



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Avaliação da calibração em LA-ICP-MS usando  
papel filtro para análise de plantas**

---

**Tese de Doutorado**

**Matheus Augusto Gonçalves Nunes**

**Santa Maria, RS - Brasil  
2015**

# **Avaliação da calibração em LA-ICP-MS usando papel filtro para análise de plantas**

---

por

**Matheus Augusto Gonçalves Nunes**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para a obtenção do grau de  
**Doutor em Ciências.**

Orientador: Dr. Valderi Luiz Dressler

Santa Maria, RS - Brasil  
2015

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

**Avaliação da calibração em LA-ICP-MS usando papel filtro  
para análise de plantas**

elaborada por

**Matheus Augusto Gonçalves Nunes**

Como requisito parcial para a obtenção do título de  
**Doutor em Ciências**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Dr. Valderi Luiz Dressler - Orientador (UFSM - RS)**

---

**Dr. Fábio Andrei Duarte (UFSM - RS)**

---

**Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega (UFSCar - SP)**

---

**Dr. Juliano Smanioto Barin (UFSM - RS)**

---

**Dr. Sergio Roberto Mortari (UNIFRA - RS)**

Santa Maria, 13 de janeiro de 2015.

## **Declaração**

A pesquisa descrita nesta Tese foi totalmente elaborada por mim e as informações retiradas da literatura estão devidamente referenciadas. Esta Tese não foi apresentada anteriormente para obtenção de qualquer outro grau.

**Matheus Augusto Gonçalves Nunes**

Dedico este trabalho à minha família.

**“Muitos são os obstinados que se empenham no caminho que escolheram, poucos os que se empenham no objetivo.”**

*Friedrich Nietzsche*

## AGRADECIMENTOS

---

---

Ao **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Maria pela possibilidade de execução do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. **Valderi Luiz Dressler**, pela amizade, orientação e por todas as contribuições ao longo do meu desenvolvimento como químico analítico, além do acompanhamento das atividades desempenhadas na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Joaquim de Araújo Nóbrega**, pela participação como banca examinadora e por todas as considerações para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Fábio Andrei Duarte**, pela amizade e pelas importantes contribuições na avaliação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Juliano Smanioto Barin**, pela amizade e pela participação como banca examinadora, além das considerações para o melhoramento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Sergio Roberto Mortari**, pela amizade e por todas as contribuições como membro da banca examinadora deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Érico Marlon de Moraes Flores**, pelo exemplo profissional e pelas oportunidades disponibilizadas para o meu crescimento profissional e pessoal, além da amizade.

À **Michele**, pelos momentos juntos.

A todos os professores e colegas do grupo **LAQIA/CEPETRO**, pela amizade e companheirismo durante a convivência dentro e fora do laboratório.

Ao **Ademir** e **Valéria** do PPGQ-UFSM, pela disposição e auxílio durante a execução do trabalho.

## SUMÁRIO

---

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....	xiii
<b>RESUMO</b> .....	xiv
<b>ABSTRACT</b> .....	xv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	5
<b>3.1. Laser - um breve histórico</b> .....	5
<b>3.2. Princípios básicos do laser</b> .....	6
<b>3.3. Utilização do laser para introdução de amostras em ICP-MS</b> .....	8
3.3.1. Interação da radiação laser com sólidos.....	11
<b>3.4. Ablação por laser acoplada à espectrometria de massa com plasma         indutivamente acoplado</b> .....	13
3.4.1. Limite de detecção em LA-ICP-MS.....	15
3.4.2. Calibração em LA-ICP-MS.....	16
3.4.2.1. Calibração com padrões sem ajuste de matriz .....	19
3.4.2.2. Calibração com padrões com ajuste de matriz .....	20
3.4.3. Análise de plantas por LA-ICP-MS .....	22
<b>3.5. Calibração em LA-ICP-MS utilizando papel filtro</b> .....	24
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
<b>4.1. Instrumentação</b> .....	27
<b>4.2. Reagentes e soluções</b> .....	35
<b>4.3. Amostras</b> .....	36
<b>4.4. Otimizações do sistema de LA-ICP-MS</b> .....	37
4.4.1. Estudo do volume de solução absorvido pelo papel filtro .....	37
4.4.2. Avaliação da vazão do gás carregador para as determinações por LA-ICP-MS .....	39

---

4.4.3. Efeito da adição de vapor de água e ácido nítrico na câmara de ablação .....	39
4.4.4. Avaliação dos parâmetros de ablação para análise de amostras de plantas por LA-ICP-MS .....	40
<b>4.5. Calibração em LA-ICP-MS utilizando papel filtro.....</b>	<b>40</b>
<b>4.6. Efeito da pressão utilizada para obtenção dos comprimidos das amostras .....</b>	<b>41</b>
<b>4.7. Análise de amostras de plantas por LA-ICP-MS.....</b>	<b>42</b>
<b>4.8. Distribuição elementar em folha de sene por LA-ICP-MS.....</b>	<b>42</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1. Caracterização das amostras de plantas medicinais.....</b>	<b>44</b>
5.1.1. Preparo das amostras.....	44
5.1.2. Determinação da distribuição do tamanho de partícula .....	44
5.1.3. Determinação da composição elementar das amostras de plantas.....	49
<b>5.2. Otimização das condições de ablação .....</b>	<b>50</b>
5.2.1. Avaliação do volume de solução de referência no papel filtro .....	52
5.2.2. Avaliação da vazão do gás carregador.....	54
5.2.3. Avaliação da adição de aerossol no gás carregador .....	61
5.2.4. Avaliação dos parâmetros do laser.....	67
<b>5.3. Calibração por LA-ICP-MS utilizando papel filtro .....</b>	<b>72</b>
5.3.1. Limites de detecção e quantificação por LA-ICP-MS.....	80
5.3.2. Determinação da faixa de calibração por LA-ICP-MS.....	82
<b>5.4. Efeito da pressão de compactação dos comprimidos para análise por LA-ICP-MS .....</b>	<b>87</b>
<b>5.5. Análise de plantas por LA-ICP-MS.....</b>	<b>90</b>
<b>5.6. Determinação da distribuição elementar em folha de sene.....</b>	<b>95</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>99</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>101</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Representação do laser de rubi criado por Theodore Maiman, em 1960. <sup>22</sup> .....	5
<b>Figura 2.</b>	Transições eletrônicas que ocorrem durante a geração de laser. (A) Átomo no estado fundamental; (B) excitado e (C) emissão estimulada de radiação. <sup>23</sup> .....	6
<b>Figura 3.</b>	Esquema básico dos componentes de um sistema de geração de laser. ....	7
<b>Figura 4.</b>	Escala de tempo aproximada para os processos que ocorrem com lasers de nanossegundo e femtossegundo. Adaptado da referência 36. ....	12
<b>Figura 5.</b>	Configuração geral de um sistema de LA-ICP-MS.....	14
<b>Figura 6.</b>	Equipamento de ICP-MS utilizado (A) e detalhe das conexões para análise com nebulização pneumática (B) e para ablação com laser (C). ....	27
<b>Figura 7.</b>	Sistema de ablação com laser utilizado no trabalho. ....	29
<b>Figura 8.</b>	Equipamento de ICP OES utilizado no trabalho.....	31
<b>Figura 9.</b>	Sistema de destilação utilizado para a determinação de N pelo método micro-Kjeldahl.....	32
<b>Figura 10.</b>	Analizador elementar utilizado para a determinação de S e Cl em plantas.....	33
<b>Figura 11.</b>	(A) Procedimento de adição da solução de referência sobre o papel filtro e (B) secagem do papel filtro com aquecimento por infravermelho.....	34
<b>Figura 12.</b>	Amostras de plantas moídas e comprimidas: anis-estrelado, boldo, espinheira-santa, maracujá e quebra-pedra.....	37
<b>Figura 13.</b>	Disco de papel filtro posicionado sobre lâmina de vidro para ablação.....	38
<b>Figura 14.</b>	Representação do perfil do sinal gerado durante a análise por LA-ICP-MS.....	38
<b>Figura 15.</b>	Diagrama das condições avaliadas para a análise de plantas por LA-ICP-MS. ....	43

<b>Figura 16.</b> Perfil da distribuição do tamanho de partículas nas amostras de plantas moídas (n = 5).....	45
<b>Figura 17.</b> Imagens das superfícies dos comprimidos de (A) anis-estrelado; (B) boldo; (C) espinheira-santa; (D) maracujá e (E) quebra-pedra.....	47
<b>Figura 18.</b> Ilustração da linha traçada na imagem da amostra para ablação com laser.....	51
<b>Figura 19.</b> Intensidades normalizadas para avaliação da distribuição de V, Sr, Cd e Pb no papel filtro (n = 3). .....	53
<b>Figura 20.</b> Exemplo do perfil de sinal obtido e resultados reportados durante a avaliação do Ar carregador. ....	56
<b>Figura 21.</b> Avaliação da formação de óxidos e íons de carga dupla em LA-ICP-MS. ....	56
<b>Figura 22.</b> Avaliação da intensidade do $^{59}\text{Co}$ em diferentes vazões de Ar como gás carregador. ....	58
<b>Figura 23.</b> Avaliação da intensidade do $^{115}\text{In}$ em diferentes vazões de Ar como gás carregador. ....	58
<b>Figura 24.</b> Avaliação da intensidade do $^{238}\text{U}$ em diferentes vazões de Ar como gás carregador. ....	59
<b>Figura 25.</b> Intensidade do $^{13}\text{C}$ em diferentes vazões de Ar como gás carregador.....	59
<b>Figura 26.</b> Efeito da adição de aerossol úmido sobre a intensidade do sinal do V, Cr, Mn e Co, em LA-ICP-MS (n = 3). ....	63
<b>Figura 27.</b> Efeito da adição de aerossol úmido sobre a intensidade do sinal do Zn, As, Se, Cd, La e Ce, em LA-ICP-MS (n = 3). ....	64
<b>Figura 28.</b> Efeito da adição de aerossol úmido sobre a intensidade do sinal do Ni, Cu, Sr, Ba, Tl e Pb, em LA-ICP-MS (n = 3).....	65
<b>Figura 29.</b> Efeito da velocidade de varredura na aquisição do sinal para $^{55}\text{Mn}$ por LA-ICP-MS.....	68
<b>Figura 30.</b> Efeito da velocidade de varredura na aquisição do sinal para $^{112}\text{Cd}$ por LA-ICP-MS.....	68
<b>Figura 31.</b> Efeito da velocidade de varredura na aquisição do sinal para $^{208}\text{Pb}$ por LA-ICP-MS.....	69
<b>Figura 32.</b> Efeito do diâmetro do feixe de laser no sinal para $^{55}\text{Mn}$ por LA-ICP-MS.....	70

---

<b>Figura 33.</b> Efeito do diâmetro do feixe de laser no sinal para $^{112}\text{Cd}$ por LA-ICP-MS.....	71
<b>Figura 34.</b> Efeito do diâmetro do feixe de laser no sinal para $^{208}\text{Pb}$ por LA-ICP-MS.....	71
<b>Figura 35.</b> Curvas de calibração obtidas por LA-ICP-MS utilizando os procedimentos sem normalização e com normalização com $^{13}\text{C}$ (n = 3).....	74
<b>Figura 36.</b> Curva de calibração para $^{65}\text{Cu}$ obtida por LA-ICP-MS com normalização do sinal em relação ao $^{13}\text{C}$ .....	83
<b>Figura 37.</b> Perfil dos sinais obtidos para $^{65}\text{Cu}/^{13}\text{C}$ com adições de duas e três alíquotas de 40 $\mu\text{L}$ da solução de referência de 10 $\text{mg L}^{-1}$ sobre o mesmo papel filtro. ....	84
<b>Figura 38.</b> Curvas de calibração obtidas por LA-ICP-MS para $^{138}\text{Ba}$ , $^{55}\text{Mn}$ , $^{88}\text{Sr}$ e $^{64}\text{Zn}$ . ....	86
<b>Figura 39.</b> Efeito da pressão de compactação para obtenção dos comprimidos de quebra-pedra nos resultados de $^{51}\text{V}$ , $^{138}\text{Ba}$ e $^{208}\text{Pb}$ por LA-ICP-MS (n = 3). ....	89
<b>Figura 40.</b> Fotografia do comprimido de uma amostra após a ablação com laser. ....	91
<b>Figura 41.</b> Perfil do sinal obtido para $^{138}\text{Ba}$ na folha de sene durante a análise da distribuição elementar por LA-ICP-MS. ....	96
<b>Figura 42.</b> Imagens da distribuição de diferentes elementos em folha de sene.....	97

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1.</b>	Aplicações de diferentes tipos de laser combinados à técnica de ICP-MS. Adaptado da referência 15.....	9
<b>Tabela 2.</b>	Condições operacionais para a análise de plantas por ICP-MS.....	28
<b>Tabela 3.</b>	Condições operacionais para a análise de plantas por LA-ICP-MS. ....	30
<b>Tabela 4.</b>	Condições operacionais para a análise de plantas por ICP OES.....	31
<b>Tabela 5.</b>	Condições operacionais para a determinação de S e Cl total pelo analisador elementar Multi EA <sup>®</sup> 5000.....	33
<b>Tabela 6.</b>	Diâmetro médio das partículas em diferentes proporções volumétricas obtidas após moagem criogênica e peneiramento (n = 5).....	48
<b>Tabela 7.</b>	Composição elementar das amostras de plantas (n = 3). ....	50
<b>Tabela 8.</b>	LD e LQ determinados para a técnica de LA-ICP-MS empregando papel filtro para calibração e para ICP-MS com nebulização pneumática (n = 10). ....	81
<b>Tabela 9.</b>	Resultados obtidos por ICP-MS e ICP OES em material de referência certificado e amostra de quebra-pedra após decomposição ácida assistida por micro-ondas (n = 3).....	88
<b>Tabela 10.</b>	Resultados, em $\mu\text{g g}^{-1}$ , obtidos por ICP-MS e LA-ICP-MS para as amostras de plantas (n = 3).....	92
<b>Tabela 11.</b>	Resultados obtidos por LA-ICP-MS, em $\mu\text{g g}^{-1}$ , para os materiais de referência certificados de plantas (n = 3).....	94

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

---

---

1.  $\Delta\lambda$ , variação de comprimento de onda
2. **CRM**, material de referência certificado, do inglês *certified reference material*
3. **ETV-ICP-MS**, vaporização eletrotérmica combinada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *electrothermal vaporization coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry*
4. **GF AAS**, espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês *graphite furnace atomic absorption spectrometry*
5. **ICP OES**, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*
6. **ICP-MS**, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma mass spectrometry*
7. **LA-ICP-MS**, ablação com laser combinada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *laser ablation coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry*
8. **LAMIS**, ablação com laser combinada à espectrometria isotópica molecular, do inglês *laser ablation molecular isotopic spectroscopy*
9. **Laser**, amplificação da luz por emissão estimulada de radiação, do inglês *light amplification by stimulated emission of radiation*
10. **LA-SF-ICP-MS**, ablação com laser combinada à espectrometria de massa com setor eletromagnético com plasma indutivamente acoplado, do inglês *laser ablation coupled to sector field inductively coupled plasma mass spectrometry*
11. **LIBS**, espectroscopia de emissão com plasma induzido por laser, do inglês *laser-induced breakdown spectroscopy*
12. **m/z**, razão massa/carga
13. **TIMS**, espectrometria de massa com ionização térmica, do inglês *thermal ionization mass spectrometry*
14. **VSI**, interferometria de varredura vertical, do inglês *vertical scanning interferometry*

## RESUMO

---

---

### **Título: Avaliação da calibração em LA-ICP-MS usando papel filtro para análise de plantas**

Autor: Matheus Augusto Gonçalves Nunes

Orientador: Dr. Valderi Luiz Dressler

Neste trabalho foi investigado um procedimento de calibração para a determinação de As, Ba, Cd, Ce, Co, Cr, Cu, La, Mn, Ni, Pb, Se, Sr, Tl, V e Zn em amostras de plantas medicinais por ablação com laser combinada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LA-ICP-MS). A inovação do trabalho deve-se à proposta de utilização de papel filtro para calibração como um material que represente a matriz de amostras de plantas, devido principalmente às semelhanças em relação à distribuição e concentração de carbono no papel e em amostras de origem vegetal. Essas condições, associadas a outras propriedades dos elementos determinados, possibilitaram a utilização do isótopo  $^{13}\text{C}$  como um elemento de referência durante as análises por LA-ICP-MS. Uma das principais vantagens do procedimento proposto é a possibilidade de utilização de soluções de referência aquosas, adicionadas sobre o papel filtro (secas antes da etapa de ablação), evitando assim os métodos de preparo de padrões sólidos geralmente empregados para a calibração na técnica de LA-ICP-MS. Nesse sentido, foi avaliado o efeito da normalização do sinal de cada analito em função do  $^{13}\text{C}$ , a utilização de vapor úmido e vapor seco na câmara de ablação, a vazão do gás carregador, a energia e diâmetro do feixe de laser e o efeito da pressão aplicada para obtenção dos comprimidos das amostras moídas, além da faixa de calibração para cada elemento. A exatidão dos resultados obtidos por LA-ICP-MS foi avaliada através da análise de materiais de referência certificados de amostras de plantas, além da comparação com os resultados obtidos por ICP-MS e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), após decomposição das amostras por via úmida assistida por radiação micro-ondas. Os limites de detecção por LA-ICP-MS foram cerca de 1 a 2 ordens de magnitude superiores aos obtidos com a análise das amostras decompostas. O procedimento possibilitou a análise multielementar direta em amostras de plantas, além da determinação da distribuição dos elementos em amostra de folha de planta medicinal.

