



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

**“DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS USANDO
ESPECTROMETRIA DE RAIOS X E QUIMIOMETRIA”**

GISELE GONÇALVES BORTOLETO

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Izabel Maretti Silveira Bueno

TESE DE DOUTORADO

Campinas – SP

Maiο de 2007

*Dedico esta tese ao meu noivo Guilherme,
aos meus pais Gumercindo e Lourdes
e ao meu irmão Pablo ...
Pessoas que tanto amo!*

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Maria Izabel Maretti Silveira Bueno pela orientação e amizade que proporcionaram um grande crescimento pessoal e profissional.

Aos professores da Unicamp pelas contribuições que, direta ou indiretamente, enriqueceram meu trabalho.

A Profa. Dra. Nelci F. Höehr por intermediar com confiança meu acesso ao laboratório de análises clínicas da Unicamp.

Ao pessoal do HC-UNICAMP pelas facilidades.

As pessoas que gentilmente cederam amostras de urina para realização desse trabalho.

As pessoas que colaboraram com amostras de óleos e azeites.

Aos colegas de trabalho e amigos: Greice, Larissa, Karen, Sandrinha, Thaís, Simone, Alexandre, André, Guto, Luiz, Rafaele, Fabíola e, em especial, ao Rafael pelo auxílio com o ICP OES.

Aos funcionários do IQ (BIQ, CPG, Xerox, Desenho, Vidraria, Segurança e Limpeza) pela prestação de serviços com eficiência.

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida e todo apoio financeiro.

CURRICULUM VITAE

DADOS PESSOAIS

Nome: Gisele Gonçalves Bortoleto
Nascimento: 28/02/1978 - Piracicaba/SP - Brasil
CPF: 27765943804

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

- 2003 - 2007 Doutorado em Química.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil.
Título: Desenvolvimento de métodos analíticos usando espectrometria de raios X e quimiometria.
Orientador: Maria Izabel Maretti Silveira Bueno
Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2001 - 2003 Mestrado em Química.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil.
Título: Pré-concentração e determinação em linha de arsênio inorgânico em águas usando espectrometria de absorção atômica com geração de hidreto.
Ano de obtenção: 2003
Orientador: Solange Cadore
Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- Licenciatura em Química.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
- 1997 - 2001 Bacharelado em Química.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil.
Bolsista do Serviço de Apoio ao Estudante

PRODUÇÃO EM C, T & A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. BORTOLETO, G. G., BORGES, S. S. O., BUENO, M. I. M. S.
X-ray scattering and multivariate analysis for classification of organic samples: a comparative study using Rh tube and synchrotron radiation. *Analytica Chimica Acta*. v.595, p.38 - 42, 2007.
2. XAVIER, A. M., LIMA, A. G., VIGNA, C. R. M., VERBI, F. M., BORTOLETO, G. G., GORAIEB, K., COLLINS, C. H., BUENO, M. I. M. S.
Marcos da história da radioatividade e tendências atuais. *Química Nova*. v.30, p.83 - 91, 2007.
3. MACAROVSKA, G. T., BORTOLETO, G. G., CADORE, S.
Silica modified with zirconium oxide for on-line determination of inorganic arsenic using a hydride generation-atomic absorption system. *Talanta (Oxford)*. v.71, p.1150 - 1154, 2007.
4. BORTOLETO, G. G., PATACA, L. C. M., BUENO, M. I. M. S.
A new application of X-ray scattering using principal component analysis - classification of vegetable oils. *Analytica Chimica Acta*. v.539, p.283 - 287, 2005.

5. BORTOLETO, G. G., PATACA, L. C. M., BUENO, M. I. M. S.
Determinação de arsênio em águas contaminadas usando fluorescência de raios X por dispersão de energia. Química Nova. v.28, p.579 - 582, 2005.
6. BORTOLETO, G. G., CADORE, S.
Determination of total inorganic arsenic in water using on-line pre-concentration and hydride-generation atomic absorption spectrometry. Talanta. v.67, p.169 - 174, 2005.
7. TREVISAN, M. G., POPPI, R. J., PATACA, L. C. M., MARCUCCI, M. C., LIMA, A. G., BUENO, M. I. M. S., BORTOLETO, G. G., ASHIDANI, L.
Semi-quantitative analysis of propolis and determination of geographical origin using SXRF, fundamental parameters and PLS-DA. Activity Report (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron), 2005.
8. BORGES, S. S. O., MORAES, S. G., LIMA, A. G., HEMERLY, F. P., GORAIEB, K., BUENO, M. I. M. S., BORTOLETO, G. G., ALEXANDRE, T. L.
X-ray scattering and multivariate analysis - a new technique for classification of organics. Activity Report (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron), 2005.
9. BORTOLETO, G. G., MACAROVSCHA, G. T., CADORE, S.
Determination of cadmium by flame-atomic absorption spectrometry after preconcentration on silica gel modified with cupferron. Journal of the Brazilian Chemical Society. v.15, p.313 - 317, 2004.

Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (resumo)

43 trabalhos apresentados em reuniões científicas.

Produção Técnica

Processos ou técnicas com registro ou patente

1. BORTOLETO, G. G., PATACA, L. C. M., BUENO, M. I. M. S.
Espalhamento de Raios X e Quimiometria para Classificação de Óleos Vegetais, Minerais e/ou Sintéticos, 2005.

Patente: Privilégio de Inovação n.PI0500177-3, Espalhamento de raios X e quimiometria. 21 de Janeiro de 2005 (Depósito).

RESUMO

Esta tese de doutorado apresenta uma inovação na química analítica abordando novas aplicações da técnica de fluorescência de raios-X, na qual o espalhamento da radiação X e a quimiometria exercem papel fundamental.

Os sinais de espalhamento dos raios X provenientes da interação de diferentes fontes de excitação com amostras essencialmente orgânicas foram avaliados a partir de estudos realizados com um espectrômetro de bancada com tubo de Rh, como também com luz síncrotron, da linha de fluorescência de raios-X do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, SP, Brasil. Os resultados mostraram diferentes perfis de espalhamento da radiação para as diferentes fontes de excitação empregadas. Uma banda contínua em toda região espectral foi obtida como sinal, no caso do uso da luz síncrotron, e intensos picos em determinadas regiões espectrais caracterizaram os espalhamentos Compton e Rayleigh, quando o tubo de Rh foi utilizado. A alta intensidade da luz síncrotron resolveu os problemas de precisão intermediária observados nas medidas das amostras de álcoois realizadas com tubo de Rh.

Em outro estudo, no qual os espectros de XRF de amostras de adoçantes dietéticos e óleos vegetais foram analisados por PCA, os resultados revelaram agrupamentos entre compostos com composições químicas ligeiramente distintas. Nesse caso, o uso do tubo de Rh foi adequado para atingir os objetivos propostos. Nas análises de óleos, a formação dos diversos grupos foi baseada nas variedades de óleos de soja, canola, girassol e milho. Nos testes realizados com adoçantes, os resultados mostraram uma tendência de diferenciação entre as amostras compostas por diferentes edulcorantes, principalmente entre aqueles que contêm ou que não contêm o átomo de enxofre em suas moléculas.

O estudo realizado com amostra de urina conclui este trabalho, ressaltando mais uma vantagem do uso da XRF aliada a quimiometria: a possibilidade de realizar quantificações diretas e simultâneas de elementos inorgânicos e compostos orgânicos em amostras líquidas complexas. Nesse caso, um método para determinação de Ca, P, Na, K, Mg, Cl, uréia, glicose e creatinina em amostra de urina é apresentado, no qual os coeficientes de regressão da ordem de 0,99, obtidos para os modelos de calibração dos

diferentes analitos, mostram a potencialidade da técnica para ser implementada em laboratórios de rotina.

ABSTRACT

This work presents an innovation in analytical chemistry dealing with new applications of X-ray fluorescence technique in which the X-ray scattering effects and the chemometric tools play essential roles.

X-ray scattering spectra resulting from interaction of simple organic samples were obtained with two sources, a common bench top spectrometer equipped with a Rh tube and also with synchrotron radiation (from the XRF beam line of the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, SP, Brazil). Distinct scattering profiles are observed for both excitation sources: a *continuum* for synchrotron light and intense peaks related to Compton and Rayleigh effects when a Rh tube is used. After processing the spectra from both sources, it was observed that the high intensity of synchrotron radiation solved the intermediate precision problems found in measuring samples *via* Rh tube.

In another study, the spectra of sweeteners and vegetable oils were analysed by XRF with PCA and the results showed distinct groupings for distinct samples. In this case, the Rh source was adequate to reach the objectives. In oil analyses, different groupings are based on the varieties of soybean, corn, canola and sunflower oils. In the case of sweeteners, the results show a tendency to differentiate samples of dissimilar artificial sweeteners, especially when the presence of sulfur is of major importance.

A study performed with urine samples is the final part of this work, pointing out one more advantage of using X-ray fluorescence with chemometrics, that is, the possibility of simultaneous and direct quantifications of inorganic elements and organic compounds in complex liquid samples. In this case a method for determining Ca, P, Na, K, Mg, Cl, urea, glucose and creatinine is presented with good regression coefficients being obtained for the different analytes. This can be taken as a good indication of the potential of the technique for implementation in routine laboratories.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE FIGURAS	xxi
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	1
I.1 INTRODUÇÃO	3
CAPÍTULO II – OBJETIVOS	5
II.1 OBJETIVOS GERAIS	7
CAPÍTULO III – ESPECTROMETRIA DE RAIOS X	9
III. 1 A DESCOBERTA DOS RAIOS X	11
III. 2 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X (XRF)	11
III. 2.1 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR COMPRIMENTO DE ONDA DISPERSIVO (WDXRF)	13
III. 2.2 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR DISPERSÃO DE ENERGIA (EDXRF)	14
III. 2.3 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X COM REFLEXÃO TOTAL (TXRF) ..	16
III. 2.4 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X COM FONTE DE LUZ SÍNCROTRON (SEXRF)	17
III. 2.5 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X INDUZIDA POR PARTÍCULA (PIXE)	18
III. 3 ESPALHAMENTO DE RAIOS X	18
III. 4 MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS E A ESPECTROMETRIA DE RAIOS X	26
III. 4.1 ANÁLISE EXPLORATÓRIA	27
III. 4.2 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA	28
CAPÍTULO IV – ESTUDO DO ESPALHAMENTO DE RAIOS X	31
IV. 1 ESTUDO DO ESPALHAMENTO DE RAIOS X	33
IV. 2 PARTE EXPERIMENTAL	34
IV. 3 ANÁLISE DE GRAFITE, NANOTUBOS DE CARBONO, COQUE E CARVÃO ATIVADO	35

IV. 4 ANÁLISE DE ÁLCOOIS	39
CAPÍTULO V – ANÁLISE DE ADOÇANTES DIETÉTICOS	47
V. 1 ANÁLISE DE ADOÇANTES DIETÉTICOS	49
V. 2 PARTE EXPERIMENTAL	50
V. 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
CAPÍTULO VI – ANÁLISE DE ÓLEOS VEGETAIS.....	57
VI. 1 ANÁLISE DE ÓLEOS VEGETAIS	59
VI. 2 PARTE EXPERIMENTAL	60
VI. 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
CAPÍTULO VII – ANÁLISE DE URINA.....	67
VII. 1 ANÁLISE DE URINA	69
VII. 2 PARTE EXPERIMENTAL	70
VII. 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
CAPÍTULO VIII – CONCLUSÕES.....	85
VIII. 1 CONCLUSÕES.....	87
CAPÍTULO IX – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
IX. 1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS

- EDXRF** – Fluorescência de Raios X por Dispersão em Energia
- ET-AAS** – Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica
- FSA** – Agência de Padrões de Alimentos
- FT - IR** – Espectrometria no Infravermelho com Transformada de *Fourier*
- GERX** – Grupo de Espectrometria de Raios X
- HCA** – Análise Hierárquica de Agrupamento
- HC-UNICAMP** – Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas
- ICP-MS** – Espectrometria de Massas com Fonte de Plasma por Acoplamento Indutivo
- ICP OES** – Espectrometria de Emissão Óptica com Fonte de Plasma por Acoplamento Indutivo
- INMETRO** – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
- IOOC** – Conselho Internacional do Azeite
- KNN** – Regra dos K-Vizinhos mais Próximos
- LNLS** – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
- MS** – Espectrometria de Massas
- NIR** – Espectrometria no Infravermelho Próximo
- PC** – Componente Principal
- PCA** – Análise de Componentes Principais
- PCR** – Regressão de Componentes Principais
- PIXE** – Fluorescência de Raios X Induzida por Partículas
- PLS** – Regressão por Quadrados Mínimos Parciais
- RDA** – Análise Discriminante Regularizada
- SIMCA** – Modelos Independentes e Similaridades utilizando Componentes Principais
- SRXRF** – Fluorescência de Raios X com Luz Síncrotron
- SR TXRF** – Fluorescência de Raios X com Reflexão Total induzido por Luz Síncrotron
- TXRF** – Fluorescência de Raios X com Reflexão Total
- WDXRF** – Fluorescência de Raios X por Dispersão em Comprimento de Onda
- XAS** – Espectrometria de Absorção de Raios X
- XRF** – Fluorescência de Raios X

LISTA DE TABELAS

Tabela VII.3 Valores previstos pelos modelos de calibração construídos com dados do EDXRF para os diferentes analitos e valores de referência (obtidos por ICP OES para os elementos químicos e por métodos padrão do HC-UNICAMP para os compostos orgânicos).....	83
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura III.2 Representação do efeito fotoelétrico.....	12
Figura III.3.1 Representação dos fenômenos Compton e Rayleigh.....	19
Figura III.3.2 Espectros da grafite contendo o pico Rayleigh e as bandas Compton e Raman, onde λ_0 nas figuras representam a posição do pico Rayleigh, λ_C a posição da banda Compton e λ_R a posição da pequena banda do efeito Raman (Suzuki et al., 1970)	21
Figura III.3.3 Espectros de diferentes amostras contendo o pico Rayleigh e as bandas Compton e Raman, onde λ_0 nas figuras representam a posição do pico Rayleigh, λ_C a posição da banda Compton e λ_R a posição da pequena banda do efeito Raman (Suzuki et al., 1970)	23
Figura III.3.4 Espectros de espalhamento Raman e de absorção de raios X para amostras puras de lítio e berílio (Suzuki et al., 1970)	24
Figura III.3.5 Representação da ocorrência do fenômeno Raman de raios X (Tohji & Udagawa, 1989)	24
Figura IV.1 Espectro de uma amostra de sílica pura.....	33
Figura IV.3.1 Espectros das amostras de matriz de carbono a) Espectros obtidos no EDXRF com tubo de Rh b) Espectros obtidos no LNLS com luz síncrotron.....	36
Figura IV.3.2 Gráficos de <i>scores</i> das amostras a base de carbono, após processar PCA a) Amostras analisadas no EDXRF com tubo de Rh b) Amostras analisadas no LNLS com radiação síncrotron.....	38
Figura IV.4.1 Espectros das amostras dos diferentes álcoois a) Amostras analisadas por EDXRF com tubo de Rh b) Amostras analisadas por EDXRF com radiação síncrotron.....	40
Figura IV.4.2 Gráficos de <i>scores</i> das amostras de álcoois, obtidos após processar PCA a) Amostras analisadas por EDXRF com tubo de Rh b) Amostras analisadas por EDXRF com radiação síncrotron.....	41
Figura IV.4.3 Modelo de regressão construído empregando-se o método PLS.....	42
Figura IV.4.4 Espectros contendo o pico Rayleigh e as bandas Compton e Raman, onde λ_0 nas figuras representam a posição do pico Rayleigh, λ_C a posição da banda Compton e λ_R a posição da pequena banda do efeito Raman (Suzuki et al., 1970)	44
Figura V.1 Estruturas moleculares dos diferentes edulcorantes presentes nos adoçantes analisados.....	50
Figura V.3.1 Espectro de amostra de adoçante irradiada com 15 kV de voltagem aplicada ao tubo de Rh.....	51

Figura V.3.2 Espectro de uma amostra de adoçante irradiada com 50 kV de voltagem aplicada ao tubo de Rh.....	52
Figura V.3.3 Resultados de PCA das amostras de adoçantes dietéticos irradiadas com 15 kV de voltagem aplicada ao tubo de Rh a) Gráficos de <i>scores</i> das amostras de adoçantes. b) Gráficos de <i>loadings</i> das amostras de adoçantes.....	53
Figura V.3.4 Resultados de PCA das amostras de adoçantes dietéticos irradiadas com 50 kV de voltagem aplicada ao tubo de Rh a) Gráficos de <i>scores</i> das amostras de adoçantes. b) Gráficos de <i>loadings</i> das amostras de adoçantes.....	54
Figura VI.3.1 Resultados obtidos para as amostras de óleos vegetais, após processar PCA utilizando <i>Pirouette 2.02</i> . a) Gráfico de <i>scores</i> das amostras de óleos. b) Gráfico de <i>loadings</i> das amostras de óleos.....	62
Figura VI.3.2 Gráfico de <i>scores</i> das amostras de azeites obtido após processar PCA.....	63
Figura VI.3.3 Gráfico de <i>scores</i> das amostras de óleos de oliva autênticas e adulteradas, após processar PCA	64
Figura VII.3.1 Superfície de resposta obtida para o elemento Ca.....	73
Figura VII.3.2 Superfície de resposta obtida para o elemento P.....	74
Figura VII.3.3 Superfície de resposta obtida para o elemento Mg.....	74
Figura VII.3.4 Superfície de resposta obtida para o elemento Cl.....	75
Figura VII.3.5 Superfície de resposta obtida para o elemento Na.....	76
Figura VII.3.6 Superfície de resposta obtida para o elemento K.....	76
Figura VII.3.7 Curvas de calibração e validação obtidas por PLS para o Ca com 3 variáveis latentes, usando-se espectros de EDXRF convencional (valores previstos pelo modelo) e dados de ICP OES (valores de referência).....	77
Figura VII.3.8 Curvas de calibração e validação obtidas por PLS para o P com 3 variáveis latentes, usando-se espectros de EDXRF convencional (valores previstos pelo modelo) e dados de ICP OES (valores de referência)	78
Figura VII.3.9 Curvas de calibração e validação obtidas por PLS para o Na com 2 variáveis latentes, usando-se espectros de EDXRF convencional (valores previstos pelo modelo) e dados de ICP OES (valores de referência).....	78
Figura VII.3.10 Curvas de calibração e validação obtidas por PLS para o K, usando-se espectros de EDXRF convencional (valores previstos pelo modelo) e dados de ICP OES (valores de referência).....	79
Figura VII.3.11 Curvas de calibração e validação obtidas por PLS para o Mg com 5 variáveis latentes, usando-se espectros de EDXRF convencional (valores previstos pelo modelo) e dados de ICP OES (valores de referência).....	79

Figura VII.3.12 Curvas de calibração e validação obtidas por PLS para o Cl com 2 variáveis latentes, usando-se espectros de EDXRF convencional (valores previstos pelo modelo) e dados de ICP OES (valores de referência).....80

Figura VII.3.13 Curvas de calibração e validação da uréia, obtidas por PLS com 4 variáveis latentes, usando-se espectros de EDXRF convencional (valores previstos pelo modelo) e dados do HC-UNICAMP (valores de referência)81

Figura VII.3.14 Curvas de calibração e validação da glicose, obtidas por PLS com 4 variáveis latentes, usando-se espectros de EDXRF convencional (valores previstos pelo modelo) e dados do HC-UNICAMP (valores de referência)81

Figura VII.3.15 Curvas de calibração e validação da creatinina, obtidas por PLS com 4 variáveis latentes, usando-se espectros de EDXRF convencional (valores previstos pelo modelo) e dados do HC-UNICAMP (valores de referência)82

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

I. 1 INTRODUÇÃO

A Química Analítica é a área responsável pelo desenvolvimento de novas metodologias de análise, aplicáveis aos mais variados campos da pesquisa científica e em laboratórios de rotina. A contínua procura por métodos cada vez mais seletivos, versáteis, econômicos, robustos, etc., é que mantém o desenvolvimento desta área, o que acaba contribuindo significativamente para o progresso de outras.

Uma das grandes sub-áreas da Química Analítica é a Espectrometria, dentro da qual, nesse trabalho, destaca-se a técnica de fluorescência de raios X (XRF, do inglês, *X-ray Fluorescence*). A XRF nasceu por volta de 1912, quando o físico inglês Henry Moseley estabeleceu uma relação matemática entre as energias dos raios X e os números atômicos dos elementos químicos (Jenkis, 1999).

Pode-se dizer que a XRF hoje está bem disseminada na comunidade científica, por sua habilidade em determinar elementos químicos, geralmente de forma rápida, sem destruir a matriz, com baixo custo operacional e mínimo, ou mesmo nenhum, preparo da amostra. Está pronta a solucionar certos problemas químicos, além das inúmeras aplicações em outras áreas da ciência como medicina, geologia, biologia, arqueologia, entre outras (Börjesson et al, 2003; Potts et al, 2003)

O fenômeno que fundamenta as medidas por XRF é o efeito fotoelétrico. Porém, além deste, efeitos de espalhamento do feixe incidente, conhecidos como espalhamentos Rayleigh, Compton e Raman de raios X, ocorrem simultaneamente, embora sejam pouco utilizados pelos pesquisadores em medidas analíticas.

Considerando-se a importância dos estudos científicos voltados para o aprimoramento das técnicas analíticas e visando avanços, especialmente dentro da espectrometria de raios X, desenvolveu-se neste trabalho uma alternativa para análises envolvendo a fluorescência de raios X, mas enfocando principalmente o uso do espalhamento da radiação X e a análise multivariada de dados químicos, área conhecida como quimiometria.

CAPÍTULO II - OBJETIVOS

II. 1 OBJETIVOS GERAIS

O principal objetivo deste trabalho é apresentar uma nova aplicação da técnica de espectrometria de raios X, baseada nos sinais analíticos gerados tanto pelo efeito fotoelétrico, como pelos efeitos dos espalhamentos Compton, Rayleigh e, principalmente, Raman de raios X. A partir disso, outros objetivos fazem parte do trabalho:

- ✓ Estudar o espalhamento de raios X, avaliando a posição e a intensidade dos picos ou bandas de espalhamento provenientes de diferentes amostras contendo essencialmente elementos leves.
- ✓ Avaliar o perfil espectral do espalhamento de raios X provenientes de diferentes fontes de excitação, comparando as informações obtidas dos diferentes sinais.
- ✓ Conduzir estudos que comprovem que a região do espalhamento da radiação traz informações qualitativas e quantitativas a respeito das amostras.
- ✓ Empregar a quimiometria no tratamento dos espectros obtidos, utilizando análise de componentes principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*) para a análise exploratória não supervisionada dos dados e o método de regressão PLS (do inglês, *Partial Least Squares*), para a construção de modelos de calibração multivariada.
- ✓ Desenvolver métodos analíticos que, aprimorados em estudos futuros, possam ser implementados na prática, segundo as necessidades de laboratórios de rotina.

CAPÍTULO III - ESPECTROMETRIA DE RAIOS X

III. 1 A DESCOBERTA DOS RAIOS X

Na noite de 08 de novembro de 1895, o físico alemão Wilhelm Conrad Röntgen trabalhava numa sala totalmente escura, utilizando um tubo de *Coolidge* com o qual estudava a condutividade dos gases. A certa distância do tubo, havia uma folha de papel tratada com platinocianeto de bário usada como tela. Röntgen viu com espanto a tela brilhar, emitindo luz. Ele achou que esta luz não poderia ser proveniente da válvula, pois estava coberta por uma cartolina negra e nada (luz ou raio catódico) poderia ter vindo dela. Surpreso, fez várias investigações. Virou a tela, expondo o lado sem o revestimento de platinocianeto de bário, e esta continuava a brilhar. Colocou diversos objetos entre a válvula e a tela e viu que todos pareciam transparentes, mas não demorou a ter uma surpresa maior quando sua mão escorregou em frente à válvula e viu seus ossos na tela. Registrou em chapas fotográficas suas observações e só então teve certeza de que estava diante de algo novo. Em 28 de dezembro de 1895, Röntgen entregou à Sociedade Físico-Médica de Wurzburg, Alemanha, um relatório preliminar de sua descoberta, descrevendo as pesquisas que fizera nas sete semanas anteriores: os objetos tornavam-se transparentes diante dos novos raios que, por serem desconhecidos, chamou-os de raios X. Em 1901, Röntgen foi laureado com o primeiro Prêmio Nobel da Física e, posteriormente, o seu nome foi dado ao elemento 111 (IUPAC, 2004). Na Primeira Guerra Mundial, pode-se dizer que os benefícios dos raios X salvaram mais de 10 mil vidas. A partir de 1950, técnicas baseadas em raios X se tornaram ferramentas importantes dentro da física teórica e desde então, seu uso vem crescendo em diversas áreas, como a de caracterização de materiais, por exemplo. Hoje, os métodos baseados em absorciometria de raios-X são essenciais para as indústrias e radiografias médicas (Jenkins, 1999).

