,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ e limites de quantificação entre 0,04 e 0,8 $\mu\text{g g}^{-1}$. Foram obtidas concordâncias com materiais de referência no nível de 95% de confiança através de um teste t [17].

A ICP OES foi empregada para determinar as concentrações de Al, Cr, Cd, Cu, Fe, Mg, Mn, Pb e Zn em feijão branco, fava, lentilha, ervilha e grão de bico. Para avaliar as melhores condições de decomposição foram empregados quatro métodos: decomposição por via úmida com $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ ou $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$; e decomposição por via seca com $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ou $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2/\text{HNO}_3$. Foram encontrados resultados aceitáveis para ambas as digestões, mas as melhores recuperações foram obtidas na decomposição por via úmida com a mistura $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$. Foi obtido desvio padrão relativo menor do que 8,5% para todos os elementos. A exatidão foi avaliada através do erro relativo, que foi menor do que 11%. Os limites de quantificação foram menores do que 2,5 $\mu\text{g g}^{-1}$. A concentração de Cd mostrou-se abaixo do limite de detecção na ervilha e no grão de bico e as concentrações de Cr e Pb ficaram abaixo do limite de quantificação em todas as amostras. As concentrações de Al, Cd, Cu, Fe e Mg encontradas são compatíveis com as concentrações provenientes de várias regiões do mundo [18].

Um planejamento experimental com sete fatores (volumes de HNO_3 , H_2SO_4 e H_2O_2 ; tempo de decomposição; tempo de pré-decomposição; temperatura de aquecimento e peso da amostra) foi empregado para otimizar a decomposição por via seca de amendoins, amêndoa, avelã e noz [19]. O volume de HNO_3 e H_2O_2 e o tempo de decomposição foram apontados como os parâmetros mais importantes. O método desenvolvido foi aplicado na determinação de Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn, Al, Ba, Cd e Pb apresentando limite de detecção menor do que 0,74 $\mu\text{g g}^{-1}$. Foi avaliada a exatidão com erro relativo entre 0,4 e 11% e precisão com desvio padrão relativo entre 2 e 8,2%.

No Brasil, o crescimento acelerado do consumo de um suplemento alimentar inicialmente designado de “Ração Humana” preocupou as autoridades. A composição deste produto varia de acordo com o fabricante, podendo conter cereais, farelos, fibras,

farinhas, linhaça, gergelim, extrato de soja, levedo de cerveja, cacau em pó, gelatina em pó e guaraná em pó. Devido aos inúmeros questionamentos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou um informe técnico no qual proibiu a denominação “RAÇÃO HUMANA” para estes alimentos [21]. Nesta nota, a ANVISA declara que este nome não corresponde à “verdadeira natureza e característica do produto”, pois indica que o produto poderia substituir refeições, o que não é verdade. Produtos deste tipo podem causar danos à saúde por não possuir os nutrientes necessários para uma alimentação saudável. A ANVISA também proibiu a garantia de propriedades terapêuticas e medicamentosas nas embalagens destes produtos, pois segundo o artigo 56 do Decreto lei n. 986/1969 [22] e o item 3.1 da Resolução ANVISA RDC n. 259/2002 [23] este tipo de declaração é proibido em alimentos. A ANVISA também proibiu que as embalagens contivessem qualquer informação com alusão à perda ou manutenção de peso corporal, pois os alimentos com esta finalidade devem obedecer à Portaria SVS/MS n. 30, de 13 de janeiro de 1998 [24].

3.2 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi empregar ICP OES para avaliar o efeito de matriz em três procedimentos de decomposição. Os objetivos específicos foram:

- Determinar para cada elemento os comprimentos de onda de emissão com maior sensibilidade e menor interferência;
- Avaliar emprego da correção do padrão interno;
- Comparar o efeito de matriz para soluções não diluídas e com diluições 1:2, 1:5 e 1:10;
- Determinar os coeficientes angulares das curvas analíticas e de adição de padrão;
- Comparar as concentrações dos elementos determinados com valores reportados em trabalhos da literatura.

3.3 Fundamentação teórica

3.3.1 Preparação da amostra

3.3.1.1 Ultra-som

A exposição de líquidos a ondas ultra-sônicas provoca a formação de bolhas micrométricas. Um ciclo de rarefação e compressão da bolha ocorre até a bolha atingir um diâmetro limite e colapsar. Este fenômeno é denominado cavitação [20]. O colapso das bolhas produz altas temperaturas na fase gasosa e na fase líquida e altas pressões na interface entre a bolha e o solvente [20,24]. Devido a estas condições, pode ocorrer a quebra de ligações das moléculas que estão no interior da bolha, resultando na produção de radicais livres [20].

Em sistemas sólido-líquido, o colapso das bolhas pode causar a desagregação do sólido, devido à microjatos formados e a fusão do sólido devido às altas temperaturas [26, 20]. Além disso, as altas temperaturas alcançadas durante o colapso provocam a fusão do material. Estes dois processos provocam a dissolução da amostra no meio ácido.

3.3.1.2 Decomposição

3.3.1.2.1 Decomposição por radiação microondas

A radiação microondas ocorre entre 300 e 300.000 MHz. A interação entre a radiação microondas com a amostra e o solvente, provoca o fenômeno da migração iônica dos íons dissolvidos e a rotação de dipolos do solvente. A migração iônica é resultado da interação dos íons com o campo elétrico oscilante. A rotação de dipolos ocorre devido a interação do campo oscilante e as moléculas que possuem momento dipolar induzido ou permanente. Estes dois processos contribuem para o aumento da temperatura do sistema, responsável pela decomposição da amostra, pois a energia gerada pela radiação microondas é insuficiente para promover quebra da ligação química [20].

Devido ao aumento da temperatura do sistema ser provocado por mecanismos de conversão de energia, o aquecimento na decomposição por microondas é mais rápido e

eficiente do que o aquecimento condutivo. Além disso, a decomposição ocorre em recipientes fechados impossibilitando a contaminação entre as amostras e diminuindo a quantidade de reagentes e minimizando a perda de analitos através de arraste pelos vapores formados [20].

3.3.1.2.2 Decomposição por combustão na mufla

Na decomposição por aquecimento na mufla, as amostras são introduzidas no forno para serem submetidas a temperaturas adequadas e durante um tempo suficiente para decompôr as amostras. O oxigênio promove a queima e consequente perda, na forma de gases, da fração orgânica e a fase inorgânica da amostra é retida na forma de fosfatos, óxidos de metais, sulfatos não voláteis, e etc. A pirólise orgânica ocorre em aproximadamente 450 e 550°C [20].

Uma desvantagem deste método é a possibilidade de haver alguma perda de elementos por volatilização durante o aquecimento a altas temperaturas. Por exemplo, mais de 20% Cu, Fe e Zn são perdidos quando a amostra é submetida a 550°C [20]. Outras desvantagens são a formação de cinzas de difícil diluição em alguns casos e digestões muito demoradas, bem como a perda de substâncias inorgânicas devido a volatilização e o grande tempo de decomposição, os quais podem ser contornados pela utilização de aditivos de incineração e controle de temperatura. Neste contexto, oxidantes como ácido nítrico podem ser utilizados para acelerar a oxidação.

3.3.2 ICP OES

Na ICP OES, a amostra é vaporizada, atomizada e excitada ao entrar em contato com o plasma. Um espectro de emissão é gerado após a relaxação das espécies químicas presentes. A fonte do plasma é uma tocha composta por três tubos de quartzo que são alimentados por argônio. O processo é iniciado com a ionização do argônio, em seguida, os íons e elétrons começam a se movimentar devido à interação com o campo magnético flutuante. A resistência ao movimento dos íons e dos elétrons provoca o aquecimento ôhmico. A temperatura do plasma é mantida por ionizações adicionais que ocorrem devido à absorção de energia dos íons de argônio [9].

A introdução de amostras é realizada comumente pelo nebulizador. Neste, a amostra líquida é aspirada e convertida numa névoa com gotas de diferentes tamanhos (aerossol) por um jato de argônio de alta velocidade. Em seguida, o aerossol é transportado para a tocha.

A leitura do sinal pode ocorrer no raio da tocha (configuração radial) ou no eixo da tocha (configuração axial). A configuração axial confere maior sensibilidade e melhor limite de detecção, mas está sujeita a maiores interferências que são resultado de processos de recombinação e auto-absorção [27]. Devido a estas interferências, a configuração axial pode não ser indicada na análise de amostras complexas [28].