## ABSTRACT

---

---

### **Title: Evaluation of calibration in LA-ICP-MS using filter paper for plant analysis**

Author: Matheus Augusto Gonçalves Nunes

Advisor: Dr. Valderi Luiz Dressler

In this work, a new calibration strategy was investigated for the determination of As, Ba, Cd, Ce, Co, Cr, Cu, La, Mn, Ni, Pb, Se, Sr, Tl, V and Zn in medicinal plants by laser ablation and inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). The main innovation of this work was the use of filter paper for calibration, due to its similarities with botanical samples regarding to carbon concentration and distribution through both materials. These conditions allowed the use of  $^{13}\text{C}$  as a reference element during the analysis by LA-ICP-MS. An advantage of the proposed procedure is the possibility of using aqueous standard solutions to perform the calibration, which were placed on the filter paper and dried before ablation, avoiding the time-consuming procedures of standard preparation for LA-ICP-MS analysis. In this way, parameters as analyte signal normalization with  $^{13}\text{C}$ , use of dry or wet aerosol during the ablation, carrier gas flow rate, laser energy, spot size, pressure applied for pellet preparation and calibration range were investigated. Accuracy of LA-ICP-MS determinations were evaluated by analysis of certified reference materials of vegetal composition, as well as by comparison with results obtained by ICP-MS and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) after microwave assisted sample digestion. Limits of detection obtained by LA-ICP-MS were 1 to 2 orders higher than those obtained by ICP-MS with pneumatic nebulization. Besides the application of LA-ICP-MS for multielement analysis of plant samples, the method was successfully applied for imaging of elemental distribution in a leaf of medicinal plant.

## 1. INTRODUÇÃO

---

Informações relacionadas à concentração e distribuição de elementos essenciais e contaminantes em plantas são de grande interesse em diversas áreas, entre elas, nutrição, na atividade agrícola, assim como em pesquisas ambientais. O conhecimento da concentração de vários elementos permite estabelecer estratégias para a correção de deficiências e melhoramento de plantas.<sup>1,2</sup> A determinação de elementos essenciais e contaminantes geralmente é feita na parte foliar do material, a qual é submetida a procedimentos de amostragem, limpeza, secagem, homogeneização e decomposição empregando misturas ácidas, antes da etapa de determinação por técnicas de espectrometria atômica, principalmente.<sup>3-6</sup> Os procedimentos utilizados para a decomposição ácida de amostras de plantas são relativamente simples, mas alguns métodos de decomposição envolvendo o uso de sistemas abertos, sob elevadas temperaturas, podem ser considerados morosos e passíveis de erros relacionados à contaminação ou perda de elementos voláteis, quando comparados aos métodos de análise direta.<sup>7-9</sup> Nesse sentido, técnicas como a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) têm sido combinadas a técnicas como a vaporização eletrotérmica (ETV) e a ablação com laser (LA) para a análise direta de sólidos.<sup>10,11</sup>

A ablação com laser combinada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LA-ICP-MS) é uma importante ferramenta, na qual uma porção da amostra sólida pode ser convertida em vapor ou partículas, com mínima ou nenhuma manipulação da amostra. Isso possibilita a determinação da concentração e da distribuição espacial dos elementos em quantidades de amostra da ordem de microgramas, sendo considerada uma técnica praticamente não

---

<sup>1</sup> Wu, B., *et al.*, *Metallomics* 4 (2012) 403-416.

<sup>2</sup> Nagajyoti, P. C., *et al.*, *Environmental Chemistry Letters* 8 (2010) 199-216.

<sup>3</sup> Bizzi, C. A., *et al.*, *Talanta* 83 (2011) 1324-1328.

<sup>4</sup> Shirisha, K., *et al.*, *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 45 (2014) 2201-2206.

<sup>5</sup> Rechcigl, J. E., *et al.*, *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 21 (1990) 2209-2218.

<sup>6</sup> Fragoso, M. A. C., *et al.*, Optimization and plant nutrition, Chapter 1, 1993, 3-6.

<sup>7</sup> Virgilio, A., *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 78 (2012) 58-61.

<sup>8</sup> Masson, P., *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 62 (2007) 224-230.

<sup>9</sup> Pisonero, J., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24 (2009) 1145-1160.

<sup>10</sup> Voellkopf, U., *et al.*, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 342 (1992) 917-923.

<sup>11</sup> Darke, S. A., *et al.*, *Microchemical Journal* 50 (1994) 310-336.



destrutiva em virtude da massa de amostra consumida, na faixa de picogramas ou femtogramas.<sup>12,13</sup> No entanto, a análise quantitativa de amostras sólidas por LA-ICP-MS é dependente da etapa de calibração, que visa estabelecer uma correlação matemática adequada do sinal analítico com a concentração do analito na amostra. Os problemas associados a essa limitação não estão relacionados apenas ao preparo de padrões sólidos, mas também à produção de vapores não representativos da amostra durante a ablação da amostra, efeitos no transporte do aerossol, atomização e ionização dos elementos no plasma.<sup>14</sup> Esses efeitos são conjuntamente chamados de fracionamento elementar, e são muito dependentes da matriz da amostra, sendo assim necessário que os padrões utilizados para a calibração por LA-ICP-MS devam representar a matriz das amostras analisadas, com a melhor semelhança possível, de forma a minimizar tais efeitos adversos.<sup>15</sup>

Os diferentes procedimentos utilizados para o preparo de padrões utilizados em LA-ICP-MS são considerados laboriosos e geralmente requerem tempos longos para obtenção. Uma vez que a LA-ICP-MS tem sido aplicada para análises quantitativas, diferentes alternativas têm sido propostas para contornar os problemas observados durante a calibração, sendo o preparo de padrões com a mesma matriz da amostra a maneira mais recomendada. Em muitos casos, a precisão e a exatidão da técnica de LA-ICP-MS são inferiores às do sistema de ICP-MS com nebulização convencional, e para melhorar essas características, métodos de padronização interna têm sido recomendados.<sup>16</sup>

Os elementos de referência, também denominados como padrões internos, são utilizados para melhorar a precisão e exatidão de análises de soluções por ICP-MS. A padronização interna em LA também contribui para determinações mais precisas e exatas. De maneira geral, algumas condições devem ser atendidas para que a correção seja satisfatória, tais como: *i*) distribuição homogênea do elemento de referência nos padrões e nas amostras, *ii*) a concentração do elemento de referência deve ser conhecida ou determinada por um método complementar, de forma a possibilitar a sua utilização para tal finalidade e, principalmente, *iii*) a possibilidade de corrigir variações durante as medições.<sup>17</sup> Atendendo a esses

<sup>12</sup> Russo, R. E., *et al.*, *Talanta* 57 (2002) 425-451.

<sup>13</sup> Russo, R. E., *et al.*, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 17 (1998) 461-469.

<sup>14</sup> Miliszkiewicz, N., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 30 (2015) 327-338.

<sup>15</sup> Günther, D., *et al.*, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 24 (2005) 255-265.

<sup>16</sup> Montaser, A., *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, 1998, 1004.

<sup>17</sup> Frick, D. A., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 1294-1303.

requisitos, o elemento utilizado como referência precisa ser ablado, transportado, vaporizado, atomizado e ionizado no ICP-MS de forma similar ao analito. De maneira geral, a normalização do sinal é feita a partir da relação entre a intensidade do analito de interesse e de algum isótopo do principal constituinte da matriz da amostra.

Nesse contexto, o carbono tem sido amplamente utilizado como elemento de referência nas análises por LA-ICP-MS em uma diversidade de materiais, incluindo amostras de plantas. O emprego do C deve-se, principalmente, por ser o elemento majoritário nesse tipo de amostra e sua distribuição relativamente homogênea.<sup>14,18</sup> Além da melhora da precisão na determinação de diversos elementos em diferentes partes de plantas com a normalização do sinal em relação ao  $^{13}\text{C}$ ,<sup>19</sup> a utilização desse isótopo também foi eficiente para a normalização e análise de amostras de plantas com diferentes teores de água, sendo observado que a diferença no teor de umidade entre padrões e amostras não afetou a análise quantitativa.<sup>20</sup>

Dentre as estratégias de calibração mais utilizadas em LA-ICP-MS, destacam-se os procedimentos que fazem o uso de *i)* diferentes materiais de referência certificados, com matriz semelhante ou não às amostras; *ii)* um único material de referência com adição de concentrações crescentes dos analitos ou *iii)* a utilização de amostras previamente caracterizadas quanto à composição elementar e enriquecidas com diferentes concentrações dos elementos a serem investigados.<sup>19</sup> Adicionalmente a essas formas de calibração, a utilização do papel filtro tem sido proposta para a dispersão de padrões aquosos e análise de amostras líquidas por LA-ICP-MS. Esse procedimento é relativamente novo, e foi estabelecido inicialmente para a determinação de Pb em sangue depositado sobre o papel.<sup>21</sup>

Embora o procedimento de calibração com papel filtro tenha sido empregado principalmente para a análise de amostras líquidas e, considerando que atualmente não há na literatura trabalhos propondo a utilização do papel filtro para calibração visando a determinação de diversos elementos em amostras de plantas por LA-ICP-MS, neste trabalho foram investigados diferentes parâmetros do sistema de ablação, como energia do laser, velocidade de varredura, diâmetro do feixe de radiação,

<sup>14</sup> Miliszkiwicz, N., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 30 (2015) 327-338.

<sup>18</sup> Kötschau, A., *et al.*, *Microchemical Journal* 110 (2013) 783-789.

<sup>19</sup> Hanc, A., *et al.*, *International Journal of Mass Spectrometry* 363 (2014) 16-22.

<sup>20</sup> Becker, J. S., *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 63 (2008) 1248-1252.

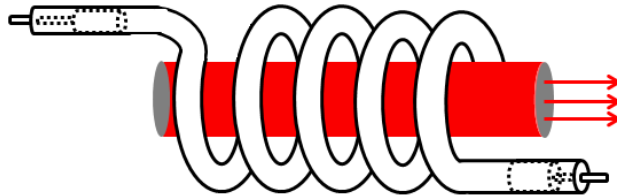
<sup>21</sup> Cizdziel, J. V., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388 (2007) 603-611.

vazão do gás carregador e condições para obtenção dos comprimidos das amostras, uma vez que a eficiência da técnica está diretamente associada aos fenômenos observados durante a ablação.

Nesse sentido, no presente trabalho buscou-se investigar a aplicabilidade do papel filtro, cujo constituinte majoritário é a celulose, para reproduzir a matriz de materiais botânicos e possibilitar um procedimento de calibração rápido e adequado para a análise direta de amostras de plantas medicinais e determinação de As, Ba, Cd, Ce, Co, Cr, Cu, La, Mn, Ni, Pb, Se, Sr, Tl, V e Zn por LA-ICP-MS. Além disso, foi avaliada a utilização do  $^{13}\text{C}$  como elemento de referência para correção do sinal obtido durante as análises, assim como a aplicação do procedimento proposto na análise da distribuição dos referidos analitos em folhas de plantas medicinais.

### 3.1. Laser - um breve histórico

A radiação laser foi produzida pela primeira vez em 1960, por Theodore Maiman, nos Estados Unidos, usando um cristal de rubi ( $\text{Al}_2\text{O}_3$  dopado com  $\text{Cr}^{3+}$ ) como fonte de emissão de radiação e uma lâmpada de arco de xenônio como fonte de excitação. Na configuração original, mostrada na Figura 1, a lâmpada helicoidal circunda um bastão de rubi e a cavidade óptica é formada pelo revestimento das extremidades do bastão com um material refletivo, sendo que em uma das pontas a reflexão é apenas parcial. Quando a lâmpada foi ligada, Theodore observou a emissão de um feixe de radiação vermelho emergindo da ponta do bastão de rubi com revestimento parcial, o qual foi posteriormente caracterizado quanto ao comprimento de onda e energia.<sup>22</sup>



**Figura 1.** Representação do laser de rubi criado por Theodore Maiman, em 1960.<sup>22</sup>

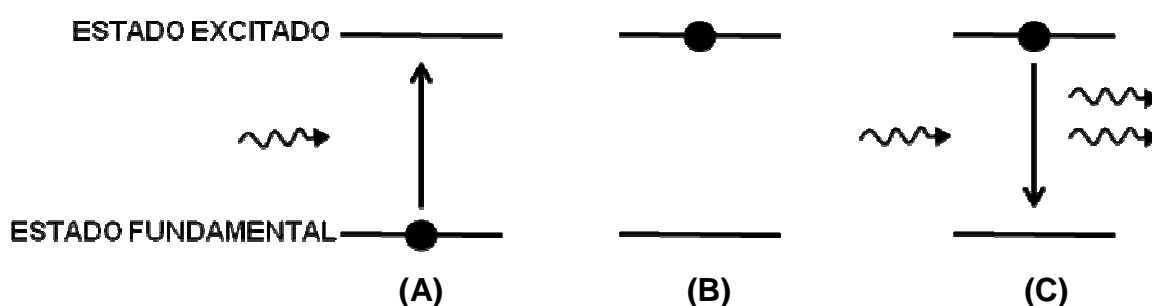
A palavra *laser* é um acrônimo do termo em inglês “*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*”, traduzido literalmente como o processo de amplificação da luz a partir da emissão estimulada de radiação. O dispositivo que gera o laser amplifica uma fonte de luz e produz um feixe de radiação de alta intensidade, focalizada e com uma faixa de comprimentos de onda extremamente estreita ( $\Delta\lambda \sim 0,01 \text{ nm}$ ). A potência da radiação laser pode variar de  $10^{-9}$  a  $10^{20} \text{ W}$ , com comprimentos de onda que abrangem o espectro das micro-ondas até os raios-X.<sup>22</sup>

---

<sup>22</sup> Silfvast, W. T., *Laser Fundamentals*, 2<sup>nd</sup> ed., 2008, 674 p.

### 3.2. Princípios básicos do laser

A emissão estimulada que acontece nas fontes de laser corresponde à liberação de um fóton durante a transição de um elétron de um nível de maior energia (estado excitado) para um nível de menor energia. Essa transição é causada pela incidência de um fóton com a mesma energia daquela passível de ser emitida pelo átomo excitado.<sup>23</sup> Tanto o processo de absorção da radiação da fonte de excitação, como a emissão de radiação pelos átomos no estado de mais alta energia, ocorrem simultaneamente. Uma representação das transições que ocorrem no processo de emissão estimulada é mostrada na Figura 2.



**Figura 2.** Transições eletrônicas que ocorrem durante a geração de laser. (A) Átomo no estado fundamental; (B) excitado e (C) emissão estimulada de radiação.<sup>23</sup>

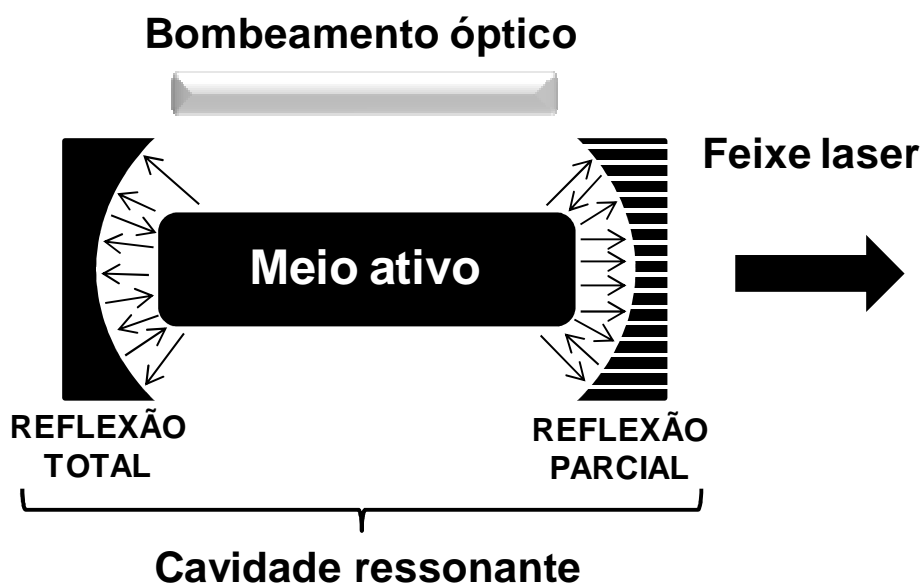
Quando o meio está em equilíbrio termodinâmico, há mais átomos no estado fundamental do que no estado excitado. No entanto, quando o material é preparado adequadamente, a emissão estimulada pode superar a absorção da radiação. Havendo amplificação suficiente, o caráter da emissão é alterado, passando de difuso e não direcional, para um feixe intenso e altamente direcionado que acompanha a direção do eixo definido pelos dois espelhos posicionados para reflexão da radiação. Para que a radiação laser seja produzida, há a necessidade da existência de um grande número de átomos no estado excitado. Quando ocorre esse tipo de emissão, é dito que o dispositivo apresenta efeito laser.<sup>23</sup>

Dessa forma, uma condição essencial que deve ser atendida é a existência de um meio ativo, composto por átomos, moléculas ou íons que emitam radiação eletromagnética. Esse meio pode ser um gás (como o CO<sub>2</sub>), um líquido (como uma solução de corante) ou um sólido (como o cristal de rubi). Além disso, é necessário

<sup>23</sup> Young, M., Óptica e Lasers, 1998, 448 p.

que ocorra a inversão de população do meio ativo. Isso ocorre através do bombeamento óptico, utilizando uma lâmpada de alta potência, que promove a amplificação da luz por emissão de radiação estimulada, onde tanto a radiação indutora quanto a radiação induzida estão em fase.<sup>22</sup>

Atualmente, o sistema para geração da radiação laser é bastante parecido com a configuração original criada por Theodore Maiman (Figura 1). O esquema mostrado na Figura 3 ilustra a estrutura fundamental de um sistema para geração de radiação laser. Para que o feixe seja gerado, é preciso que haja uma cavidade ressonante, a qual contém dois espelhos perpendiculares ao eixo do meio ativo. Um dos espelhos é semitransparente, possibilitando que parte da radiação seja liberada. A radiação que permanece oscilante dentro da cavidade estimula o decaimento dos átomos que são excitados continuamente pelo bombeamento óptico, produzindo o feixe liberado.<sup>22</sup>



**Figura 3.** Esquema básico dos componentes de um sistema de geração de laser.

A aplicação do laser pode acontecer de duas maneiras, de acordo com a forma de bombeamento: modo contínuo ou modo pulsado. Em relação ao comportamento temporal, a operação pode ser com emissão contínua, emissão pulsada e emissão variável (*Q-switched*). No primeiro modo, o meio ativo é excitado de forma ininterrupta, emitindo radiação constantemente. No modo de operação

<sup>22</sup> Silfvast, W. T., Laser Fundamentals, 2<sup>nd</sup> ed., 2008, 674 p.

pulsado, o funcionamento é governado pela forma de bombeamento e o pulso têm duração que varia de 1  $\mu$ s a 10 ms, além de uma baixa temperatura quando o feixe interage com a matéria. Nesse modo, um dos principais efeitos na ablação é a elevada formação de crateras na superfície da amostra e emissão de material na forma de partículas, predominantemente. No modo *Q-switched*, o bombeamento é aplicado de modo intenso, de forma a obter um pulso com pico de potência elevado, com alta intensidade (alguns mJ) e curta duração, na faixa de femtossegundo (fs) a nanossegundo (ns), resultando assim em elevadas temperaturas quando o feixe interage com a matéria. O modo de operação *Q-switched* proporciona uma maior quantidade de material vaporizado, embora espécies atômicas possam coalescer para formar partículas e agregados.<sup>22,23</sup>

Além dos efeitos provocados na eficiência de ablação e precisão das determinações pelo modo de aplicação do laser, outros parâmetros como a formação de material particulado no interior da câmara de ablação, a linha de transferência dos vapores gerados e o sistema de introdução do vapor no plasma também devem ser considerados.<sup>16</sup>

O processo de ablação com laser de amostras sólidas para análise elementar ou isotópica pode ser acoplado a diferentes técnicas de detecção, como as técnicas de ICP OES e ICP-MS, ou para a análise baseada na emissão de radiação eletromagnética nas técnicas de LIBS (espectroscopia de emissão com plasma induzido por laser) e LAMIS (ablação com laser combinada à espectrometria isotópica molecular). Neste trabalho, as principais abordagens relacionadas à técnica de LA serão fundamentadas, principalmente, com enfoque nas análises por ICP-MS.