III. 2 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X (XRF)

A técnica de fluorescência de raios X nasceu por volta de 1912, com um trabalho apresentado por Henry Moseley embora, somente a partir de 1948, a técnica ganhou força com um trabalho apresentado por Freidman & Birks (Jenkins, 1999).

A XRF é classificada como uma técnica de emissão atômica, fundamentada no efeito fotoelétrico. Quando um átomo é submetido a um processo de irradiação utilizando-se de uma fonte de raios X (tubos de raios X, indução por partícula, radioisótopos naturais, luz síncrotron, etc.), um elétron pode ser ejetado das camadas eletrônicas mais internas do átomo. Para estabilização deste estado de excitação, elétrons das camadas eletrônicas mais externas ocupam rapidamente as vacâncias geradas, liberando a diferença de energia existente entre os dois níveis de energia; a radiação emitida para cada transição é característica para cada elemento presente na amostra. O fenômeno está representado na Figura III.2. Desta maneira, a energia ou comprimento de onda da radiação emitida pode ser diretamente utilizada na determinação qualitativa de um elemento, assim como a intensidade da radiação emitida pode ser empregada na quantificação de tal espécie (Jenkins, 1999; Skoog et al., 2002).

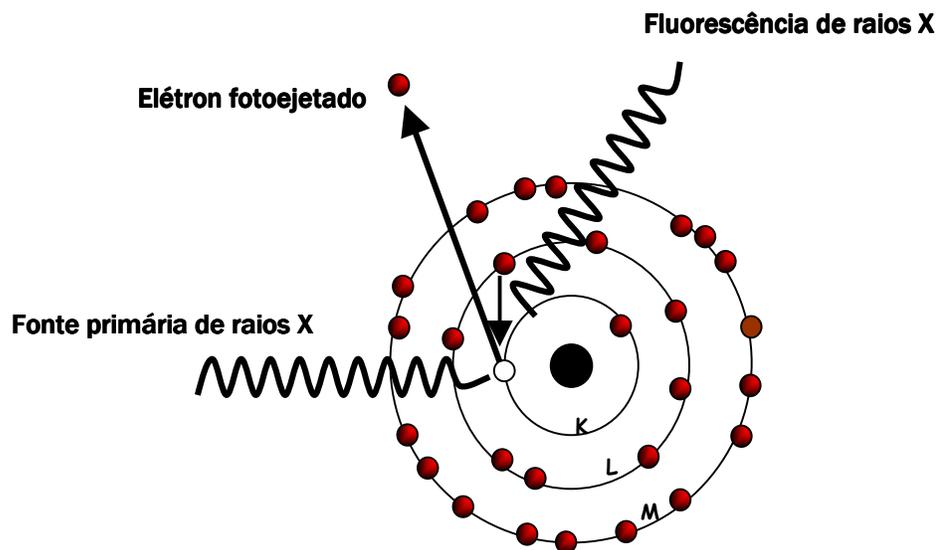


Figura III.2 Representação do efeito fotoelétrico.

A partir de 1950, começaram a surgir os primeiros espectrômetros de fluorescência de raios X comerciais, de forma que hoje a técnica apresenta uma ampla variedade de equipamentos que se diferenciam pelo modo de excitação ou pela configuração (geometria), sendo basicamente divididos em 3 categorias:

1 – Por dispersão em comprimento de onda (seqüencial ou simultâneo), sigla em inglês, WDXRF (*Wavelength Dispersive X-ray Spectrometry*).

2 – Por dispersão em energia (com diferentes modos de excitação), sigla em inglês, EDXRF (*Energy Dispersive X-ray Spectrometry*).

3 – Os especiais, que apresentam configurações que merecem ser destacadas:

3.1 – Reflexão Total, sigla em inglês, TXRF (*Total Reflection X-ray Spectrometry*).

3.2 – Com Fonte de Luz Síncrotron, sigla em inglês, SRXRF (*Synchrotron Radiation X-ray Spectrometry*).

3.3 – Indução por Partículas, sigla em inglês, PIXE (*Particle Induced X-ray Emission*).

Equipamentos portáteis de XRF, que utilizam radioisótopos ou tubos de raios X como fonte de excitação, também já são bastante empregados em análises de rotina, sendo que as principais aplicações estão voltadas para análises de obras de arte (Calligaro, 2002; Pappalardo et al., 2006). Na ciência, seu grande potencial é focado para análises *in vivo* (Aro et al., 2000; Börjesson et al., 2003).

III. 2.1 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR COMPRIMENTO DE ONDA DISPERSIVO (WDXRF)

Os espectrômetros de comprimento de onda dispersivo (WDXRF, do inglês, *Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence*) são constituídos essencialmente por um cristal e um detector monocanal que são usados para a medida seqüencial de vários comprimentos de onda, ou por um detector multicanal que apresenta um conjunto de cristais e detectores para realização de medidas simultâneas. Nos espectrômetros convencionais, um cristal de espaço interplanar conhecido (cristal analisador), que é movimentado por um goniômetro, atua como uma rede de difração. Ele dispersa o feixe policromático proveniente da emissão da amostra, difratando cada comprimento de onda característico a um ângulo específico. Ou seja, quanto maior o comprimento de onda, maior o ângulo de dispersão, segundo a lei de Bragg (Skoog et al., 2002).

Uma das grandes vantagens associadas à utilização de instrumentos de WDXRF está no fato das análises serem obtidas quase sem interferências espectrais, devido à

alta resolução proporcionada pelo sistema cristal/goniômetro. Isso permite uma seleção de comprimentos de onda com máxima eficiência na linha de interesse ou eficiência mínima nas linhas interferentes. Além disso, existem filtros que possibilitam eliminar as interferências entre as linhas características da fonte e o sinal de emissão do elemento de interesse, bem como a escolha correta do cristal analisador, que permite separar e selecionar uma região específica e muito estreita do espectro de emissão de raios X.

Recentemente, Barilaro et al. (2006) empregaram a técnica em análises arqueológicas para caracterização de fragmentos obtidos de escavação no sul da Itália. A escolha da WDXRF e da FT-IR (do inglês, *Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*) pelos autores foi baseada na possibilidade de realizar análises não destrutivas das amostras consideradas preciosas, e na possibilidade de correlacionar os dados obtidos com a origem dos fragmentos. Os resultados obtidos usando WDXRF, principalmente relativos às concentrações de Ni e Cr, foram valiosos na diferenciação das amostras pertencentes à Itália e algumas pertencentes à Grécia. Valores abaixo de 150 e 250 mg L⁻¹ para Ni e Cr, respectivamente, são característicos de amostras da Sibari, região do sul da Itália, enquanto valores acima destes supostamente são de origem grega.

Em outro trabalho (Marguí et al., 2005), a técnica foi empregada para determinação multielementar de mais de 14 elementos em amostras de vegetais. Considerando a ampla faixa de concentração obtida em material de referência certificado, que variou de < 0,1 mg L⁻¹ até > 1000 mg L⁻¹ para diferentes elementos, considera-se o uso da WDXRF bastante adequado para o estudo em questão.

III. 2.2 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR DISPERSÃO DE ENERGIA (EDXRF)

A maioria dos instrumentos de fluorescência de raios X por EDXRF é multicanal e consiste somente de duas unidades básicas: a fonte de excitação e o sistema de detecção, que geralmente emprega um detector semicondutor de Si(Li) acoplado a sistemas eletrônicos que atuam como agente de dispersão.

A análise quantitativa por EDXRF apresenta baixa resolução e pobre detectabilidade para certos elementos, quando comparada à análise por WDXRF;

porém, tem a grande vantagem de ser rápida, permitir a montagem de um espectrômetro de baixo custo, entre outras.

Para contornar o problema dos limites de detecção, alguns trabalhos reportados na literatura empregam métodos de concentração da amostra antes da análise por EDXRF (Nagata et al., 1997; Cornejo-Ponce et al., 1998). Recentemente, Teixeira et al. (2007) propuseram um método de quantificação para cobre e ferro em gasolina automotiva, após concentração dos analitos em papel celulose. Embora muitas técnicas sejam capazes de realizar determinações quantitativas de Cu e Fe, o trabalho é interessante, se for considerado que XRF é a técnica padrão para quantificar enxofre em gasolina, e que pode se estender para quantificar simultaneamente outros elementos de grande importância nesse tipo de amostra.

Em outro estudo recente, a técnica de EDXRF foi aplicada para análises arqueológicas e metalúrgicas de amostras provenientes de certas regiões de Israel, com base na vantagem da técnica que permite realizar análises em campo (Shalev et al., 2006). As amostras foram irradiadas em uma estação piloto com um espectrômetro improvisado com tubo de Rh e detector Peltier e os resultados foram bastante satisfatórios, podendo ser correlacionados com a procedência das amostras.

Outros trabalhos recentes reportados na literatura mostram muitas aplicações da EDXRF. Enfocando especificamente o uso de radioisótopos como fontes de excitação da amostra, Papachristodoulou et al. (2006) e Mukhamedshina & Mirsagatova (2005) empregaram ^{109}Cd em estudos de caracterização de amostras de porcelanas antigas e ligas metálicas, respectivamente. Os autores ressaltam que a XRF mostrou ser bastante útil, considerando a rápida obtenção da composição química dos materiais, a determinação de macro-componentes com resultados semi-quantitativos, sem a necessidade de um padrão, e ainda, no estudo com as porcelanas, possibilitar o uso da quimiometria para o tratamento dos dados obtidos, o que foi essencial para avaliação da procedência e processos de manufatura.

III. 2.3 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X COM REFLEXÃO TOTAL (TXRF)

Uma vertente de grande sucesso da técnica de XRF é a TXRF, baseada nos mesmos princípios da técnica convencional, embora com algumas diferenças na configuração do equipamento, que são bastante significativas. Nesse caso, o feixe de radiação atinge a amostra com um ângulo de incidência muito pequeno, minimizando a sua interação com o substrato. A radiação emitida é detectada perpendicularmente e bem próxima à amostra, maximizando o número de fótons coletados pelo detector. Para isso, a amostra, que deve ser líquida ou solubilizada, deve ser apresentada na forma de um filme depositado sobre um suporte muito limpo e opticamente plano, geralmente de quartzo.

Essas modificações elevam a detectividade da técnica de XRF convencional, famosa por apresentar alta radiação de fundo decorrente de efeitos de espalhamento da radiação.

Considerando as vantagens dessa vertente da XRF, muitos trabalhos que envolvem a TXRF estão sendo publicados com diferentes enfoques (Misra & Singh Mudher, 2002; Meinschad et al., 2003; Klockenkämper, 2006; Nagata et al., 2006; Strelt et al. 2006).

Com os 30 anos da descoberta da TXRF, é interessante mencionar que hoje, além da sua grande importância em microanálises, ela vem ganhando espaço em análises de superfície e de camadas finas. Segundo Misra & Singh Mudher (2002), nenhuma outra técnica de análise pode competir com a TXRF, considerando sua aplicação para análises de *wafers* finos. Segundo Klockenkämper (2006), os bons limites de detecção que vêm sendo alcançados pela técnica a tem colocado em pé de igualdade com outras bastante empregadas, como ICP OES, ET-AAS e ICP-MS. Os maiores desafios são combinar a reflexão total dos raios X com os diversos métodos de excitação de raios X e, assim, disseminar a potencialidade da técnica. Nesse contexto, Strelt et al. (2006) descreveram alguns resultados recentes obtidos com a SR TXRF (do inglês, *Synchrotron Radiation Induced Total Reflection X-Ray Fluorescence*), os quais foram bastante satisfatórios para análises de aerossol, alumina ultra pura e especiação

de As em xilema. Nagata et al. (2006) determinaram traços de chumbo e arsênio em soluções aquosas, após empregarem quimiometria para análise de dados.

III. 2.4 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X COM FONTE DE LUZ SÍNCROTRON (SRXRF)

A técnica de SRXRF difere da XRF convencional pelo fato de empregar a luz síncrotron como fonte de excitação. Para se gerar a luz síncrotron, elétrons são injetados em um anel com alto vácuo e mantidos em alta energia cinética através de uma bobina de radiofrequência e de um oscilador eletromagnético. Os campos verticais aceleram os elétrons horizontalmente, e esta aceleração por um ímã curvo, causa a emissão tangencial de um feixe de radiação de amplo espectro, denominada luz síncrotron.

Este tipo de fonte tem proporcionado melhoras significativas na detectabilidade dos elementos, decorrentes das próprias propriedades físicas deste tipo de radiação. A radiação síncrotron apresenta um feixe muito mais intenso que as fontes convencionais, distribuição contínua de energia, feixe altamente colimado e polarização linear no plano da trajetória em que o elétron é mantido, permitindo reduzir os efeitos de espalhamento e, conseqüentemente, a radiação de fundo. Assim, recentemente, Bazhanova et al. (2007) aplicaram a SRXRF num estudo de avaliação da composição elementar de tecidos humanos saudáveis e doentes, enquanto Farquharson et al. (2007) mapearam cobre e outros elementos traços em tumor de mama, usando um micro feixe de luz síncrotron. Muitos outros trabalhos reportados na literatura envolvendo SRXRF têm sido aplicados em análises biológicas, principalmente em estudos de casos, como os citados acima.

Apesar das grandes vantagens de se empregar luz síncrotron, deve ser ressaltado que um dos principais inconvenientes desta técnica é o alto custo embutido na construção e manutenção do gerador dessa radiação. Além disso, a intensidade da fonte diminui com tempo, propriedade que deve ser contornada através do monitoramento contínuo do feixe primário ou com o emprego de padrão interno nas amostras analisadas.

III. 2.5 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X INDUZIDA POR PARTÍCULA (PIXE)

A técnica PIXE difere da XRF tradicional basicamente por empregar um acelerador de partículas (Acelerador de Van de Graaff), que acelera partículas alfa ou prótons que são os responsáveis pela excitação do átomo. Para evitar perdas de intensidade da fonte, o sistema é mantido em câmara de vácuo. A maior intensidade e a facilidade de focalização do feixe produzido pelo acelerador de partículas são as grandes vantagens da técnica PIXE em relação a XRF tradicional, enquanto o alto custo é o principal inconveniente da técnica.

Zhu et al. (2006) aplicou PIXE num estudo de origem de porcelanas chinesas antigas e Wierzchos et al. (2006) estudou a composição elementar de pedras do deserto da Antártica. Os autores sempre destacam a vantagem de a técnica possibilitar análises não destrutivas, tornando-a bastante apropriada para estudos nessas áreas.

O uso de quimiometria para tratamento de dados provenientes de PIXE também vem ganhando algum espaço na comunidade científica. Biancato et al. (2006) empregaram análise de componentes principais para analisar os resultados obtidos das composições elementares de partículas de aerosol provenientes da costa da Antártica, enquanto no trabalho realizado por Zhu et al. (2006), a análise de fatores foi empregada para identificar a procedência das porcelanas analisadas.

III. 3 ESPALHAMENTO DE RAIOS X

O espalhamento da radiação X ocorre quando um fóton de raios X interage com os elétrons dos elementos químicos, sem que haja os fenômenos quantizados de absorção/emissão de energia pelo átomo. Assim, esses efeitos acontecem concomitantemente ao efeito fotoelétrico, sendo o efeito de espalhamento mais acentuado para os elementos que apresentam baixos coeficientes de absorção para a radiação X.

O espalhamento Rayleigh, também chamado de espalhamento coerente, ocorre quando a interação entre os fótons da fonte de excitação e os elétrons das camadas externas do átomo é elástica, ou seja, quando não há perda de energia durante o

processo de colisão. Todos os átomos espalham fótons de raios X pelo processo Rayleigh a uma maior ou menor extensão, embora a intensidade do espalhamento dependa do número atômico.

O espalhamento Compton, também chamado de espalhamento incoerente, ocorre quando os fótons espalhados dispersam uma pequena parte de sua energia durante a colisão, especialmente quando o elétron que colide com o fóton está ligado fracamente ao átomo (Jenkins, 1999). Segundo Compton, os raios espalhados sofrem mudanças no comprimento de onda, caracterizadas por um aumento no seu tamanho (Compton, 1929). Nesse trabalho, Compton denominava os efeitos de espalhamento como as linhas “não modificadas” e linhas “modificadas”, o que hoje correspondem aos fenômenos Rayleigh e Compton.

Uma representação simples desses fenômenos se encontra na Figura III.3.1 abaixo:

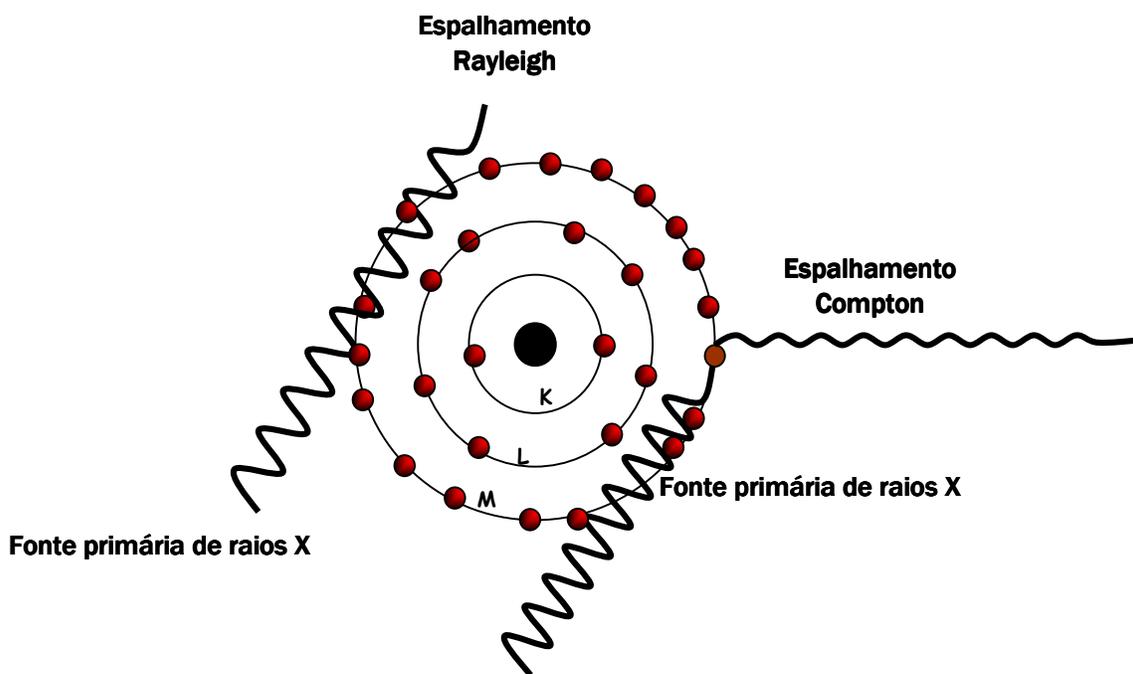


Figura III.3.1 Representação dos fenômenos Compton e Rayleigh.

As intensidades relativas destes fenômenos dependem também da composição da matriz da amostra e aumentam proporcionalmente com a diminuição da massa molar média da amostra. Portanto, amostras com grande quantidade de átomos leves

(amostras orgânicas, por exemplo) apresentam espalhamento muito intenso (Jenkins, 1999).

Considerando as aplicações da XRF tradicional, o espalhamento da radiação incidente sempre foi considerado muito indesejável. Estes efeitos de espalhamento foram estudados com a ajuda de métodos matemáticos sofisticados e têm sido usados para corrigir resultados quantitativos de concentrações elementares (Marcó et al., 1999). Mais freqüentemente, tenta-se minimizar estes efeitos, já que eles contribuem fortemente para a radiação de fundo, quando sinais de certos elementos químicos são monitorados (Bos & Vrieling, 2005).

Além dos efeitos Compton e Rayleigh, outro tipo de espalhamento de baixa intensidade também ocorre, chamado espalhamento Raman de raios X ou espalhamento eletrônico (Tohji & Udagawa, 1987; Tohji & Udagawa, 1989). Já em 1929, Compton relatou algumas palavras sobre as linhas “modificadas” correspondentes à radiação espalhada serem raios X muito análogos às linhas Raman vibracionais, descobertas alguns meses antes. Todavia, a teoria do espalhamento Raman de raios X só foi aceita pela comunidade científica após publicação do trabalho de Mizuno & Ohmura (1967), no qual o espalhamento foi definido como o referente à perda de energia do fóton durante sua interação com um átomo, caracterizada como a energia de ionização de elétrons de camadas internas (K, L, ou mesmo M) do átomo em questão.

No mesmo ano, Suzuki (1967), baseando-se nas considerações teóricas de Mizuno e Ohmura, resolveu demonstrar experimentalmente o espalhamento Raman, trabalhando com amostras de elementos puros leves tais como lítio, berílio, boro e carbono, tubos de raios X (radiação $K\alpha$ do Cu e Cr) e espectrômetros por dispersão de comprimento de onda. Os autores variavam o ângulo de incidência dos raios X (30° , 60° , 80° , 120° e 140° , dependendo do elemento usado como espalhador) e detectavam a ocorrência de um processo de absorção de energia, no qual os elétrons eram deslocados para níveis atômicos não quantizados acima do nível de Fermi, o que gerava um pico deslocado em relação ao espalhamento Rayleigh, que representava esse processo. Os autores provavam assim a ocorrência de um fenômeno desconhecido até então, chamando-o de espalhamento Raman de raios X. Nesta

situação, os fótons de alta energia que incidiram sobre as amostras com baixo número atômico não provocariam a ocorrência do fenômeno fotoelétrico.

Em 1970, Suzuki e colaboradores (Suzuki et al., 1970) publicaram outro trabalho na área, quando foi observado e confirmado experimentalmente que o pico Compton variava seu perfil e sua posição no espectro com a variação no ângulo entre a fonte de excitação e o detector (Figura III.3.2). Por outro lado, o espalhamento Raman se deslocava e tinha sua intensidade alterada de acordo com a composição da amostra (Figura III.3.3).

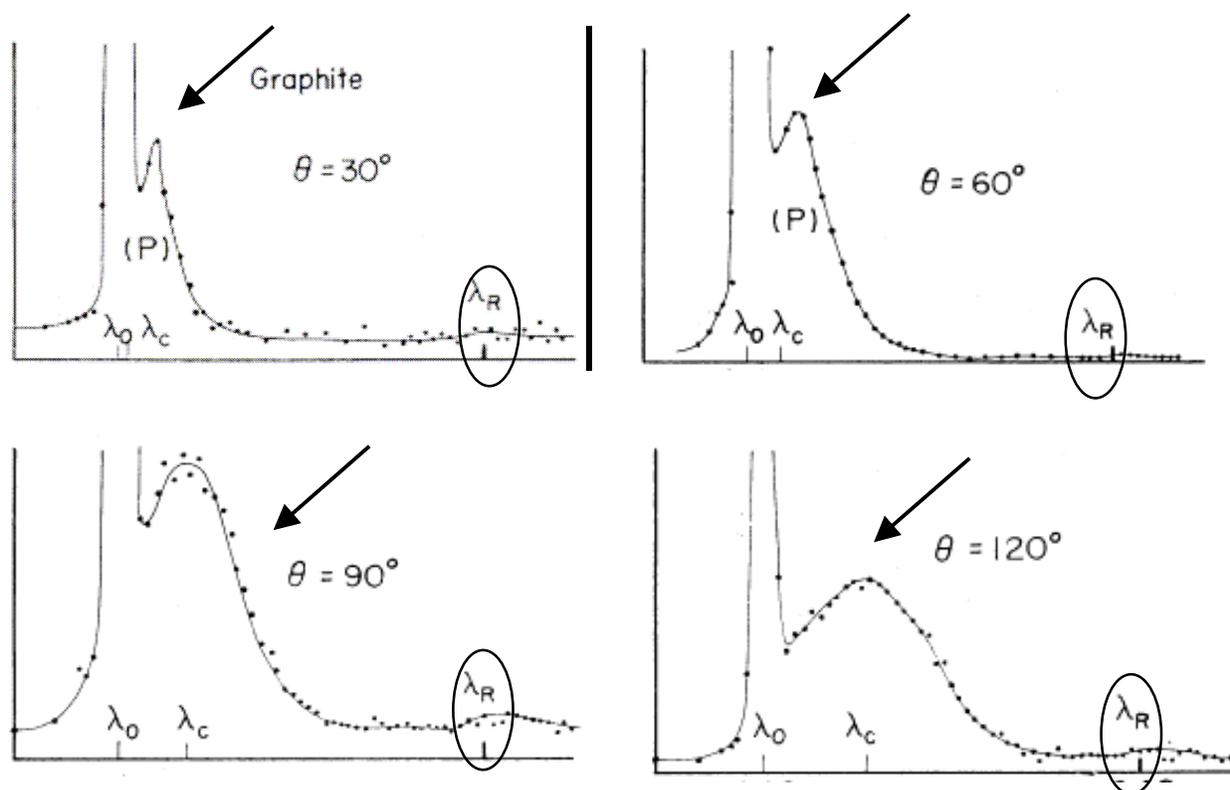


Figura III.3.2 Espectros da grafite contendo o pico Rayleigh e as bandas Compton e Raman, onde λ_0 nas figuras representam a posição do pico Rayleigh, λ_c a posição da banda Compton e λ_R a posição da pequena banda do efeito Raman (Suzuki et al., 1970).