Devido às altas temperaturas atingidas pela amostra ao entrar em contato com o plasma, a ICP OES permite a excitação de diferentes átomos e íons ao mesmo tempo [9]. Sendo assim, grande parte das espécies presentes na amostra emitem suas radiações características praticamente ao mesmo tempo. Uma consequência disto é que o espectro de emissão da amostra conterá picos de emissão características de diferentes espécies químicas do mesmo elemento. A vantagem disto é a possibilidade de escolher qual o comprimento de onda mais adequado para ser empregado nos cálculos das concentrações de cada elemento químico presente na amostra, pois se deve optar pelos comprimentos de onda com maior sensibilidade e menor interferência [9].

3.4 Procedimento experimental

3.4.1 Instrumentação

Foram empregados os seguintes equipamentos:

- Banho de ultra-som modelo 3000514, Selecta (Barcelona, Espanha), com capacidade de 9 L;
- Banho de areia modelo 6000709, Selecta (Barcelona, Espanha);
- Forno mufla modelo ECF 12/45A Lenton com um programador Eurotherm 2416 de Biometa (Llanera, Espanha);
- Digestor de Microondas “Ethos Sel” Milestone (Soriso, Itália);
- Sistema de limpeza dos reatores de Teflon® com HNO₃, “Trace clean” Milestone (Soriso, Itália);
- Sistema MILLI-Q PLUS “Milipore” (Bedford, Massachusetts, EUA);
- Espectrofotômetro de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado “Optima 5300 DV” Perkin-Elmer (Shelton, Connecticut, EUA) equipado com um amostrador automático AS93-plus, e nebulizador de fluxo cruzado com uma câmara Scott de duplo passo.

3.4.2 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes:

- HNO₃ 69% para análise de traços, Scharlau (Barcelona, Espanha);
- H₂O₂ 35% grau reagente, Scharlau (Barcelona, Espanha);
- Água deionizada de aproximadamente 18,2 MΩ;
- Argônio Premier X50S 99,9992%, Carburos Metálicos (Barcelona, Espanha);

- Padrão Multielementar 100 mg L⁻¹ de Al, As, Ba, Be, Bi, B, Cd, Ca, Cr, Co, Cu, Fe, Pb, Li, Mg, Mn, Mo, Ni, K, Se, Na, Sr, Tl, Ti, V e Zn, em HNO₃ 5%, pureza ICP, Scharlau (Barcelona, Espanha);
- Padrão multielementar de lantanídeos 100 mg L⁻¹ em Ce, La, Nd e Pr de 20 mg L⁻¹ em Dy, Er, Eu, Gd, Ho, Lu, Sm, Sc, Tb, Tm, Yb e Y em HNO₃ 5%, pureza ICP, Scharlau (Barcelona, Espanha);
- Solução estoque de Rutênio 1000 mg L⁻¹ preparado com RuCl₃ e HCl 1 mol L⁻¹, Fluka (Buchs, Suíça);
- Solução estoque de Potássio 1000 mg L⁻¹, preparado a partir de KNO₃ com HNO₃ 0,5 mol L⁻¹, pureza AA, Scharlau (Barcelona, Espanha);
- Solução estoque de Sódio 1000 mg L⁻¹ preparado a partir de NaNO₃ com HNO₃ 0,5 mol L⁻¹, pureza AA, Scharlau (Barcelona, Espanha);
- Solução estoque de Cálcio de 1000 mg L⁻¹ preparado a partir de Ca(NO₃)₂ com HNO₃ 0,5 mol L⁻¹, pureza AA, Scharlau (Barcelona, Espanha);
- Solução estoque de Magnésio de 1000 mg L⁻¹ preparado a partir de Mg(NO₃)₂ com HNO₃ 0,5 mol L⁻¹, pureza AA, Scharlau (Barcelona, Espanha).

3.4.3 Identificação das amostras

Todas as amostras de suplemento alimentar foram adquiridas em estabelecimentos comerciais do Brasil. A Tabela 3.1 apresenta a identificação das amostras analisadas.

3.4.4 Preparação das amostras

As amostras de suplemento alimentar foram trituradas com um processador de alimentos, até a obtenção de um aspecto uniforme. Esta etapa é muito importante, pois além de tornar a amostra mais homogênea, garantindo a representatividade de alíquotas da mesma, aumenta a superfície de contato das partículas, facilitando o processo de extração.

Com o objetivo de se determinar a influência entre o método de decomposição e o efeito de matriz durante as medidas por ICP OES, foram realizadas três tipos de decomposição: 1) decomposição assistida por radiação microondas; 2) decomposição por combustão na mufla com adição de nitrato de magnésio e óxido de magnésio; 3) decomposição por combustão na mufla sem aditivos. As amostras digeridas por cada método são listadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.1: Relação das amostras analisadas

Identificação*	Identificação*
Mistura Energética, Vida boa produtos naturais	Ultra Fiber com Quinoa + Colágeno, Flora 7 ervas
Nutrição Humana Light, Sabor da Terra	Multimistura, Celeiro
Grão Nutri, Vale das Flores	Ração Humana Multimistura, Mata Redonda
Ração Humana RH27 baixo teor de sódio, Kobber	Ração Humana 0% Açucar, Naturisse
Nutrição Humana Integral, Sabor da Terra	RH 15 Sabor baunilha, Sabor Nutri
Nutrição Humana mistura de cereais integrais, Cereal Life	Ração Humana RH 27, Kobber
Mistura de alimentos à base de cereais, Grannutri	Nutrição Humana Light, Nutra Way
Designer Super Ração, DNA	Ração Humana RH 27, Kobber
Bomshake, Naturisse	

*A ordem das amostras apresentada nesta tabela é diferente da numeração nas amostras adotada neste trabalho, sendo assim, não será revelada a composição química de nenhum destes suplementos.

Tabela 3.2: Quantidade de amostras decompostas por cada método.

Método de decomposição	Amostras digeridas
Microondas	17
Mufla com adição de nitrato de magnésio e óxido de magnésio	17
Mufla	8

3.4.4.1 Decomposição assistida por radiação microondas

Na decomposição assistida por radiação microondas optou-se por utilizar um procedimento já otimizado e testado com amostras certificadas no laboratório para decomposição de amostras cereais e vegetais [29]. Para isso, uma massa aproximada de 0,5000 g ($\pm 0,1$ mg) de amostra foi pesada diretamente em cada reator de teflon.

Antes de se iniciar a decomposição por radiação microondas, foi realizada uma pré-decomposição das amostras colocando os reatores no banho de ultra-som. Para isso, foram adicionados 8 mL de HNO_3 65% em todos os reatores. Em seguida, os reatores foram colocados no ultra-som, com banho de água por 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados vagarosamente (para evitar formação de espuma) 2 mL de H_2O_2 35%, permanecendo a mistura por mais 10 minutos no ultra-som.

Os reatores foram retirados do ultra-som e colocados no microondas com a seguinte programação: rampa linear até 85°C por 3 minutos, rampa linear até 145°C por 12 minutos, rampa linear até 180°C por 10 minutos, temperatura em 180°C por 15 minutos e rampa linear até 25°C por 20 minutos, potência máxima de 500 W. Após retirar os reatores do microondas, aguardou-se que os mesmos atingissem a temperatura ambiente para serem levados novamente ao banho com ultra-som por uma hora. O volume contido em cada reator foi transferido para um tubo de polietileno de 50 mL e o restante do volume foi completado com água deionizada até 20 mL.

As soluções que não continham analito (branco) foram preparadas seguindo o mesmo procedimento empregado para as amostras.

3.4.4.2 Decomposição por combustão na mufla com adição de nitrato de magnésio e óxido de magnésio

O procedimento utilizado foi o mesmo apresentado por Matos-Reyes e colaboradores para determinação de As, Sb, Se, Te e Bi em amostras de alimentos [30]. Aproximadamente 1,0000 g ($\pm 0,1$ mg) de cada amostra foi pesada em um béquer de 250 mL. Em seguida, foram adicionados: 2,5 mL de uma suspensão, contendo 20,00 g ($\pm 0,01$ g) de nitrato de magnésio e 2,00 g ($\pm 0,01$ g) de óxido de magnésio em 100 mL de água deionizada; 5 mL de uma solução 1:2 de ácido nítrico preparada a partir de uma solução HNO_3 69%. A suspensão foi mantida sob agitação durante a adição.