### 3.3. Utilização do laser para introdução de amostras em ICP-MS

Dentre as principais propriedades da radiação laser que a tornou excepcionalmente útil em espectrometria analítica, destaca-se: radiação na forma de um feixe estreito, que implica numa elevada densidade de potência ( $W\ m^{-2}$ ); radiação com estreita faixa de frequência, podendo ser considerada monocromática;

<sup>16</sup> Montaser, A., *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, **1998**, 1004 p.

<sup>22</sup> Silfvast, W. T., *Laser Fundamentals*, 2<sup>nd</sup> ed., **2008**, 674 p.

<sup>23</sup> Young, M., *Óptica e Lasers*, **1998**, 448 p.

possibilidade de modulação da radiação para emissão na forma pulsada, produzindo pulsos de elevada energia.<sup>22</sup>

Ao longo dos anos, vários tipos de laser pulsado têm sido testados para ablação e um significativo melhoramento foi obtido com o sistema LA-ICP-MS em virtude do desenvolvimento da tecnologia de construção dos lasers. Como ilustrado na Tabela 1, os comprimentos de onda foram sendo gradualmente alterados da faixa do infravermelho e visível para os dispositivos atualmente predominantes na faixa do ultravioleta (266, 213 e 193 nm), cujas características principais estão relacionadas aos mecanismos da ablação que ocorrem nesses baixos comprimentos de onda, principalmente relacionados a efeitos térmicos.<sup>24</sup>

**Tabela 1.** Aplicações de diferentes tipos de laser combinados à técnica de ICP-MS. Adaptado da referência 15.

Ano	Laser	$\lambda$ (nm)	Tempo do pulso
1985	Rubi	694	ns
1992	Nd:YAG	1064	ns
1993	Nd:YAG	266	ns
1995	ArF	193	ns
1996	KrF	248	ns
1997	Nd:YAG	532	ns
1997	XeCl	308	ns
1998	Nd:YAG	213	ns
2002	Ti:safira	800	fs
2003	F <sub>2</sub>	157	ns
2003	Nd:YAG	193	ns
2003	Ti:safira	260	fs

O laser de estado sólido de Nd:YAG, com pulso de nanosegundo, tornou-se um dos sistemas mais utilizados nas técnicas atuais envolvendo LA, por ser adequado para ablação de vários materiais. Esses lasers possuem um custo de produção relativamente baixo, fácil operação, são compactos e altamente estáveis

<sup>15</sup> Günther, D., *et al.*, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 24 (2005) 255-265.

<sup>22</sup> Silfvast, W. T., *Laser Fundamentals*, 2<sup>nd</sup> ed., 2008, 674 p.

<sup>24</sup> Ohata, M., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 1345-1353.



energeticamente. A frequência fundamental desse tipo de laser produz uma emissão em 1064 nm, a qual pode ser modulada para a obtenção da frequência duplicada (532 nm), triplicada (355 nm), quadruplicada (266 nm) ou quintuplicada (213 nm), desde que haja uma elevada potência disponível no feixe inicial. Dentre todas essas possibilidades, o quarto harmônico é o mais empregado para análise química por ter uma elevada eficiência de absorção pela maioria dos materiais.<sup>25</sup> No entanto, cabe destacar que os menores comprimentos de onda estão associados a energias também inferiores. A energia média do pulso do laser de Nd:YAG, por exemplo, é de 320 mJ em 1064 nm, mas de apenas 0,05 a 10 mJ na região ultravioleta.<sup>16,24,26,27</sup>

Apesar do comprovado melhoramento do processo de ablação em comprimentos de onda na faixa do ultravioleta, foi observado um enriquecimento do aerossol com elementos como Cu, Zn, Cd, Ag e Pb em pequenas partículas, na análise de material de referência de vidro (NIST 610) utilizando o laser de 266 nm, evidenciando assim a ocorrência do fenômeno de fracionamento dos elementos.<sup>28</sup> No entanto, para a determinação de metais, como no caso de ligas de bronze, Russo *et al.*<sup>29</sup> e Koch *et al.*<sup>30</sup> observaram que a vaporização seletiva de alguns elementos durante o processo de ablação pode ser significativamente reduzida com o uso de pulsos de laser de fs ao invés de ns. Esses melhoramentos foram atribuídos à diminuição de efeitos térmicos na amostra, como uma menor dissipação do calor ao longo da mesma.

Uma das primeiras demonstrações da diminuição do efeito de fracionamento utilizando um laser de 266 nm com pulso de fs, comparado ao pulso de ns, foi feita por Poitrasson *et al.*<sup>31</sup> com amostras de silicatos e zircônia. Atualmente, uma clara tendência é observada na técnica de LA-ICP-MS no que diz respeito à utilização de comprimentos de onda na região UV e pulsos de ablação com tempos cada vez menores. No entanto, uma maior disseminação do uso dos sistemas baseados em lasers com feixes de fs ainda está limitada ao custo dessa instrumentação. Além disso, estudos adicionais são necessários para garantir a ablação estequiométrica

<sup>16</sup> Montaser, A., *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, **1998**, 1004 p.

<sup>24</sup> Ohata, M., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **29** (2014) 1345-1353.

<sup>25</sup> Meyers, R. A., *Encyclopedia of Analytical Chemistry - Applications, Theory and Instrumentation*, **2010**, 14484 p.

<sup>26</sup> Gonzalez, J., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **17** (2002) 1108-1113.

<sup>27</sup> Günther, D., *et al.*, *American Laboratory* **27** (1995) 24-29.

<sup>28</sup> Kuhn, H. R., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **19** (2004) 1158-1164.

<sup>29</sup> Russo, R. E., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **17** (2002) 1072-1075.

<sup>30</sup> Koch, J., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **19** (2004) 267-272.

<sup>31</sup> Poitrasson, F., *et al.*, *Analytical Chemistry* **75** (2003) 6184-6190.

com o uso de laser com pulso de fs, possibilitando, principalmente, a calibração sem a necessidade de correção do efeito de matriz para qualquer tipo de amostra.

### 3.3.1. Interação da radiação laser com sólidos

Desde o surgimento do primeiro laser de rubi, muitos estudos têm sido dedicados ao entendimento dos mecanismos fundamentais que ocorrem durante a interação da radiação laser com a matéria na análise de sólidos por LA-ICP-MS. A LA consiste de vários mecanismos não lineares que ocorrem em diferentes escalas de tempo, que varia de femtossegundos a alguns segundos. Quando o feixe do laser atinge a superfície do material, elétrons são removidos durante os primeiros femtossegundos a picossegundos de interação, seguidos pela formação de espécies atômicas e moleculares na faixa de nanossegundos. Após, processos térmicos são responsáveis pela ocorrência de erupção e produção de partículas, que ocorrem alguns microsegundos após a interrupção da irradiação por laser.<sup>25</sup>

A interação do laser com a superfície do material resulta em diversos efeitos que iniciam com o aquecimento, evaporação e degradação do material. Os principais fenômenos associados são: *i*) a formação de um plasma, o qual se expande a partir da superfície do sólido quando a densidade energética da radiação excede um valor de cerca de  $10^8 \text{ W cm}^{-2}$ ; *ii*) a projeção de material em virtude da pressão gerada pela expansão do gás no entorno da superfície onde a radiação interage; *iii*) do gás presente dentro da amostra; e *iv*) de processos de vaporização/degradação. A formação do plasma não é uma condição essencial para a ocorrência da ablação. Na verdade, o plasma gerado pode absorver fortemente a radiação incidente, reduzindo consideravelmente a eficiência da ablação.<sup>32</sup>

Durante o processo de ablação, hélio e argônio podem ser utilizados como gás carregador dos vapores gerados até a tocha do ICP. O tipo de gás tem um efeito significativo no desempenho da técnica, pois está diretamente relacionado à capacidade de expansão do material após a incidência do laser, uma vez que a dissipação do calor é governada pelo calor específico do gás utilizado. Além disso, flutuações do plasma e subseqüentes variações nas condições de ionização são

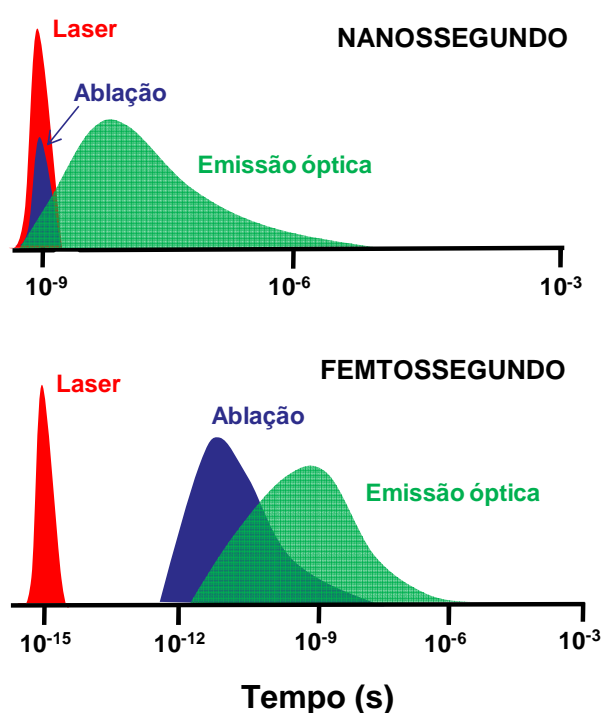
<sup>25</sup> Meyers, R. A., *Encyclopedia of Analytical Chemistry - Applications, Theory and Instrumentation*, **2010**, 14484 p.

<sup>31</sup> Poitrasson, F., *et al.*, *Analytical Chemistry* **75** (2003) 6184-6190.

<sup>32</sup> Darke, S. A., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **8** (1993) 145-209.

mais prováveis para gases com baixa energia de ionização, o que faz com que a utilização de He venha sendo mais recomendada.<sup>33,34</sup>

Outro parâmetro a ser considerado na interação da radiação laser com a matéria é o tempo do pulso do laser. As crateras geradas após a incidência do laser sobre uma superfície e o plasma formado são estritamente dependentes de alguns parâmetros do laser, incluindo o tempo do pulso. As diferenças entre os mecanismos que ocorrem com feixes de ns e fs são consideráveis. Enquanto processos pontuais de ionização, aquecimento da amostra e vaporização durante a incidência de lasers de ns, lasers de fs são tão curtos que esses fenômenos não ocorrem até o término da incidência da radiação, como pode ser observado na representação dos processos que ocorrem ao longo do tempo de aplicação do laser, na Figura 4.<sup>33,35</sup>



**Figura 4.** Escala de tempo aproximada para os processos que ocorrem com lasers de nanossegundo e femtossegundo. Adaptado da referência 36.

<sup>33</sup> Garcia, C. C., et al., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24 (2009) 14-26.

<sup>34</sup> Horn, I., et al., *Applied Surface Science* 207 (2003) 144-157.

<sup>35</sup> Russo, R. E., et al., *Spectroscopy* 28 (2013) 1-6.

<sup>36</sup> Verhoff, B., et al., *Journal of Applied Physics* 112 (2012) 1-9.

A utilização de fontes de ns resulta na formação de regiões da amostra afetadas pelo aquecimento. Nesses casos, a redistribuição do material devido à difusão térmica ocorre mesmo se a temperatura atingida é elevada o suficiente para evaporar a maioria dos elementos. Como consequência, haverá a evaporação preferencial de algumas espécies, e o enriquecimento ou diminuição de certos constituintes durante o estágio inicial de ablação.<sup>37</sup> Adicionalmente, parte da energia é absorvida pelo plasma formado logo acima da área irradiada, podendo também alterar a composição das partículas do aerossol formado durante a expansão. Todos esses efeitos estão relacionados ao tempo de duração do pulso do laser, responsável pela dinâmica do processo de ablação. Para compensar esses efeitos, a transição de um sólido até a fase vapor precisa ser completada antes que a energia seja difundida além da área irradiada ou interaja com o material ejetado da amostra. Nesse sentido, a duração do pulso precisa ser inferior ao tempo de relaxação térmica do material, a qual pode ser determinada experimentalmente e é definida como sendo inferior a 1 ps para materiais semicondutores.<sup>38</sup> Dessa forma, a diminuição no tempo do pulso de laser para a escala fs tem sido sugerida para melhorar as características da ablação e obter, de forma mais homogênea e representativa a vaporização da amostra.<sup>29,33,39</sup>

### **3.4. Ablação por laser acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado**

Desde o advento das técnicas com plasma indutivamente acoplado, grande parte das aplicações têm sido desenvolvidas para a análise de amostras na forma líquida, sendo necessário, no caso de amostras sólidas ou até mesmo líquidas, um procedimento prévio de decomposição utilizando, majoritariamente, condições de elevada temperatura e/ou pressão.<sup>16</sup> Uma alternativa para a análise de amostras sólidas por ICP-MS, a ablação com laser foi desenvolvida em 1985 por Gray.<sup>40</sup> A

<sup>16</sup> Montaser, A., *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, **1998**, 1004 p.

<sup>29</sup> Russo, R. E., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **17** (2002) 1072-1075.

<sup>33</sup> Garcia, C. C., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **24** (2009) 14-26.

<sup>37</sup> Koch, J., *et al.*, *Applied Spectroscopy* **65** (2011) 155A-162A.

<sup>38</sup> Chichkov, B. N., *et al.*, *Applied Physics A* **63** (1996) 109-115.

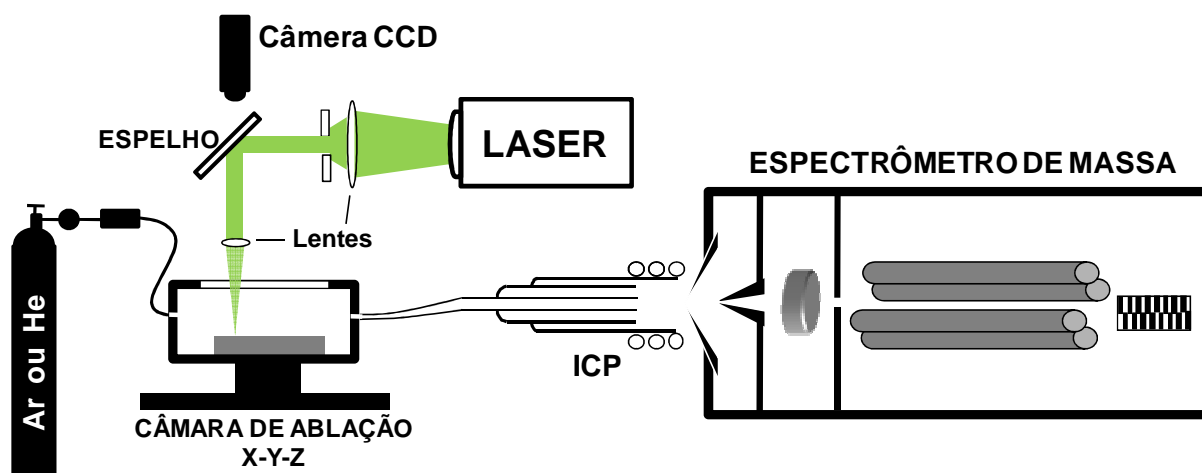
<sup>39</sup> LaHaye, N. L., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **29** (2014) 2267-2274.

<sup>40</sup> Gray, A. L., *Analyst* **110** (1985) 551-556.

combinação da ablação com laser com a técnica de ICP-MS, representada pela sigla LA-ICP-MS, tornou-se comercialmente disponível durante a década de 1990.