Analisando a Figura III.3.2, retirada do trabalho de Suzuki e colaboradores (1970), observa-se o aparecimento de uma banda deslocada em relação ao pico

Rayleigh, com uma perda de energia bastante significativa. Além disso, observa-se o deslocamento do pico Compton com o aumento do ângulo entre fonte e detector.

Isso leva a concluir que o espalhamento Compton não é dependente da composição da amostra, mas sim do desenho experimental analítico. Essa consideração está de acordo com a teoria que descreve o pico Compton em XRF proposta por Van Gysel et al. (2003), que mostra a dependência desse efeito com seu ângulo de medida. Nesse trabalho, os autores apresentam a equação:

$$\Delta E = E_0 - E_C / mc^2 (1 - \cos \theta) \quad \text{Equação 1}$$

onde ΔE é a diferença de energia (keV) entre a radiação incidente e a radiação espalhada, mc^2 é a energia de um elétron no estado de repouso (510,996 keV), θ é o ângulo de espalhamento, E_0 é a energia do fóton antes do processo do espalhamento ocorrer e E_C é o valor de energia devido ao espalhamento Compton. Sendo assim, outros fenômenos de espalhamento, se característicos da amostra irradiada, não podem estar relacionados com o espalhamento Compton, que depende somente de parâmetros geométricos.

Analisando outra figura (Figura III.3.3), também retirada do trabalho de Suzuki e colaboradores (1970), podem ser observados novamente os deslocamentos de uma banda de baixa intensidade referente ao efeito Raman de raios X. Neste estudo, os deslocamentos foram observados em função da variação da composição da amostra. Assim, é possível associar o espalhamento Raman aos sinais analíticos obtidos para certas amostras, como é descrito mais adiante.

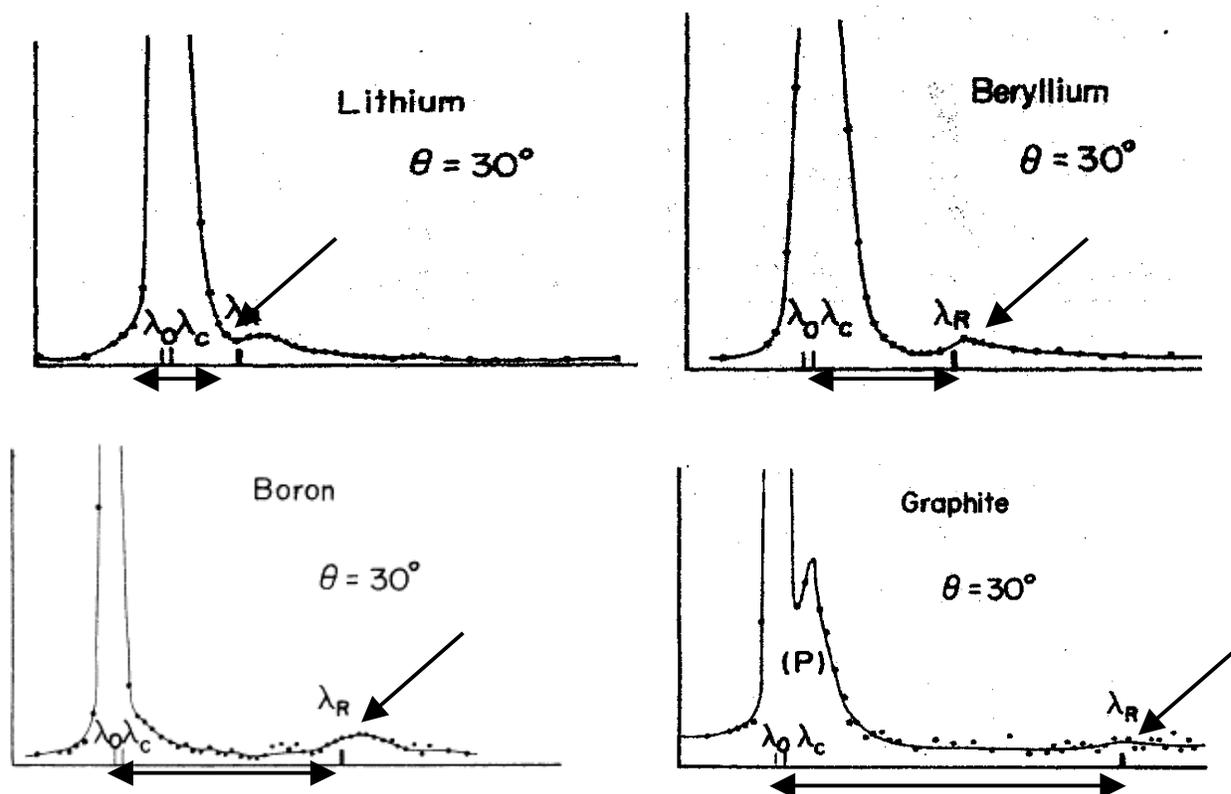


Figura III.3.3 Espectros de diferentes amostras contendo o pico Rayleigh e as bandas Compton e Raman, onde λ_0 nas figuras representam a posição do pico Rayleigh, λ_c a posição da banda Compton e λ_R a posição da pequena banda do efeito Raman (Suzuki et al., 1970).

Ainda analisando a Figura III.3.3, nota-se que quanto mais pesado é o elemento, maior é o deslocamento Raman em relação ao Rayleigh, ou seja, maior é a perda de energia em relação à energia incidente. Esse fato só vem a reforçar a teoria de Mizuno & Ohmura (1967) que atribuem essa perda de energia a energia de ionização de elétrons das camadas K dos átomos leves. Nesse caso, quanto mais pesado é o elemento, maior é a energia de ionização e maior é a diferença de energia referente ao processo de espalhamento.

Outro aspecto bastante interessante do efeito Raman de raios X, observado por pesquisadores que passaram a estudar o fenômeno em questão (Tohji & Udagawa, 1987; Tohji & Udagawa, 1989; Bergman et al., 2002), é que o perfil do espectro obtido para o espalhamento Raman é muito análogo ao espectro de absorção de raios X para um mesmo material, como pode ser observado na Figura III.3.4.

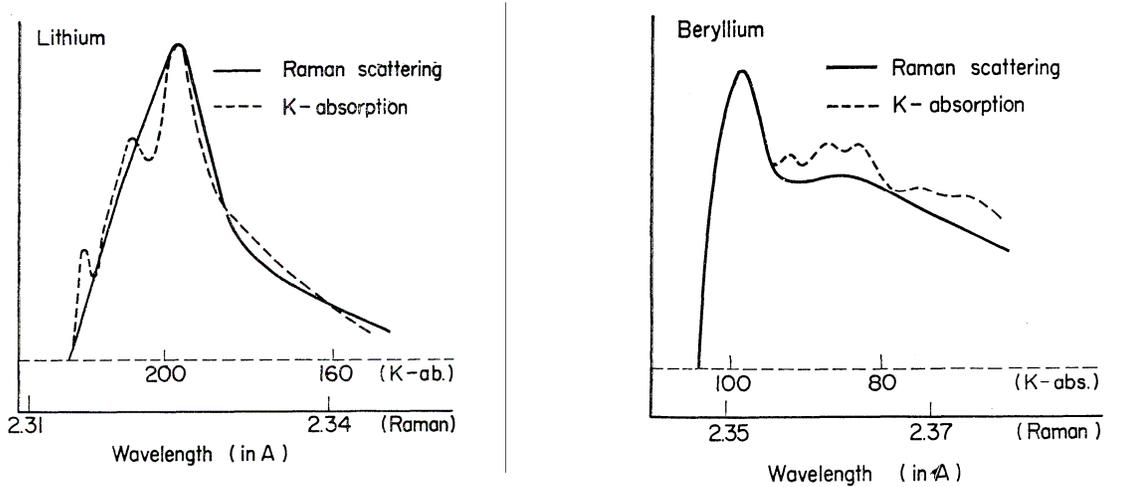


Figura III.3.4 Espectros de espalhamento Raman e de absorção de raios X para amostras puras de lítio e berílio (Suzuki et al., 1970)

Exatamente pelo fato do espalhamento Raman de raios X se iniciar com um processo de absorção de energia pelos elétrons da camada K dos elementos leves, a sua resposta é exatamente a mesma dos processos de XAS (do inglês, *X-Ray Absorption Spectroscopy*). A partir desses trabalhos, ficou mais fácil a compreensão do efeito Raman de raios X, representado na Figura III.3.5, extraída do trabalho de Tohji & Udagawa (1989).

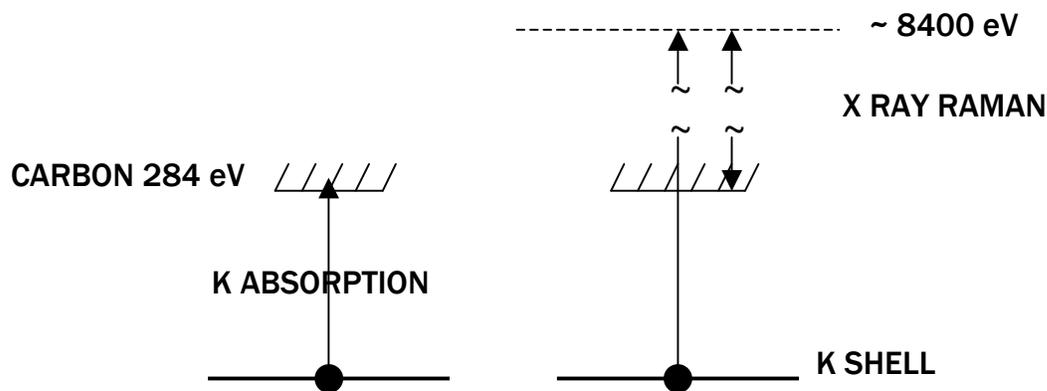


Figura III.3.5 Representação da ocorrência do fenômeno Raman de raios X (Tohji & Udagawa, 1989).

De qualquer maneira, até alguns anos atrás, ainda se acreditava que, para medir especificamente o efeito Raman, seriam necessários seguir alguns requisitos:

1. utilizar uma fonte de radiação muito intensa, altamente polarizada e modulável, como é o caso da radiação síncrotron.
2. empregar tempos bastante elevados para a contagem do sinal durante as irradiações, para a produção de uma razão sinal/ruído razoável.
3. empregar um detector especial, já que a resolução requerida para observação do sinal é de décimos de eV, o que não é, de forma alguma, comum em equipamentos convencionais de XRF.

De fato, linhas específicas de processos Raman eram somente observáveis em condições muito especiais e, por isso, muitas vezes sua existência foi considerada duvidosa, antes do experimento de Suzuki em 1967.

Porém, como esses fenômenos se apresentam como uma multiplicidade de sinais, principalmente para amostras complexas, hoje se sabe que estes podem ser perfeitamente tratados por quimiometria, como descrito por Bueno et al. (2005) e mostrado no decorrer desse trabalho. Mesmo assim, embora muitos pesquisadores saibam da existência desses efeitos de espalhamento nos espectros obtidos por XRF, não se costuma usar as informações contidas nesses espectros como sinal de medida em análises por XRF. Poucos trabalhos são reportados na literatura, que envolvem o uso do espalhamento da radiação X como resposta do instrumento analítico. Somente alguns deles tratam da teoria que explica os fenômenos envolvidos, considerando a composição química das amostras.

Molt & Schramm em 1999 determinaram C, H e O em matrizes líquidas orgânicas de óleos, glicerina e 2-propanol empregando análise orgânica elementar e usaram PCR (do inglês, *Principal Component Regression*) para a construção de modelos de calibração multivariada, considerando o espalhamento da radiação X como medida analítica. Os autores apontaram uma maneira simples de quantificar elementos leves por XRF usando quimiometria para o tratamento de dados, embora não tenham discutido nada a respeito da correlação entre o espalhamento Raman e os elementos da amostra. Em continuidade ao estudo, Schramm (2000) mostra ainda a possibilidade

de se quantificar Zn nessas amostras orgânicas empregando o espalhamento de raios X como resposta.

Em trabalho apresentado por Kessier et al. (2002), o uso do espalhamento Compton e Rayleigh foi fundamental para a identificação de compostos químicos usando PCA e RDA (do inglês, *Regularized Discriminant Analysis*). Nesse trabalho, os autores apontaram a alta correlação existente entre o tamanho das amostras, a posição e a espessura delas com o sinal do espalhamento da radiação X. Nesse mesmo ano, Vázquez et al. (2002) empregaram o espalhamento proveniente de experimentos realizados no modo TXRF, PCA e HCA (do inglês, *Hierarchical Cluster Analysis*) para analisar semelhanças e diferenças entre amostras de polímeros. Continuando os estudos com polímeros, Boeykens & Vázquez (2004) concluíram que a técnica se mostrou interessante e inovadora para ser aplicada na área, embora estudos teóricos que possam vir a explicar os resultados experimentais mereçam ainda maior atenção, sem, portanto, mencionar o efeito Raman como responsável pelo processo.

A partir de 2005, alguns trabalhos começaram a ser publicados pelo grupo de pesquisa GERX – Grupo de Espectrometria de Raios X (Bortoleto et al., 2005; Bueno et al., 2005; Verbi et al., 2005; Alexandre & Bueno, 2006; Pereira, 2006; Bortoleto et al., 2007), mostrando resultados interessantes de estudos com o espalhamento de raios X, principalmente no que se refere às hipóteses para as observações experimentais. Dentro desse contexto esta tese foi desenvolvida, ressaltando que a quimiometria para a análise dos dados exerce um papel fundamental em todos os trabalhos da área.

III. 4 MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS E A ESPECTROMETRIA DE RAIOS X

Devido aos grandes avanços em *hardware* e *software*, o uso de computadores para interpretar resultados de medições químicas aumentou drasticamente nos últimos anos. Paralelamente, a aquisição de dados na área de química analítica atingiu níveis bastante sofisticados com o interfaceamento de instrumentos aos computadores, produzindo uma enorme quantidade de informação, muitas vezes complexa e variada. Os modernos instrumentos analíticos têm a capacidade de produzir respostas multivariadas para cada amostra, gerando a necessidade de métodos matemáticos e

estatísticos para o tratamento de dados e a máxima extração de informações relevantes. Foi nesse panorama que surgiu a quimiometria, que é considerada uma área da química destinada à análise de dados de natureza multivariada (Ferreira et al., 1999; Hopke, 2003). Embora a quimiometria seja uma área relativamente nova, ela já produz um grande impacto no campo da espectroscopia, de tal modo que hoje existem diversos *softwares* comerciais disponíveis para o processamento dos mais diversos métodos quimiométricos, além daqueles que já estão incorporados em muitos instrumentos analíticos comerciais (Geladi, 2003; Hopke, 2003).

De acordo com Luo (2006), embora a quimiometria venha sendo aplicada à espectrometria de raios X desde o início da década de 90 (Wang et al., 1990; Swerts et al., 1993; Swerts et al., 1994) quando os primeiros trabalhos começaram a surgir, ela poderia ter alcançado um sucesso ainda maior na área de XRF, se estudos fossem conduzidos na mesma proporção como os das outras áreas espectroscópicas.

III. 4.1 ANÁLISE EXPLORATÓRIA

A análise exploratória não supervisionada baseada em métodos de reconhecimento de padrões visa evidenciar similaridades ou diferenças entre amostras de um determinado conjunto de dados (Silva et al., 2002). A PCA é a base principal de diversos métodos de análise multivariada e seu grande objetivo é comprimir a quantidade de informação de um conjunto de dados iniciais para um novo sistema de eixos, denominados Componentes Principais (PC). Estas PC representam as amostras, possibilitando visualizar características multivariadas dos dados em poucas dimensões, através de uma projeção de dados sobre um subespaço dimensional menor, maximizando a variância, sem perda de informação relevante. A primeira componente principal, PC1, é a combinação linear de máxima variância (isto é, de máxima informação) das variáveis originais, ou seja, os auto vetores, num determinado eixo. A segunda componente, PC2, de segunda maior variância, é ortogonal a PC1, isto é, não correlacionada a ela. A terceira apresenta a terceira maior variância e é ortogonal às duas primeiras PC, portanto também não correlacionadas, e assim por diante. Como esses eixos são calculados em ordem decrescente de importância, a informação

relevante fica concentrada nas duas ou três primeiras PC, que podem ser então confrontadas com padrões de características conhecidas (Wold et al., 1987; Silva et al., 2002; Neto et al., 2006).

De acordo com Luo (2006), as aplicações dos métodos de reconhecimento de padrões não supervisionados, que envolvem PCA, HCA e outros, à espectrometria de raios X, têm apresentado resultados bastante promissores nas mais diversas áreas como materiais, análise forense, investigações arqueológicas, alimentos e agricultura, entre outras. Nesse contexto, é interessante mencionar o trabalho de Swerts et al. (1994), um dos primeiros a empregar quimiometria à análise de dados de XRF, no qual os autores determinaram a idade de porcelanas chinesas empregando PCA e métodos de calibração multivariada.

III. 4.2 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Calibração é o procedimento para encontrar uma função matemática que produza relações entre propriedades de interesse com resultados registrados pelos instrumentos. A calibração multivariada é uma das mais bem sucedidas combinações de métodos estatísticos com dados químicos, tanto na química analítica quanto na química teórica. Dentre os diversos métodos de calibração multivariada existentes, o mais utilizado é o de regressão por quadrados mínimos parciais (PLS) (Ferreira et al., 1999).

O método PLS (Barthus, 2005) abrange aplicações em vários campos da Química, tais como analítica, físico-química, processos industriais e análises. Neste método de regressão, a matriz dos sinais instrumentais (matriz X de dados independentes), como um espectro, por exemplo, é relacionada com a matriz das variáveis dependentes (matriz Y), como concentrações, por exemplo. As duas matrizes são decompostas em uma soma de n variáveis latentes, equivalentes a componentes principais no PCA, que sofreram rotação durante a decomposição. O número de variáveis latentes utilizadas no processo de calibração é normalmente obtido usando um procedimento chamado validação cruzada (*cross validation*), que é uma

metodologia baseada na magnitude dos erros de previsão de um dado modelo de calibração (Geladi & Kowalski, 1986; Ferreira et al., 1999).

Alguns trabalhos que envolvem análises de dados de XRF por PLS surgiram na literatura por volta de 1990 (Wang et al., 1990; Swerts et al., 1993; Urbanski & Kowalska, 1995). Mais recentemente, o espalhamento da radiação X vem complementando as informações dos sinais de XRF, o que provavelmente levará a um aumento considerável nas publicações que envolvem a espectrometria de raios X e a calibração multivariada (Goraieb et al. 2006; Pereira et al., 2006).

**CAPÍTULO IV –
ESTUDO DO ESPALHAMENTO DE
RAIOS X**

IV. 1 ESTUDO DO ESPALHAMENTO DE RAIOS X

Em certos espectros de XRF obtidos por um equipamento de EDXRF convencional de bancada, equipado com tubo de raios X de Rh, linhas características de XRF dos elementos químicos e picos característicos dos espalhamentos Compton e Rayleigh geralmente podem ser observados, o que facilmente prova a existência de certos elementos na amostra, assim como a presença de elementos leves que geram intenso espalhamento da radiação.

A Figura IV.1 mostra um exemplo destes efeitos, quando uma amostra de sílica pura foi irradiada nestas condições.

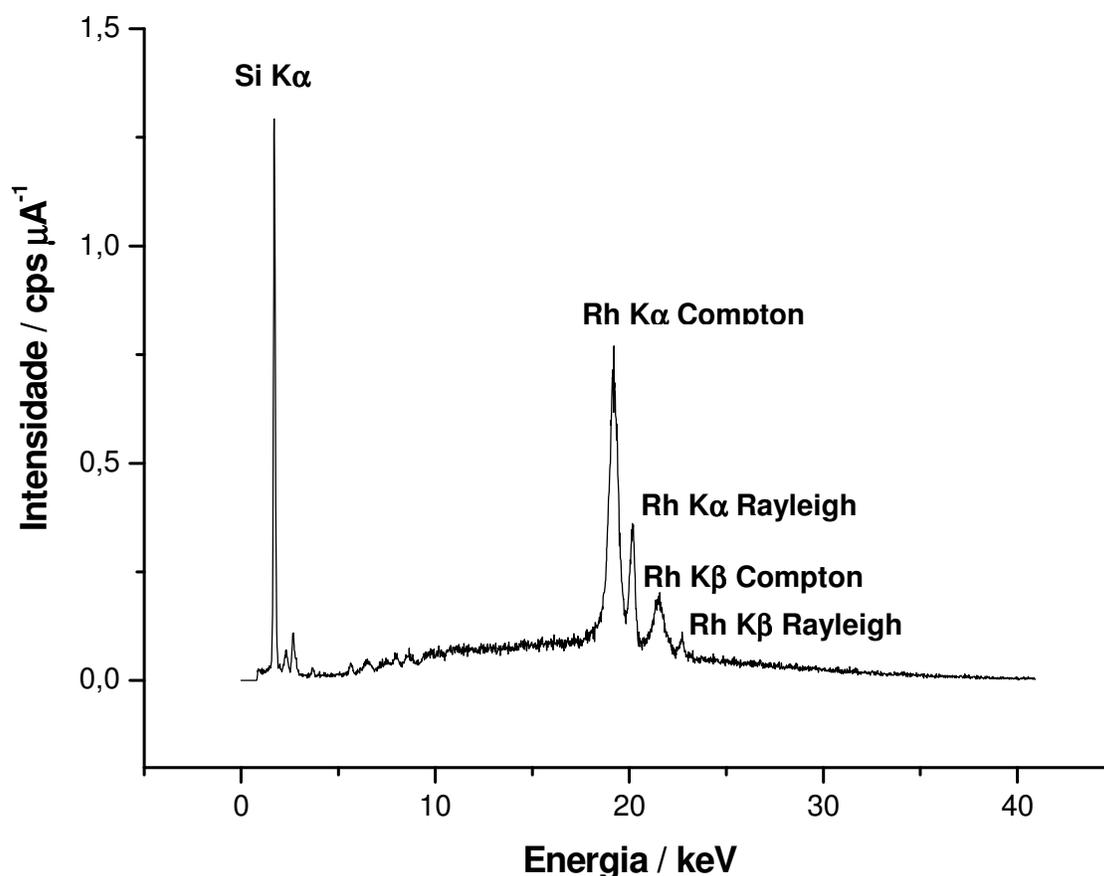


Figura IV.1 Espectro de uma amostra de sílica pura.

No espectro acima, é possível notar a presença de Si, caracterizado pelo intenso sinal de XRF desse elemento em 1,74 keV, além dos picos Compton $K\alpha$ e $K\beta$ e

Rayleigh $K\alpha$ e $K\beta$ característicos da interação da fonte de Rh com a amostra composta por elementos leve, Si e O. Como era de se esperar, devido às condições de análise, o espalhamento Raman específico de cada elemento não é observado, mas a multiplicidade de variações de intensidade do sinal na região do espalhamento da radiação (em torno de 20 keV) pode conter manifestações do efeito Raman, que ocorrem junto ao Compton e Rayleigh.

Neste capítulo, o objetivo principal do trabalho visa mostrar os perfis do espalhamentos provenientes da interação do tubo de Rh com diferentes amostras à base de carbono e diferentes álcoois simples, assim como o proveniente da interação da luz síncrotron com as mesmas amostras. Em ambos os casos, realizaram-se as medidas no modo de detecção do sinal por dispersão de energia.

Também é de interesse provar que a região de espalhamento de raios X pode ser útil, quando se assume que, nessa região, a quantidade de informação a respeito da amostra é bastante significativa. Nesse contexto, o uso de quimiometria se torna fundamental para interpretação dos dados gerados.

IV. 2 PARTE EXPERIMENTAL

Para realização deste estudo, foram analisadas amostras sólidas de grafite (Synth), de carvão ativado (Norit), de nanotubos de carbono (CNT Co.) e de coque (obtido da refinaria de petróleo da Paulínia, SP-Brasil). Amostras líquidas de quatro diferentes tipos de álcoois (metanol, etanol, propan-1-ol e propan-2-ol), todos de grau analítico, de três diferentes marcas, também foram analisadas.