Em seguida, os béqueres foram colocados em aquecimento no banho de areia, colocando sobre os mesmos um vidro de relógio, para evitar contaminação entre as amostras. Os béqueres foram mantidos em aquecimento até que toda a parte líquida evaporasse. Foram então colocados na mufla com o seguinte programa de temperatura: aumentar a temperatura por uma rampa linear até 150°C durante 30 minutos; manter a temperatura em 150°C durante 30 minutos; aumentar temperatura por uma hora com 1°C por minuto até 450°C; manter temperatura em 450°C durante 24 horas; abaixar a temperatura até 30°C durante 120 minutos.

Os béqueres foram retirados da mufla quando a temperatura da mesma estava em torno de 30°C. Após passar pela calcinação na mufla, a maior parte das amostras apresentava coloração branca, mas com algumas regiões marrons, indicando que a parte orgânica da amostra ainda não havia se decomposto por completo.

Foram adicionados em todos os béqueres 5 mL de uma solução 1:2, preparada a partir de uma solução HNO_3 69%. Após a adição do ácido nítrico, os béqueres foram recolocados no aquecimento na areia até a parte líquida evaporar. Posteriormente, todos os béqueres foram recolocados na mufla para repetir o mesmo programa de calcinação.

Após a retirada da mufla pela segunda vez, todas as amostras apresentavam coloração branca, indicando que toda a parte orgânica da amostra havia se decomposto. Foram adicionados em cada béquer 3 mL de água deionizada pelo sistema Milli-Q e ainda 8 mL de uma solução 1:10 de HCl preparada a partir de uma solução de HCl a 37%. O HCl foi utilizado para dissolver o produto da calcinação. O volume do béquer foi transferido para um tubo de 15 mL.

Todo o procedimento foi também empregado para o preparo de quatro soluções sem analito (brancos).

3.4.4.3 Decomposição por combustão na mufla

Esta decomposição consistiu na utilização de 12 béqueres altos de 250 mL, 8 contendo amostras e 4 contendo soluções sem analito (brancos). Nesta decomposição, foi pesado aproximadamente 1,0000 g ($\pm 0,1$ mg) de amostra em cada béquer. Posteriormente, foram adicionados aos béqueres, 5 mL de uma solução 1:2 de ácido nítrico preparada a partir de uma solução HNO_3 69%. Após a adição do HNO_3 as amostras foram colocadas no aquecimento em banho de areia até que toda a parte líquida fosse evaporada. Em seguida, os béqueres foram colocados na mufla para seguir o mesmo programa da decomposição apresentada na seção 3.3.4.2.

Após a calcinação na mufla, as amostras apresentavam coloração marrom, então foram adicionados 5 mL de uma solução 1:2 de ácido nítrico preparada a partir de uma solução HNO_3 69%. Em seguida os béqueres foram recolocados no aquecimento na areia até a evaporação de toda a parte líquida. Após o aquecimento na areia, os béqueres foram novamente submetidos ao programa da mufla.

Após a segunda calcinação na mufla, as amostras ainda apresentavam coloração marrom, assim, todos os béqueres foram ressubmetidos à adição de ácido, aquecimento na areia e calcinação na mufla. Finalmente após a terceira calcinação, as amostras apresentavam-se sem cor e translúcidas. Então, foram adicionados em cada béquer 3 mL de água deionizada e 8 mL de uma solução 1:10 de HCl preparada a partir de uma solução de HCl a 37%.

3.4.5 Medidas por ICP OES

O padrão interno utilizado foi o rutênio, pois não é um elemento comum às amostras. A função do padrão interno é corrigir interferências de nebulização, transporte e atomização.

Foram preparadas as seguintes soluções para a construção das curvas analíticas padrões:

(1) padrão multielementar de 26 elementos (Al, As, Ba, Be, Bi, B, Cd, Ca, Cr, Co, Cu, Fe, Pb, Li, Mg, Mn, Mo, Ni, K, Se, Na, Sr, Tl, Ti, V e Zn) com soluções nas concentrações, 0, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1 e 2 mg L⁻¹;

(2) padrão de lantanídeos de 16 elementos com soluções nas concentrações 0,05, 0,1, 0,25, 0,50, 0,75 e 1 mg L⁻¹ para Ce, La, Nd e Pr, e 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,15 e 0,2 mg L⁻¹ para Dy, Er, Eu, Gd, Ho, Lu, Sm, Sc, Tb, Tm, Yb e Y;

(3) padrão com os elementos Ca, Mg, K e Na com soluções nas concentrações 20, 40, 60, 80 e 100 mg L⁻¹.

Em todas as soluções foi adicionado 1 mL de uma solução de Ru com concentração igual a 10 mg L⁻¹. Devido à utilização do HNO₃ 69% na decomposição por microondas e do HCl 37% na decomposição por combustão na mufla, com o objetivo de aproximar a composição das soluções padrões das amostras, foram preparadas duas curvas analíticas uma empregando 0,1 mL de HNO₃ 69% (para a decomposição assistida por radiação microondas) e a outra, o mesmo volume de HCl 37% (para decomposição em mufla). Todas as soluções preparadas possuem volume total igual a 10 mL.

3.4.5.1 Amostras decompostas por radiação microondas

Foram realizadas medidas com as diluições 1:10, 1:5, 1:2 e sem diluição (Tabela 3.3). O estudo do efeito de diluição é importante porque inicialmente não se conhece a concentração dos elementos. Sendo assim, amostras diluídas são necessárias para a medida da concentração de elementos presentes em altas concentrações, enquanto que

as amostras não diluídas são importantes para medir elementos presentes em baixas concentrações.

Também foram realizadas medidas com adição de analito para as diluições 1:5, 1:2 e sem diluir. A faixa de concentração da adição foi de 0 a 1 mg L⁻¹. A adição de analito foi realizada em uma mistura preparada tomando-se 10 mL do digerido de cada uma das amostras 1, 2, 5 e 7, escolhidas aleatoriamente. Foi calculado o erro relativo percentual com os coeficientes angulares da curva analítica e com os obtidos das curvas analíticas das adições de analito para detectar possíveis efeitos de matriz. As Tabelas 3.4, 3.5 e 3.6 indicam os volumes adicionados para preparação das soluções empregadas na construção das curvas obtidas por adição de analito.

Tabela 3.3: Volumes da solução das amostras decompostas por combustão na mufla, do padrão interno (Ru) e de água, empregadas para o preparo das soluções sem diluição, e com diluição 1:2, 1:5 e 1:10.

	V_{amostra} (mL)	V_{HNO_3} (mL)*	V_{Ru} (mL)**	$V_{\text{H}_2\text{O}}$ (mL)
Sem diluição	4,5	-	0,5	-
Diluição 1:2	2,5	-	0,5	2,0
Diluição 1:5	1,0	0,1	0,5	3,4
Diluição 1:10	0,5	0,1	0,5	3,9

*HNO₃ 69%; **solução de Ru com concentração igual a 10 mg L⁻¹.

Tabela 3.4: Volumes da solução das amostras decompostas por microondas, da solução de referência, do padrão interno (Ru) e de água, adicionadas para traçar curvas de adição de analito sem diluição.

	V_{Mistura} (mL)*	$V_{\text{padrão}}$ (μL)**	V_{Ru} (mL)***	$V_{\text{H}_2\text{O}}$ (mL)
	4	0	0,5	0,5
	4	125	0,5	0,375
	4	250	0,5	0,250
	4	375	0,5	0,125
	4	500	0,5	0

*Mistura preparada tomando-se 10 mL do digerido das amostras 1, 2, 5 e 7

Concentração do padrão multielementar igual a 10 mg L⁻¹; *Solução de Ru com concentração igual a 10 mg L⁻¹.

Tabela 3.5: Volumes da solução das amostras decompostas por microondas, da solução de referência, do padrão interno (Ru) e de água, adicionadas para traçar curvas de adição de analito com diluição 1:2.