Dentre as principais vantagens da utilização do instrumento de ICP-MS combinado ao sistema de LA está a elevada sensibilidade, ampla faixa dinâmica de calibração, podendo chegar a até nove ordens de magnitude e um espectro relativamente simples.<sup>16</sup> Em adição aos sistemas baseados no uso do quadrupolo como filtro de massas, o acoplamento da ablação com laser com espectrômetros de massa com setor eletromagnético<sup>41,42</sup> e tempo de voo também tem sido empregados.<sup>21,43</sup>

A montagem geral do sistema LA-ICP-MS não sofreu alterações significativas em relação à sua configuração original nas últimas décadas. A amostra é posicionada em uma câmara fechada e isolada da atmosfera externa, a qual é purgada com Ar ou He como gás carregador e o feixe de radiação é focalizado na superfície da amostra através de uma janela na câmara de ablação.<sup>15</sup> Se a radiação incidente na amostra for suficientemente energética,<sup>44</sup> o material será ablado (formando vapor, partículas e aglomerados) e transportado até o plasma do equipamento de ICP-MS. Uma representação do sistema de LA-ICP-MS, desconsiderando as proporções reais de cada parte, está mostrada na Figura 5.



**Figura 5.** Configuração geral de um sistema de LA-ICP-MS.

<sup>15</sup> Günther, D., *et al.*, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 24 (2005) 255-265.

<sup>16</sup> Montaser, A., *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, 1998, 1004 p.

<sup>21</sup> Cizdziel, J. V., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388 (2007) 603-611.

<sup>41</sup> O'Reilly, J., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 1378-1384.

<sup>42</sup> Aramendia, M., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 30 (2015) 296-309.

<sup>43</sup> Jurowski, K., *et al.*, *Talanta* 115 (2013) 195-199.

<sup>44</sup> Russo, R. E., *et al.*, *Analytical Chemistry* 74 (2002) 70A-77A.

O instrumento de ICP-MS funciona como uma fonte de excitação adicional, onde as partículas geradas na ablação são vaporizadas, atomizadas e ionizadas. Posteriormente, os íons são transportados até a interface e guiados pelo separador de massas para separação em função da  $m/z$ .

As aplicações do sistema LA-ICP-MS têm aumentado significativamente em virtude de um maior entendimento dos fatores que influenciam as análises quantitativas com essa técnica.<sup>34,45-47</sup> O uso de materiais de referência comerciais ou preparados em laboratório para calibração, com o objetivo de representar e corrigir efeitos associados à matriz das amostras estudadas, tem demonstrado o potencial da técnica para aplicações específicas. No entanto, apenas recentemente fatores como o processo de ablação, a composição do material transportado e os processos de atomização e ionização que ocorrem no plasma têm sido investigados, os quais são igualmente importantes para a otimização e completo entendimento dos mecanismos envolvidos durante as análises e, conseqüentemente, para o sucesso da técnica.<sup>15</sup>

#### 3.4.1. Limite de detecção em LA-ICP-MS

Uma das vantagens da introdução de amostras no instrumento de ICP-MS por LA é a obtenção de uma condição de plasma seco, assim denominada quando não é feita a introdução de soluções dessolvatadas, resultando na melhora das condições de excitação e ionização e aumento na densidade eletrônica, quando comparado às condições obtidas pela análise com nebulização de líquidos. Esses benefícios, combinados ao espectro de massa mais simples, em virtude da diminuição de interferências poliatômicas, resulta na melhora das características de detecção.<sup>25</sup> O limite de detecção (LD) absoluto (massa absoluta de analito detectável) para elementos terras-raras em silicato foi cerca de duas ordens de grandeza melhor para o sistema LA-ICP-MS, quando comparados aos resultados

<sup>15</sup> Günther, D., *et al.*, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 24 (2005) 255-265.

<sup>25</sup> Meyers, R. A., *Encyclopedia of Analytical Chemistry - Applications, Theory and Instrumentation*, 2010, 14484 p.

<sup>34</sup> Horn, I., *et al.*, *Applied Surface Science* 207 (2003) 144-157.

<sup>45</sup> Motelica-Heino, M., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 16 (2001) 542-550.

<sup>46</sup> Rodushkin, I., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 17 (2002) 1223-1230.

<sup>47</sup> Rodushkin, I., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 17 (2002) 1231-1239.

obtidos por nebulização pneumática.<sup>48</sup> No entanto, quando os limites de detecção relativos são comparados (quantidade de analito detectável na amostra), a nebulização é melhor. Essa situação ocorre porque a massa de analito nebulizada para o plasma é muito maior que aquela introduzida pela ablação com laser, uma vez que o LD relativo depende da quantidade de massa de amostra utilizada no procedimento.

Assumindo uma eficiência de nebulização de 2%, com vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>, uma taxa de 20 mg min<sup>-1</sup> da solução será introduzida no plasma. Por outro lado, a quantidade de massa ablada por pulso de laser varia de 1 ng a 1 µg. Considerando-se uma frequência de ablação de 10 Hz e uma eficiência de transferência do vapor da câmara até o plasma de 40% (alguns estudos indicam uma eficiência de até 95%<sup>49</sup>), a quantidade de massa introduzida é de apenas 0,2 µg min<sup>-1</sup> a 0,2 mg min<sup>-1</sup>. Dessa forma, a quantidade de massa que chega ao plasma a partir da câmara de ablação é da ordem de 10<sup>2</sup> a 10<sup>5</sup> vezes menor quando comparada à nebulização pneumática.

Os limites de detecção da técnica de LA-ICP-MS, determinados como três vezes o desvio padrão do branco, são da ordem de alguns µg g<sup>-1</sup> a até mesmo ng g<sup>-1</sup>, em contraste com os limites de ng g<sup>-1</sup> a pg g<sup>-1</sup> obtidos com nebulização pneumática. Melhores LDs podem ser obtidos com o aumento da massa ablada por pulso de laser, a partir do melhoramento do sistema de transporte dos vapores ou do aumento da energia do laser.<sup>50,51</sup>

### 3.4.2. Calibração em LA-ICP-MS

O sinal adquirido pela técnica de ICP-MS durante a introdução de amostras líquidas ou sólidas é proporcional à concentração do elemento de interesse na amostra analisada. Para a introdução de líquidos, as soluções de referência são de fácil obtenção, tanto como mono ou multielementares, e a faixa linear da calibração pode atingir até 9 ordens de grandeza.<sup>16</sup> Em contraste, a eficiência da ablação e transporte dos vapores gerados durante a análise por LA pode ser diferente para

<sup>16</sup> Montaser, A., *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, **1998**, 1004 p.

<sup>48</sup> Mochizuki, T., *et al.*, *Nippon Kagaku Kaishi* **58** (1990) 19-27.

<sup>49</sup> Garcia, C. C., *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **63** (2008) 271-276.

<sup>50</sup> Liu, X. R., *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **50** (1995) 537-548.

<sup>51</sup> Günther, D., *et al.*, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **355** (1996) 771-773.

amostras e padrões, caso a matriz de ambos os materiais seja diferente. Embora a técnica de LA-ICP-MS tenha sido melhorada significativamente nos últimos anos, principalmente em relação aos processos de ablação, possibilitando a determinação de elementos majoritários e traço em uma variedade de amostras, diferentes estratégias de calibração têm sido adotadas para tentar contornar os efeitos devido às diferenças entre a matriz dos padrões e amostras.<sup>52</sup>

Em virtude da condição de plasma seco obtida durante a análise de amostras sólidas por LA-ICP-MS, quando não há a nebulização de soluções, a utilização de padrões sólidos para calibração também é recomendada.<sup>14</sup> Com exceção de padrões à base de vidro, grande parte dos demais materiais são heterogêneos na escala necessária para ablação (micrômetros) e um grande esforço tem sido feito para contornar essas limitações. Adicionalmente, o número de materiais de referência certificados (CRM), comumente indicados para calibração na técnica de LA, disponíveis comercialmente, ainda é bastante limitado. Paralelamente aos métodos de calibração externa, procedimentos relacionados à normalização do sinal também têm sido avaliados a fim de corrigir alterações relacionadas à quantidade de material ablado, transporte do aerossol ou ao processo de ionização no plasma.<sup>53,54</sup> Na maioria dos casos, a calibração com normalização da intensidade do sinal resulta em elevada eficiência na compensação para efeitos da massa de amostra vaporizada, variações na sensibilidade do equipamento e efeitos de matriz.<sup>55</sup>

Atualmente, há quatro procedimentos principais que podem ser utilizados para a normalização e análise quantitativa por LA-ICP-MS, conforme descrição a seguir:<sup>54</sup>

(i) o primeiro consiste na adição de uma solução de referência, dessolvada ou não, introduzida diretamente na câmara de ablação ou no tubo injetor da tocha, contendo o padrão interno em uma concentração conhecida. Esse procedimento pode corrigir variações do instrumento e possíveis alterações na sensibilidade dos analitos, mas não é adequado para correções relacionadas à ablação, como as alterações na massa de amostra vaporizada na ablação.<sup>56</sup>

<sup>14</sup> Miliszkiwicz, N., et al., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 30 (2015) 327-338.

<sup>52</sup> Pozebon, D., et al., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 2204-2228.

<sup>53</sup> Guillong, M., et al., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 17 (2002) 831-837.

<sup>54</sup> Frick, D. A., et al., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 30 (2015) 254-259.

<sup>55</sup> Longerich, H. P., et al., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 11 (1996) 899-904.

<sup>56</sup> Krosiakova, I., et al., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 22 (2007) 51-62.



(ii) o segundo procedimento é baseado na utilização de uma camada do padrão interno sob a superfície da amostra ou entre a amostra e o suporte. Essa correção é eficiente para variações na eficiência de transporte dos vapores e flutuações na estabilidade do equipamento de ICP-MS, mas não é adequada para amostras que apresentem variações na espessura.<sup>57</sup>

(iii) a terceira forma de normalização consiste na homogeneização da amostra com soluções de referência de diferentes concentrações dos elementos de interesse e do padrão interno. Após essa etapa, o material é congelado e seccionado para obtenção de filmes finos (da ordem de 10 a 100  $\mu\text{m}$ ) que serão posteriormente abladados. Esse procedimento é aplicável para a equalização na eficiência do transporte dos padrões e da amostra, desde que a secção utilizada seja completamente ablada. Esse procedimento de normalização tem sido aplicado fundamentalmente para a análise de materiais biológicos.<sup>58</sup>

(iv) o quarto procedimento de correção consiste na utilização de um elemento que esteja homogeneamente distribuído na amostra. Nesse caso, o C tem sido o principal constituinte escolhido como elemento de referência, principalmente no caso de amostras biológicas<sup>52</sup> e de plantas.<sup>19</sup> Apesar do C ser um dos constituintes principais nessas amostras, a sua utilização como elemento de referência deve ser avaliada, pois, dependendo das condições de ablação, o C e os analitos podem ser diferentemente transportados tanto na fase gasosa quanto na forma de partículas, alterando os processos de difusão até o plasma, bem como sua ionização. Outras limitações referentes à utilização do C como elemento de referência para normalização do sinal estão relacionadas à sua elevada energia de ionização (11,26 eV) e à elevada intensidade do sinal de fundo, em virtude da presença de  $\text{CO}_2$  na atmosfera do plasma.

Destaca-se que todos os procedimentos de normalização com um elemento de referência ou padrão interno podem ser combinados com as diferentes estratégias de calibração para a análise por LA-ICP-MS, que envolvem, principalmente, procedimentos de calibração externa, diluição isotópica e recobrimento das amostras com películas metálicas ou impressão. Algumas dessas estratégias serão descritas a seguir.

<sup>19</sup> Hanc, A., *et al.*, *International Journal of Mass Spectrometry* 363 (2014) 16-22.

<sup>52</sup> Pozebon, D., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 2204-2228.

<sup>57</sup> Bonta, M., *et al.*, *Analyst* 139 (2014) 1521-1531.

<sup>58</sup> Becker, J. S., *et al.*, *Analytical Chemistry* 77 (2005) 3208-3216.

### 3.4.2.1. Calibração com padrões sem ajuste de matriz

A utilização de padrões com ajuste de matriz é a forma de calibração mais recomendada nas análises de amostragem de sólidos por LA, mas, em alguns casos, o seu preparo é demorado e torna mais complexo um procedimento que tem o objetivo de tornar as análises mais simples e rápidas, tornando a etapa de quantificação a mais demorada na técnica de LA-ICP-MS.<sup>59</sup>

Se o fracionamento elementar e os diferentes comportamentos de ablação entre padrões e amostras forem desconsiderados, materiais de referência certificados, geralmente à base de silicatos, podem ser empregados para a análise de diferentes tipos de amostras. Além dos CRMs de vidro atualmente disponíveis (NIST 610 a 617), esse tipo de padrão pode ser facilmente preparado em laboratório, contendo todos os elementos de interesse, homoganeamente distribuídos e na faixa de concentração adequada.<sup>60,61</sup>

Embora o uso de materiais de referência compostos por vidro seja bastante empregado, principalmente para a análise de amostras geológicas,<sup>62,63</sup> a aplicação para amostras com diferentes composições geralmente requerem um procedimento prévio de fusão com tetraborato de lítio ( $\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ). Pickhardt *et al.*<sup>64</sup> investigaram o uso de CRMs de material geológico para a determinação de diversos elementos em amostras de zeólitas, incluindo terras-raras e metais de transição. Antes da análise, padrões e amostras foram submetidos ao procedimento de fusão com  $\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$ . Os resultados obtidos sem normalização foram comparados àqueles utilizando Li e Ti como elementos de referência. A normalização com Ti contribuiu para resultados mais precisos, com desvios padrão relativos (RDS) na faixa de 1 a 6%, enquanto sem a correção o RSD foi de 4 a 11%. Os limites de detecção obtidos com a normalização foram de 0,03 a 7,3  $\mu\text{g g}^{-1}$ , para Lu e Cu, respectivamente. Além disso, os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) foram de 0,90 a 0,93 sem normalização, enquanto com a correção do sinal com Ti esse parâmetro foi sempre superior a 0,99.

<sup>59</sup> Becker, J. S., *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 57 (2002) 1805-1820.

<sup>60</sup> Pickhardt, C., *et al.*, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 368 (2000) 173-181.

<sup>61</sup> Pearce, N. J. G., *et al.*, *Journal of Geostandards and Geoanalysis* 21 (1997) 115-144.

<sup>62</sup> Liu, Y., *et al.*, *Chinese Science Bulletin* 58 (2013) 3863-3878.

<sup>63</sup> Ulrich, T., *et al.*, *Geostandards and Geoanalytical Research* 37 (2013) 169-188.

<sup>64</sup> Pickhardt, C., *et al.*, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 368 (2000) 79-87.

A determinação da razão isotópica de Pb em feldspato e pirita foi feita por LA-ICP-MS sem a correção de matriz.<sup>65</sup> Para tal procedimento, foram empregados CRMs de vidro (NIST 612 e 614) e a razão isotópica foi determinada por ICP-MS com setor eletromagnético (SF-ICP-MS). Os resultados obtidos foram concordantes com a técnica de comparação de espectrometria de massa com ionização térmica (TIMS) e o RSD foi inferior a 0,6% para as medidas por LA-SF-ICP-MS. Os autores destacaram a aplicabilidade do método para a determinação da razão isotópica de Pb sem a necessidade de utilizar a correção de matriz. No entanto, o procedimento foi adequado para amostras com baixas concentrações de Hg. Quando uma amostra de pirita contendo cerca de 60  $\mu\text{g g}^{-1}$  de Hg foi analisada, o RSD foi próximo a 5%, o que foi relacionado a possíveis erros na correção da interferência isobárica do  $^{204}\text{Hg}$  sobre o  $^{204}\text{Pb}$ .

#### 3.4.2.2. Calibração com padrões com ajuste de matriz

A calibração externa baseada no uso de padrões com ajuste de matriz é um procedimento amplamente empregado em análises por LA-ICP-MS, sendo utilizados CRMs ou padrões preparados e caracterizados em laboratório. Quando não há a disponibilidade de CRMs que atendam aos parâmetros de interesse, como a presença dos analitos e suas respectivas faixas de concentração, os padrões podem ser preparados com a adição dos elementos de interesse em uma matriz em pó, a qual pode ser um CRM, o principal constituinte da matriz da amostra ou uma amostra previamente caracterizada quanto à concentração dos elementos constituintes.<sup>14</sup>

A necessidade de preparo de padrões com correção de matriz deve-se principalmente à produção de vapores não estequiométricos durante a ablação da amostra, diferentes comportamentos no transporte do aerossol, atomização e ionização dos elementos no plasma.<sup>14</sup> No entanto, o uso de padrões sólidos com matriz similar às amostras não garante uma ablação com as mesmas características, pois fatores como o grau de compactação, porosidade, tamanho de partícula, assim

<sup>14</sup> Miliszkiewicz, N., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 30 (2015) 327-338.

<sup>65</sup> Souders, A. K., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 25 (2010) 975-988.

como a forma como o analito está presente na amostra, pode influenciar o sinal obtido.<sup>66</sup>

Uma das maneiras de compensar os efeitos associados aos diferentes comportamentos dos elementos durante a ablação é através da normalização do sinal do analito em função de algum elemento presente na amostra ou adicionado posteriormente, conforme já foi descrito no item 3.2.2. Esse procedimento requer que a concentração do elemento de referência seja conhecida ou constante na amostra e no padrão, além do mesmo apresentar um comportamento similar ao analito durante a ablação.<sup>13</sup>

Considerando essas condições, o carbono é um dos elementos mais utilizados para normalização, onde os isótopos  $^{12}\text{C}$  ou  $^{13}\text{C}$  são monitorados nas análises de diversos tipos de amostras que contenham esse elemento como constituinte, e uma quantidade considerável de aplicações para materiais vegetais é encontrada na literatura.<sup>1,67,68</sup> A utilização dos isótopos de enxofre ( $^{33}\text{S}$  e  $^{34}\text{S}$ ) como elemento de referência também têm sido proposta para a análise de plantas. Nesse sentido, Hanc *et al.*<sup>19</sup> avaliaram três estratégias de calibração para a determinação de Cd, Cu, Pb e Zn em ervilhas cultivadas *in vivo*, por LA-ICP-MS, com laser de Nd:YAG (266 nm) e usando os isótopos  $^{13}\text{C}$  e  $^{34}\text{S}$  como elementos de referência. Uma investigação prévia demonstrou que o RSD dos resultados obtidos para um CRM de planta (NIST 1515, *Apple Leaves*) foi cerca de 2% menor quando  $^{34}\text{S}$  foi utilizado como elemento de referência, além de um melhor coeficiente de correlação para os quatro analitos estudados, variando de 0,9980 a 0,9998 com o emprego da calibração com NIST 1515 enriquecido com diferentes concentrações de uma solução de referência.