Todas as amostras foram inseridas em celas apropriadas para irradiação (Chemplex[®]), adaptadas com um filme de Mylar[®], com 2,5 μm de espessura. Alíquotas de 2 mL foram utilizadas para as amostras líquidas, enquanto as amostras sólidas foram inseridas nas celas até seu preenchimento. Todas as amostras, em todas as análises, foram irradiadas por 100 segundos sob atmosfera de ar, com colimação do feixe de 10 mm, sendo este último considerado só no caso do uso do EDXRF.

Para as análises de espectrometria de raios X por dispersão de energia com equipamento convencional, um espectrômetro modelo EDX 700, marca Shimadzu,

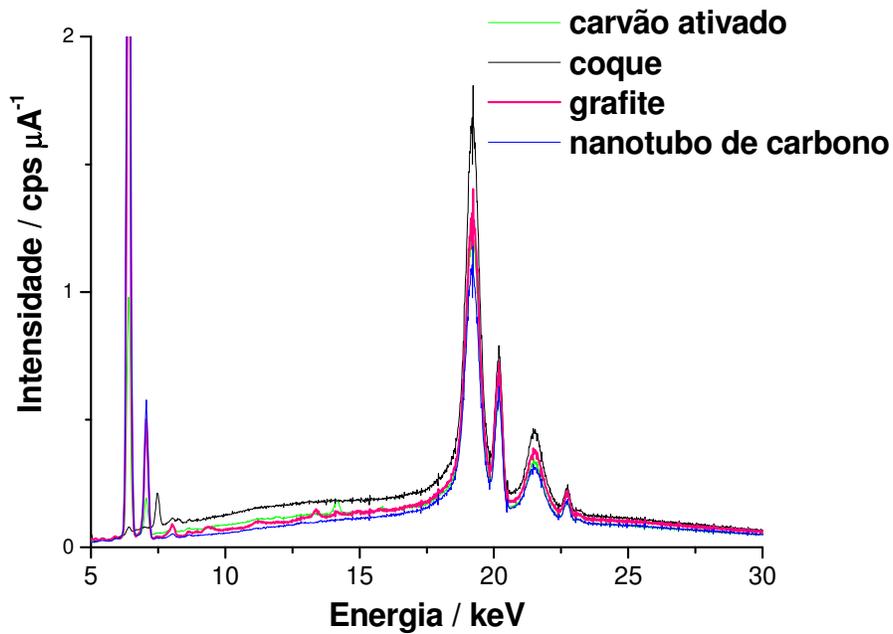
equipado com tubo de raios X de Rh e detector de Si(Li) foi empregado. A voltagem aplicada ao tubo foi 50 kV, produzindo corrente ao redor de 100 mA, quando o *dead-time* do detector é 25%.

As análises na linha de fluorescência de raios X do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS – Campinas, SP-Brasil) foram realizadas com energia do anel operando em 1,37 GeV, corrente variável de 240,8 – 163,2 mA (normalizada) e detector de Ge hiper puro.

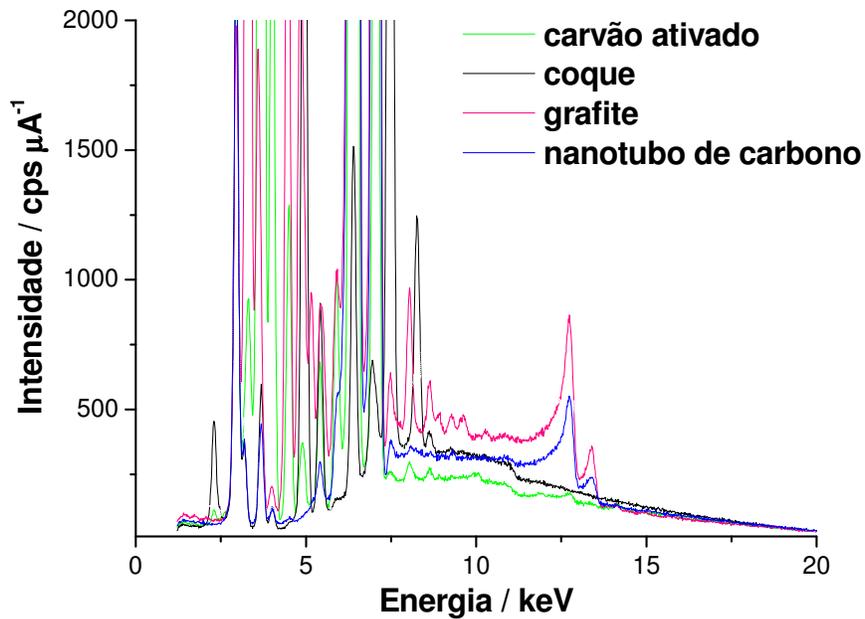
Os espectros gerados foram usados para construção de matrizes de variáveis independentes (valores de energia, em keV) para serem analisadas por PCA, utilizando o programa *The Unscrambler*, versão 9.2, da CAMO. As variáveis empregadas para o processamento de PCA foram de 18,00 – 24,00 keV, quando os experimentos foram realizados com o EDX 700 e de 5,00 – 20,00 keV, quando os experimentos foram realizados no LNLS.

IV. 3 ANÁLISE DE GRAFITE, NANOTUBOS DE CARBONO, COQUE E CARVÃO ATIVADO

Para avaliar a influência da estrutura atômica no sinal do espalhamento (provenientes de um tubo de Rh e de radiação síncrotron), quatro materiais sólidos, compostos essencialmente por carbono, foram selecionados: carbono ativado, coque, grafite e nanotubos de carbono. Quando elementos leves são irradiados com energia muito maior que 0,284 keV (energia de ligação do elétron K do carbono), eles não devem absorver a radiação X, mas sim espalhá-la, já que esses átomos não têm elétrons fortemente ligados ao núcleo que permitam a ocorrência do efeito fotoelétrico. Assim, o resultado do fenômeno de interação da radiação X com as amostras sólidas de matriz leve, que deveria ser basicamente o espalhamento, está mostrado na Figura IV.3.1.



a) Espectros obtidos no EDXRF com tubo de Rh.



b) Espectros obtidos no LNL com luz síncrotron.

Figura IV. 3.1 Espectros das amostras de matriz de carbono.

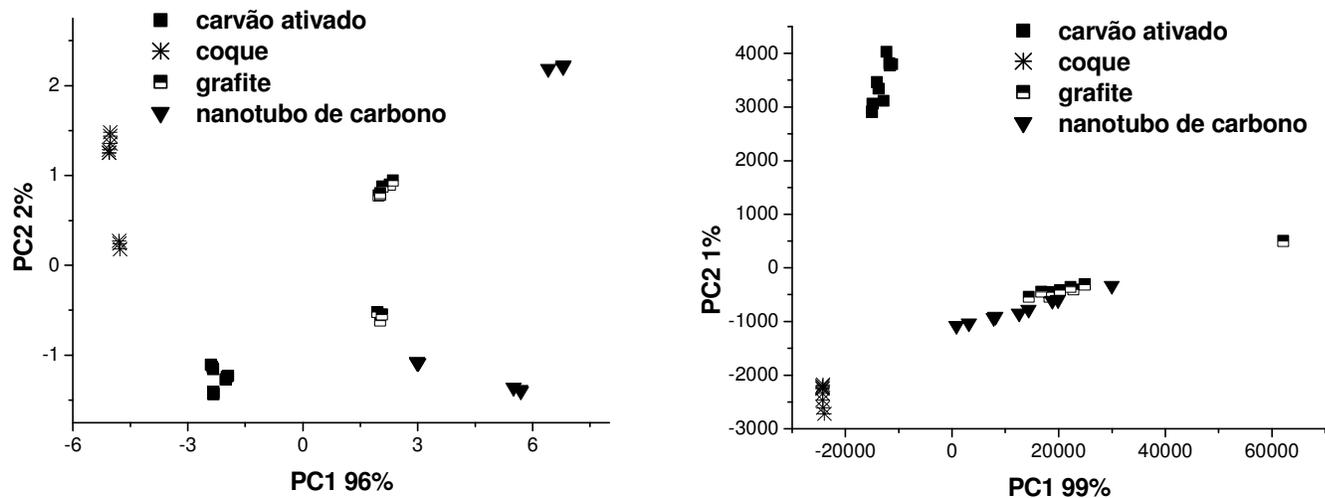
A Figura IV.3.1 mostra diferentes perfis de espectros de raios X usando duas distintas fontes de raios X para irradiação das mesmas amostras. Nos espectros obtidos com tubo de Rh, além de alguns picos característicos de certos elementos químicos presentes nos materiais analisados, é possível visualizar também os picos característicos da fonte de Rh, que correspondem ao espalhamento da radiação X: Compton $K\alpha$ (19,20 keV), Rayleigh $K\alpha$ (20,16 keV), Compton $K\beta$ (21,56 keV) e Rayleigh $K\beta$ (22,74 keV). Já nos espectros obtidos com luz síncrotron, observam-se muitas linhas de fluorescência (referentes aos elementos que compõem estes materiais sólidos) e um baixo sinal de fundo, correspondente ao espalhamento da radiação X. Os picos em 13,3 keV e 14,7 keV nas amostras de grafite e nanotubos de carbono são correspondentes às linhas $K\alpha$ e $K\beta$ do Rb, respectivamente, outro elemento provavelmente presente nos materiais analisados.

A diferença observada nos espectros obtidos é perfeitamente normal, considerando que a intensidade da luz síncrotron é propositalmente empregada para detectar elementos não detectáveis por XRF convencional. Todavia, no estudo em questão realizado com amostras sólidas, a alta intensidade da luz síncrotron não se mostrou adequada para fornecer dados de espalhamento de raios X. Ela fez com que os sinais gerados pelos elementos se sobressaíssem sobre o sinal de espalhamento que seria gerado pelo carbono.

De qualquer forma, uma observação interessante pôde ser feita a respeito da semelhança dos espectros da grafite e dos nanotubos de carbono representados na Figura IV. 3.1b. Para explicar esse resultado, Iijima (1991) afirma que nanotubos de carbono são formados essencialmente por folhas de grafite enroladas em formas cilíndricas, o que provavelmente, nesse caso, gerariam espectros muito parecidos.

Mesmo após a obtenção dos espectros com baixo sinal de espalhamento quando se empregou a luz síncrotron, resolveu-se continuar esse estudo seguindo para o tratamento de dados por análise multivariada. Para processar os espectros por PCA, primeiramente centraram-se os dados na média. Os gráficos de *scores* da Figura IV.3.2 foram obtidos, a partir dos quais é possível concluir que existe uma tendência de separação dos compostos a base de carbono, no eixo da PC1, em ambos os casos.

Isso é interessante, pois informações químicas de compostos essencialmente orgânicos estão sendo obtidas a partir de análises de XRF e quimiometria.



a) Amostras analisadas no EDXRF com tubo de Rh.

b) Amostras analisadas no LNLS com radiação síncrotron.

Figura IV.3.2 Gráficos de *scores* das amostras à base de carbono, após processar PCA.

Analisando a Figura IV.3.2b, nota-se que a grafite e os nanotubos de carbono não são completamente separados em dois distintos grupos, principalmente usando as respostas do experimento com fonte de luz síncrotron. Novamente, isso está de acordo com a literatura (Iijima, 1991), na qual esses materiais estão descritos como compostos de mesma composição e estrutura.

Considerando os resultados obtidos com o tubo de Rh, observa-se uma baixa precisão das medidas, já que as distâncias entre as replicatas são maiores que as distâncias entre os diferentes tipos de amostras. Nesse caso, considerou-se o uso do Rh não adequado para estudos desse tipo. Por outro lado, melhores resultados poderiam ser obtidos com aumentos significativos no tempo de irradiação das análises, o que aumentaria a intensidade do sinal analítico.

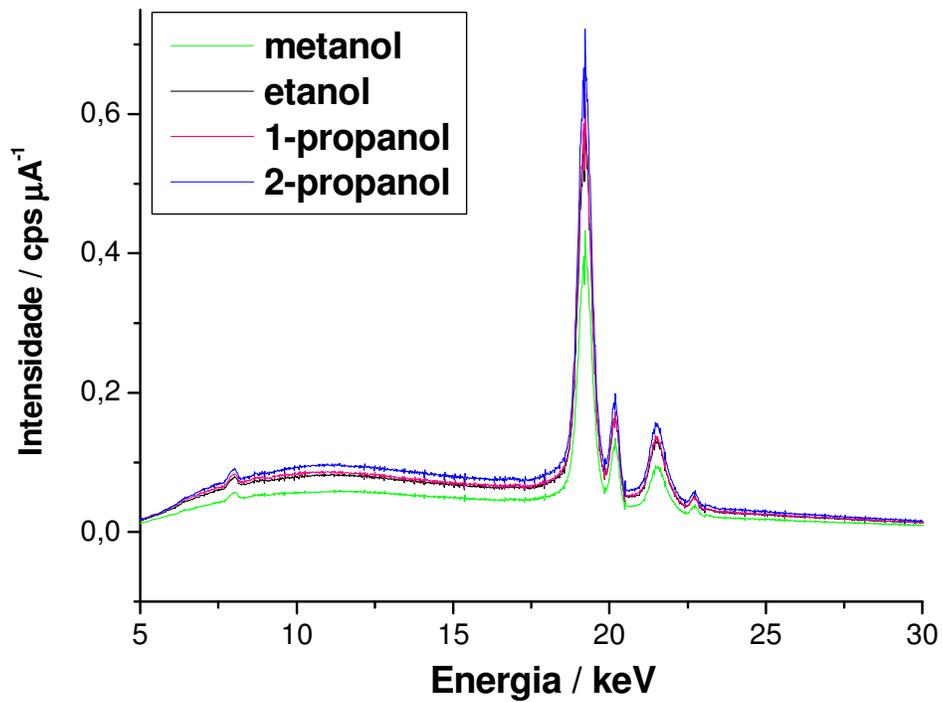
De qualquer modo, avaliando a tendência da separação dos diferentes materiais a base de carbono em amostras de estrutura cristalina (grafite e nanotubos de carbono) e amostras de estrutura amorfa (coque e carvão ativado), conclui-se que informações

relevantes podem ser obtidas da região do espalhamento no espectro, mesmo que obtidos em equipamentos de baixa resolução, como os que utilizam os tubos de raios X de Rh como fonte de radiação.

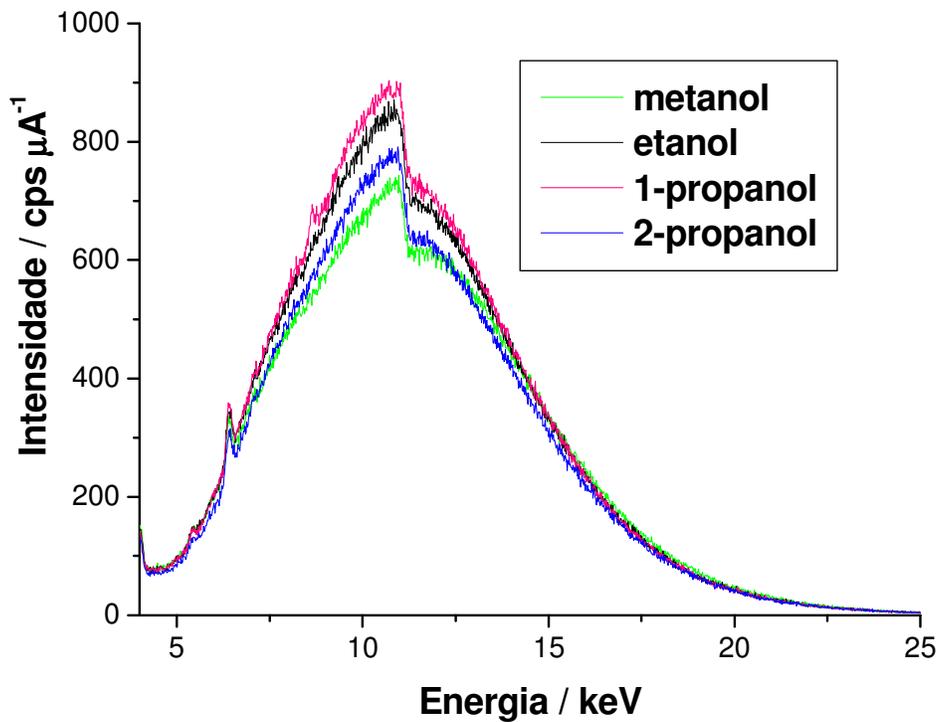
IV. 4 ANÁLISE DE ÁLCOOIS

Outro estudo que visou investigar o perfil do espalhamento da radiação X e o tipo de informação que pode ser obtida desses efeitos de espalhamento, empregando diferentes fontes primárias de raios X, foi realizado com amostras líquidas de diferentes álcoois, variando-se o número de carbonos que compõem a molécula e a isomeria do composto: metanol, etanol, propan-1-ol e propan-2-ol.

Observando os espectros dos materiais em questão (Figura IV.4.1), é possível notar intenso espalhamento da radiação X das amostras líquidas, gerado por ambas as fontes de raios X. No experimento realizado com tubo de Rh, os picos de espalhamento Compton e Rayleigh, $K\alpha$ e $K\beta$ do Rh, aparecem como o esperado, enquanto no experimento realizado com luz síncrotron, o sinal de espalhamento aparece como uma banda intensa.



a) Amostras analisadas por EDXRF com tubo de Rh.

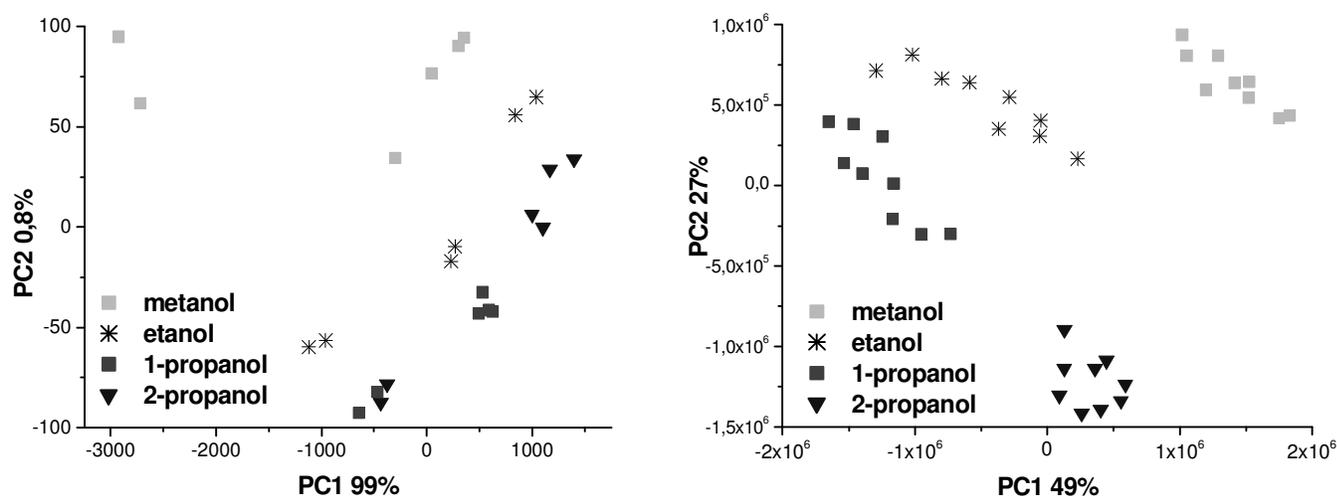


b) Amostras analisadas por EDXRF com radiação síncrotron.

Figura VI.4.1 Espectros das amostras dos diferentes álcoois.

O fato dos picos de espalhamento não aparecerem em posições determinadas nos espectros obtidos com a luz síncrotron (região em torno de 20 keV) é devido à radiação síncrotron ser policromática, sem apresentar linhas referentes aos elementos que compõem os tubos de raios X, de Rh, no caso presente.

Tratando os espectros por quimiometria (empregando PCA, após centrar os dados na média), foi obtida a Figura IV.4.2, na qual é possível observar uma tendência de separação dos álcoois em grupos, de acordo com o número de átomos de carbono das moléculas das amostras e com a isomeria presente nessas moléculas.



a) Amostras analisadas por EDXRF com tubo de Rh.

b) Amostras analisadas por EDXRF com radiação síncrotron.

Figura IV.4.2 Gráficos de *scores* das amostras de álcoois, obtidos após processar PCA.

Na Figura IV.4.2a, embora a PC1 explique 99% da variância, nota-se que as distâncias entre amostras do mesmo tipo estão maiores que as distâncias entre amostras de tipos diferentes, indicando baixa precisão intermediária das medidas. Nesse caso, a tendência de separação dos diferentes álcoois no eixo da PC1 perde um pouco seu significado quando as análises são feitas com o tubo de Rh.

Os resultados obtidos para a separação das diferentes amostras estão bastante satisfatórios, quando as análises são realizadas com luz síncrotron. A PC1 explica 49% da variância para separar os álcoois pelo número de átomos de carbono que compõe

as moléculas e a PC2 explica 27% de variância para separar os álcoois isômeros. A melhor performance obtida com luz síncrotron está relacionada com o fato da intensidade da luz síncrotron ser da ordem de 10000 vezes maior que a proveniente de um tubo de raios X, o que obviamente influencia significativamente nas variações dos sinais de espalhamento e, por conseqüência, na separação de amostras consideradas muito semelhantes a olho nu. Uma forma de contornar esse problema com o tubo de Rh seria aumentar o tempo de irradiação das amostras de forma a atingir sinais de espalhamento mais precisos, o que pareceu ser fundamental nas análises em questão, já que a luz síncrotron forneceu resultados bastante satisfatórios.

Outro estudo, realizado com os espectros das amostras de álcoois e dados da literatura (Lide, 1996), foi conduzido com objetivo de se construir um modelo de calibração multivariada para prever pontos de ebulição de álcoois. As curvas de calibração e validação do modelo, obtidas utilizando duas variáveis latentes, estão apresentadas na Figura IV.4.3.

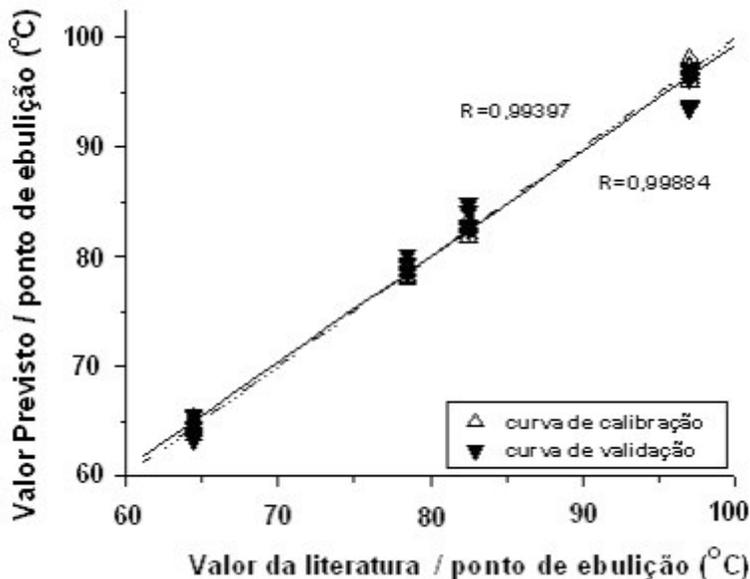


Figura IV.4.3 Modelo de regressão construído empregando-se o método PLS.

A curva apresentada na Figura IV.4.3 visa mostrar a gama de informações que podem ser obtidas com o espalhamento de raios X, embora estudos mais detalhados devam ser feitos para obtenção de modelos de calibração e previsão mais confiáveis.

Nesse contexto, Henriques & Bueno (2005), em trabalho desenvolvido junto com a Petrobrás, depositaram uma patente que aborda um método de quantificação de parâmetros da indústria petrolífera, usando a técnica proposta nesse trabalho.

Em suma, nesse capítulo, fica clara a quantidade de informações que pode ser obtida a partir de espectros de XRF gerados a partir do uso da luz síncrotron ou, mesmo, com tubos de raios X. Deve ser considerado que os equipamentos convencionais que empregam tubos de raios X para excitação da amostra são construídos com geometria fixa entre seus componentes, para minimizar efeitos de espalhamento da radiação. Sabe-se que o ângulo de 90° adotado para construção dos espectrômetros, segundo Van Gysel et al. (2003), foi otimizado para diminuir ao máximo a intensidade de espalhamento que chega ao detector, o qual a princípio interferiria em estudos de quantificação baseados unicamente no efeito fotoelétrico.