V_{Mistura} (mL)*	$V_{\text{padrão}}$ (μL)**	V_{Ru} (mL)***	$V_{\text{H}_2\text{O}}$ (mL)
2,5	0	0,5	2
2,5	125	0,5	1,875
2,5	250	0,5	1,75
2,5	375	0,5	1,625
2,5	500	0,5	1,5

*Mistura preparada tomando-se 10 mL do digerido das amostras 1, 2, 5 e 7

Concentração do padrão multielementar igual a 10 mg L^{-1} ; *Solução de Ru com concentração igual a 10 mg L^{-1} .

Tabela 3.6: Volumes da solução das amostras decompostas por microondas, da solução de referência, do padrão interno (Ru) e de água, adicionadas para traçar curvas de adição de analito com diluição 1:5.

V_{Mistura} (mL)*	$V_{\text{padrão}}$ (μL)**	V_{Ru} (mL)***	$V_{\text{H}_2\text{O}}$ (mL)
1	0	0,5	3,5
1	125	0,5	3,375
1	250	0,5	3,250
1	375	0,5	3,125
1	500	0,5	3,00

*Mistura preparada tomando-se 10 mL do digerido das amostras 1, 2, 5 e 7

Concentração do padrão multielementar igual a 10 mg L^{-1} ; *Solução de Ru com concentração igual a 10 mg L^{-1} .

3.4.5.2 Amostras decompostas por combustão na mufla com e sem adição de nitrato de magnésio e óxido de magnésio

Nesta etapa, foram estudadas as diluições 1:2 e 1:5. As soluções preparadas são mostradas na Tabela 3.7. A adição de analito foi realizada numa mistura contendo 3 mL do digerido das amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8. As adições de analito com relação às diluições 1:2 e 1:5 são mostradas na Tabela 3.8 e 3.9.

Tabela 3.7: Volumes da solução das amostras decompostas por combustão na mufla, do padrão interno (Ru) e de água, empregadas para o preparo das soluções com diluição 1:2 e 1:5.

	V_{amostra} (mL)	V_{Ru} (mL)*	$V_{\text{H}_2\text{O}}$ (mL)
Diluição 1:2	2,5	0,5	2,0
Diluição 1:5	1,0	0,5	3,5

* Solução de Ru com concentração igual a 10 mg L^{-1} .

Tabela 3.8: Volumes da solução das amostras decompostas por combustão na mufla, da solução de referência, do padrão interno (Ru) e de água, adicionadas para traçar curvas de adição de analito com diluição 1:2.

V_{Mistura} (mL)*	$V_{\text{padrão}}$ (μL)**	V_{Ru} (mL)***	$V_{\text{H}_2\text{O}}$ (mL)
2,5	0	0,5	2
2,5	250	0,5	1,75
2,5	500	0,5	1,5
2,5	750	0,5	1,25
2,5	1000	0,5	1,0

*Mistura contendo 3 mL do digerido das amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8

Concentração do padrão multielementar igual a 5 mg L^{-1} ; *Solução de Ru com concentração igual a 10 mg L^{-1} .

Tabela 3.9: Volumes da solução das amostras decompostas por combustão na mufla, da solução de referência, do padrão interno (Ru) e de água, adicionadas para traçar curvas de adição de analito com diluição 1:5.

V_{Mistura} (mL)*	$V_{\text{padrão}}$ (μL)**	V_{Ru} (mL)***	$V_{\text{H}_2\text{O}}$ (mL)
1	0	0,5	2
1	250	0,5	1,75
1	500	0,5	1,5
1	750	0,5	1,25
1	1000	0,5	1,0

*Mistura contendo 3 mL do digerido das amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8

Concentração do padrão multielementar igual a 5 mg L^{-1} ; *Solução de Ru com concentração igual a 10 mg L^{-1} .

3.4.5.3 Parâmetros instrumentais

Foram utilizados os seguintes parâmetros instrumentais:

- Potência da radiofrequência - 1400 W;
- Tempo de espera - 90 s;
- Número de replicas - 3;
- Fluxo de Ar do plasma - 15 L min⁻¹;
- Fluxo de Ar do gás auxiliar - 0,2 L min⁻¹;
- Fluxo de Ar do gás nebulizador - 0,8 L min⁻¹;
- Fluxo da bomba peristáltica - 1,10 mL min⁻¹;
- Padrão interno - rutênio 1 mg L⁻¹;
- Modo de medida - axial, exceto Ca, K, Mg, Na, Li e Sr que foram medidos na forma radial;
- Nebulizador de fluxo cruzado (*cross flow*).

3.4.6 Cálculos realizados

3.4.6.1 Sensibilidade de calibração

A sensibilidade de calibração indica a variação de sinal analítico provocada pela medida de diferentes concentrações do analito, sendo, portanto, igual ao coeficiente angular da curva analítica.

3.4.6.2 Estimativa do limite de detecção (LD_e) e do limite de quantificação (LQ_e)

O limite de detecção (LD) é a quantidade mínima de um elemento que pode ser detectada com um nível de confiança adequado. O limite de quantificação (LQ) é a concentração mínima que pode ser quantificada por um método [31]. As equações 3.1 e 3.2 expressam o LD e o LQ, respectivamente:

$$LOD = \frac{3s_b}{m}, \quad 3.1$$

$$LQ = \frac{10s_b}{m}, \quad 3.2$$

em que s_b é o desvio padrão calculado a partir de repetições do branco, e m é a sensibilidade da curva de calibração.

Neste trabalho foi calculada uma estimativa preliminar do LD e do LQ, pois o desvio padrão foi calculado a partir de apenas 3 medidas do branco.

3.3.6.3 Erro relativo entre os coeficientes angulares das curvas analíticas e de adição de analito

O erro relativo (Er) foi estimado por:

$$Er = \frac{a_a - a_p}{a_p} \times 100\%, \quad 3.3$$

em que a_p e a_a são os coeficientes angulares das curvas analíticas e da adição de analito, respectivamente.

3.5 Resultados e discussão

3.5.1 Seleção dos comprimentos de onda

Para cada elemento, além das medidas realizadas nos comprimentos de onda recomendados pelo fabricante do equipamento, também foram obtidas medidas em outros comprimentos de onda para avaliar a presença de interferências espectrais. As raia selecionadas para análise são indicadas na Tabela 3.10, 3.11 e 3.12.

Na maior parte dos elementos, o comprimento de onda selecionado foi o mesmo recomendado pelo fabricante do equipamento. Entretanto para alguns elementos foi encontrada outra raia que possuía maior sensibilidade e menor interferência. A Figura 3.1a, ilustra duas raia de emissão característica do B, em que a indicada pelo fabricante (249,677 nm) apresentou menor intensidade, justificando a escolha da raia 249,772 nm. No caso do Er (Figura 3.1b), foram indicadas duas raia pelo fabricante (337,271 nm e 349,910 nm). Na raia 337,271 nm a intensidade obtida na solução das amostras (coloração cinza), apresentou-se muito maior do que a intensidade medida na solução dos padrões (coloração vermelha). Isto não é coerente, pois o Er é um elemento pouco encontrado em alimentos, portanto deve haver algum efeito interferente. Sendo assim, a raia selecionada para o Er foi 349,910 nm. Para o Pr (Figura 3.1c) a raia selecionada foi 414,311 nm, pois apresentou maior intensidade e formato mais simétrico do que a indicada pelo fabricante (390,844 nm).