Todoli e Mermet<sup>69</sup> observaram que o C pode estar presente na forma gasosa ou como partícula após a ablação, sendo transportado como  $\text{CO}_2$ , CO ou outra espécie gasosa ou sólida, o que pode diferir significativamente do comportamento dos analitos.

<sup>1</sup> Wu, B., *et al.*, *Metallomics* 4 (2012) 403-416.

<sup>13</sup> Russo, R. E., *et al.*, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 17 (1998) 461-469.

<sup>19</sup> Hanc, A., *et al.*, *International Journal of Mass Spectrometry* 363 (2014) 16-22.

<sup>66</sup> Motelica-Heino, M., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14 (1999) 675-682.

<sup>67</sup> Wu, B., *et al.*, *Talanta* 78 (2009) 132-137.

<sup>68</sup> Oliveira, S. R., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 30 (2015) 389-395.

<sup>69</sup> Todoli, J. L., *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 53 (1998) 1645-1656.

Em um trabalho de Frick e Günther,<sup>70</sup> a utilização do carbono como elemento de referência para análise de diferentes amostras por LA-ICP-MS foi investigada. Os autores observaram uma influência da matriz da amostra na conversão do carbono em espécies gasosas ou partículas, dependendo da forma como o C está presente e também da presença de outras espécies como H, O, S, N e halogênios. Dentre as amostras estudadas, naquelas em que o O não estava presente na composição (grafite e diamante) houve uma tendência na formação de C na fase sólida, enquanto que para amostras com elevado teor de O (celulose, amido e madeira), o C foi convertido quase completamente em espécies gasosas. Além disso, de acordo com os experimentos realizados, os elementos investigados (Ag, Al, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Tl e Zn) são transportados até o instrumento de ICP-MS juntamente com as espécies na forma de partículas. Dessa forma, a escolha do C para normalização do sinal deve ser feita com precaução, uma vez que a formação de diferentes espécies após a ablação pode afetar a precisão e a exatidão das determinações. Outra condição, também associada à obtenção de resultados errôneos, deve-se à distribuição heterogênea do C nos padrões e amostras.

### 3.4.3. Análise de plantas por LA-ICP-MS

A técnica de LA-ICP-MS tem sido utilizada para a análise de diferentes materiais vegetais, como raízes<sup>71</sup>, caule<sup>72</sup>, folhas<sup>73,74</sup> e grãos.<sup>75</sup> A análise quantitativa, associada à determinação da distribuição espacial dos elementos em plantas, permite uma avaliação do potencial cumulativo de elementos em solos contaminados,<sup>76</sup> transporte através dos tecidos vegetais,<sup>77</sup> translocação<sup>20</sup> e seus respectivos efeitos.<sup>78,79</sup>

<sup>20</sup> Becker, J. S., et al., *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 63 (2008) 1248-1252.

<sup>70</sup> Frick, D. A., et al., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 1294-1303.

<sup>71</sup> Shi, J., et al., *Planta* 229 (2009) 945-954.

<sup>72</sup> Narewski, U., et al., *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 366 (2000) 167-170.

<sup>73</sup> Kaiser, J., et al., *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 64 (2009) 67-73.

<sup>74</sup> Punshon, T., et al., *Journal of Environmental Monitoring* 6 (2004) 153-159.

<sup>75</sup> Meharg, A. A., et al., *Environmental Science & Technology* 42 (2008) 1051-1057.

<sup>76</sup> Moradi, A. B., et al., *Environmental and Experimental Botany* 69 (2010) 24-31.

<sup>77</sup> Debeljak, M., et al., *Analytica Chimica Acta* 787 (2013) 155-162.

<sup>78</sup> Wu, B., et al., *Analytica Chimica Acta* 633 (2009) 165-172.

<sup>79</sup> Siebold, M., et al., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402 (2012) 3323-3331.

No trabalho de Becker *et al.*<sup>20</sup> a técnica de LA-ICP-MS foi utilizada para a determinação de elementos essenciais e traços em raiz, caule e folhas de tabaco. Foi utilizado um laser de Nd:YAG (266 nm), feixe de laser com 300 µm de diâmetro, frequência do pulso de 20 Hz e Ar como gás carregador. Secções de 30 a 40 µm de cada tecido foram fixadas sobre uma lâmina de vidro. Os padrões para calibração foram preparados a partir da mistura de folhas de tabaco em pó com soluções de referência de diferentes concentrações, sendo obtidas concentrações de 5 a 106 µg g<sup>-1</sup>. Os sinais foram normalizados em relação aos isótopos <sup>13</sup>C, <sup>33</sup>S e <sup>34</sup>S. A diferença entre o teor de água nos tecidos vegetais e nos padrões pôde ser compensada com a utilização dos elementos de referência. No entanto, o <sup>13</sup>C foi escolhido em virtude do sinal mais intenso obtido. Os coeficientes de correlação das curvas de calibração variaram de 0,985 (para Cu) a 0,999 (para Pt) e as imagens obtidas possibilitaram a avaliação da distribuição de cada elemento nos diferentes tecidos.

Macro e microelementos (Ca, Cd, Ce, Cr, Cu, Fe, K, La, Mn, Ni, P, S e Zn) foram determinados em folhas de girassol por LA-ICP-MS<sup>18</sup> utilizando <sup>13</sup>C como elemento de referência. A estratégia de calibração utilizada consistiu no uso de um CRM de folhas de tabaco (CTA-VTL-2 *Virginia tobacco leaves*) na forma de comprimido como único ponto para correlação. Diferentes materiais de referência certificados de origem vegetal (NIST 1572, NIST 1575, IAEA-359 e IAEA-V10) foram analisados para avaliar a exatidão das determinações. A ablação foi feita com um laser de estado sólido de Nd:YAG (266 nm), com diâmetro de feixe de 180 µm e velocidade de varredura de 100 µm s<sup>-1</sup>. A precisão, avaliada a partir de 10 determinações do mesmo CRM utilizado para calibração, variou de 3% (para elementos em alta concentração) até 27% (para elementos presentes em concentrações abaixo de 2 µg g<sup>-1</sup>). Os limites de detecção (LD) variaram de 0,03 a 239 µg g<sup>-1</sup>, para La e S, respectivamente. Os autores ainda avaliaram o perfil da cratera gerada após a ablação nos comprimidos de CRMs e nas amostras de folhas. A partir dos resultados obtidos por interferometria de varredura vertical (VSI, do inglês *vertical scanning interferometry*), foi observado que as crateras produzidas pelo laser nas folhas tinham cerca de 30 µm de profundidade, enquanto no CRM esse valor foi de 18 µm. Esses resultados estão diretamente associados à diferença

<sup>18</sup> Kötschau, A., *et al.*, *Microchemical Journal* 110 (2013) 783-789.

<sup>20</sup> Becker, J. S., *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 63 (2008) 1248-1252.

na quantidade de material que é removido e posteriormente transportado até o ICP. No entanto, como foi feita a normalização com  $^{13}\text{C}$ , essa diferença não teve efeito no processo de quantificação. A partir das imagens da distribuição espacial dos elementos nas amostras de folhas, várias considerações foram feitas em função do metabolismo vegetal e transporte dos elementos ao longo da folha.

Nove elementos (Mg, Ca, Mn, Cu, Sr, Cd, Ba, Hg e Pb) foram determinados por LA-ICP-MS em folhas de espécies vegetais encontradas no deserto.<sup>80</sup> A calibração foi feita a partir da utilização de sete CRMs de plantas na forma de comprimidos e o sistema de ablação consistiu em um laser de Nd:YAG (213 nm), com frequência de pulso de 20 Hz, diâmetro do feixe de 100  $\mu\text{m}$  e velocidade de varredura de 50  $\mu\text{m s}^{-1}$ . Um comprimido de celulose foi utilizado para estimar os limites de detecção da técnica, determinado a partir da relação  $3s/a$ , onde  $s$  é o desvio padrão de 30 medições da celulose e  $a$  é o coeficiente angular da equação da curva de calibração. Os valores de LD variaram de 0,04 a 26  $\mu\text{g g}^{-1}$ , para Pb e Ca, respectivamente. A ablação foi feita na forma de linha, desde a base até a ponta da folha. O teor de umidade foi determinado em cada amostra e variou de 56 a 76%. Os coeficientes de correlação obtidos foram superiores a 0,98 para a maioria dos elementos, com exceção de Hg (0,96) e Sr (0,95). A exatidão das determinações foi avaliada a partir da análise dos mesmos CRMs utilizados para calibração e, de acordo com os autores, o procedimento foi considerado adequado para a determinação da maioria dos elementos, mesmo sendo observada uma diferença de massa removida de cada espécie de folha após a ablação com laser. As determinações de Pb e Hg não foram possíveis devido às baixas concentrações presentes nas amostras analisadas.

### 3.5. Calibração em LA-ICP-MS utilizando papel filtro

Uma nova estratégia de calibração envolvendo o uso de diferentes materiais como suporte de soluções tem sido proposta nos últimos anos para as análises por LA-ICP-MS. Desenvolvida em 2007 para a determinação de Pb em sangue,<sup>21</sup> o procedimento consistiu na deposição do sangue sobre discos de papel filtro que

<sup>21</sup> Cizdziel, J. V., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388 (2007) 603-611.

<sup>80</sup> Cizdziel, J. V., *et al.*, *Analytical Methods* 4 (2012) 564-569.

foram previamente caracterizados quanto à concentração de Pb, os quais foram utilizados para a calibração. A análise das amostras foi feita a partir da deposição de sangue sobre o papel filtro, o qual foi seco antes da ablação, assim como os padrões. O sistema de ablação utilizado consistiu em um laser de estado sólido de Nd:YAG (213 nm), feixe de 200  $\mu\text{m}$ , frequência de pulso de 20 Hz e velocidade de varredura de 100  $\mu\text{m s}^{-1}$ . O coeficiente de correlação obtido foi de 0,996 e a exatidão das determinações foi avaliada a partir da análise de CRMs de sangue (NIST 955 e 966) reconstituídos em água e depositados sobre o disco de papel filtro. Os valores de RSD variaram de 12 a 16% e os autores associaram essas variações à falta de um elemento de referência ou padrão interno, que não foi utilizado no procedimento.

Suportes como politetrafluoretileno (PTFE), lâmina de vidro, papel absorvente e papel filtro foram avaliados por Kumtabtim *et al.*<sup>81</sup> para a determinação de 20 elementos em urina por LA-ICP-MS. Nessa avaliação, volumes de 1, 2, 5 e 10  $\mu\text{L}$  de urina foram depositados em cada suporte. Antes da etapa de ablação, as amostras foram evaporadas com o auxílio de uma lâmpada de infravermelho. A ablação foi feita com laser de 266 nm, feixe de 160  $\mu\text{m}$ , frequência de pulso de 20 Hz e velocidade de varredura de 50  $\mu\text{m s}^{-1}$ . Os padrões de calibração foram preparados a partir da diluição de soluções de referência em uma amostra de urina com baixas concentrações dos analitos investigados. De acordo com os autores, o melhor suporte para análise por LA-ICP-MS foi o PTFE, em virtude da menor dispersão da gota no suporte, resultando assim em uma maior intensidade do sinal para cada elemento. Foi utilizado o  $^{13}\text{C}$  como elemento de referência e os LDs variaram de 0,003 a 1,8  $\mu\text{g g}^{-1}$ , para U e Mg, respectivamente. Os coeficientes de correlação variaram de 0,97 a 0,99 para a maioria dos elementos e a aplicação do método para a análise de urina de pacientes com a doença de Fabry possibilitou a detecção de apenas alguns elementos (B, Mg, Cu, Ti, As, Rb e Mo) e com valores de RSD inferiores a 20%.

Trabalhos similares envolvendo o uso de suportes sólidos para a calibração com soluções de referência líquidas para análise por LA-ICP-MS têm sido desenvolvidos principalmente para a determinação de metais em amostras de

---

<sup>81</sup> Kumtabtim, U., *et al.*, *International Journal of Mass Spectrometry* 307 (2011) 174-181.



fluidos biológicos, como sangue<sup>42,82</sup> e urina.<sup>83,84</sup> Apenas um trabalho foi desenvolvido até o presente momento, relacionado ao uso de ICP OES acoplado à ablação com laser, usando o papel filtro para calibração e análise de P em líquidos de fermentação biológica.<sup>85</sup>

Adicionalmente, recentes estudos têm demonstrado a viabilidade do procedimento de calibração em papel utilizando tintas de impressão, as quais são preparadas com diferentes concentrações de diversos elementos para a análise de amostras como tecidos cancerosos<sup>86</sup> e proteínas.<sup>87</sup>

Tendo em vista o recente desenvolvimento da estratégia de calibração utilizando papel filtro para análises por LA-ICP-MS, associado às possibilidades já evidenciadas em diversos trabalhos, o desenvolvimento do presente trabalho foi motivado pela composição desse tipo de material e a avaliação da sua aplicação para amostras de composição similar, como plantas. Cabe destacar que até o momento esse tipo de aplicação ainda não foi descrito na literatura. Os principais fatores que sustentaram essa investigação estão relacionados à composição do papel, constituído majoritariamente por celulose, um polissacarídeo cujo monômero é  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , resultando em uma fração mássica de C de aproximadamente 45%. Essa concentração de C é similar à concentração geralmente presente em folhas vegetais,<sup>88,89</sup> sendo viável, dessa forma, a utilização do C como elemento de referência para a análise de plantas por LA-ICP-MS empregando o procedimento de calibração com soluções de referência depositadas em papel filtro.

<sup>42</sup> Aramendia, M., et al., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 30 (2015) 296-309.

<sup>82</sup> Hsieh, H.-F., et al., *Analytica Chimica Acta* 699 (2011) 6-10.

<sup>83</sup> Resano, M., et al., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 28 (2013) 98-106.

<sup>84</sup> Aramendia, M., et al., *Analytical Chemistry* 84 (2012) 8682-8690.

<sup>85</sup> Nischkauer, W., et al., *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 101 (2014) 123-129.

<sup>86</sup> Bonta, M., et al., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 2159-2167.

<sup>87</sup> Hoessl, S., et al., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 1282-1291.

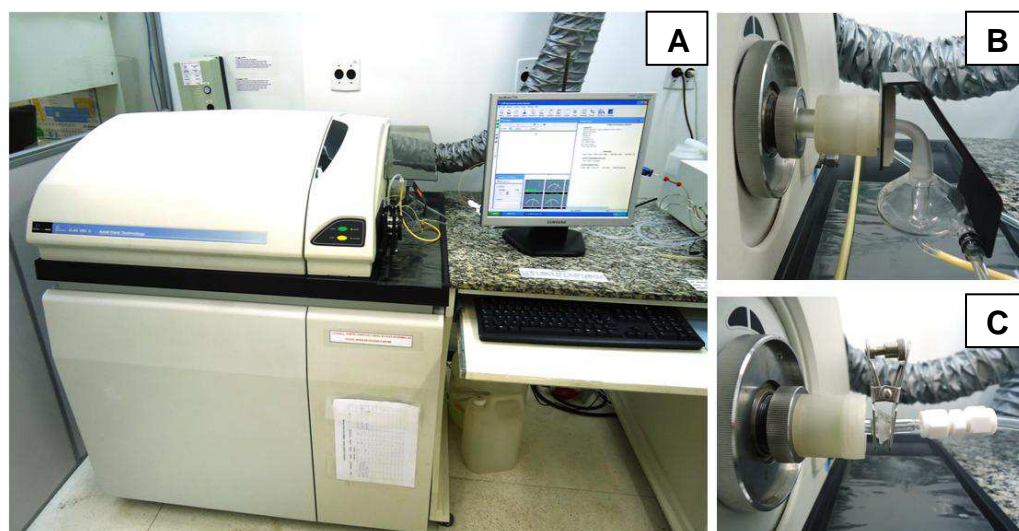
<sup>88</sup> Kalra, Y. P., *Handbook of Reference Methods for Plant Analysis*, 1998, 291 p.

<sup>89</sup> Thomas, S. C., et al., *Forests* 3 (2012) 332-352.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Instrumentação

As determinações de As, Ba, Cd, Ce, Co, Cr, Cu, La, Mn, Ni, Pb, Se, Sr, Tl, V e Zn foram feitas utilizando um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (modelo Elan DRC II, Perkin Elmer Sciex, Canadá), mostrado na Figura 6 A, equipado com nebulizador concêntrico (Meinhard Associates, USA), câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Inc., Austrália), mostrada na Figura 6 B, e tocha de quartzo com injetor de quartzo (2 mm d.i.). O equipamento de ICP-MS possui separador de massas do tipo quadrupolo, o qual foi operado no modo padrão, sem utilização da cela dinâmica de reação. Para as determinações por LA-ICP-MS, a câmara de nebulização foi removida e a tubulação para transporte dos vapores gerados durante a ablação foi conectada diretamente no tubo injetor da tocha de quartzo, conforme mostrado na Figura 6 C. O plasma foi gerado a partir de argônio 99,996% (White Martins-Praxair, Brasil). As condições operacionais utilizadas para as determinações por ICP-MS estão mostradas na Tabela 2.



**Figura 6.** Equipamento de ICP-MS utilizado (A) e detalhe das conexões para análise com nebulização pneumática (B) e para ablação com laser (C).