Além disso, após análise dos artigos que descrevem o espalhamento Raman, foi considerado que, em ângulos acima de 90° , o espalhamento Compton que ainda consegue chegar ao detector pode ser suficientemente intenso para se sobrepor ao espalhamento Raman, que é o principal responsável pelas informações a respeito da composição das amostras, como mostra a Figura IV.4.4 (Suzuki, 1970).

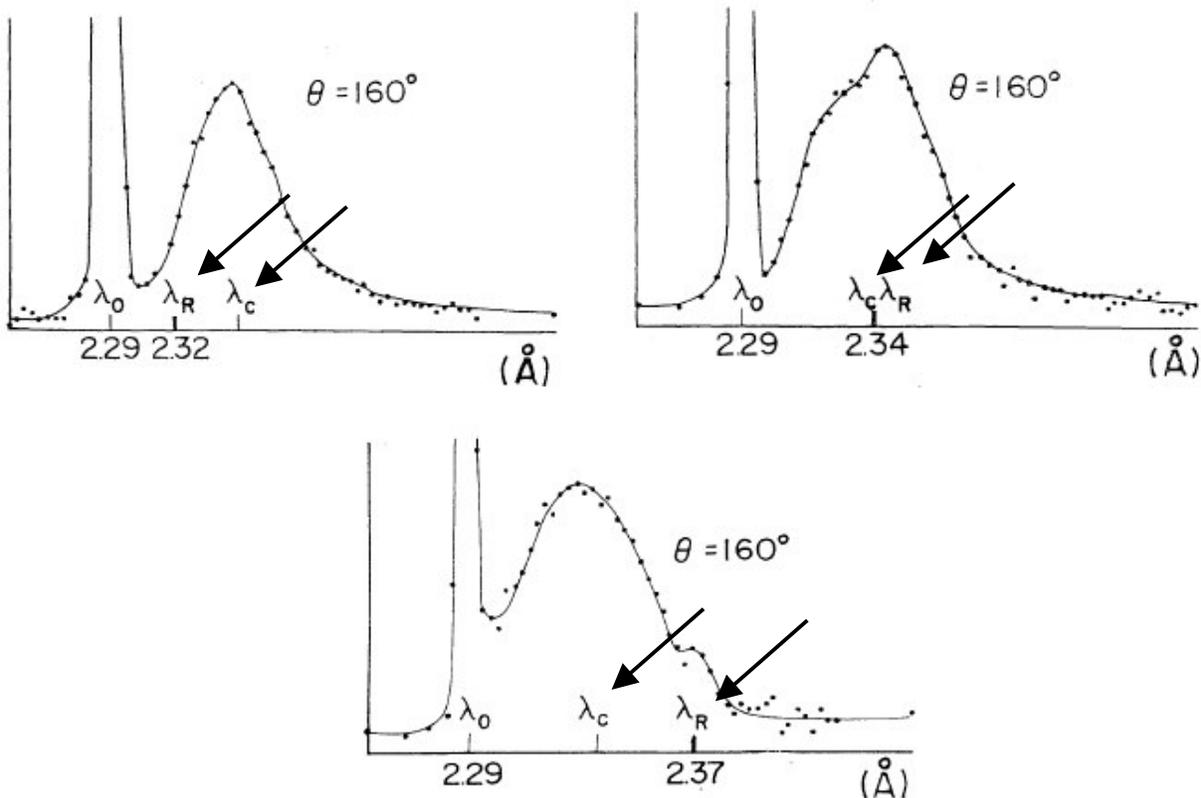


Figura IV.4.4. Espectros contendo o pico Rayleigh e as bandas Compton e Raman, onde λ_0 nas figuras representam a posição do pico Rayleigh, λ_c a posição da banda Compton e λ_R a posição da pequena banda do efeito Raman (Suzuki et al., 1970).

Assim, dificilmente o efeito Raman de raios X é visualizado em espectros obtidos com equipamentos convencionais, uma vez que este efeito geralmente está sobreposto pelo espalhamento Compton.

Em visita a Delft University of Technology em 2006, foi realizado um experimento rápido com um equipamento XRF modular e fonte radioativa para excitar uma amostra de papelão. Foi possível observar claramente o deslocamento do pico Compton, enquanto variava-se manualmente a posição da fonte radioativa em relação à amostra e ao detector. Além disso, observou-se o aparecimento de um pequeno pico deslocado em relação ao Rayleigh, o qual foi atribuído ao efeito Raman.

Pode ser concluído então que, independente da fonte de raios X, o espalhamento gerado pode ser analisado por quimiometria, que mais uma vez se mostra como uma poderosa ferramenta para análise de dados químicos.

Aumentos consideráveis no tempo de irradiação das amostras poderiam aumentar significativamente o sinal do espalhamento da radiação, o que poderia minimizar o problema de precisão intermediária das medidas realizadas com o tubo de Rh.

Mudanças na configuração dos equipamentos convencionais de bancada poderiam possibilitar uma observação do pico Raman de raios X.

**CAPÍTULO V –
ANÁLISE DE ADOÇANTES
DIETÉTICOS**

V. 1 ANÁLISE DE ADOÇANTES DIETÉTICOS

Enquanto o açúcar atua como parte da dieta alimentar das pessoas, os cientistas têm observado um aumento em problemas de saúde como cáries dentárias, diabetes tipo II e obesidade, problemas diretamente relacionados com a alimentação. Conseqüentemente, a substituição de açúcar comum por outras substâncias com poder de adoçar tem mudado hábitos alimentares e gerado muita discussão.

O uso de adoçante alternativamente à sacarose permite a obtenção de alimentos com baixo teor calórico e doçura normal. Ele pode assim ser apropriado para pessoas que têm restrições na ingestão de sacarose, frutose e glicose, como é o caso dos obesos e dos diabéticos. Neste contexto, o uso de edulcorantes, como ciclamato, sacarina, aspartame e esteviosídeo, ficou popular no Brasil, Europa e Ásia, países nos quais eles são comumente usados na produção de alimentos “light” e “diet” e também na produção de adoçantes de mesa.

Nos últimos 50 anos, muitos estudos foram realizados visando encontrar substitutos para a sacarose e, também, para monitorar a qualidade de alimentos que contêm edulcorantes. A avaliação da degradação de aspartame em bebidas e a determinação de contaminantes como metanol e anilina em alimentos que contêm aspartame e ciclamato, respectivamente, são alguns exemplos (Saurina et al., 2004; Sales & Cardeal, 2003). Além disso, ainda existe a necessidade de se garantir a qualidade do adoçante quanto ao edulcorante utilizado. Algumas pessoas apresentam restrição ao uso de alguns edulcorantes e, nesse caso, a presença deles deve constar no rótulo, além de outras informações importantes, como o limite de consumo diário. Em uma pesquisa realizada pelo IDEC (2007) os resultados constataram que os adoçantes e bebidas light desrespeitam o Código de Defesa do Consumidor quanto à omissão de dados importantes nos rótulos dos produtos em questão.

Dessa forma, o objetivo principal desse trabalho foi avaliar a eficiência da técnica de XRF aliada à quimiometria em estudos de diferenciação de compostos basicamente orgânicos, realizados com amostras de impacto social como os adoçantes dietéticos. O equipamento de XRF convencional de bancada, equipado com o tubo de raios X de Rh, foi empregado neste estudo.

Os adoçantes analisados são compostos por diferentes tipos de edulcorantes, os quais estão apresentados na Figura V.1.

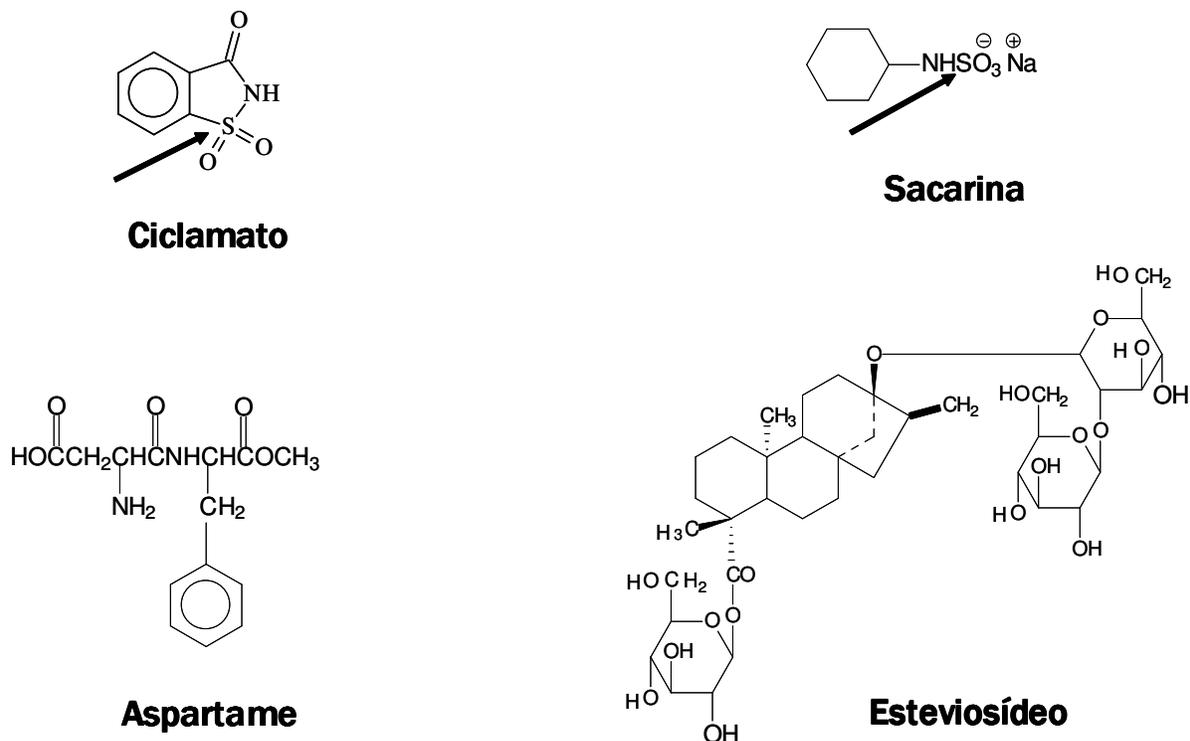


Figura V.1. Estruturas moleculares dos diferentes edulcorantes presentes nos adoçantes analisados.

V. 2 PARTE EXPERIMENTAL

Para realização desse estudo, foram analisadas vinte e seis amostras de adoçantes dietéticos líquidos de diferentes marcas, obtidas de supermercados locais. Detalhes sobre o procedimento, o equipamento, as condições de operação do EDXRF e o tratamento de dados estão descritos no item **IV. 2** desta tese, com o diferencial de que neste estudo, mais uma etapa de irradiação também foi realizada com voltagem de 15 kV aplicada ao tubo de Rh.

V. 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A voltagem aplicada aos tubos de raios X é um parâmetro comumente avaliado quando se propõe à determinação de elementos leves com maior eficiência, já que os coeficientes de absorção para esses elementos são maiores a baixas energias. Durante a realização deste estudo, foi possível perceber que este parâmetro também tem grande importância em análises que envolvem o uso do espalhamento da radiação X.

Quando se aplica baixa voltagem nos tubos de raios X, a energia alcançada, muitas vezes, não é suficiente para promover excitação de elétrons de camadas K dessas fontes e o que se observa como sinais do espalhamento da radiação X são as linhas pouco intensas, $L\alpha$ e $L\beta$ do Rh (Figura V.3.1).

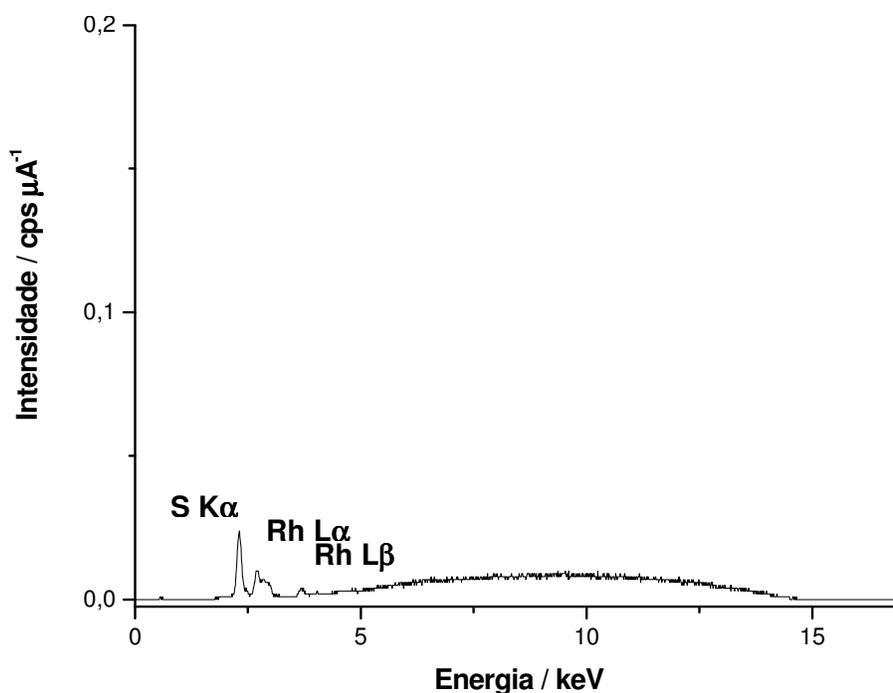


Figura V.3.1. Espectro de uma amostra de adoçante irradiada com 15 kV de voltagem aplicada ao tubo de Rh.

Ainda, analisando a Figura V.3.1, pode-se notar a presença de um pico de fluorescência de raios X, em 2,3 keV, referente ao elemento enxofre presente na amostra de adoçante analisada.

Em uma outra situação, trabalhando-se com energia suficiente para excitar elétrons de camadas K das fontes de raios X, o que se observa, geralmente, são sinais do espalhamento da radiação X que podem aparecer como as linhas $K\alpha$ e $K\beta$ (Compton e Rayleigh) da fonte de radiação, como pode ser observado no espectro obtido com tubo de Rh (Figura V.3.2). Nesse caso (Figura V.3.2), também é possível notar as linhas pouco intensas $K\alpha$ do S e $L\alpha$ do Rh.

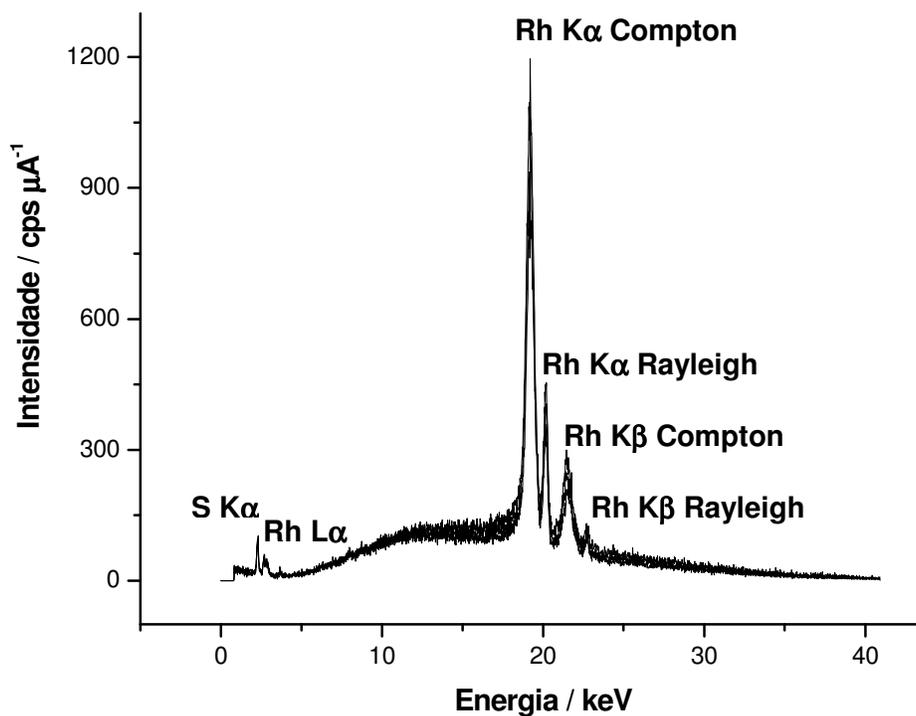


Figura V.3.2 Espectro de uma amostra de adoçante irradiada com 50 kV de voltagem aplicada ao tubo de Rh.

Dessa forma, fica evidente que, dependendo da amostra, certas condições de análise podem fornecer melhores resultados que outras.

Assim, trabalhando-se com os resultados provenientes da irradiação das amostras de adoçantes com 15 kV de voltagem aplicada ao tubo, realizou-se a análise exploratória não supervisionada dos espectros obtidos empregando-se PCA. Os dados foram centrados na média e todas as variáveis do espectro foram empregadas para geração dos resultados mostrados na Figura V.3.3.

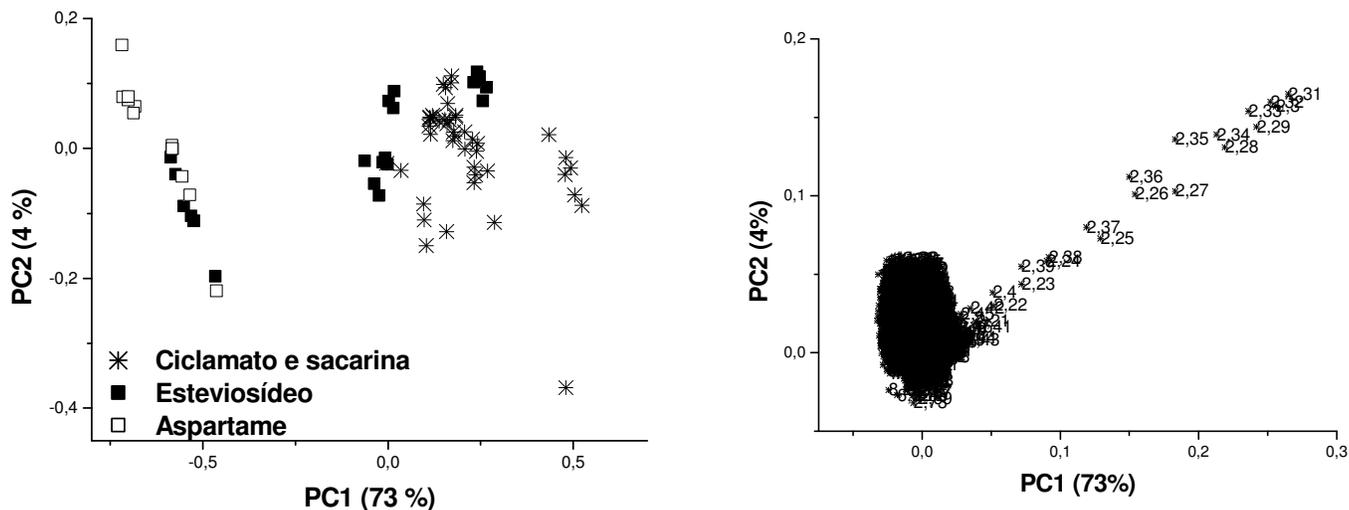
a) Gráfico de *scores* das amostras de adoçantes.b) Gráfico de *loadings* das amostras de adoçantes.

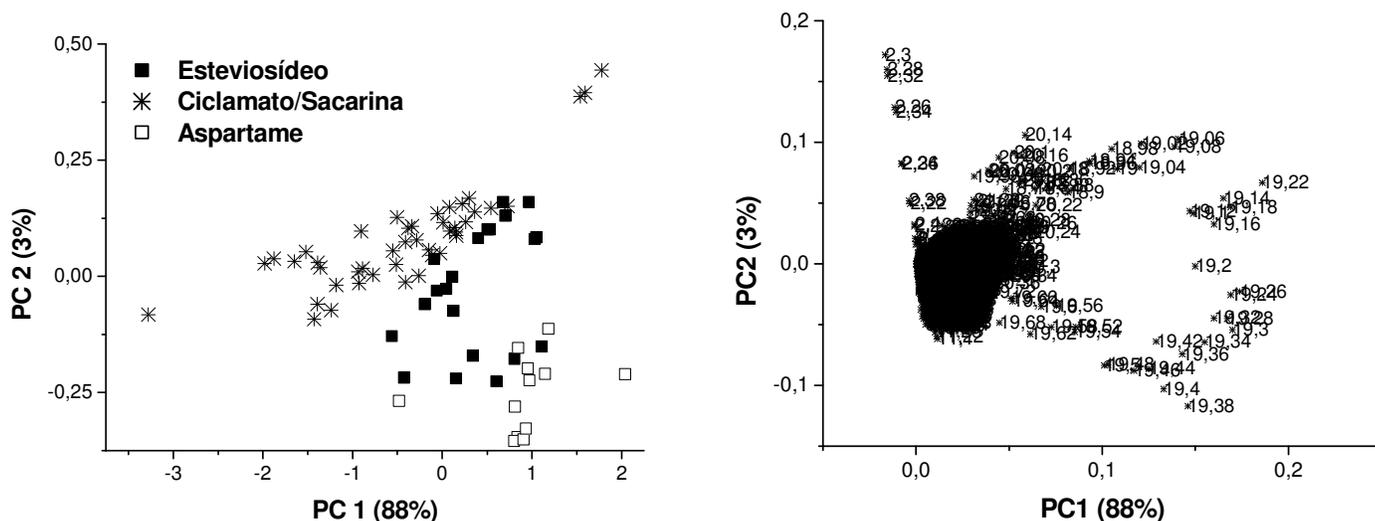
Figura V.3.3 Resultados de PCA das amostras de adoçantes dietéticos irradiadas com 15 kV de voltagem aplicada ao tubo de Rh.

É possível observar no gráfico de *scores* da Figura V.3.3a uma separação das amostras de adoçantes dietéticos em basicamente dois grupos. Considerando as estruturas dos edulcorantes presentes nas amostras analisadas (Figura V.1), associou-se a separação obtida à presença do átomo de enxofre no ciclamato de sódio e na sacarina sódica, que compõem certas amostras. Ainda vale ressaltar que algumas amostras de adoçantes a base de esteviosídeo, que se agruparam com amostras a base de ciclamato e sacarina, são justamente aquelas que contém, segundo seus rótulos, ciclamato e sacarina em suas composições, ou seja, são misturas dos três edulcorantes em questão.

O gráfico de *loadings* da Figura V.3.3b mostra que as variáveis responsáveis pelo agrupamento das amostras são os valores próximos a 2,3 keV, cujos valores são exatamente os que geram o pico de fluorescência $K\alpha$ do enxofre (fenômeno fotoelétrico). Pode-se dizer, então, que a influência do sinal de fluorescência foi maior que a dos sinais de espalhamento, o que condiz com o perfil do espectro mostrado na

Figura V.3.1, no qual é possível notar a linha $K\alpha$ do S bem mais intensa que as linhas $L\alpha$ e $L\beta$ do Rh.

Em uma outra situação, a irradiação das amostras foi realizada com 50 kV de voltagem aplicada ao tubo e os resultados obtidos, após serem analisados por PCA, estão representados na Figura V.3.4. Nesse caso, também centraram-se os dados na média e processou-se a PCA com todas as variáveis que compõem o espectro.



Nesse caso, não só a região do espalhamento de raios X foi importante para a separação dos compostos, mas o pico do enxofre representado por um sinal de fluorescência de raios X teve um papel fundamental para os resultados obtidos. Assim, empregando-se essa nova proposta de análise, é importante considerar que os resultados obtidos com toda a região espectral, além daquela em torno do espalhamento da radiação devem ser avaliados. Um estudo de seleção de variáveis é bastante adequado na otimização dos métodos da XRF aliada à quimiometria.

Em suma, nesse capítulo fica mostrada a potencialidade da técnica proposta em estudos de diferenciação de amostras orgânicas. Uma avaliação detalhada dos compostos em estudo pode fornecer importantes informações químicas, que se correlacionam muito bem com os resultados da análise multivariada. O uso do tubo de raios X mostrou que pode ser útil, dependendo da amostra a ser analisada, não fazendo da luz síncrotron um pré-requisito para estudos com o espalhamento da radiação X.

CAPÍTULO VI - ANÁLISE DE ÓLEOS VEGETAIS

VI. 1 ANÁLISE DE ÓLEOS VEGETAIS

Nos últimos anos, os consumidores têm demonstrado crescente interesse por alimentos de elevada qualidade, com clara identidade de origem. As razões variam desde patriotismo, qualidades organolépticas, hábitos de consumo específicos de cada região, possíveis benefícios à saúde associados com produtos de certas origens, exigência maior pela qualidade e segurança de alimentos produzidos fora da região ou país de consumo, até preocupações concernentes a métodos de produção ambientalmente corretos e que respeitem os animais. Paralelamente, a globalização do mercado de alimentos e a relativa facilidade com que as mercadorias são transportadas através de países e continentes vêm favorecendo o aparecimento de fraudes de forma que, cada vez mais os consumidores se preocupam com a autenticidade do alimento que consomem (Kelly et al., 2005). Uma recente matéria publicada pelo jornal britânico *The Independent* (2006) revela que fraudes em alimentos são atualmente um “grande negócio”, gerando imensos lucros aos criminosos. Em 2005, as alfândegas da União Européia (UE) chegaram, pela primeira vez na história, à marca de 5 milhões de produtos alimentícios apreendidos devido a falsificações (Food Navigator.com, 2006).