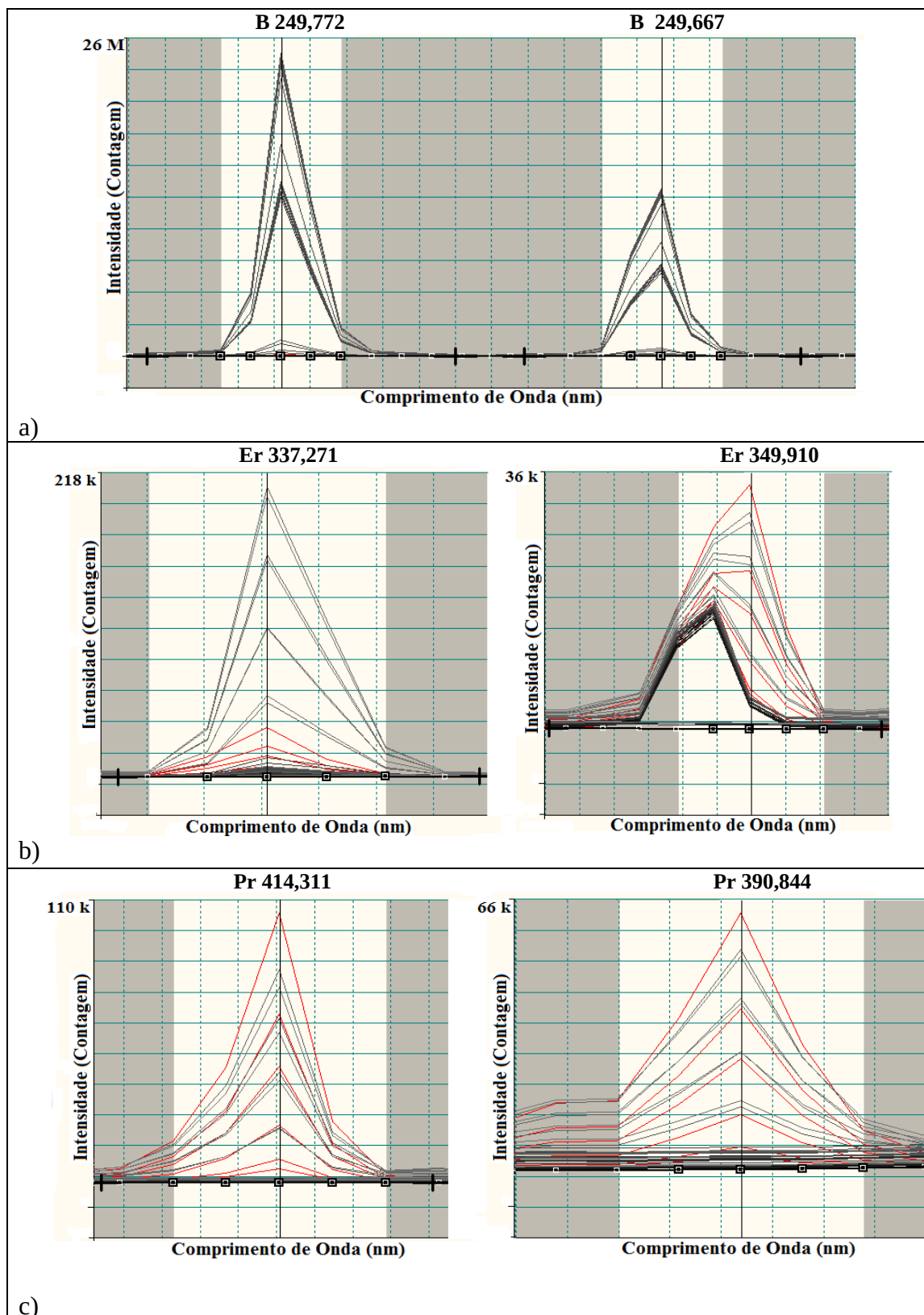


Figura 3.1: Raias de emissão características do B, Er e Pr medidas nas soluções das amostras (cinza) e dos padrões (vermelho).

3.5.2 Comparação entre os coeficientes angulares das curvas analíticas e de adição de analito

Devido ao sinal do rutênio ter apresentado uma possível interferência (Figura 3.2), os dados com correção do rutênio não serão sendo apresentados.

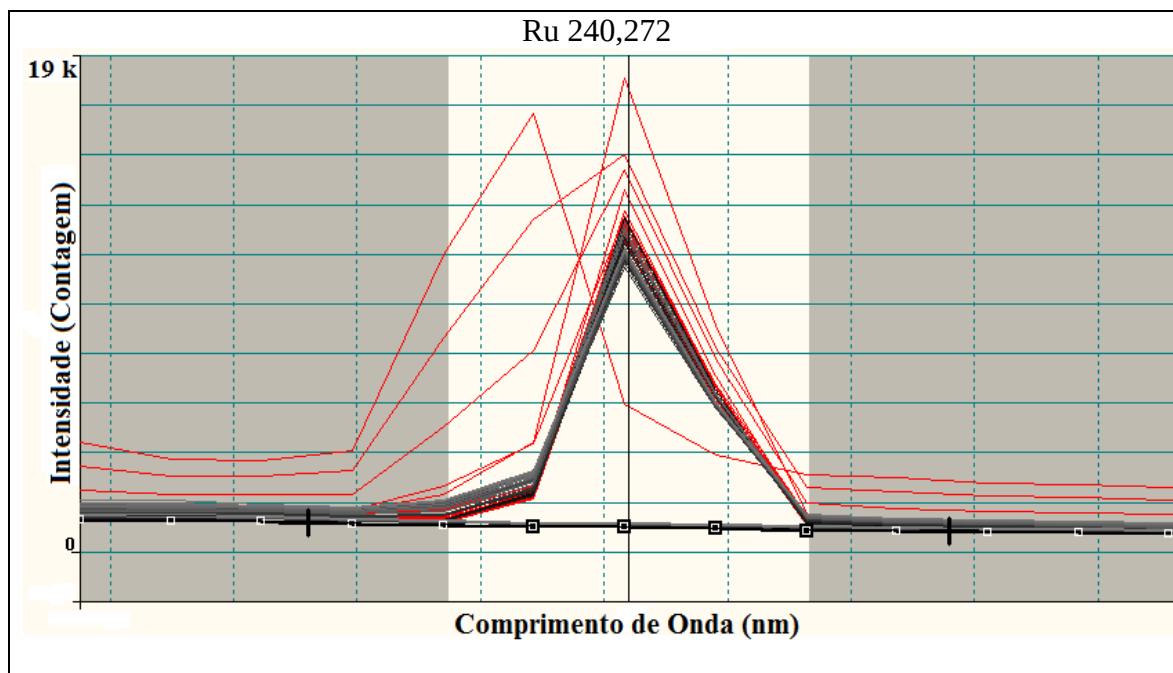


Figura 3.2: Espectros de emissão do rutênio medidas nas soluções das amostras (coloração cinza) e dos padrões (coloração vermelha).

Os erros relativos com relação aos coeficientes angulares obtidos com o método da adição de analito para cada decomposição são mostrados nas Tabelas 3.10, 3.11 e 3.12. Não foi realizada adição de analito de Ca, K, Na e Mg, pois estes elementos se encontram em altas concentrações nas amostras, assim, a diluição seria alta e o efeito de matriz seria minimizado.

Na Tabela 3.10 é mostrado que há um efeito de matriz bastante significativo, pois todos os erros relativos estão acima de 20%. Em geral, observa-se uma pequena diminuição dos erros relativos referentes às diluições 1:2 e 1:5. O elevado efeito de matriz pode estar relacionado com a presença de compostos orgânicos ou interferências não espectroscópicas que ocorrem na etapa de nebulização, transporte e efeitos energéticos do plasma.

Tabela 3.10: Valores do erro relativo (%) para os coeficientes angulares da curva de adição de analito com a curva analítica realizada nas amostras digeridas por microondas.

Elemento/Raia (nm)	Erro relativo (%) com relação ao coeficiente angular da curva analítica		
	Sem Diluir	Diluição 1:2	Diluição 1:5
Al 396,153	41	42	37
As 188,979	45	43	38
B 249,772	44	45	40
Ba 493,408	42	42	38
Be 313,042	45	45	40
Bi 223,061	47	45	40
Cd 228,802	47	47	41
Co 228,616	44	44	39
Cr 267,716	45	44	39
Cu 324,752	35	37	33
Fe 238,204	36	43	40
Li 670,784	42	41	36
Mn 257,610	39	44	40
Mo 202,031	40	40	36
Ni 231,604	45	45	39
Pb 220,353	47	45	39
Se 196,026	51	51	46
Sr 407,771	42	41	38
Ti 334,940	42	42	38
Tl 190,801	46	46	38
V 290,880	41	42	38
Zn 206,200	42	47	42

A decomposição por combustão na mufla sem adição de nitrato de magnésio e óxido de magnésio apresentou os menores erros relativos para a comparação dos coeficientes angulares da curva analítica (Tabela 3.11). Com exceção do Al e do B, os erros relativos referentes à diluição 1:2 são pelo menos duas vezes maiores do que o erro relativo referente à diluição 1:5. Isto ocorreu porque na diluição 1:2, o efeito de matriz é maior, pois o(s) possível(eis) componente(s) causador(es) deste efeito, presente(s) nas matrizes das amostras está(ão) em maior(es) concentração(ões). O alumínio é o único elemento que apresenta o maior erro relativo na diluição 1:5 em comparação com a diluição 1:5.