**Tabela 2.** Condições operacionais para a análise de plantas por ICP-MS.

<b>ICP-MS</b>	<b>Condição</b>
Potência de radiofrequência, W	1300
Vazão de gás principal, L min <sup>-1</sup>	15
Vazão de gás auxiliar, L min <sup>-1</sup>	1,2
Vazão de gás de nebulização, L min <sup>-1</sup>	1,00
Cone de amostragem e <i>skimmer</i>	Pt
<i>Dwell time</i> , ms	40
Varreduras ( <i>sweeps</i> )	3
Varreduras por replicata ( <i>readings</i> )	3
Replicatas	3
Isótopos monitorados, m/z	<sup>75</sup> As, <sup>138</sup> Ba, <sup>13</sup> C, <sup>111</sup> Cd, <sup>112</sup> Cd, <sup>140</sup> Ce, <sup>59</sup> Co, <sup>52</sup> Cr, <sup>53</sup> Cr, <sup>63</sup> Cu, <sup>65</sup> Cu, <sup>139</sup> La, <sup>55</sup> Mn, <sup>58</sup> Ni, <sup>60</sup> Ni, <sup>207</sup> Pb, <sup>208</sup> Pb, <sup>82</sup> Se, <sup>88</sup> Sr, <sup>203</sup> Tl, <sup>205</sup> Tl, <sup>51</sup> V, <sup>64</sup> Zn e <sup>66</sup> Zn

Para avaliação do desempenho do equipamento de ICP-MS para as análises utilizando nebulização pneumática, foi utilizada uma solução contendo 1 µg L<sup>-1</sup> de In e Ce e 10 µg L<sup>-1</sup> de Ba. Dessa forma, as intensidades dos sinais referentes aos isótopos <sup>115</sup>In<sup>+</sup>, <sup>156</sup>CeO<sup>+</sup>/<sup>140</sup>Ce<sup>+</sup> e <sup>138</sup>Ba<sup>++</sup>/<sup>138</sup>Ba<sup>+</sup> foram monitoradas para verificação da sensibilidade do equipamento, formação de íons óxidos e de carga dupla no plasma, respectivamente.

O equipamento utilizado no estudo para a análise de plantas com ablação com laser consiste em uma fonte de laser de estado sólido, composto pelo meio ativo de Nd:YAG, operando no comprimento de onda de 266 nm (modelo LSX-266, Cetac Technologies, USA), conforme mostrado na Figura 7.



**Figura 7.** Sistema de ablação com laser utilizado no trabalho.

O sistema consiste em um microcomputador independente para operação do programa de controle do laser. A fonte de excitação do cristal de Nd:YAG é constituída por uma lâmpada de arco de xenônio mantida em 605 V, 72 W e pulso de 20 Hz. O sistema de geração da radiação laser é refrigerado por um circulador de água e a temperatura normal de funcionamento é de  $35 \pm 3$  °C. O tempo de duração do pulso do laser é inferior a 6 ns e a energia nominal do feixe é de 15 mJ. O sistema possui uma câmera CCD com resolução de até 2  $\mu\text{m}$  que permite a visualização da superfície da amostra no microcomputador, captada através da janela de quartzo de 2 mm de espessura na parte superior de uma câmara de ablação circular, com dimensões de 50 mm de diâmetro e 50 mm de altura. O controle operacional do sistema de ablação é feito por software individual (DigiLaz G2, versão 4.1.2.1940) e a câmara pode ser movida nas direções x, y e z simultaneamente. A comunicação do equipamento de LA ao ICP-MS foi feita através da porta I/O (Input/Output) utilizando uma conexão com plug tipo P2 de 3,5 mm. Os parâmetros avaliados e as condições operacionais do sistema LA-ICP-MS estão mostrados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Condições operacionais para a análise de plantas por LA-ICP-MS.

<b>LA-ICP-MS</b>	<b>Condição</b>
Gás de arraste (Ar), L min <sup>-1</sup>	1,05 a 1,40
Diâmetro do feixe, µm	100
Velocidade de varredura, µm s <sup>-1</sup>	100
Frequência do pulso de laser, Hz	20
Energia*, %	20

\* A energia de 100% corresponde a 15 mJ.

A utilização de vapor de água e HNO<sub>3</sub> 5% (v/v) na câmara de ablação com laser foi avaliada com um nebulizador ultrassônico (modelo U6000AT<sup>+</sup>, CETAC Technologies, EUA) equipado com sistema de dessolvatação em temperaturas de aquecimento e resfriamento de 140 e -2 °C, respectivamente.

A avaliação do desempenho do ICP-MS acoplado ao sistema de ablação com laser foi feita utilizando 40 µL de uma solução multielementar (SCP33MS, SCP Science, Canadá) contendo 5 mg L<sup>-1</sup> de cada elemento, a qual foi dispensada sobre um disco de papel filtro de 17 mm de diâmetro que foi aquecido até evaporação do solvente. As intensidade dos isótopos <sup>13</sup>C<sup>+</sup>, <sup>59</sup>Co<sup>+</sup>, <sup>115</sup>In<sup>+</sup> e <sup>238</sup>U<sup>+</sup> foram monitoradas para avaliação da sensibilidade do equipamento para uma ampla faixa de m/z. A razão entre os íons <sup>156</sup>CeO<sup>+</sup>/<sup>140</sup>Ce<sup>+</sup> e <sup>138</sup>Ba<sup>++</sup>/<sup>138</sup>Ba<sup>+</sup> foi monitorada para verificação da formação de íons óxidos e de carga dupla, respectivamente.

Para comparação dos resultados obtidos por LA-ICP-MS, as amostras de plantas foram decompostas por via úmida assistida por radiação micro-ondas e as determinações foram feitas por ICP OES e por ICP-MS, com nebulização pneumática. As determinações por ICP OES foram feitas em equipamento com vista axial e aquisição simultânea de sinal (modelo Optima 4300 DV, Perkin Elmer Sciex, Canadá), injetor de alumina, nebulizador do tipo *GemCone*<sup>®</sup> e câmara de nebulização ciclônica. Uma fotografia do equipamento é mostrada na Figura 8.



**Figura 8.** Equipamento de ICP OES utilizado no trabalho.

As condições operacionais do equipamento de ICP OES e os comprimentos de onda monitorados estão mostrados na Tabela 4. O plasma foi gerado a partir de argônio.

**Tabela 4.** Condições operacionais para a análise de plantas por ICP OES.

<b>ICP OES</b>	<b>Condição</b>
Potência de radiofrequência, W	1400
Vazão de Ar principal, L min <sup>-1</sup>	15
Vazão de Ar auxiliar, L min <sup>-1</sup>	0,20
Vazão de Ar de nebulização, L min <sup>-1</sup>	0,70
Comprimentos de onda monitorados, nm I - linha atômica; II - linha iônica	Ba II (233,527), Cd II (214,440), Co II (228,616), Cr II (205,560), Cu I (324,752), Mn II (257,610), Ni II (231,604), Pb II (220,355), Sr II (407,771), V II (290,880), Zn II (206,200)

As amostras de plantas foram moídas em moinho criogênico (modelo 6750, Spex CertiPrep Inc., Estados Unidos) com argônio líquido. Após a moagem, o material foi peneirado em peneira de 35 fios (partículas inferiores a 200 µm) e caracterizado quanto à distribuição do tamanho de partícula. As determinações

foram feitas em analisador de partículas (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Inglaterra) após dispersão das amostras em vaselina.

A decomposição das amostras foi feita em um forno de micro-ondas Multiwave 3000<sup>®</sup> (Microwave Sample Preparation System, Anton Paar, Áustria), equipado com oito frascos de quartzo com capacidade máxima de operação de 280 °C e pressão de 80 atm. As condições para decomposição foram adaptadas de Bizzi *et al.*<sup>3</sup>, com o emprego de 6 mL de HNO<sub>3</sub> 7 mol L<sup>-1</sup> para a decomposição de cerca de 350 mg de amostra (n = 3). A mistura foi submetida a aquecimento durante 20 min a 1000 W de potência, com rampa de aquecimento de 10 min. Após arrefecimento por 20 min, as soluções foram transferidas para frascos de polipropileno e o volume completado para 30 mL. As determinações foram feitas diretamente nessas soluções ou diluídas com água, quando necessário.

Adicionalmente, as amostras de plantas foram caracterizadas quanto à composição elementar (C, N, S e Cl). As determinações de C foram feitas nas amostras moídas, em analisador elementar (modelo Flash 2000, Thermo Fisher, Estados Unidos), assim como no papel filtro utilizado nos procedimentos de calibração. Para as determinações de N total, foi utilizado o método micro-Kjeldahl, com decomposição das amostras em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 18 mol L<sup>-1</sup> e titulação com solução padrão de HCl 0,0668 mol L<sup>-1</sup>.<sup>88</sup> O equipamento utilizado para destilação dos extratos (modelo LUCA-74, Lucadema, Brasil) está mostrado na Figura 9.



**Figura 9.** Sistema de destilação utilizado para a determinação de N pelo método micro-Kjeldahl.

<sup>3</sup> Bizzi, C. A., *et al.*, *Talanta* 83 (2011) 1324-1328.

<sup>88</sup> Kalra, Y. P., *Handbook of Reference Methods for Plant Analysis*, 1998, 291 p.

As determinações de S e Cl foram feitas utilizando um analisador elementar (modelo Multi EA<sup>®</sup> 5000, Analytik Jena AG, Alemanha), conforme mostrado na Figura 10, com módulo para introdução de amostras líquidas e sólidas (modelo MMS 5000/autoX 112).



**Figura 10.** Analisador elementar utilizado para a determinação de S e Cl em plantas.

O equipamento permite a determinação de S a partir da combustão da amostra e determinação por fluorescência no ultravioleta. Cerca de 10 mg de amostra foram pesadas em plataforma de quartzo e inseridas no compartimento para introdução de amostras. No caso da determinação de Cl, os vapores gerados na combustão da amostra sólida são borbulhados em um reservatório contendo  $\text{H}_2\text{SO}_4$  18 mol  $\text{L}^{-1}$ . O HCl gerado na solução é purgado com Ar e transportado até uma cela eletroquímica contendo 65 mL de um solução de acetato de sódio 0,03 mol  $\text{L}^{-1}$  em ácido acético 80% (v/v), para determinação por coulometria. As condições operacionais do analisador de S e Cl estão mostradas na Tabela 5.

**Tabela 5.** Condições operacionais para a determinação de S e Cl total pelo analisador elementar Multi EA<sup>®</sup> 5000.

<i>Multi EA 5000</i>	Condição
Vazão de Ar carregador, mL $\text{min}^{-1}$	100
Vazão de $\text{O}_2$ carregador, mL $\text{min}^{-1}$	100
Vazão de $\text{O}_2$ no tubo de combustão, mL $\text{min}^{-1}$	300
Temperatura do tubo, °C	1050
Volume de injeção, $\mu\text{L}$	50

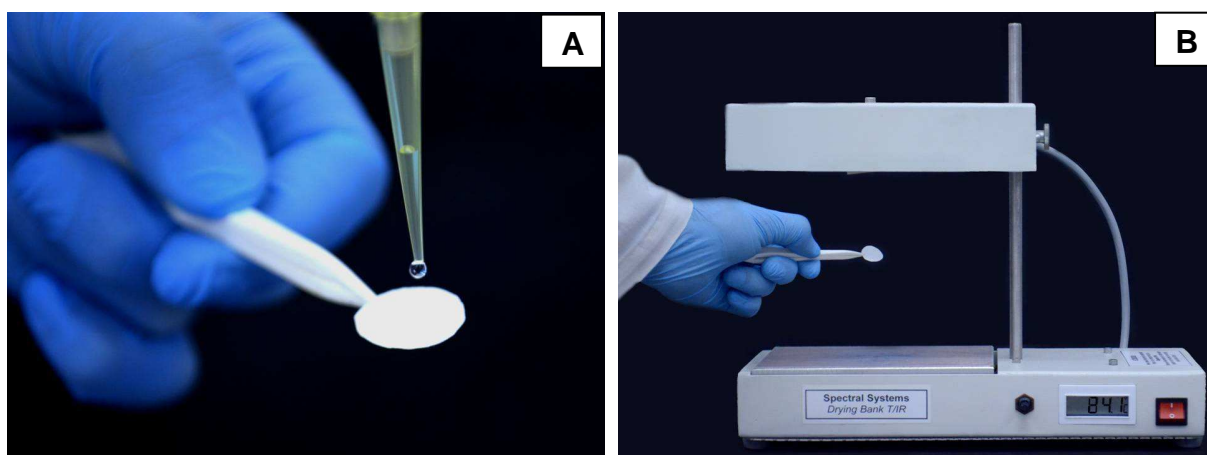
Para os procedimentos de pesagem, foi utilizada uma balança analítica (modelo AY220, Shimadzu do Brasil, Brasil), com resolução de 0,0001 g e carga



máxima de 220 g e uma microbalança (modelo M2P, Sartorius, Alemanha) com resolução de 0,001 mg e carga máxima de 2 g.

Para a calibração por LA-ICP-MS, foram utilizados discos de papel filtro com baixo teor de cinzas (Schleicher & Schüll, nº 5891, 90 mm de diâmetro, Alemanha). O papel filtro foi previamente recortado em discos de 17 mm de diâmetro, os quais foram submersos em um béquer com solução de HNO<sub>3</sub> 10% (v/v) e mantidos em banho de ultrassom (modelo Transsonic TI-H-5, Elma, Alemanha, 25/45 kHz) durante 30 min. Após a etapa de descontaminação, o material foi seco em capela de fluxo laminar (modelo CFLH 12, Veco do Brasil, Brasil) durante 48 h. Para a utilização do papel filtro no procedimento proposto, foi feita uma avaliação prévia do volume de solução absorvido pelo material, de forma a garantir uma distribuição homogênea da solução em toda a sua superfície e evitar a perda de solução com volumes excessivos. Dessa forma, volumes de 20 a 40 µL de solução foram considerados adequados, estabelecendo-se em 40 µL o volume de solução utilizado para todas as avaliações empregando o sistema LA-ICP-MS e papel filtro como suporte para as soluções.

Após a adição dos padrões aquosos, a etapa de secagem do papel filtro foi feita em sistema de aquecimento com infravermelho (Spectral Systems, Alemanha). O papel foi mantido próximo à fonte de aquecimento com o auxílio de uma pinça de politetrafluoretileno, durante cerca de 2 min, a temperatura de 80 °C. Uma representação da forma como o papel foi seco e o sistema de aquecimento utilizado estão mostrados na Figura 11 A e 11 B, respectivamente.



**Figura 11.** (A) Procedimento de adição da solução de referência sobre o papel filtro e (B) secagem do papel filtro com aquecimento por infravermelho.

Para a análise por LA-ICP-MS, as amostras moídas foram comprimidas em prensa de aço (modelo Hydraulic Press 15 ton, Specac, Inglaterra), durante 3 min a 10 ton, sendo obtidos discos de 13 mm de diâmetro, com cerca de 250 mg.

#### 4.2. Reagentes e soluções

A água utilizada em todos os procedimentos desenvolvidos neste trabalho foi previamente destilada e desionizada em uma coluna de troca iônica (condutividade máxima de  $1,0 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) e, posteriormente, purificada em sistema Milli-Q® (Ultrapure Water Purification Systems, Millipore, Estados Unidos), com resistividade superior a  $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ . O ácido nítrico concentrado (65% m/m,  $1,4 \text{ kg L}^{-1}$ , Merck, Alemanha), utilizado na decomposição das amostras foi previamente destilado em sistema de destilação abaixo do ponto de ebulição (modelo duoPUR, Subboiling Distillation System, Milestone, Itália). A vidraria utilizada e demais materiais de laboratório foram descontaminados por imersão em  $\text{HNO}_3$  5% (v/v) durante um tempo mínimo de 24 h, sendo posteriormente lavados com água.

A decomposição das amostras pelo método de micro-Kjeldahl foi feita em sistema aberto, utilizando bloco digestor (modelo Velp Scientifica DK, Itália), com capacidade para 42 tubos. O procedimento consistiu na mistura de 250 mg de amostra com 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30% m/m, Vetec, Brasil), 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $18 \text{ mol L}^{-1}$  e cerca de 700 mg de uma mistura catalítica composta por sulfato de sódio anidro P.A. ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , Vetec) e sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , Vetec) na razão mássica de 10:1. Após a mistura das amostras moídas e de todos os reagentes, os tubos foram submetidos a aquecimento até  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 min,  $250 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 min e  $380 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 3 h. Ao término da decomposição e após o arrefecimento, foram adicionados 15 mL de água em cada tubo. Os extratos obtidos foram destilados em sistema de destilação de nitrogênio após neutralização do  $\text{H}_2\text{SO}_4$  com solução de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ , 40% m/v, Vetec). Os vapores gerados foram coletados em 10 mL de solução de ácido bórico a 4% m/v ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ , Merck) até volume final de 75 mL. A solução obtida foi titulada com solução padronizada de  $\text{HCl}$   $0,0668 \text{ mol L}^{-1}$  e indicador vermelho de metila para determinação da concentração de N total nas amostras de plantas.

Para as determinações no analisador elementar, as soluções de calibração para S foram preparadas a partir da diluição em tolueno ( $C_7H_8$ , 0,87 kg L<sup>-1</sup>, Vetec, Brasil) de uma solução de referência de enxofre em óleo mineral (AccuStandard, Inc., 5000 ± 50 mg kg<sup>-1</sup>, Estados Unidos). As soluções de calibração para a determinação de Cl total foram preparadas a partir da diluição em tolueno de uma solução estoque de 1000 mg L<sup>-1</sup> de Cl, na forma de clorobenzeno (1,10 kg L<sup>-1</sup>, Merck, Alemanha). A solução de preenchimento do reservatório para a determinação coulométrica de Cl foi preparada a partir da dissolução de acetato de sódio triidratado ( $NaC_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$ , Vetec, Brasil) e ácido acético glacial (1,05 kg L<sup>-1</sup>, Vetec, Brasil). Ácido sulfúrico (97% m/m, 1,84 kg L<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) foi utilizado para a determinação de Cl por coulometria.