No Brasil, em 2001, Nagato et al. publicaram um trabalho sobre a fraude de bebidas no Brasil, no qual a autenticidade de bebidas alcoólicas (whisky, vodka, conhaque de gengibre, etc.), enviadas para análise ao Instituto Adolfo Lutz, foi verificada no período de 1993 a agosto de 1999.

Aued-Pimentel et al. (2002) testaram a pureza de 236 amostras de azeites de oliva, avaliando o teor de ácidos graxos presentes nessas amostras, entre janeiro de 1993 e setembro de 2000. Do total, 136 amostras também foram analisadas por espectrometria ultravioleta, para verificar se a qualidade dos produtos era condizente com a classificação da rotulagem. Foram observadas adulterações em 43 amostras (18,2%), sendo que o principal tipo de fraude foi adição de óleos vegetais de menor valor comercial, principalmente de soja. Esse fato sugere que um sistema de fiscalização mais eficiente no que se refere à comercialização desse tipo de amostra deveria ser implementado no país.

Dentro desse contexto de falsificação de alimentos, considerando análises de óleos comestíveis, nota-se que muitos trabalhos estão reportados na literatura ilustrando meios para identificação da amostra e de sua procedência. Geralmente, técnicas que empregam quimiometria no tratamento dos dados (Lanteri et al., 2002; Christy et al., 2004) têm sido propostas.

Assim, por se tratar de uma amostra complexa e de grande apelo no mercado industrial, avaliou-se neste trabalho a possibilidade de se empregar a nova técnica em questão, usando a análise exploratória de dados, para diferenciar amostras de óleos comuns (como os de soja, girassol, entre outros) e amostras de azeites de oliva. Isso possibilitaria, em estudos futuros, a construção de bancos de dados para identificação e classificação de amostras de diferentes tipos de óleos, inclusive identificação de azeites de oliva adulterados com óleos de pior qualidade.

A IOOC (International Olive Oil Council) estabelece em suas normas algumas categorias de azeites de oliva, sendo que a categoria dos extra-virgens é a dos azeites de oliva de melhor qualidade, com os maiores benefícios para a saúde. Considerando que isso também implica em um produto de maior custo, a adulteração de azeites extra-virgens com outros óleos vegetais como os de canola, girassol, soja ou até mesmo com azeites de oliva de pior qualidade, é prática no Brasil, já detectada pelo INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), principalmente quando o envasamento do produto importado é feito no próprio país (INMETRO, 2007). A fim de garantir a identidade e a qualidade desses produtos à população, segundo Aued-Pimentel et al. (2002), é necessário um aprimoramento dos laboratórios brasileiros de controle de adulterações e falsificações de óleos, contando principalmente com métodos e parâmetros rápidos e confiáveis para a realização das análises e classificações.

VI. 2 PARTE EXPERIMENTAL

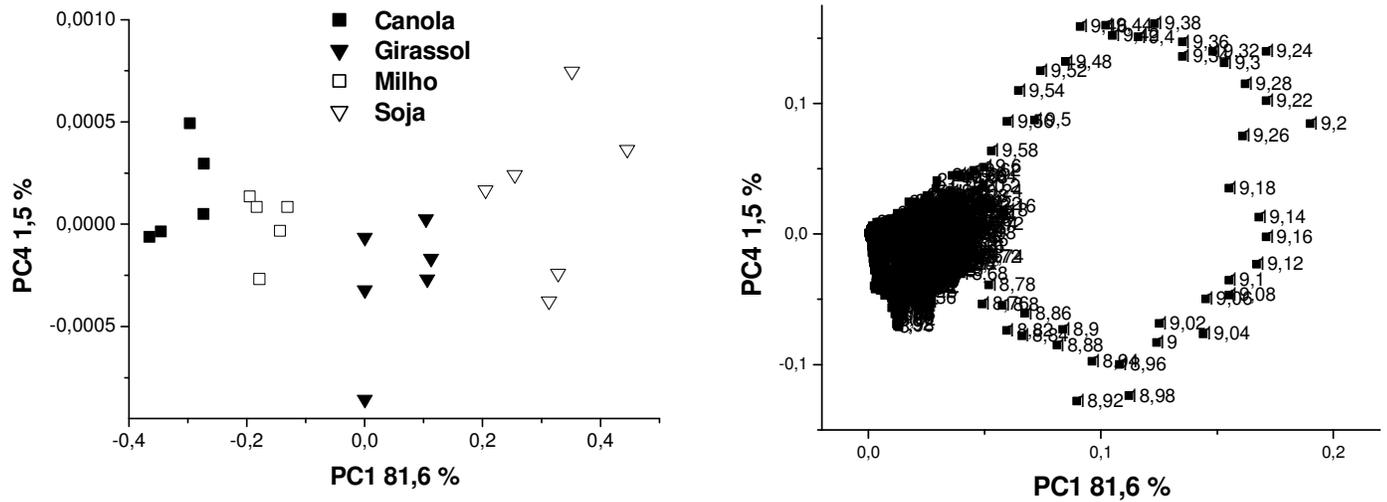
Seis diferentes tipos de óleos comestíveis (algodão, soja, milho, girassol, canola e oliva) de pelo menos quatro diferentes marcas comerciais, obtidos de supermercados locais, foram analisados. Detalhes sobre o procedimento para análise de amostras

líquidas, sobre o espectrômetro e as condições de operação do EDXRF são os mesmos descritos no item **IV. 2**.

Os espectros gerados foram usados para construção de matrizes de variáveis independentes (valores de energia, em keV) para serem analisadas por PCA, utilizando o programa *Pirouette 2.02*. O único pré-tratamento realizado com as variáveis originais foi centrar os dados na média antes do processamento de PCA. Neste estudo, o programa *The Unscrambler* não foi empregado, devido à sua indisponibilidade no laboratório na época em que se realizou o tratamento de dados.

VI. 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estudos descritos neste capítulo mostram resultados satisfatórios, considerando a separação dos diferentes tipos de óleos após análise por XRF e quimiometria. As análises foram conduzidas separadamente, considerando dois grupos de óleos: comuns e de azeites. Os resultados das amostras de óleos comuns, após serem processados por PCA, estão representados na Figura VI.3.1. Nesse caso, não só a região em torno de 19 keV, referente aos sinais de espalhamento da fonte, foi selecionada para o tratamento dos dados, mas toda a região espectral, que inclui também os possíveis sinais de fluorescência, ou seja, todas as variáveis que compõem o espectro obtido.

a) Gráfico de *scores* das amostras de óleos.b) Gráfico de *loadings* das amostras de óleos.**Figura VI.3.1** Resultados obtidos para as amostras de óleos após processar PCA.

Avaliando a composição dos óleos analisados, foi possível associar a formação dos grupos de óleos de soja, girassol, milho e canola apresentada no gráfico de *scores* (VI.3.1a) às diferentes proporções de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados presentes em cada tipo de amostra, que variam de acordo com suas diferentes fontes de origem. Um exemplo típico é a alta concentração de ácidos graxos monoinsaturados presentes nas amostras de óleos de canola, em comparação à baixa concentração desses compostos nos óleos de soja, (Lima et al., 2006).

Observando os resultados fornecidos pelo gráfico dos *loadings* (Figura VI.3.1b), nota-se que, mesmo trabalhando com o espectro todo, as variáveis de peso na separação das amostras correspondem às energias dos espalhamentos Compton, Rayleigh e Raman de raios X. Em outra situação de análise, na qual somente a região do espalhamento foi selecionada para o tratamento dos dados (18,00 – 24,00 keV), os resultados obtidos foram bastante semelhantes aos da Figura VI.3.1, comprovando que os sinais analíticos de importância na análise em questão são realmente os referentes ao espalhamento da radiação X.

Durante a análise dos azeites de oliva, outro resultado interessante foi obtido, após processamento dos dados por PCA. É possível observar no eixo da PC2 (Figura

VI.3.2) a formação de um grupo referente aos azeites de oliva extra-virgens e de um grupo que englobou todos os outros tipos de óleos de oliva. A ausência de água ou qualquer tratamento químico durante o processo de extração para produção dos azeites extra-virgens é o que pode estar diferenciando facilmente essas amostras dos outros azeites, além dos teores diferenciados das gorduras que compõem a amostra.

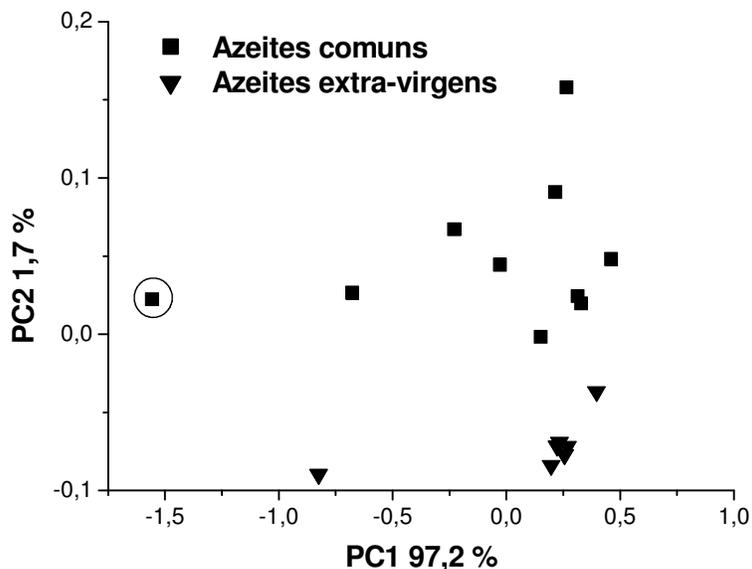


Figura VI. 3.2 Gráfico de *scores* das amostras de azeites obtido após processar PCA.

A amostra assinalada com o círculo na Figura VI.3.2 é um azeite extra-virgem que se diferencia dos demais azeites extra-virgens por ter sido temperado com um condimento chamado *Tartufo*, o qual deve ter modificado as características originais do azeite. Nesse caso, essa amostra pode ser considerada como um *outlier*.

A partir desses resultados, a técnica de XRF que usa a quimiometria para o tratamento de dados se mostra promissora para análises de amostras orgânicas, assim como NIR, FT-IR, MS, entre outras.

Em outro estudo realizado com amostras de azeites de oliva extra-virgem, uma adulteração foi simulada com 10% e 50% de óleo de soja, visando avaliar a capacidade da técnica em separar grupos de amostras de azeites extra-virgens autênticos de amostras de azeites extra-virgens adulterados, com diferentes quantidades de óleos de pior qualidade.

Os resultados obtidos após processamento dos dados por PCA estão mostrados na Figura VI.3.3, onde se observa a formação de basicamente dois grupos de óleos: o dos óleos autênticos e o dos óleos adulterados. Antes do processamento da PCA centaram-se os dados na média.

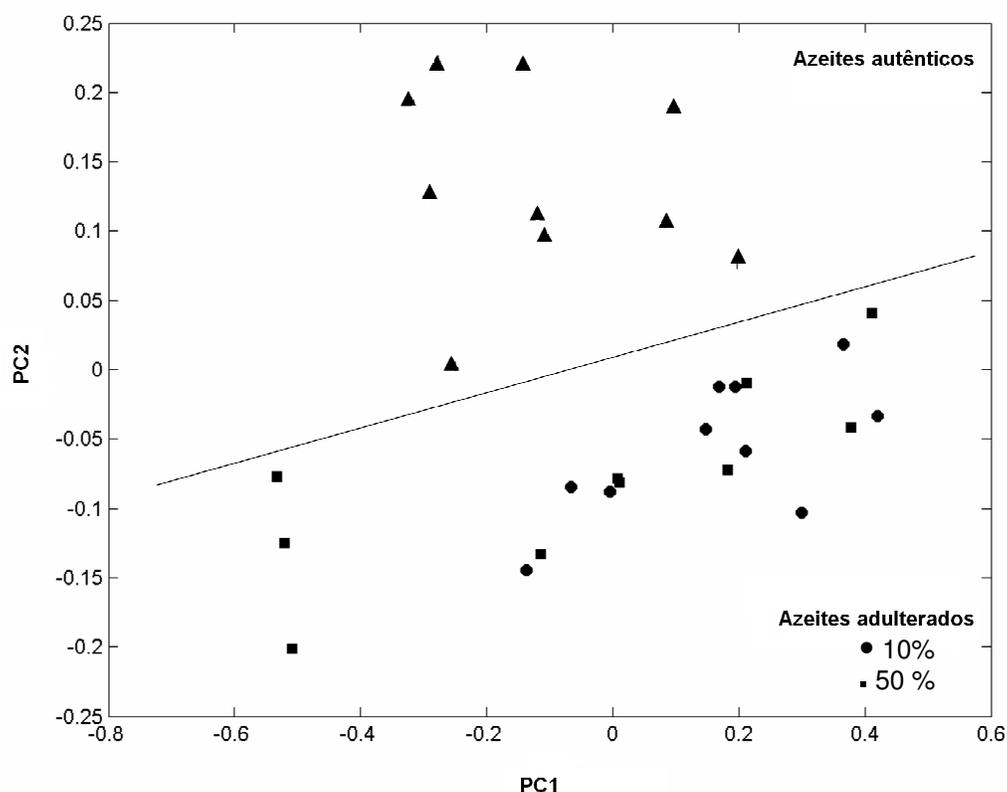


Figura VI.3.3 Gráfico de *scores* das amostras de óleos de oliva autênticos e adulterados, após processar PCA.

Embora outros testes tenham sido realizados visando à construção de modelos de calibração e de previsão para quantificação dos adulterantes nas amostras de azeites, os resultados obtidos não foram satisfatórios. Considerando que as adulterações foram simuladas com pequenas quantidades do óleo adulterante (1% até 10%), o que pode ter interferido na obtenção de uma boa resposta analítica é a baixa detectabilidade da técnica em questão para determinar compostos orgânicos em matriz leve como a de óleo, figura de mérito ainda não avaliada para a XRF aliada à quimiometria.

Assim, neste capítulo fica mais uma vez mostrada a potencialidade da técnica em empregar sinais do espalhamento para realizar análises químicas. Nesse caso específico dos óleos, o trabalho apresenta uma metodologia viável para ser implementada nos laboratórios de rotina de controle de qualidade de óleos. Obviamente, para isso, estudos mais detalhados devem ser realizados, principalmente visando à construção de modelos de classificação de amostras de óleos, empregando métodos supervisionados de análise multivariada como SIMCA ou KNN, por exemplo.

CAPÍTULO VII - ANÁLISE DE URINA

VII.1 ANÁLISE DE URINA

A técnica de XRF teve sua primeira aplicação para análise de urina reportada na literatura em 1969, quando Beyermann et al. determinaram quantidades em torno de nanogramas de cromo, utilizando 25 mL de urina, após uma etapa de pré-concentração com 8-quinolinol como agente quelante do analito. Até a década de 90, poucos trabalhos foram reportados na literatura (Agarwal et al., 1975; Vos et al., 1981; Ping et al., 1983), o que evidencia o desinteresse, na época, em utilizar a técnica para análises de amostras líquidas, principalmente de amostras líquidas complexas, como é o caso da urina.

Após o desenvolvimento da técnica de TXRF, o número de trabalhos que envolvem a aplicação da XRF em análises de amostras líquidas aumentou significativamente, colocando-a em pé de igualdade com outras técnicas espectroquímicas (Klockenkämper, 2006). De qualquer maneira, a aplicação de XRF em laboratórios de rotina ainda é bastante reduzida, sendo que os métodos espectrofotométricos, os eletroanalíticos e os baseados em absorção atômica e emissão óptica são os mais utilizados (Fleury, 1999).

Entretanto, se alguns aspectos interessantes da XRF forem considerados, como a não necessidade de um preparo laborioso de amostra e, principalmente, a possibilidade de determinação multielementar e simultânea de analitos inorgânicos e orgânicos (como vem sendo descrita nesta tese), a proposta de empregar XRF e quimiometria parece ser uma alternativa viável na área de análises clínicas. Recentemente, o laboratório Fleury Medicina e Saúde vem investindo em novos sistemas de análise de urina adquirindo novos equipamentos, visando à redução do tempo gasto nas análises realizadas pelos métodos tradicionais (SaudeBusinessWeb, 2007).

Nesse contexto, o trabalho descrito neste capítulo propõe o uso da espectrometria de raios X aliada a quimiometria para avaliar a quantificação multielementar e simultânea de Ca, P, Na, K, Mg e Cl, glicose, uréia e creatinina em urina, compostos frequentemente requisitados em exames clínicos, devido ao importante controle destes compostos no organismo.

A determinação de Ca em urina é útil na avaliação de cálculo renal, lesões ósseas, acidose tubular renal, etc. A determinação de P, na avaliação do balanço Ca/P, acidose tubular renal, uso de diuréticos, etc. A determinação de Na, no equilíbrio hidro-salino, oligúria renal, etc. A determinação de K, no balanço hidro-salino, ácido-básico, hipocalêmias renais, etc. A quantificação de Mg, na avaliação de homeostase. A quantificação de Cl, no metabolismo hidro-salino, ação de diuréticos, etc. A quantificação de uréia, como indicador da função renal. A quantificação de glicose, na glicosúria em diabéticos e a determinação de creatinina, como índice de várias substâncias (Fleury, 1999).

Para o desenvolvimento do método, uma parceria com o laboratório de análises clínicas da UNICAMP foi estabelecida, a qual previa o fornecimento das amostras e resultados das análises dessas amostras obtidos por métodos padrão de rotina.

Com a metodologia proposta, visa-se propor uma única alternativa para substituir os diversos métodos empregados para quantificação de cada analito, gerando assim economia de tempo e reagentes. Além disso, uma inovação dentro dos laboratórios de análises clínicas poderia ser implementada usando o banco de dados gerado pela técnica.

VII.2 PARTE EXPERIMENTAL

As amostras de urina (coletadas por 24 horas em frascos volumétricos de 2000 mL) cedidas pelo HC-UNICAMP são condicionadas em HNO_3 , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e armazenadas em geladeira em frascos volumétricos de polietileno menores, de 50 mL, por, no máximo, dois dias. Após esse tempo, as amostras são descartadas.

Para análise por XRF, porções analíticas (2 mL) são colocadas nos suportes específicos para análise no espectrômetro e, em seguida, são irradiadas por 100 segundos em um equipamento EDXRF, modelo EDX 700, marca Shimadzu, operando nas seguintes condições otimizadas: 15 kV de voltagem aplicada no tubo de Rh, corrente variável (para 25% de *dead-time* do detector) e 10 mm de colimação do feixe. Para análise por ICP OES, as amostras são diluídas a 50% e introduzidas diretamente no espectrômetro modelo Optima 3000 DV, marca Perkin-Elmer, utilizando os seguintes

parâmetros otimizados: visão axial do plasma, potência do plasma de 1,4 kW e vazões de nebulização da amostra e do gás auxiliar iguais a 0,6 L min⁻¹ e 0,5 L min⁻¹, respectivamente.

Os espectros gerados pelo EDXRF foram usados para construção de matrizes X, de variáveis independentes (valores de energia, em eV) e Y, de variáveis dependentes (concentrações de cada espécie nas amostras, obtidas pelo ICP OES para os elementos Ca, P, Na, K, Mg e Cl e pelos métodos padrão do HC-UNICAMP para uréia, glicose e creatinina). Os dados da matriz X foram centrados na média e analisados por PLS, para construção dos modelos de calibração, via *The Unscrambler*, versão 9.2 da CAMO.

VII.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os primeiros estudos com urina se iniciaram com a otimização da melhor condição de armazenamento das amostras em laboratório. Sabe-se que os exames de urina realizados em laboratórios de análises clínicas são feitos a partir da coleta e análise da amostra no mesmo dia, para que não haja perdas e/ou contaminação durante a estocagem do material. Entretanto, para o desenvolvimento de um método analítico em laboratório de pesquisa, este procedimento fica inviável e, portanto, um método eficiente de armazenamento da amostra teve que ser otimizado. Para isso, quantificaram-se os elementos de interesse em amostras de urina, imediatamente após a coleta e compararam-se os resultados obtidos com os das quantificações realizadas, utilizando-se as condições citadas abaixo.

1. Armazenamento durante 2 dias fora da geladeira, sem nenhum conservante;
2. Armazenamento durante 2 dias fora da geladeira, com HNO₃ 0,1 mol L⁻¹ como conservante;
3. Armazenamento durante 2 dias na geladeira, sem conservante;
4. Armazenamento na geladeira com HNO₃ 0,1 mol L⁻¹ como conservante por 1 dia, 2 dias e 3 dias.

O armazenamento da amostra de urina na geladeira, com HNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como conservante, por no máximo 2 dias, foi a melhor forma de estocar a amostra de urina no laboratório. Nesta situação, nenhum precipitado se formou no fundo dos frascos, como observado nas outras condições testadas, além dos testes não apresentarem diferença significativa entre os valores obtidos antes e depois da estocagem, para os elementos/compostos de interesse determinados. Além disso, a condição foi compatível com as necessidades requeridas para análise da amostra no ICP OES.

No decorrer do trabalho, outro fator limitante do desenvolvimento do método foi a dificuldade encontrada para obtenção dos resultados por métodos padrão utilizados no Hospital das Clínicas da UNICAMP. Assim, houve a necessidade de se empregar uma técnica de referência do IQ-UNICAMP para facilitar o desenvolvimento do método proposto.

A técnica de ICP OES, já bastante utilizada para esse tipo de análise (Fleury, 1999), foi avaliada e apresentou resultados em concordância com os fornecidos pelo laboratório do HC-UNICAMP. Assim, foi escolhida como técnica de referência para o desenvolvimento do método por XRF.

Para a otimização das melhores condições de análise do ICP OES, foram realizados testes envolvendo diferentes configurações do plasma, vazões de nebulização e do gás auxiliar e potência do plasma. Para diagnosticar o plasma, foi avaliada a robustez, que é um parâmetro geralmente analisado e pode ser calculada através da razão das intensidades dos sinais de MgII/MgI . Essa razão forneceu um resultado em torno de 10 para a matriz de urina, valor considerado adequado segundo Mermet (1991). Dessa forma, as condições de operação do ICP OES descritas no item VII.2 deste capítulo foram as selecionadas.

Considerando os testes realizados com o EDXRF, notou-se que os sinais obtidos, empregando-se diferentes condições de operação do espectrômetro, variavam de forma aleatória. Para otimizar as melhores condições do EDXRF, ou seja, que fornecessem os melhores sinais analíticos, considerando-se também o espalhamento como medida analítica, um planejamento fatorial 2^2 com ponto central foi realizado.

Como respostas do planejamento experimental, os coeficientes de regressão das curvas obtidas para cada analito, em cada experimento realizado, foram utilizados. Os fatores avaliados foram tempo de irradiação da amostra (100 e 1000 segundos) e voltagem aplicada ao tubo de Rh (15 e 50 kV). Os resultados obtidos se apresentam nas Figuras VII.3.1 a VII.3.6, ressaltando que a melhor condição de trabalho, representada nas superfícies de respostas, é a correspondente ao ponto (experimento) mais alto da superfície. Nesse estudo, pode-se concluir que tanto a voltagem aplicada ao tubo de Rh como o tempo de irradiação das amostras são fatores significativos na obtenção da melhor resposta.

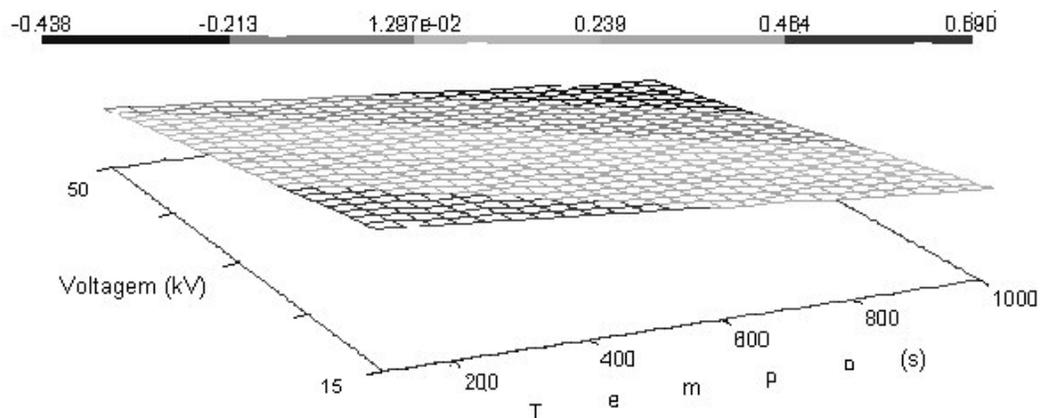


Figura VII.3.1 Superfície de resposta obtida para o elemento Ca.