Tabela 3.11: Valores do erro relativo (%) para os coeficientes angulares da curva de adição de analito com a curva analítica realizada nas amostras digeridas por combustão na mufla sem adição de nitrato de magnésio e óxido de magnésio.

Elemento/ Raia (nm)	Erro relativo (%) com relação ao coeficiente angular da curva padrão	
	Diluição 1:2	Diluição 1:5
Al 396,153	-10	-13
As 188,979	-0,002	-5
B 249,772	-18	-18
Ba 233,527	5	-2
Be 313,042	4	-2
Bi 223,061	11	3
Cd 228,802	8	0,5
Co 228,616	10	2
Cr 267,716	8	1
Cu 327,393	6	0,06
Fe 238,204	9	-0,9
Li 670,784	13	6
Mn 257,610	13	4
Mo 202,031	8	1
Ni 231,604	9	2
Pb 220,353	9	1
Se 196,026	15	4
Sr 407,771	12	6
Ti 334,940	6	-0,3
Tl 190,801	10	2
V 290,880	5	-1
Zn 206,200	-0,6	-0,5

*Os erros relativos menores ou iguais a 10% estão ressaltados em azul.

Também foi observado um grande efeito de matriz nas amostras digeridas por combustão na mufla com adição de nitrato de magnésio e óxido de magnésio (Tabela 3.12).

Tabela 3.12: Valores do erro relativo (%) para os coeficientes angulares da curva de adição de analito com a curva analítica realizada nas amostras digeridas por combustão na mufla com adição de nitrato de magnésio e óxido de magnésio.

Elemento/ Raia (nm)	Erro relativo (%) com relação ao coeficiente angular da curva padrão	
	Diluição 1:2	Diluição 1:5
Al 396,153	6	-1
As 188,979	14	6
B 249,772	14	1
Ba 233,527	25	14
Be 313,042	27	17
Bi 223,061	25	17
Cd 228,802	21	15
Co 228,616	35	24
Cr 267,716	24	14
Cu 327,393	11	6
Fe 238,204	25	20
Li 670,784	13	7
Mn 257,610	27	20
Mo 202,031	23	13
Ni 231,604	34	24
Pb 220,353	33	20
Se 196,026	40	27
Sr 407,771	15	10
Ti 334,940	21	11
Tl 190,801	40	27
V 310,230	17	10
Zn 213,857	26	16

*Os erros relativos menores ou iguais a 10% estão ressaltados em azul.

A decomposição por combustão na mufla foi a mais apropriada para o tipo de amostra analisado, pois apresentou erros relativos menores ou iguais a 10% para quase todos os elementos. Sendo assim, os valores de emissão referentes a esta decomposição foram utilizados no cálculo das concentrações dos elementos em cada amostra.

3.5.3 Características analíticas e concentrações das amostras

A Tabela 3.13 apresenta os coeficientes angulares e os coeficientes de correlação da curva analítica e da estimativa do LQ e do LD. Foram obtidos coeficientes angulares com diferentes ordens de grandezas (de 10^2 até 10^6) para os elementos. Os maiores valores foram obtidos para o Be, Sr, Y e Yb e o menor para o Tl. O coeficiente de correlação atribuído ao Er apresentou um resultado muito aquém do desejado. Os limites de detecção e de quantificação estimados preliminarmente apresentaram valores baixos para a maioria dos elementos, sendo adequados para determinação da composição das amostras analisadas. Entretanto, deve-se ressaltar que estas estimativas são preliminares, é possível que seus valores estejam subestimados.

As concentrações dos elementos foram calculadas através da interpolação dos sinais obtidos na curva analítica sem a correção do padrão interno, com as amostras digeridas por combustão na mufla sem adição de nitrato de magnésio e óxido de magnésio. Só são apresentados, portanto, os resultados obtidos para as amostras digeridas por este procedimento, uma vez que os outros métodos de decomposição apresentaram erros consideráveis. Os sinais referentes à diluição 1:2 foram utilizados para o cálculo da concentração dos elementos presentes em baixa concentração, pois poderia haver perda de informação destes elementos com a diluição 1:5 devido a uma diluição (Tabela 3.14 e Tabela 3.15). O teor dos elementos mais concentrados foi calculado com a diluição 1:5, pois com esta diluição os efeitos de matriz são menores (Tabela 3.16 e Tabela 3.17). Como as amostras não foram preparadas em replicata, o desvio padrão apresentado nas Tabelas 3.14, 3.15, 3.16 e 3.17 é relativo às concentrações calculadas a partir de três réplicas de leitura no espectrofotômetro, em cada amostra.

Os lantanídeos Ce, Dy, Gd, La, Lu, Nd, Pr, Sc, Sm, Tb e Tm bem como o As, Tl, V e o Yb não são apresentados nas Tabelas 3.14 e 3.15 por terem apresentado concentração inferior ao LD_e . Algumas amostras apresentaram concentrações de Er e Ho abaixo do LD_e e outras acima LD_e , mas sempre abaixo do LQ_e . Elementos como Be, Cd, Co, Er, Eu, Ho, La, Pb e Y apresentaram concentrações abaixo de $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ em todas as amostras. O Cr, Li, Mo, Ni e Ti apresentaram concentrações superiores a $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$ e inferiores a 6 mg kg^{-1} . As concentrações do Al, Ba, Sr e Cu variaram entre 3 e 22 mg kg^{-1} . O Fe, Mn e Zn apresentaram concentrações entre 29 e 95 mg kg^{-1} .

Os elementos mais abundantes foram o Ca, K, Na e Mg que variaram entre 491 e 6278 mg kg⁻¹. O Li apresentou concentração abaixo do LQ_e na amostra 7.

Tabela 3.13: Coeficiente angular e coeficiente de correlação da curva analítica sem correção do rutênio e as estimativas dos respectivos limites de quantificação e limites de detecção. Para os maioritários (Ca, K, Mg e Na) considere a faixa linear de 20 a 100 mg L⁻¹ e para o restante dos elementos entre 0 e 2 mg L⁻¹.

Elemento/Raia (nm)	Coeficiente Angular	Coeficiente de correlação	LQ _e (µg kg ⁻¹)*	LD _e (µg kg ⁻¹)*
Al 396,153	106.315	0,99990	66	20
As 188,979	14.111	0,9998	1050	320
Ba 233,527	98.078	0,9998	44	13
Be 313,042	2.970.434	0,9998	20	6
Ca 317,933	12.749	0,9998	1730	520
Cd 228,802	34.093	0,9998	120	40
Co 228,616	21.974	0,99990	15	4
Cr 267,716	66.448	0,9998	90	270
Cu 327,393	183.943	0,99992	71	22
Er 349,910	196.860	0,8	29	9
Eu 381,967	996.405	0,9995	6,6	2,0
Fe 238,204	49.673	0,9997	77	23
Ho 345,600	300.714	0,9993	29	8,8
K 766,490	2.244	0,9995	4650	1400
La 408,672	410.159	0,9992	88	26
Li 670,784	89.709	0,997	260	80
Mg 285,213	51.588	0,9995	270	80
Mn 257,610	327.030	0,9997	17	5,5
Mo 202,031	18.274	0,99993	130	40
Na 589,592	15.245	0,9996	4640	1390
Nd 406,109	120.030	0,9991	140	41
Ni 231,604	20.617	0,99992	120	3,2
Pb 220,353	4.514	0,99995	290	87
Sr 407,771	1.818.995	0,997	5,5	2,2
Ti 334,940	466.739	0,99990	20	6,2
Tl 190,801	962	0,99990	550	160
V 290,880	66.964	0,99991	150	45
Y 371,029	1.013.996	0,9996	4,4	1,3
Yb 328,937	2.052.352	0,9991	4,4	1,3
Zn 206,200	18.648	0,99991	77	23

*LQ_e e LD_e são estimativas preliminares dos limites de quantificação e detecção, respectivamente.

Tabela 3.14: Concentração dos elementos calculados a partir dos sinais não corrigidos com o padrão interno, das amostras digeridas por combustão na mufla sem adição de nitrato de magnésio e óxido de magnésio, e com diluição 1:2 (da amostra 1 até a amostra 4).