Para as determinações de As, Ba, Cd, Ce, Co, Cr, Cu, La, Mn, Ni, Pb, Se, Sr, Tl, V e Zn por LA-ICP-MS, ICP-MS e ICP OES, as soluções foram preparadas a partir da diluição de uma solução estoque de 10 mg L<sup>-1</sup> (SCP33MS, SCP Science, Canadá) em HNO<sub>3</sub> 5% (v/v). Adicionalmente, uma solução estoque contendo 23 elementos na concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup> (Merck IV, Certipur<sup>®</sup>, Estados Unidos) também foi utilizada para o preparo das soluções de calibração para as análises por LA-ICP-MS, ICP-MS e ICP OES.

Para avaliação da exatidão dos métodos de decomposição e análise das amostras por LA-ICP-MS e pelos métodos de comparação (ICP OES e ICP-MS), foram utilizados materiais de referência certificados de amostras de plantas: NIST 1515 (Apple Leaves), NIST 1575 (Pine Needles) e BCR 60 (Trace Elements in Aquatic Plant). A avaliação estatística dos resultados foi feita usando o software GraphPad InStat (GraphPad InStat Software Inc, versão 3.00, 1997) para os testes *t-Student* ou ANOVA, ambos com nível de confiança de 95%.

### 4.3. Amostras

Cinco amostras de plantas foram adquiridas no mercado local e utilizadas para o desenvolvimento do trabalho: anis-estrelado (*Illicium verum*), boldo (*Peumus boldus* Molina), espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*), maracujá (*Passiflora alata* Dryand) e quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*). Para as análises por LA-ICP-MS, as amostras foram secas a 60 °C durante 2 h, moídas e utilizadas na forma de

comprimidos (13 mm de diâmetro, aproximadamente 250 mg), conforme mostrado na Figura 12.



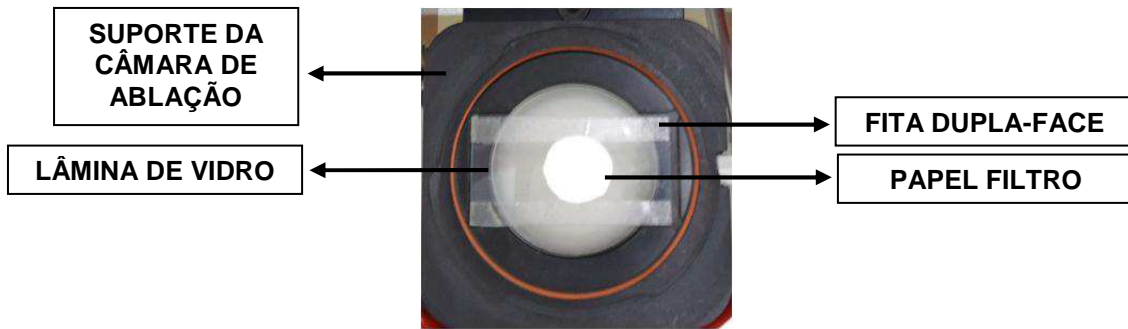
**Figura 12.** Amostras de plantas moídas e comprimidas: anis-estrelado, boldo, espinheira-santa, maracujá e quebra-pedra.

Para o procedimento de obtenção da imagem da distribuição dos elementos, foi utilizada uma folha de sene (*Cassia angustifolia*), também adquirida no mercado local e utilizada diretamente para a análise por LA-ICP-MS.

#### 4.4. Otimizações do sistema de LA-ICP-MS

##### 4.4.1. Estudo do volume de solução absorvido pelo papel filtro

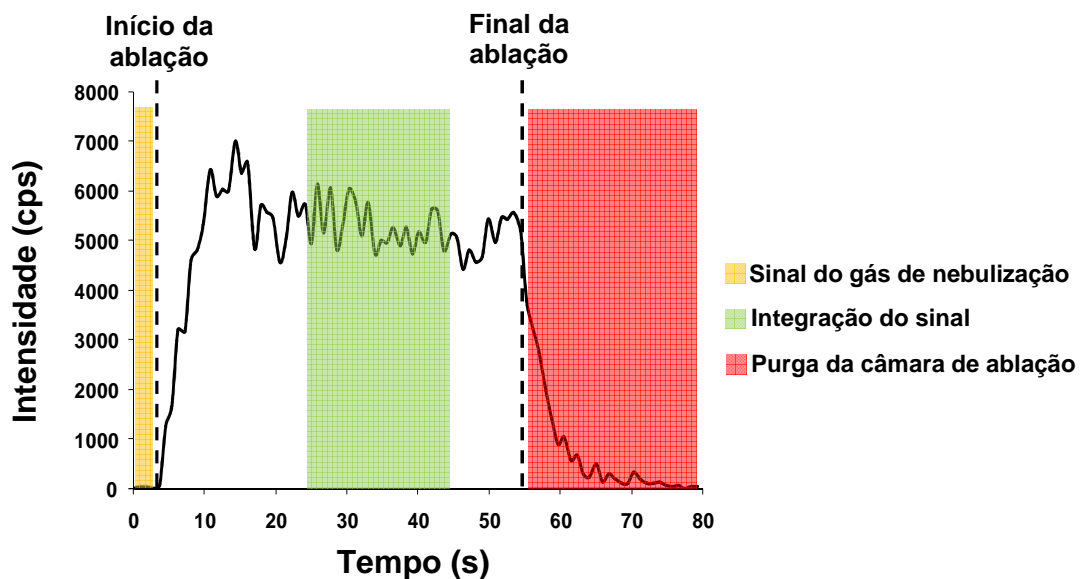
O volume de solução de referência utilizado para os experimentos empregando o papel filtro foi avaliado em função da intensidade do sinal obtido para cada um dos elementos estudados e o aspecto visual relacionado à distribuição da solução em toda a superfície do papel. Assim, volumes de 10 a 50  $\mu\text{L}$  de uma solução padrão de 5  $\text{mg L}^{-1}$  (SCP33MS) foram avaliados. Logo após a adição da solução, o papel foi submetido à secagem, sendo posteriormente colocado sobre uma lâmina de vidro contendo fita dupla-face para fixação, conforme ilustrado na Figura 13.



**Figura 13.** Disco de papel filtro posicionado sobre lâmina de vidro para ablação.

O laser foi aplicado sobre uma área central do papel, no modo de análise “*line scan*”, no qual uma linha de cerca de 5 mm de comprimento foi marcada pelo programa do equipamento de LA para definição do local de incidência do laser. A intensidade e a estabilidade dos sinais adquiridos foram avaliadas para a escolha do volume mais adequado de solução de referência.

A intensidade do sinal gerado durante as análises por LA-ICP-MS foi obtida de forma contínua. O tempo de ablação do papel filtro e das amostras foi estabelecido com uma etapa inicial de 3 s para monitoramento das intensidades do gás de nebulização, antes do início da ablação. Como o pulso inicial do laser pode causar uma perturbação no plasma e, conseqüentemente, uma maior variação no sinal obtido, a faixa de 25 a 45 s foi utilizada para integração do sinal, em um total de 55 s de aquisição do sinal. Uma representação do perfil do sinal obtido durante a ablação do papel filtro é mostrada na Figura 14.



**Figura 14.** Representação do perfil do sinal gerado durante a análise por LA-ICP-MS.

Cabe destacar que quando a câmara de ablação foi aberta para ser efetuada a troca de padrão ou amostra, o programa de controle do equipamento de LA foi ajustado para efetuar uma purga da câmara de ablação durante 5 min com Ar, na vazão do gás carregador, antes de habilitar a função para dar início à uma nova ablação. Esse procedimento foi aplicado com o objetivo de limpar a câmara de ablação e a tubulação de transporte dos vapores até o plasma, de forma a evitar possíveis efeitos de memória nas determinações subsequentes, assim como uma maior estabilidade do sinal do C. As mesmas condições de integração do sinal e purga do sistema de ablação com laser foram mantidas para todos os experimentos realizados.

#### 4.4.2. Avaliação da vazão do gás carregador para as determinações por LA-ICP-MS

A otimização da vazão do gás carregador foi feita de forma a obter uma condição com baixa taxa de formação de íons óxidos e de carga dupla, além de uma elevada sensibilidade do equipamento. Nesse sentido, um disco de papel filtro impregnado com 40 µL de uma solução de referência de 5 mg L<sup>-1</sup> (SCP33MS) foi fixado sobre uma lâmina de vidro e posicionado na câmara de ablação. Foram avaliadas vazões de 1,05 a 1,40 L min<sup>-1</sup>. Os sinais foram adquiridos durante a ablação de um linha de 5 mm de comprimento marcada no papel filtro. Foram utilizadas três linhas para cada vazão estudada e as intensidades dos isótopos <sup>13</sup>C<sup>+</sup>, <sup>59</sup>Co<sup>+</sup>, <sup>115</sup>In<sup>+</sup> e <sup>238</sup>U<sup>+</sup> foram monitoradas para avaliação da sensibilidade do equipamento, assim como a razão entre os íons <sup>156</sup>CeO<sup>+</sup>/<sup>140</sup>Ce<sup>+</sup> e <sup>138</sup>Ba<sup>++</sup>/<sup>138</sup>Ba<sup>+</sup>, monitorados para verificação da formação de óxidos e íons de carga dupla, respectivamente.

#### 4.4.3. Efeito da adição de vapor de água e ácido nítrico na câmara de ablação

Foi investigado o efeito da adição de vapor de água e vapor de HNO<sub>3</sub> 5% (v/v) na câmara de ablação sobre a intensidade do sinal obtido por ICP-MS. O vapor foi gerado a partir da nebulização de água ou HNO<sub>3</sub> 5% com um nebulizador ultrassônico. O aerossol produzido no nebulizador foi passado através da câmara do sistema LA, durante a ablação de um disco de papel filtro contendo 40 µL de uma

solução de referência de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de cada um dos elementos estudados. Foram avaliadas vazões de 0,25, 0,50, 1,0 e  $1,5 \text{ mL min}^{-1}$  de água e  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  de  $\text{HNO}_3$  5% (v/v). Os resultados obtidos foram comparados com a condição otimizada sem a utilização de vapor úmido.

#### 4.4.4. Avaliação dos parâmetros de ablação para análise de amostras de plantas por LA-ICP-MS

Os parâmetros do sistema de LA foram otimizados de forma a obter a maior relação sinal/ruído e rápida aquisição de sinal, com o objetivo de reduzir o tempo de análise. Dessa forma, um disco de papel filtro contendo  $40 \text{ }\mu\text{L}$  de solução de referência de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  (SCP33MS), foi evaporado, fixado sobre uma lâmina de vidro e submetido à ablação. Parâmetros como a energia do laser (10 a 100%), diâmetro do feixe de radiação (50 a  $200 \text{ }\mu\text{m}$ ) e velocidade de varredura ( $20$  a  $150 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$ ) foram avaliados para a escolha da melhor condição de ablação.

#### 4.5. Calibração em LA-ICP-MS utilizando papel filtro

Após a avaliação das condições operacionais do sistema LA-ICP-MS, a calibração foi feita com a utilização de um disco de papel filtro com  $17 \text{ mm}$  de diâmetro para cada ponto da curva de calibração. Após a adição de  $40 \text{ }\mu\text{L}$  da solução padrão sobre o papel, a secagem foi feita durante  $2 \text{ min}$  sob temperatura média de  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ . O ponto correspondente ao branco da curva foi preparado com a adição de  $40 \text{ }\mu\text{L}$  de uma solução de  $\text{HNO}_3$  5% (v/v). A ablação foi feita na forma de linha, com 3 linhas paralelas de  $5 \text{ mm}$  de comprimento para cada ponto, representando assim três leituras do mesmo ponto ( $n = 3$ ).

Para a elaboração das curvas de calibração com e sem a correção com  $^{13}\text{C}$ , a intensidade média dos três sinais obtidos foi relacionada com a concentração de analito no papel (em  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), estabelecida em função do volume e concentração de solução padrão adicionada e da massa do papel filtro utilizado no ponto correspondente. Para a condição com a correção do sinal em função do  $^{13}\text{C}$ , a intensidade do analito foi dividida pela intensidade do  $^{13}\text{C}$  da leitura correspondente.

Após, os valores obtidos das três razões foram utilizados para a determinação da razão média. Os padrões para calibração foram preparados a partir de diluições de uma solução estoque multielementar de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (SCP 33 MS), na faixa de 0,25 até  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , correspondendo a uma faixa de concentração no papel filtro de cerca de 0,5 a  $20 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente.

Os limites de detecção e quantificação (LQ) do método de LA-ICP-MS foram estimados a partir da ablação de 10 linhas em um papel filtro contendo  $40 \mu\text{L}$  de uma solução de  $\text{HNO}_3$  5% (v/v). O LD e o LQ foram calculados como  $I + 3 s$  e  $I + 10 s$ , respectivamente, onde “I” é a intensidade média dos sinais das 10 linhas e “s” é o respectivo desvio padrão. Os valores de intensidade obtidos para cada analito, com e sem correção com o  $^{13}\text{C}$ , foram interpolados nas curvas de calibração correspondentes. Com o objetivo de avaliar a faixa linear de calibração para o procedimento proposto, foram feitos experimentos com duas e três adições de  $40 \mu\text{L}$  da solução estoque (SCP33MS,  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) sobre o mesmo papel filtro. Cabe destacar que entre cada adição da solução padrão, foi efetuado o mesmo procedimento de secagem do papel descrito anteriormente.

#### 4.6. Efeito da pressão utilizada para obtenção dos comprimidos das amostras

A análise quantitativa das amostras foi feita a partir da ablação do material moído e prensado. De acordo com estudos que abordam o transporte de partículas geradas na ablação com laser até o equipamento de ICP-MS, a eficiência no transporte é relativamente baixa para partículas com diâmetro inferior a 5 nm, as quais podem ser perdidas por difusão, assim como também é baixa para partículas maiores que  $3 \mu\text{m}$ , pois essas ficam depositadas na linha de transferência até o plasma pelo efeito da gravidade.<sup>90</sup> Com o objetivo de investigar o efeito da pressão utilizada para obtenção dos comprimidos das amostras na precisão e exatidão das determinações por LA-ICP-MS, foram avaliadas pressões de 1,0 2,5, 5,0, 7,5 e 10 ton para a amostra de quebra-pedra. O material foi submetido à ablação nas condições previamente estabelecidas com o uso do papel filtro. Os resultados obtidos foram comparados com os valores determinados por ICP-MS com nebulização pneumática, após decomposição por via úmida.

<sup>90</sup> Durrant, S. F., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14 (1999) 1385-1403.



#### 4.7. Análise de amostras de plantas por LA-ICP-MS

Após a avaliação das condições de ablação utilizando papel filtro para calibração, assim como da precisão e exatidão das determinações em função das condições utilizadas para obtenção dos comprimidos, as amostras de plantas medicinais foram analisadas por LA-ICP-MS. As determinações foram feitas com e sem normalização com  $^{13}\text{C}$  para avaliação do procedimento proposto. Para a análise quantitativa, foram feitas 3 linhas de ablação na superfície dos comprimidos, com cerca de 5 mm de comprimento cada uma, e tempo total de aquisição do sinal de 80 s para cada linha.

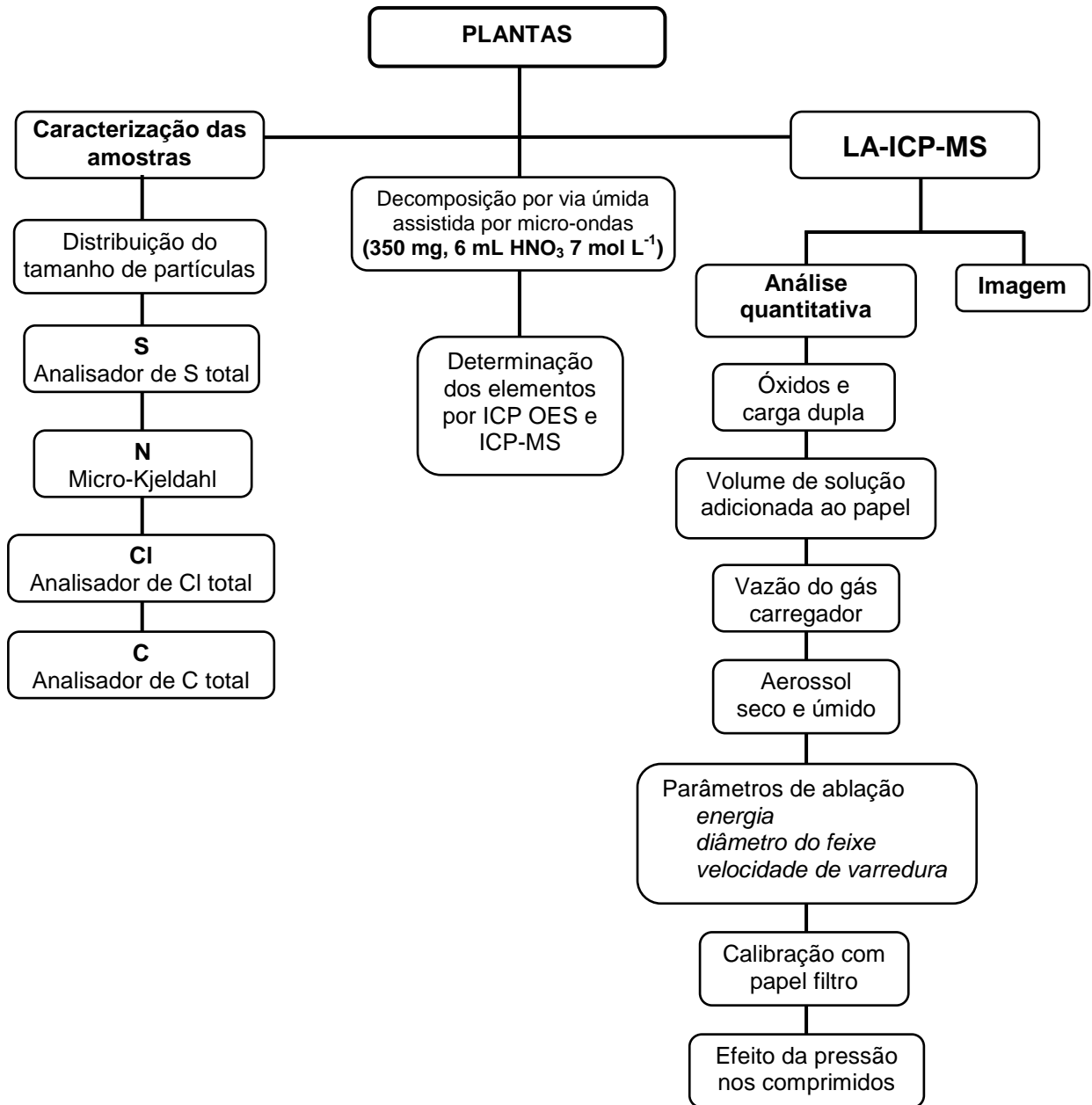
A exatidão das determinações foi avaliada com a análise de materiais de referência certificados de plantas, além da comparação dos resultados com as determinações feitas por ICP-MS e ICP OES, após decomposição das amostras.