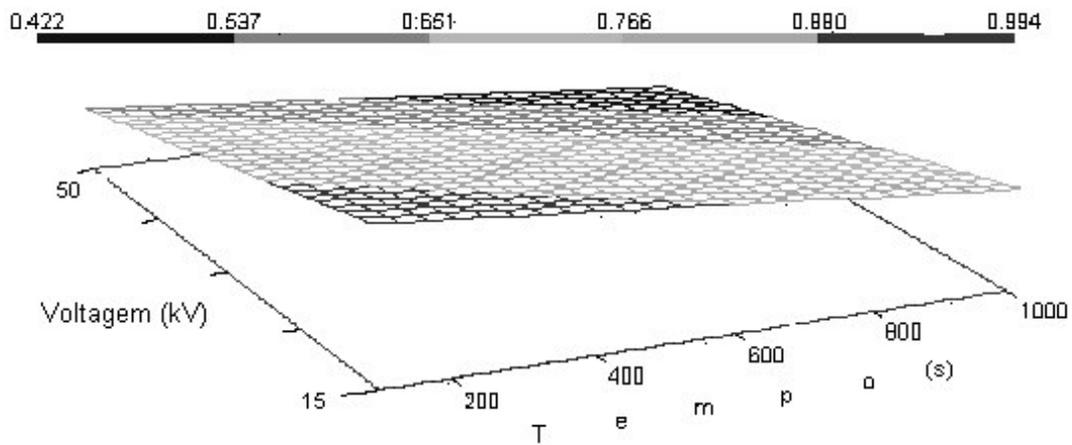


Figura VII.3.2 Superfície de resposta obtida para o elemento P.

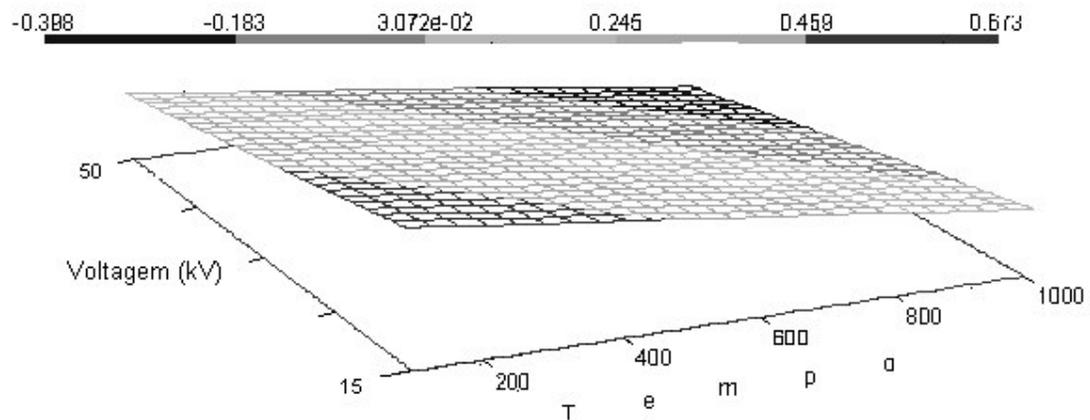


Figura VII.3.3 Superfície de resposta obtida para o elemento Mg.

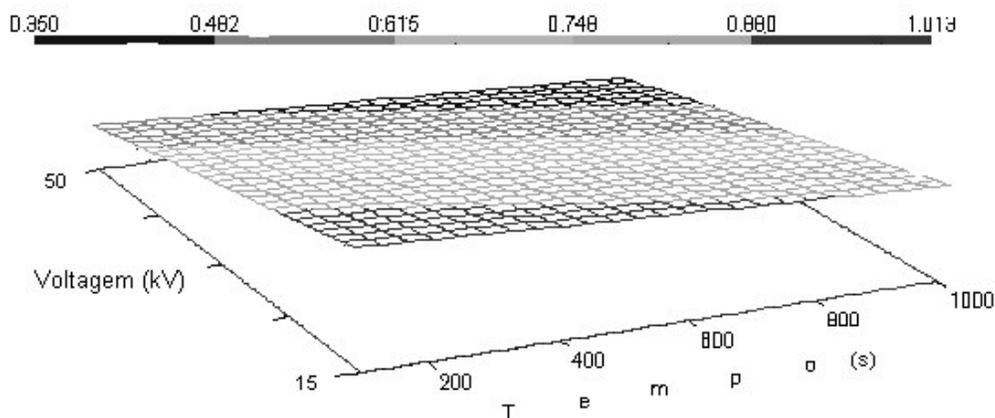


Figura VII.3.4 Superfície de resposta obtida para o elemento Cl.

Observando as Figuras VII.3.1 a VII.3.4, nota-se que a tensão aplicada ao tubo de raios X e o tempo de irradiação das amostras influenciaram na quantificação desses elementos (Ca, P, Mg e Cl) da mesma maneira, ou seja, quanto menor a tensão e menor o tempo de irradiação, melhor é a resposta obtida. Nesses casos, a quantificação simultânea de Ca, P, Mg e Cl é favorecida, empregando-se as condições do EDXRF estabelecidas em 15 kV e 100 segundos, enquanto 50 kV de tensão no tubo de Rh e 1000 segundos de irradiação das amostras levam aos piores resultados analíticos.

Nas Figuras VII.3.5 e VII.3.6, é possível observar que o fator tempo passou a não influenciar nas respostas para os analitos Na e K.

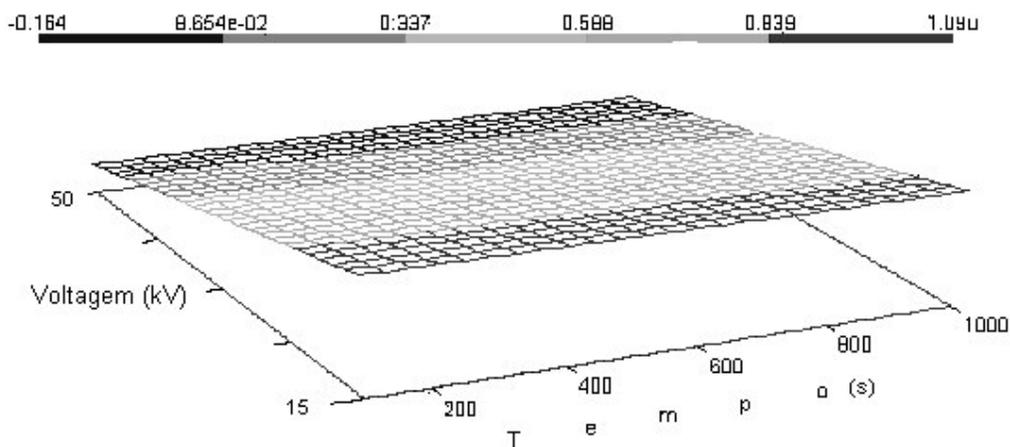


Figura VII.3.5 Superfície de resposta obtida para o elemento Na.

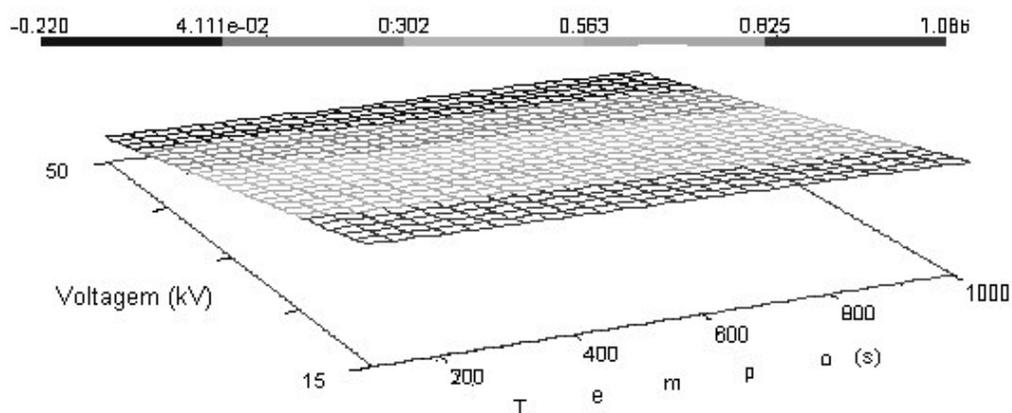


Figura VII.3.6 Superfície de resposta obtida para o elemento K.

Empregando-se qualquer tempo para irradiação das amostras de urina, os resultados obtidos para os elementos Na e K não se alteram, o que pode estar relacionado com as altas concentrações desses elementos na urina.

Tendo que optar por uma condição que atenda a análise simultânea de todos os analitos avaliados, escolheu-se continuar os estudos com as amostras de urina empregando-se o tempo de 100 segundos para irradiação das amostras e voltagem de 15 kV aplicada ao tubo de Rh.

A partir desses estudos, iniciou-se a construção dos modelos de calibração multivariada com espectros de FRX, obtidos nas condições ótimas de operação do EDXRF, e dados de referência do ICP OES (também obtidos com o ICP OES otimizado para analisar urina) para os elementos Ca, P, Na, K, Mg e Cl. Empregou-se o método PLS no modo *leave-one-out* para obtenção dos modelos, que estão representados nas figuras VII.3.7 a VII.3.12.

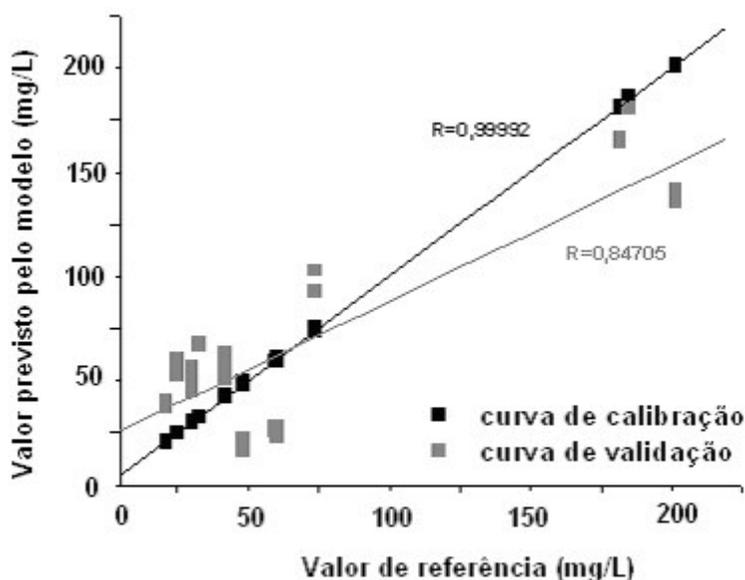


Figura VII.3.7 Curvas de calibração e validação obtidas para o Ca com 3 variáveis latentes, usando-se espectros de EDXRF convencional (valores previstos pelo modelo) e dados de ICP OES (valores de referência).

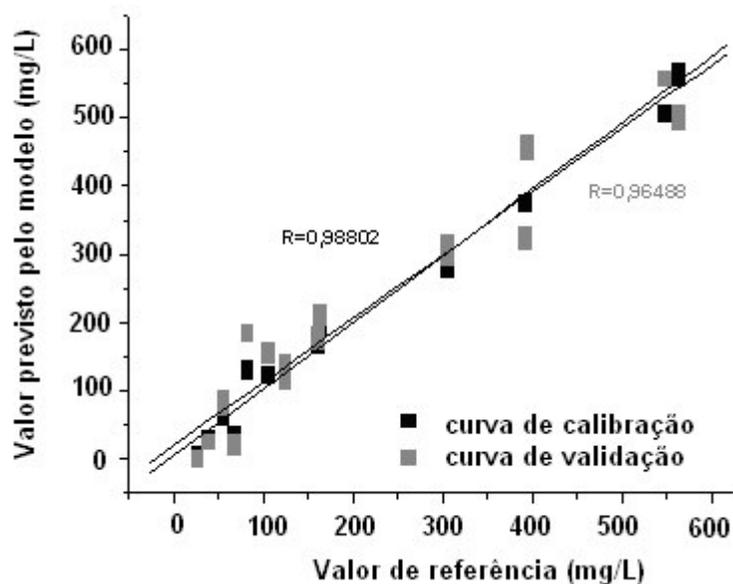


Figura VII.3.8 Curvas de calibração e validação obtidas por PLS para o P com 3 variáveis latentes, usando-se espectros de EDXRF convencional (valores previstos pelo modelo) e dados de ICP OES (valores de referência).

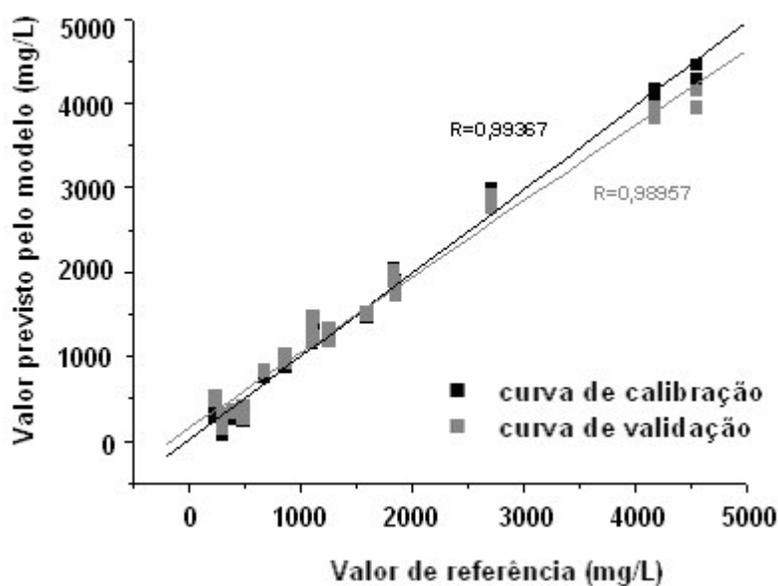


Figura VII.3.9 Curvas de calibração e validação obtidas por PLS para o Na com 2 variáveis latentes, usando-se espectros de EDXRF convencional (valores previstos pelo modelo) e dados de ICP OES (valores de referência).

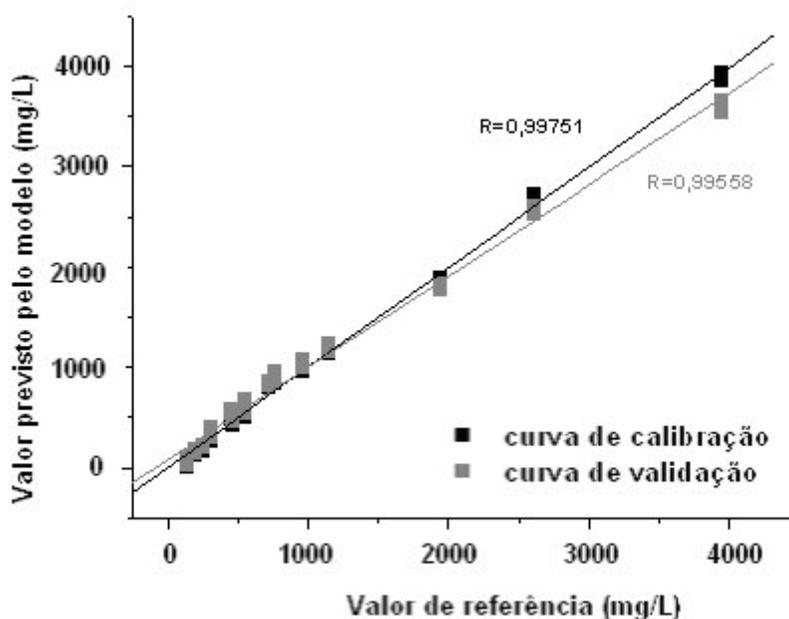


Figura VII.3.10 Curvas de calibração e validação obtidas por PLS para o K com 2 variáveis latentes, usando-se espectros de EDXRF convencional (valores previstos pelo modelo) e dados de ICP OES (valores de referência).

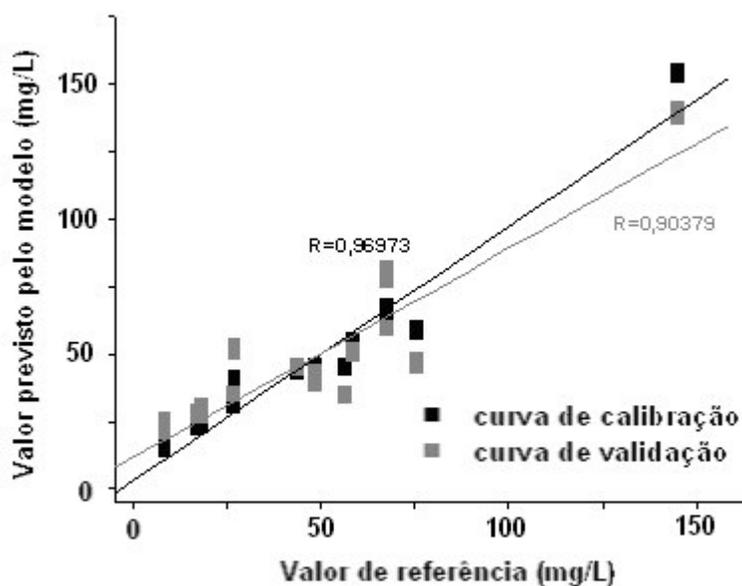


Figura VII.3.11 Curvas de calibração e validação obtidas por PLS para o Mg com 5 variáveis latentes, usando-se espectros de EDXRF convencional (valores previstos pelo modelo) e dados de ICP OES (valores de referência).

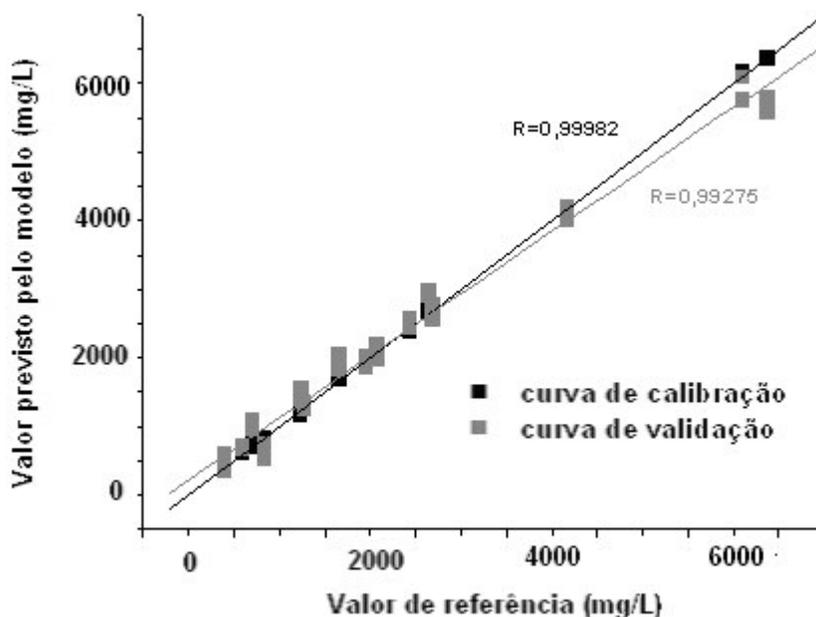


Figura VII.3.12 Curvas de calibração e validação obtidas por PLS para o CI com 2 variáveis, usando-se espectros de EDXRF convencional (valores previstos pelo modelo) e dados de ICP OES (valores de referência).

Os bons coeficientes de regressão das curvas apresentadas indicam modelos de calibração eficientes para realizar as determinações requeridas em amostras de urina.

Com as facilidades oferecidas pela análise multivariada, avaliou-se também a possibilidade de quantificar simultaneamente alguns compostos orgânicos rotineiramente requisitados nos exames urina: uréia, glicose e creatinina, utilizando as mesmas condições de irradiação. Os resultados estão mostrados nas figuras VII.3.13 a VII.3.15.

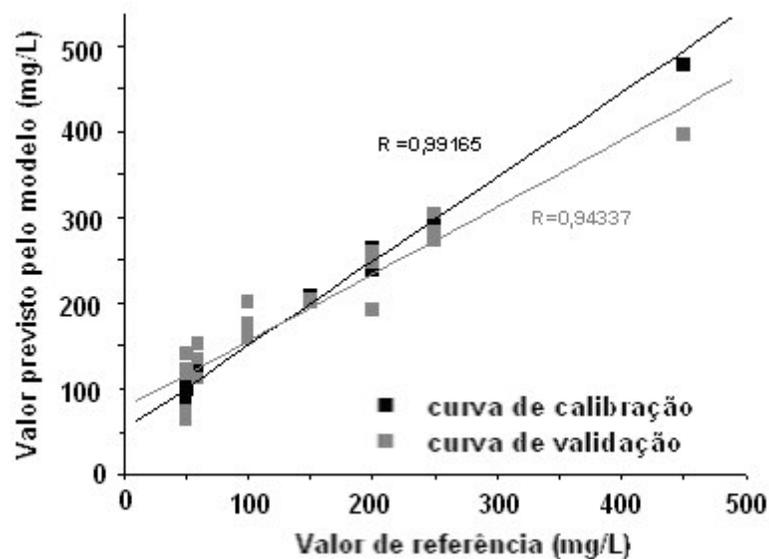


Figura VII.3.13 Curvas de calibração e validação da uréia com 4 variáveis, obtidas por PLS, usando-se espectros de EDXRF convencional (valores previstos pelo modelo) e dados do HC-UNICAMP (valores de referência).

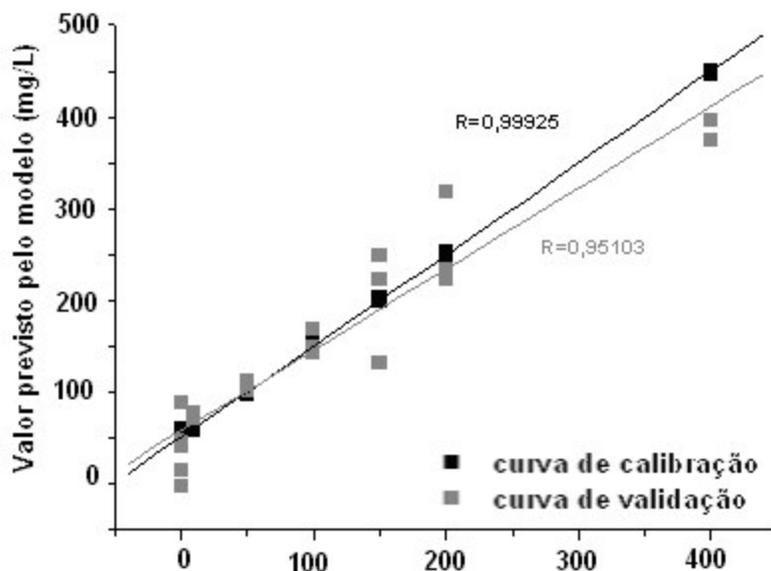


Figura VII.3.14 Curvas de calibração e validação da glicose com 4 variáveis, obtidas por PLS, usando-se espectros de EDXRF convencional (valores previstos pelo modelo) e dados do HC-UNICAMP (valores de referência).

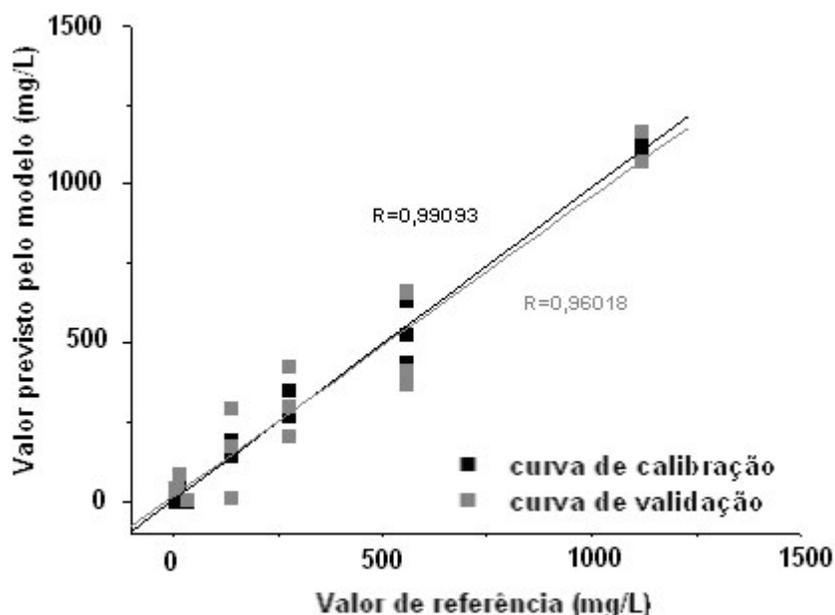


Figura VII.3.15 Curvas de calibração e validação obtidas por PLS para a creatinina com 4 variáveis latentes, usando-se espectros de EDXRF convencional (valores previstos pelo modelo) e dados do HC-UNICAMP (valores de referência).