Elemento/ Raia (nm)	Concentração (mg kg ⁻¹)			
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
Al 396,153	15,84 ± 0,06	11,04 ± 0,07	19,4 ± 0,3	8,4 ± 0,1
Be 313,042	0,03 ± 0,02	0,04 ± 0,02	<LQ _e	0,04 ± 0,02
Cd 228,802	0,03 ± 0,01	<LD _e	0,04 ± 0,02	<LD _e
Co 228,616	0,14 ± 0,02	<LD _e	0,267 ± 0,006	<LD _e
Cr 267,716	0,86 ± 0,01	5,40 ± 0,01	0,82 ± 0,01	0,62 ± 0,01
Er 349,910	<LQ _e	<LQ _e	<LQ _e	<LQ _e
Eu 381,967	<LD _e	<LQ _e	<LD _e	<LD _e
Ho 345,600	<LD _e	<LQ _e	<LQ _e	<LD _e
Mo 202,031	1,98 ± 0,01	1,641 ± 0,005	0,84 ± 0,01	0,76 ± 0,04
Ni 231,604	0,87 ± 0,01	3,25 ± 0,02	0,74 ± 0,03	0,41 ± 0,03
Ti 334,940	1,800 ± 0,008	1,29 ± 0,01	0,71 ± 0,02	0,647 ± 0,004
Y 371,029	0,012 ± 0,002	<LQ _e	0,008 ± 0,003	0,006 ± 0,003

Tabela 3.15: Concentração dos elementos calculados a partir dos sinais não corrigidos com o padrão interno, das amostras digeridas por combustão na mufla sem adição de nitrato de magnésio e óxido de magnésio, e com diluição 1:2 (da amostra 5 até a amostra 8).

Elemento/ Raia (nm)	Concentração (mg kg ⁻¹)			
	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8
Al 396,153	13,03 ± 0,03	9,9 ± 0,1	6,1 ± 0,1	12,0 ± 0,2
Be 313,042	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,027 ± 0,01	0,03 ± 0,02
Cd 228,802	0,054 ± 0,002	0,077 ± 0,004	0,06 ± 0,01	<LD _e
Co 228,616	<LD _e	0,10 ± 0,02	<LD _e	<LD _e
Cr 267,716	1,47 ± 0,01	2,814 ± 0,003	0,637 ± 0,006	0,48 ± 0,02
Er 349,910	<LQ _e	<LQ _e	<LQ _e	<LQ _e
Eu 381,967	<LD _e	<LD _e	<LD _e	<LD _e
Ho 345,600	<LQ _e	<LQ _e	<LQ _e	<LD _e
Mo 202,031	0,61 ± 0,02	0,63 ± 0,02	0,73 ± 0,02	0,56 ± 0,02
Ni 231,604	1,08 ± 0,04	2,22 ± 0,04	0,97 ± 0,02	0,61 ± 0,02
Ti 334,940	0,78 ± 0,03	0,66 ± 0,02	0,471 ± 0,002	0,45 ± 0,01
Y 371,029	0,007 ± 0,002	0,011 ± 0,003	<LQ _e	0,007 ± 0,002

Tabela 3.16: Concentração dos elementos calculados a partir dos sinais não corrigidos com o padrão interno, das amostras digeridas por combustão na mufla sem adição de nitrato de magnésio e óxido de magnésio, e com diluição 1:5 (da amostra 1 até a amostra 4).

Elemento/ Raia (nm)	Concentração (mg kg ⁻¹)			
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
Ba 233,527	11,2 ± 0,2	3,71 ± 0,02	17,1 ± 0,2	22,2 ± 0,1
Ca 317,933	1.154 ± 11	978 ± 9	1.854 ± 3	506 ± 4
Cu 327,393	9,71 ± 0,03	8,4 ± 0,1	10,42 ± 0,07	5,65 ± 0,03
Fe 238,204	64,8 ± 0,6	68,0 ± 0,4	67,5 ± 0,6	52,9 ± 0,4
K 766,490	6.278 ± 45	5.620 ± 48	3.360 ± 17	2.528 ± 14
Li 670,784	1,70 ± 0,04	1,63 ± 0,05	4,10 ± 0,07	3,69 ± 0,06
Mg 285,213	1.671 ± 14	1.363 ± 12	1.713 ± 5	1.142 ± 8
Mn 257,610	44,6 ± 0,4	19,8 ± 0,1	33,0 ± 0,3	45,1 ± 0,2
Na 589,592	836 ± 7	851 ± 8	2.149 ± 10	2.363 ± 12
Sr 407,771	5,82 ± 0,05	6,32 ± 0,07	14,60 ± 0,06	4,2 ± 0,3
Zn 206,200	48,9 ± 0,3	33,23 ± 0,05	50,14 ± 0,07	33,1 ± 0,3

Tabela 3.17: Concentração dos elementos calculados a partir dos sinais não corrigidos com o padrão interno, das amostras digeridas por combustão na mufla sem adição de nitrato de magnésio e óxido de magnésio, e com diluição 1:5 (da amostra 5 até a amostra 8).

Elemento/ Raia (nm)	Concentração (mg kg ⁻¹)			
	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8
Ba 233,527	7,41 ± 0,04	7,40 ± 0,03	9,31 ± 0,09	8,60 ± 0,02
Ca 317,933	890 ± 9	1.121 ± 15	779 ± 1	491 ± 9
Cu 327,393	9,60 ± 0,05	10,17 ± 0,01	9,83 ± 0,08	9,04 ± 0,08
Fe 238,204	72,0 ± 0,4	65,6 ± 0,4	56,0 ± 0,1	82,2 ± 0,4
K 766,490	4.026 ± 20	3.200 ± 40	4.504 ± 7	4.986 ± 90
Li 670,784	2,0 ± 0,5	3,55 ± 0,05	<LQ _e	0,31 ± 0,04
Mg 285,213	1.699 ± 16	1.708 ± 19	1.626 ± 3	1.718 ± 30
Mn 257,610	50,0 ± 0,3	29,6 ± 0,2	62,5 ± 0,1	98,4 ± 0,3
Na 589,592	1.069 ± 6	1.635 ± 19	1.139 ± 2	662 ± 12
Sr 407,771	5,86 ± 0,04	7,0 ± 0,8	5,28 ± 0,01	4,34 ± 0,08
Zn 206,200	49,7 ± 0,5	37,80 ± 0,02	62,5 ± 0,4	74,4 ± 0,3

As concentrações dos elementos determinados nas amostras 1 a 8 foram comparadas com as reportadas em trabalhos da literatura. Com exceção do Mo, todos os elementos determinados possuem valores comparáveis com os trabalhos avaliados [1,10,16-19].

- Al Concentrações inferiores às dos suplementos e plantas analisadas por Avula e colaboradores [1], comparáveis com os valores encontrados em sementes de sapucaia [10], feijão branco e fava [18];
- Ba Concentrações superiores às registradas em frutas secas [16], amêndoa, avelã, amendoim e noz [19] comparáveis às medidas em semente de girassol e soja [17];
- Ca Quantidades comparáveis ou inferiores aos suplementos e plantas investigadas na referencia [1], superior às medidas em sementes de babaçu [10];
- Cd Comparável com os teores em suplementos alimentares [6], inferiores aos registrados em feijão branco, fava e lentilha [18], superior às medidas em

- amostras de avelã, amêndoa, amendoim e noz oriunda da Espanha [19];
- Co Próximo aos valores de suplementos alimentares e plantas [1], inferiores aos determinados em frutas secas [16];
- Cr Comparáveis com os valores encontrados em avelãs, amêndoas, amendoim e noz [19] exceto para a amostra 2 (Tabela 3.14), que apresentou concentração muito alta; inferior a alguns suplementos reportados em [1];
- Cu Superior aos teores reportados para semente de babaçu e comparável com as sementes de sapucaia [10], comparável aos obtidos em lentilha e inferior a feijão branco, fava, ervilha e grão de bico [18], superior aos registrados em frutas secas [16], comparável a avelãs, amêndoas, amendoim e noz [19];
- Fe Comparável ou inferior aos teores encontrados em suplementos e plantas reportados em [1], comparável a feijão branco, girassol e soja [17,18], inferior a amêndoas oriundas da Itália [19] e fava [18];
- K Comparável aos teores obtidos em semente de babaçu e sapucaia [10], inferior ou comparável aos suplementos reportados em [1];
- Mg Inferior à maior parte dos teores encontrados nos suplementos analisados na referencia [1], inferior às concentrações medidas em sementes de sapucaia e comparável a medida em feijão branco, fava, ervilha e grão de bico [18], e muito superiores aos reportados em frutas secas [16];
- Mn Comparável aos teores encontrados na maior parte dos suplementos analisados na referência [1], girassol, soja, amendoim e noz [17,19], superior a valores reportados em amêndoa, avelã, fava e ervilha [18,19];
- Mo Concentrações superiores às obtidas em sementes de girassol e soja reportados na referencia [17];
- Na Comparável aos teores obtidos em suplementos e na maior parte das plantas analisadas em [1];
- Ni Concentrações comparáveis com as medidas em frutas secas; as amostras 5 e 7 apresentaram valores de Ni comparáveis aos medidos em semente de soja e

girassol [17];

- Sr Inferior aos teores encontrados na maior parte dos suplementos e plantas reportadas na referencia [1], superior à semente de babaçu [10], comparável às determinadas em semente de girassol e soja [17];
- Zn Comparável às concentrações apresentadas na maior parte das análises realizadas em semente de girassol, soja, amêndoas, avelã, amendoim, noz, feijão branco, fava, lentilha, grão de bico e ervilha [1,17-19], superior às determinadas em frutas secas [16].