Novamente, os coeficientes de regressão obtidos para as curvas de calibração e validação indicam modelos adequados para a determinação dos compostos em questão, em amostras de urina.

Utilizaram-se assim amostras retiradas do conjunto de validação (não incluídas no modelo de calibração), para testar a previsão dos valores dos elementos e compostos de interesse nas amostras de urina.

Os resultados estão apresentados na Tabela VII.3, na qual é possível observar resultados razoavelmente próximos entre os valores de referência e os valores previstos pelos modelos de calibração, embora alguns deles apresentem altos valores dos desvios padrão das medidas.

Tabela VII.3 Valores previstos pelos modelos de calibração construídos com dados do EDXRF para os diferentes analitos e valores de referência (obtidos por ICP OES para os elementos químicos e por métodos padrão do HC-UNICAMP para os compostos orgânicos).

Analito	Amostra	Valor previsto pelo modelo (mg L ⁻¹)	Valor de referência (mg L ⁻¹)
Ca	1	4,9 ± 0,3	5,5 ± 0,3
	2	23 ± 1	24 ± 1
	3	176 ± 2	176 ± 9
P	1	103 ± 4	125 ± 6
	2	328 ± 6	305 ± 15
	3	504 ± 9	564 ± 28
Na	1	238 ± 75	310 ± 15
	2	1232 ± 58	1250 ± 62
	3	3761 ± 56	3800 ± 90
K	1	133 ± 38	144 ± 7
	2	278 ± 18	308 ± 15
	3	1703 ± 27	1746 ± 85
Mg	1	15 ± 2	31 ± 1
	2	18 ± 2	27 ± 1
	3	11 ± 5	9,6 ± 0,5
Cl	1	264 ± 41	212 ± 11
	2	1408 ± 92	1464 ± 70
	3	5549 ± 94	5878 ± 98
Uréia	1	ND*	0,5 ± 0,1
	2	20 ± 3	15,5 ± 0,7
	3	50 ± 9	50 ± 3
Glicose	1	0,6 ± 0,5	0,5 ± 0,1
	2	14 ± 3	10 ± 1
	3	101 ± 14	100 ± 5
Creatinina	1	5,6 ± 4,8	8,8 ± 0,5
	2	305 ± 39	280 ± 14
	3	1116 ± 18	1120 ± 53

* ND = não detectado

Ainda, analisando a Tabela VII.3, nota-se que a quantificação do elemento Mg não foi satisfatória, considerando tanto a exatidão quanto a precisão da análise. Uma possível explicação para isso pode ser o fato de, nesse caso, oito variáveis latentes terem sido empregadas na construção do modelo proposto, o que deve ter causado um super ajustamento da curva, levando a tais resultados.

De qualquer maneira, com os estudos realizados, fica mostrada a potencialidade do método em realizar quantificações simultâneas de compostos orgânicos e inorgânicos em amostras de urina, o que pode gerar alternativas interessantes de análise dentro dos laboratórios de análises clínicas. Além disso, o fato desse tipo de análise funcionar para amostras de urina, perspectivas de análise podem ser consideradas para outros tipos de amostras, nas quais a determinação tanto de compostos orgânicos como de certos elementos químicos tenham importância considerável.

Considerando os resultados obtidos neste estudo, ainda é interessante mencionar que existe uma coerência em se empregar a menor voltagem no tubo para conseguir as melhores respostas analíticas para as análises das amostras de urina. Quando o EDXRF efetua as irradiações nessas condições, o equipamento seleciona uma faixa de energia para realizar a detecção dos sinais que se estende até ao redor de 15 keV. Exatamente nessa região, muitos sinais $K\alpha$ de fluorescência dos elementos de interesse estariam se manifestando, além das linhas $L\alpha$ e $L\beta$ do tubo de Rh, que aparecem como espalhamento da radiação. Ou seja, não haveria necessidade de se ampliar o espectro para detectar altas energias referentes a elementos mais pesados.

Outra conclusão interessante é que os resultados obtidos neste trabalho confirmaram que a melhor condição de análise a ser escolhida depende fortemente do tipo de amostra que se está estudando. A melhor condição do EDXRF para análise de urina foi diferente daquela mais apropriada para avaliar as amostras de adoçantes, assim como o tubo de Rh, utilizado como fonte de excitação, também mostrou ser eficiente nesse caso, conclusão oposta àquela em que foi empregado para irradiar amostras a base de carbono e amostras de álcoois.

CAPÍTULO VIII - CONCLUSÕES

VIII. 1 CONCLUSÕES

Considerando os resultados mostrados nos capítulos anteriores fica provada a potencialidade da técnica de XRF aliada à quimiometria para análises de diferentes tipos de amostras como álcoois, adoçantes, óleos vegetais e urina.

Nos primeiros capítulos, o uso do espalhamento de raios X como sinal analítico foi fundamental para abrir novas perspectivas de se empregar a XRF em análises de amostras orgânicas de matriz leve, simples e complexas, um desafio da área de espectrometria de raios X, até então.

Nos estudos com as amostras de adoçantes dietéticos e óleos vegetais, foi possível avaliar a possibilidade de se empregar a técnica em estudos de identificação de amostras, de grande interesse dentro da área de alimentos.

O desenvolvimento do método de determinação simultânea dos elementos Ca, P, Na, K, Mg, Cl e dos compostos glicose, uréia e creatinina em urina, embora com algumas pendências para ser aplicado na prática, ilustra outros aspectos positivos da técnica proposta, baseados em análises rápidas e de baixo custo, atendendo às necessidades dos grandes laboratórios de análises clínicas como os do HC-UNICAMP e Fleury, por exemplo.

Assim, esta tese se apresenta como um trabalho pioneiro que visa incentivar o desenvolvimento de novos trabalhos, dentro da área em que está sendo proposta. Algumas funcionalidades, possibilidades e potencialidades da XRF aliada à quimiometria, aqui apresentadas podem vir a ser bastante úteis em estudos futuros.

**CAPÍTULO IX -
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

IX. 1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, M.; BENNETT, R.B.; STUMP, I.G.; D'AURIA, J. Analysis of urine for trace elements by energy dispersive x-ray fluorescence spectrometry with a pre-concentrating chelating resin. **Analytical Chemistry**, v. 47, n. 6, p. 924-927, 1975.

ALEXANDRE, T.L.; BUENO, M.I.M.S. Classification of some species, genera and families of plants by x-ray spectrometry. **X-Ray Spectrometry**, v. 35, p. 257-260, 2006.

ARO, A.; AMARASIRIWARDENA, C.; LEE, M.L; KIM, R.; HU, H. Validation of K x-ray fluorescence bone lead measurements by inductively coupled plasma mass spectrometry in cadaver legs. **Medical Physics**, v. 27. n.1, p. 119-123, 2000.

AUED-PIMENTEL, S.; TAKEMOTO, E.; MINAZZI-RODRIGUES; R.S.; BADOLATO, E.S.G. Azeite de oliva: incidência de adulterações entre os anos de 1993 a 2000. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 61, n. 2, p. 69-75, 2002.

Azeite de Oliva II **INMETRO**. 07 de mar. 2004. Disponível em <<http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/azeite2.asp>>. Acesso em 25 mar. 2007.

BARILARO, D; BARONE, G.; CRUPI, V.; MAJOLINO, D.; MAZZOLENI, P.; TRISCARI, M.; VENUTI, V. Characterization of ancient amphorae by spectroscopic techniques. **Vibrational Spectroscopy**, v. 42, p. 381-386, 2006.

BARTHUS, R.C.; MAZO, L. H.; POPPI, R.J. Determinação simultânea de NADH e ácido ascórbico usando voltametria de onda quadrada com eletrodo de carbono vítreo e calibração multivariada. **Eclética Química**, v. 30, p. 51-58 , 2005.

BAZHANOVA, V.V; GULJAEVA, L.F.; KRASILNIKOV, S.E.; TITOVA, V.S.; SHAPORENKO, A.D.; SHULGA, Y. Using XRF SR for the study of changes in elemental composition of healthy and pathological tissues of human organisms. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A**, doi: 10.1016/j.nima.2007.01.069, 2007.

BERGMANN, U.; GLATZEL, P.; CRAMER, S.P. Bulk-sensitive XAS characterization of light elements: from X-ray Raman scattering to X-ray Raman spectroscopy. **Microchemical Journal**, v. 71, p. 221-230, 2002.

BEYERMANN, K.; ROSÈ, H.J.; CHRISTIAN, R.P. The determination of nanogram amounts of chromium in urine by x-ray fluorescence spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 45, p. 51-55, 1969.

BIANCATO, D.; CECCATO, D.; CHIMINELLO, F.; MITTNER, P. Micro-PIXE and principal component analysis in a study of internal mixing phenomena in Antarctic coastal aerosol. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 249, p. 561-565, 2006.

BOEYKENS, S.; VÁZQUEZ, C. Preliminary classification of polymers by using total-reflection X-ray fluorescence spectra. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 59, p. 1189-1192, 2004.

BORJESSON, J.; ISAKSSON, M.; MATTSSON, S. X-ray fluorescence analysis in medical sciences: a review. **Acta Diabetologica**, v. 40, p. S39-S44, 2003.

BORTOLETO, G.G.; PATAÇA, L.C.M.; BUENO, M.I.M.S. A new application of X-ray scattering using principal component analysis - classification of vegetable oils. **Analytica Chimica Acta**, v. 539, p. 283-287, 2005.

BORTOLETO, G.G.; BORGES, S.S.O.; BUENO, M.I.M.S. X-ray scattering and multivariate analysis for classification of organic samples: a comparative study using Rh tube and synchrotron radiation. **Analytica Chimica Acta**, V.595, P.38 - 42, 2007.

BOS, M.; VRIELINK, J.A.M. The influence of scattering processes in quantitative X-ray fluorescence analysis. **Analytica Chimica Acta**, v.545, p. 92-98, 2005.

BUENO, M.I.M.S.; CASTRO, M.T.P.O.; DE SOUZA, A. M.; DE OLIVEIRA, E.B.S.; TEIXEIRA, A.P. X-ray scattering processes and chemometrics for differentiating complex samples using conventional EDXRF equipment. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 78, p. 96-102, 2005.

CALLIGARO, T. New developments in photodetection: photodetector at *Le Louvre*. X-ray, γ -ray and visible spectrometries applied to art and archeology issues. **Centre de Recherche et de Restauration des Musées de France**, Paris, 21 jun. 2002. Disponível em: <<http://beaune.in2p3.fr/sessions/calligaro.pdf>>. Acesso em 26 mar. 2007.

CHRISTY, A.A.; KASEMSUMRAN, S.; DU, Y.; OZAKI, Y. The detection and quantification of adulteration in olive oil by near-infrared spectroscopy and chemometrics. **Analytical Sciences**, v. 20, p. 935-940, 2004.

COMPTON, A.H. The corpuscular properties of light. **Physical Review Supplement**, v.1, p. 74-89, 1929.

Counterfeit food a "serious threat" says EC. **FoodNavigator.com**, Montpellier, 13 nov. 2006. Disponível em: <<http://www.foodnavigator.com/news/ng.asp?id=72010>>. Acesso em 20 mar. 2007.

CORNEJO-PONCE, L.; PERALTA-ZAMORA, P.; BUENO, M.I.M.S. Pre-concentration of rare earths using silica gel loaded with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (PAN) and determination by energy dispersive X-ray fluorescence. **Talanta**, v. 46, p. 1371-1378, 1998.

FARQUHARSON, M.J.; GERAKI, K.; FALKENBERG, G.; LEEK, R.; HARRIS, A. The localization and micro-mapping of copper and other trace elements in breast tumors using a synchrotron micro-XRF system. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 65, p. 183-188, 2007.

FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P.L.O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.

Fleury modifica sistema de análise de urina. **SaúdeBusinessWeb**, 20 de março 2007. Disponível em: <http://www.saudebusinessweb.com.br/sbw_artigo.vxlpub?id=117169>. Acesso em 26 de março de 2007.

GELADI P. Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics. **Spectrochimica Acta B**, v. 58, p. 767-782, 2003.

GELADI, P.; KOWALSKI, B.R. Partial least-squares regression: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 185, p. 1-17, 1986.

GORAIEB, K.; LOPES, A.S.; SATO, C.A.; SEGATELLI, M.G.; SILVA, V.P.; VERZOTO, J.C.; BUENO, M.I.M.S. Characterization of Portland cements by X-ray spectrometry allied to chemometrics. **Journal of Chemometrics**, v.20, p. 455 - 463, 2006.

VAN GYSEL, M; LEMBERGE, P.; VAN ESPEN, P. Description of Compton peaks in energy-dispersive x-ray fluorescence spectra. **X-ray Spectrometry**, v. 32, p. 139-147, 2003.

HENRIQUES, C.B.; BUENO, M.I.M.S. Método de quantificação de parâmetros da indústria petrolífera por espalhamento de raios-X e quimiometria. **Universidade Estadual de Campinas (Campinas)** n.PI 0502763-2. 04 jul. 2005., 27 fev. 2007.

HOPKE, P.K. The evolution of chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 500, p. 365-377, 2003.

IIJIMA, S. Helical microtubes of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, p. 56-58, 1991.

Element 111 is named roentgenium, **IUPAC** 08 nov. 2004. Disponível em: <<http://www.iupac.org/news/archives/2004/naming111.html>>. Acesso em 25 jul. 2007.

JENKINS, R. **X-Ray Fluorescence Spectrometry**. 2^{ed.}, New York: Wiley-Interscience, 1999.

KELLY, S.; HEATON, K.; HOOGEWERFF, J. Tracing the geographical origin of food: the application of multi-element and multi-isotope analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 555-567, 2005.

KESSIER, T.; HOFFMANN, P.; GREVE, T.; ORTNER, H.M. Optimization of the identification of chemical compounds by energy-dispersive x-ray fluorescence spectrometry and subsequent multivariate analysis. **X-ray Spectrometry**, v. 31, p. 383-390, 2002.

KLOCKENKÄMPER, R. Challenges of total reflection X-ray fluorescence for surface – and thin-layer analysis. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 61, p. 1082-1090, 2006.

LANTERI, S.; ARMANINO, C.; PERRI, E.; PALOPOLI, A. Study of oils from Calabrian olive cultivars by chemometrics methods. **Food Chemistry**, v. 76, p. 501-507, 2002.

LIDE, D.R. **Handbook of Chemistry and Physics**, 77.ed, Boca Raton: CRC, 1996.

LIMA, D.M; COLUGNATI, F.A.B.; PADOVANI, R.M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; SALAY, E.; GALEAZZI, M.A.M. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO. **Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA**, Campinas, 2006. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_versao2.pdf>. Acesso em 21 jan. 2007.

LUO, L. Chemometrics and its applications to x-ray spectrometry. **X-Ray Spectrometry**, v. 35, p. 215-225, 2006.

Manual de exames. **Laboratórios Fleury**. São Paulo: Laboratório Fleury S/C Ltda, 1999.

MARCÓ, L. M.; GREAVES, E.D.; ALVARADO, J. Analysis of human blood serum and human brain samples by total reflection X-ray fluorescence spectrometry applying Compton peak standardization. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 54, p. 1469-1480, 1999.

MARGUÍ, E.; HIDALGO, M.; QUERALT, I.; Multielemental fast analysis of vegetation samples by wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry: possibilities and drawbacks. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 60, p. 1363-1372, 2005.

MEINSCHAD, T.; STRELI, C.; WOBRAUSCHEK, P.; EISENMENGER-SITTNER, C. Construction of a windowless Si-anode X-ray tube for a more efficient excitation of low Z elements on Si-wafer surfaces in total reflection fluorescence analysis. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 58, p. 2069-2077, 2003.

MERMET, J. M. Use o magnesium as a test element for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry diagnostics. **Analytica Chimica Acta**, v. 250, p. 85-94, 1991.

MISRA, N.L.; SINGH MUDHER, K.D. Total reflection X-ray fluorescence: a technique for trace element analysis in materials. **Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials**, v. 45, p. 65-74, 2002.

MIZUNO, Y.; OHMURA, Y. Theory of X-Ray Raman scattering. **Journal of the Physical Society of Japan**, v.22, n. 2, p. 445-449, 1967.

MOLT, K.; SCHRAMM, R. Determination of light elements in organic liquid matrices by principal component regression in EDXRS using backscattered radiation. **X-ray Spectrometry**, v. 28, p. 59-63, 1999.

MUKHAMEDSHINA, M.N.; MIRSAGATOVA, A.A. Application of X-ray fluorescence for the analysis of some technological materials. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 63, p. 715-722, 2005.

NAGATA, N. Avaliação das Propriedades Pré-Concentradoras de Metais das Sílicas Modificadas para Análise por Fluorescência de Raios-X. **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Química – UNICAMP – Campinas, SP, 1997.

NAGATA, N.; PERALTA-ZAMORA, P.G.; POPPI, R.; PEREZ, C. A.; BUENO, M.I.M.S. Multivariate calibrations for the SR-TXRF determination of trace concentrations of lead and arsenic in the presence of bromine. **X-ray Spectrometry**, v. 35, p. 79-84, 2006.

NAGATO, L.A.F.; DURAN, M.C.; CARUSO, M.S.F.; BARSOTTI, R.C.F.; BADOLATO, E.S.G. Monitoramento da autenticidade de amostras de bebidas alcoólicas enviadas ao Instituto Adolfo Lutz em São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p.39-42, 2001.

NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401-1406, 2006.

PAPACHRISTODOULOU C.; OIKONOMOU, A.; IOANNIDES, K.; GRAVANI, K. A study of ancient pottery by means of X-ray fluorescence spectroscopy, multivariate statistics and mineralogical analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 573-574, p. 347-353, 2006.

PAPPALARDO, L.; KARYDAS, A.G.; KOTZAMANI, N.; PAPPALARDO, G.; ROMANO, F.P.; ZARKADAS, C. Complementary use of PIXE-alpha and XRF portable systems for the non-destructive and in situ characterization of gemstones in museums. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 239, p.114-121, 2005.

PEREIRA, F.M.V.; PEREIRA-FILHO, E.R.; BUENO, M.I.M.S. Development of a methodology for calcium, iron, potassium, magnesium, manganese, and zinc quantification in teas using X-ray spectroscopy and multivariate calibration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 5723-5730, 2006.

Pesquisa do IDEC constata: adoçantes e bebidas light desrepeitam o Código de Defesa do Consumidor. **IDEC – Parceiro do Consumidor**, 21 jun. 2006. Disponível em: <<http://www.idec.org.br/emanacao.asp?id=1153>>. Acesso em 02 fev. 2007.

PING, L.; MATSUMOTO, K.; FUWA, K. Internal standardization in energy-dispersive x-ray fluorescence spectrometric determination of trace elements in urine after preconcentration with a chelating filter. **Analytical Chemistry**, v. 55, p. 1819-1821, 1983.

POTTS, P.J.; ELLIS, A.T.; KREGSAMER, P.; MARSHALL, J.; STRELI, C.; WEST, M.; WOBRAUSCHEK, P. Atomic spectrometry update. X-ray fluorescence spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 18, p. 1297-1316, 2003.

SAURINA, J.; HLABANGANA, L.; GARCÍA-MILLA, D.; HERNÁNDEZ-CASSOU, S. Flow-injection analysis of amine contaminants in cyclamate samples based on temperature for controlling selectivity. **Analyst**, v. 129, p. 468-474, 2004.

SALES, J.A.; CARDEAL, Z.L. Headspace solid-phase micro-extraction gas chromatography method for the determination of methanol in aspartame sweeteners. **Food Additives and Contaminants**, v. 20, n. 6, p. 519-523, 2003.

SCHRAMM R. Chemometrics methods in energy dispersive X-ray fluorescence. **Analytica Chimica Acta**, v. 420, p. 197-203, 2000.

SHALEV, S.; SHILSTEIN, S.S.; YEKUTIELI, Y.; XRF study of archaeological and metallurgical material from an ancient copper-smelting site near ein-Yahav, Israel. **Talanta**, v. 70, p. 909-913, 2006.

SILVA, F.V.; KAMOGAWA, M.Y.; FERREIRA, M.M.C.; NÓBREGA, J.A.; NOGUEIRA, A.R.A. A discriminação geográfica de águas minerais do Estado de São Paulo através da análise exploratória. **Eclética Química**, v. 27, p. 91-102, 2002.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIENMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**, 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

STRELI, C.; PEPPONI, G.; WOBRAUSCHEK, P.; JOKUBONIS, C.; FALKENBERG, G.; ZÁRAY, G.; BROEKAERT, J.; FITTSCHEN, U.; PESCHEL, B. Recent results of synchrotron radiation induced total reflection X-ray fluorescence analysis at HASYLAB, beamline L. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 61, p. 1129-1134, 2006.

SUZUKI, T. X-Ray Raman scattering. Experiment I. **Journal of the Physical Society of Japan**, v.22, n.5, p. 1139-1150, 1967.

SUZUKI, T.; KISHIMOTO, T.; KAJI, T.; SUZUKI, T. X-Ray Raman Scattering. II. Experiment with Cr $k\alpha$ Radiation. **Journal of the Physical Society of Japan**, v.29, n.3, p. 730-736, 1970.

SWERTS, J.; VAN ESPEN, P.; GELADI, P. Partial least squares techniques in the energy-dispersive X-ray fluorescence determination of sulfur-graphite mixtures. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 9, p. 1181-1185, 1993.

SWERTS, J.; AERTS, A.; DE BISCOP, N.; ADAMS, F.; VAN ESPEN, P. Age determination of Chinese porcelain by X-ray fluorescence and multivariate analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 22, p. 97-105, 1994.

TEIXEIRA, L.S.G.; ROCHA, R.B.S.; SOBRINHO, E.V.; GUIMARÃES, P.R.B.; PONTES, L.A.M.; TEIXEIRA, J.S.R. Simultaneous determination of copper and iron in automotive gasoline by X-ray fluorescence after preconcentration on cellulose paper. **Talanta**, doi:10.1016/j.talanta.2006.12.042, 2007.

The truth about food fraud. **The Independent**, London, 20 nov. 2006. Disponível em: <http://enjoyment.independent.co.uk/food_and_drink/features/article1996801.ece>. Acesso em 20 de março de 2006.

TOHJI, K.; UDAGAWA, Y. Novel approach for structure analysis by X-ray Raman scattering. **Physical Review B**, v. 36, p. 9410-9414, 1987.

TOHJI, K.; UDAGAWA, Y. X-ray Raman scattering as a substitute for soft-X-ray and extended X-ray-absorption fine structure. **Physical Review B**, v. 39, p. 7590-7594, 1989.

URBANSKI, P.; KOWALSKA, E. Application of partial least-squares calibration methods in low-resolution EDXRS. **X-ray Spectrometry**, v. 24, p. 70-75, 1995.

VÁZQUEZ, C.; BOCYKENS, S.; BONADEO, H. Total reflection X-ray fluorescence polymer spectra: classification by taxonomy statistic tools. **Talanta**, v. 57, p. 1113-1117, 2002.

VERBI, F.M.; PEREIRA-FILHO, E.R.; BUENO, M.I.M.S. Use of X-ray scattering for studies with organic compounds: a case study using paints. **Microchimica Acta**, v. 150, p. 131-136, 2005.

VOS, L.; ROBBERECHT, P.; VAN DYCK, P.; VAN GRIEKEN, R. Multi-element analysis of urine by energy-dispersive x-ray fluorescence spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 130, p. 167-175, 1981.

WANG, Y.; ZHAO, X.; KOWALSKI, B.R. X-ray fluorescence calibration with partial least-squares. **Applied Spectroscopy**, v. 44, p.998 – 1002, 1990.

WIERZCHOS, J.; ASCASO, C.; AGER, F. J.; GARCÍA-ORELLANA, I.; CARMONA-LUQUE, A.; RESPALDIZA, M.Á. Identifying elements in rocks from the Dry Valleys desert (Antarctica) by ion beam proton induced X-ray emission. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 249, p. 571-574, 2006.

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 2, p. 37-52, 1987.

ZHU, D.; CHENG, H.S.; LIN, J.W.; YANG, F.J. PIXE study on the provenance of Chinese ancient porcelain. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 249, p. 633-637, 2006.