3.6 Conclusões e perspectivas

Foi observado grande efeito de matriz nas amostras digeridas por microondas, possivelmente devido aos ácidos da digestão, porque as soluções contendo os brancos também apresentaram efeito de matriz. Também não foram obtidos bons resultados com as amostras digeridas por combustão na mufla com adição de nitrato de magnésio e óxido de magnésio.

Os melhores resultados foram obtidos com a decomposição por combustão na mufla. Entretanto, é um método muito demorado. Para as amostras analisadas, com exceção do Mo, todos os elementos determinados apresentaram valores comparáveis com os teores obtidos em trabalhos da literatura.

Após estimar os possíveis efeitos de matriz nos três métodos de decomposição propostos. Podem-se citar algumas propostas para continuação:

- Para obtenção de melhores resultados de decomposição por microondas, sugere-se estudar parâmetros como a quantidade de HNO_3 e H_2O_2 , bem como otimizar o programa do aquecimento do forno de microondas. Outra possibilidade é utilizar o mesmo procedimento descrito nesta tese, porém repetindo sucessivamente o programa do microondas três vezes, para promover uma decomposição mais eficiente;
- Analisar materiais de referência certificados ou realizar testes de recuperação para avaliar a exatidão dos métodos;
- Estimar a precisão dos métodos realizando medidas repetidas em amostras, desde a etapa de decomposição;
- Estimar os valores de LD e LQ do método, realizando 10 medidas repetidas da solução do branco;
- Analisar todas as amostras em triplicata pelo melhor método de decomposição.

Referências

- [1] B. Avula, Yan-Hong Wang, T. J. Smillie, N. S. Duzgoren-Aydin, I. A. Khan, *J Agric Food Chem* 58 (2010) 8887.
- [2] S. C. Hight, D. L. Anderson, W. C. Cunningham, S. G. Capar, W. H. Lamont, S. A. Sinex, *J Food Compos Anal* 6 (1993) 121.
- [3] D. B. Huggett, I. A. Khan, J. C. Allgood, D. S. Block, D. Schlenk, *Bull Environ Contam Toxicol* 66 (2001) 150.
- [4] M. K. Wong, P. Tan, Y. C. Wee, *Biol Trace Elem Res* 36 (1993) 135.
- [5] E. Ernst, *Trends Pharmacol Sci* 23 (2002) 136.
- [6] S. P. Dolan, D. A. Nortrup, M. P. Bolger, S. G. Capar, *J Agric Food Chem* 51 (2003) 1307.
- [7] I. A. Khan, J. Allgood, L. A. Walker, E. A. Abourashed, D. Schlenk, W. H. Benson, *J AOAC Int* 84 (2001) 936.
- [8] L. García-Rico, J. Leyla-perez, M. E. Jará-Marini, *Food and Chem Toxicol* 45 (2007) 1599.
- [9] D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª edição, Bookman, Porto Alegre (2002).
- [10] J. Naozuka, E. C. Vieira, A. N. Nascimento, P. V. Oliveira, *Food Chem* 124 (2011) 1667.
- [11] A. Lante, G. Lomolino, M. Cagnin, P. Spettoli, *Food Control* 17 (2006) 229.
- [12] A. Simsek, D. Korkmaz, Y. S. Velioglu, O. Y. Ataman, *Food Chem* 83 (2003) 293.
- [13] A. Krejcová, T. Cernohorský, D. Meixner, *Food Chem* 105 (2007) 242.
- [14] C. A. Bizzi, J. S. Barin, E. E. Garcia, J. A. Nóbrega, V. L. Dressler, E. M. M. *Spectrochim Acta, Part B* 66 (2011) 394.
- [15] D. Bakircioglu, Y. B. Kurtulus, G. Ucar, *Food and Chem Toxicol* 49 (2011)

202.

- [16] H. Altundag, M. Tuzen, *Food and Chem Toxicol* 49 (2011) 2800.
- [17] E. S. Chaves, E. J. Santos, R. G. O. Araujo, J. V. Oliveira, V. L. A. Frescura, A. J. Curtius, *Microchem Journal* 96 (2010) 71.
- [18] A. A. Momen, G. A. Zachariadis, A. N. Anthemidis, J. A. Stratis, *Analytica Chimica Acta* 565 (2006) 81.
- [19] A. A. Momen, G. A. Zachariadis, A. N. Anthemidis, J. A. Stratis, *Talanta* 71 (2007) 443.
- [20] F. J. Krug, *Métodos de Preparo de Amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar*, 1º Edição, Editado por Francisco José Krug, Piracicaba (2008).
- [21] Brasil, Informe Técnico n. 46, 20 maio 2011, Esclarecimentos sobre produtos comercializados com a denominação “RAÇÃO HUMANA”.
- [22] Brasil, Decreto-Lei nº. 986, de 21 de outubro de 1969. Institui normas básicas sobre alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 21 outubro 1969, Seção 1.
- [23] Brasil, Resolução RDC nº. 259, de 20 de setembro de 2002. Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 setembro 2002.
- [24] Brasil, SVS/MS nº 30, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico referente a Alimentos para Controle de Peso. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 janeiro 1998.
- [25] K. S. Suslick, Y. Didenko, M. M. Fang, T. Hyeon, K. J. Kolbeck, W. B. Mcnamara, M. M. Mdleleni, M. Wong, *Acoustic Cavitation and its chemical consequences. Philosophical transactions of the Royal Society of London, Series A - Mathematical Physical and Engineering Sciences*, v. 357, n. 1751, Londres, (1999) p. 335-353.
- [26] J. R. Blake, *Acoustic cavitation and sonoluminescence*, Philosophical

- transaction of the Royal Society of London, v.357, Londres (1999) p. 199-369.
- [27] R. A. de Sousa, Tese de Doutorado, *Determinação por ICP OES de espécies metálicas em adoçantes dietéticos*, Campinas-SP (2007).
- [28] T. B. Matias, Tese de Doutorado, *Análise química de Materiais Cerâmicos: Digestão por fusão e medidas por ICP OES com configuração axial*, São Carlos-SP (2007).
- [29] Z. Benzo, M. N. Matos-Reyes, M. L. Cervera, M. de la Guardia, *J Braz Chem Soc* 22, 9 (2011) 1782.
- [30] M. N. Matos-Reyes, M. L. Cervera, R. C. Campos, M. de la Guardia, *Food Chem* 122 (2010) 188.
- [31] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, tradução da 8ª edição Norte-americana, tradução M. Grassi, revisão C. Pasquini, *Fundamentos de Química Analítica*, Cengage Learning, São Paulo (2008).

Anexo: Publicações decorrentes do trabalho

- [1] F. S. L. Borba, J. Cortez, V. K. Asfora, C. Pasquini, M. F. Pimentel, A. Pessis, H. Khoury, Multivariate treatment of LIBS data of prehistoric paintings, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23 (2012) 958-965.
- [2] C. S. Silva, F. S. L. Borba, M F. Pimentel, M. J. C. Pontes, R. S. Honorato; C. Pasquini Classification of blue pen ink using infrared spectroscopy and linear discriminant analysis, *Microchemical Journal*, 109 (2013) 122-127.