#### 4.8. Distribuição elementar em folha de sene por LA-ICP-MS

O procedimento desenvolvido para a análise quantitativa de metais em plantas por LA-ICP-MS foi aplicado para a determinação da distribuição elementar dos analitos investigados em folhas de sene. Uma folha foi utilizada diretamente para a análise por LA-ICP-MS. Para fixação da folha na lâmina de vidro, foi utilizada uma cola instantânea em toda a base do vidro. Como a quantificação dos analitos foi feita a partir da relação com o  $^{13}\text{C}$  como elemento de referência, a intensidade média do C correspondente à cola foi descontada de todas as intensidades do C ao longo da análise da folha.

As imagens da distribuição dos elementos foram obtidas a partir da aquisição das intensidades dos sinais gerados pelo ICP-MS, exportados no formato .xls e processadas no programa MATLAB, versão 7.9.0, a partir de comando com informações como número de linhas de ablação e quantidade total de registros obtidos durante a análise.

Na Figura 15 é mostrado um fluxograma dos parâmetros avaliados para o procedimento proposto para a análise de plantas por LA-ICP-MS, utilizando papel filtro para calibração. Também, estão incluídos os ensaios feitos para caracterização das amostras e técnicas utilizadas para comparação dos resultados.



**Figura 15.** Diagrama das condições avaliadas para a análise de plantas por LA-ICP-MS.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 5.1. Caracterização das amostras de plantas medicinais

#### 5.1.1. Preparo das amostras

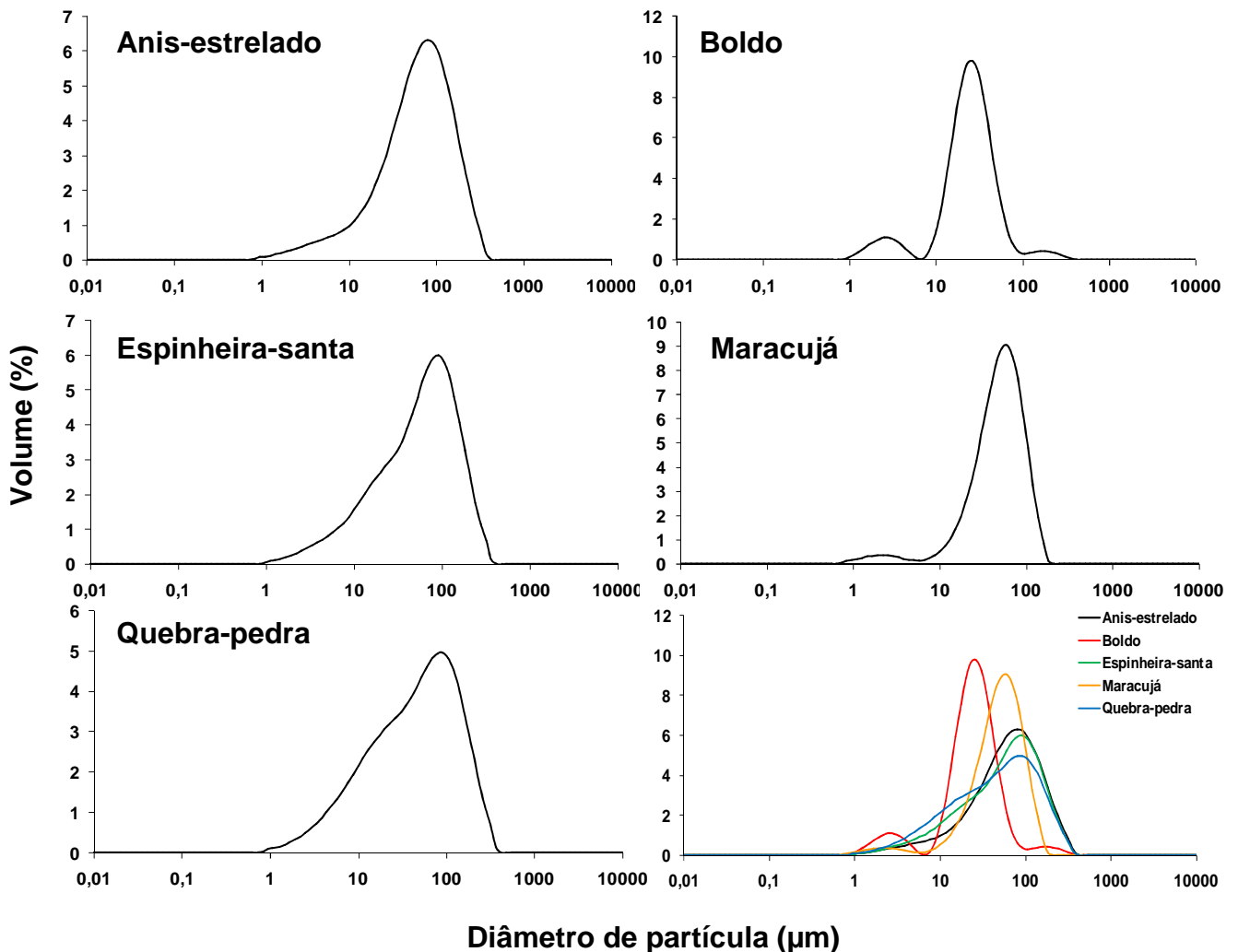
As amostras de plantas utilizadas no trabalho foram submetidas a uma etapa de moagem e homogeneização, antes da análise quantitativa. Inicialmente, foi feita a moagem criogênica de todo o material adquirido (cerca de 25 g de cada amostra) sob Ar líquido. Alíquotas de cerca de 5 g foram moídas durante dois ciclos de 2 min de moagem, com uma etapa de 2 min de pré-congelamento antes de iniciar a moagem e uma etapa de 1 min de congelamento entre cada ciclo. Após a moagem, cada amostra foi peneirada em malha de 35 fios (partículas inferiores a 200  $\mu\text{m}$ ) e uma quantidade de aproximadamente 10 g foi armazenada em frascos de polipropileno, sendo posteriormente caracterizadas quanto à distribuição do tamanho de partículas.

#### 5.1.2. Determinação da distribuição do tamanho de partícula

A determinação da distribuição do tamanho das partículas obtidas após a moagem criogênica foi feita em analisador de partículas. Para a análise, o material foi disperso em um meio líquido apropriado, que não deve dissolver o material e que possibilite uma dispersão homogênea em toda a suspensão. Dessa forma, água e vaselina foram avaliadas como líquidos dispersores. Nesse procedimento, cerca de 50 mg de cada amostra foram dispersos em 50 mL de dispersor e a mistura foi agitada manualmente durante 10 s para homogeneização.

Após uma avaliação visual do aspecto das suspensões, foi observado que a utilização de água resultou na formação de alguns aglomerados que decantavam no frasco após a agitação. Esses agregados alteram o tamanho médio das partículas em suspensão e, dessa forma, a utilização de água foi descartada. Com a utilização de vaselina, foram obtidas suspensões visualmente homogêneas, sem a formação de agregados de partículas. Considerando-se as observações feitas com os dois

líquidos dispersores, foi escolhida a vaselina para dispersão das amostras de plantas. O meio dispersante utilizado no reservatório do equipamento, para introdução das amostras, também foi vaselina. A velocidade de agitação inicial da amostra no reservatório da amostra foi de 1500 rpm, sendo reduzida para 500 rpm na etapa da medição. O equipamento dispõe de um sistema de ultrassom, o qual foi utilizado na potência de 50% de sua capacidade total durante as etapas de introdução e análise das amostras. Os perfis referentes à distribuição volumétrica do tamanho de partículas nas amostras de plantas, após moagem criogênica e peneiramento, estão mostrados na Figura 16, além de uma comparação entre todas as distribuições determinadas.



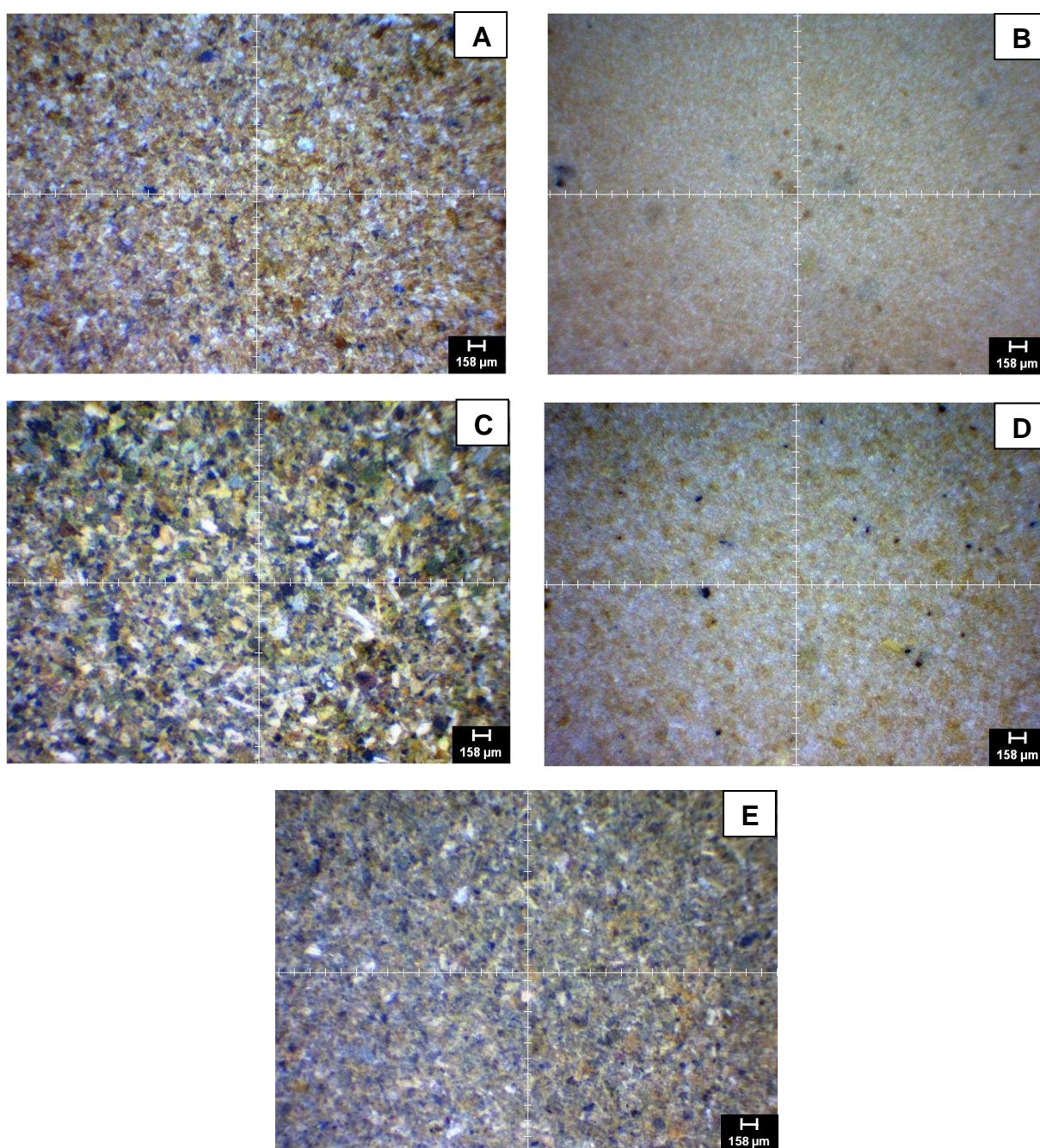
**Figura 16.** Perfil da distribuição do tamanho de partículas nas amostras de plantas moídas (n = 5).

De acordo com os perfis de distribuição determinados para cada amostra, é possível observar uma similaridade na população de partículas nas amostras de anis-estrelado, espinheira-santa e quebra-pedra, as quais se distribuem em uma faixa mais ampla de tamanhos, mas com a maior parte das partículas com tamanho em torno de 100  $\mu\text{m}$ . Por outro lado, as amostras de boldo e maracujá apresentaram uma quantidade representativa de partículas na faixa de 1 a 10  $\mu\text{m}$ , mas com maior quantidade entre 10 e 100  $\mu\text{m}$ . Esses resultados são coerentes com o fato de que as principais partes utilizadas das amostras de anis-estrelado e quebra-pedra, para fins medicinais, são frutos e ramos e raízes, respectivamente. Essas partes possuem uma estrutura mais rígida, podendo influenciar na eficiência de moagem e resultando em uma maior dispersão das partículas obtidas. Em relação às amostras de boldo e maracujá, assim como para espinheira-santa, as folhas são as partes utilizadas. No entanto, apesar de ser um material menos rígido, a folha de espinheira-santa tem como característica um aspecto pouco flexível, possivelmente em virtude da maior quantidade de lignina e taninos,<sup>91</sup> em comparação com as outras folhas.

A maior rigidez de partes como frutos e ramos e o efeito na etapa de moagem podem ser observados pela maior heterogeneidade das partículas nas imagens de cada amostra, obtidas através da câmera CCD do equipamento de ablação com laser. As imagens mostradas na Figura 17 foram obtidas após prensagem de cerca de 250 mg do material moído, em prensa de aço, durante 2 min a 5 ton.

---

<sup>91</sup> Radomski, M. I., Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2006.



**Figura 17.** Imagens das superfícies dos comprimidos de (A) anis-estrelado; (B) boldo; (C) espinheira-santa; (D) maracujá e (E) quebra-pedra.

No trabalho de Gomes *et al.*,<sup>92</sup> o efeito do processo de cominuição de amostras de folhas de plantas e a distribuição do tamanho de partícula foram avaliados para a determinação de B, Ca, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn por LIBS. Embora a técnica envolva a emissão de radiação, e não o transporte de partículas até o

<sup>92</sup> Gomes, M. S., *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 94-95 (2014) 27-33.

plasma, as considerações do trabalho são pertinentes, uma vez que também tratam da interação da radiação laser com amostras sólidas e o efeito do tamanho das partículas no resultado final. De acordo com os autores, a obtenção de partículas com tamanho inferior a 100  $\mu\text{m}$  possibilita uma melhora nos valores de RSD. Em trabalho similar,<sup>93</sup> foi observado que comprimidos com tamanho médio de partículas superior a 150  $\mu\text{m}$  resultam em uma maior variação dos resultados, em virtude da maior heterogeneidade da amostra e pelo caráter mais quebradiço do comprimido, formando partículas com uma grande variedade de tamanhos.

Nesse sentido, o equipamento utilizado para determinação do tamanho das partículas também foi utilizado para determinar o tamanho médio de 10, 50 e 90% do volume de partículas presentes no meio dispersor. Esses valores estão mostrados na Tabela 6, para cada uma das amostras analisadas.

**Tabela 6.** Diâmetro médio das partículas em diferentes proporções volumétricas obtidas após moagem criogênica e peneiramento (n = 5).

Amostra	Tamanho de partícula, $\mu\text{m}$		
	10%	50%	90%
Anis-estrelado	12	60	161
Boldo	9	23	47
Espinheira-santa	9	56	156
Maracujá	17	47	94
Quebra-pedra	7	45	151

É possível relacionar os resultados da Tabela 6 com o aspecto dos comprimidos (Figura 17), onde a maior dispersão das partículas nas amostras de anis-estrelado, espinheira-santa e quebra-pedra resulta em um tamanho médio de 150  $\mu\text{m}$ , podendo assim influenciar na precisão das determinações por LA-ICP-MS. Para as amostras de boldo e maracujá, o tamanho médio de 90% das partículas é inferior a 100  $\mu\text{m}$ , assim como uma menor dispersão do tamanho, o que pode contribuir para determinações mais precisas nessas amostras. No trabalho de Kuhn *et al.*,<sup>94</sup> a eficiência de atomização e ionização de diferentes partículas no ICP-MS foi

<sup>93</sup> de Carvalho, G. G. A., *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* (2015), IN PRESS.

<sup>94</sup> Kuhn, H. R., *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378 (2004) 1069-1074.

avaliada após a ablação de um CRM de vidro. De acordo com os autores, partículas com até 150  $\mu\text{m}$  de tamanho são completamente ionizadas no plasma.

### 5.1.3. Determinação da composição elementar das amostras de plantas

Posteriormente à caracterização das plantas após a etapa de moagem, as amostras foram analisadas para determinação dos elementos majoritários presentes. Os resultados obtidos com a análise elementar podem auxiliar na avaliação dos resultados obtidos por LA-ICP-MS, uma vez que o C será utilizado como elemento de referência nas análises, e estudos têm mostrado que amostras que contêm oxigênio na composição tendem a influenciar na espécie formada pelo C durante a ablação, havendo uma relação diretamente proporcional entre o teor de oxigênio e a quantidade de C na forma gasosa. Adicionalmente, a presença de elementos como N, S e halogênios podem alterar as espécies de C formadas na ablação com laser, contribuindo para a formação de uma maior quantidade de espécies na forma de partículas.<sup>70</sup>

Com o objetivo de caracterizar as amostras utilizadas, e investigar possíveis efeitos dos constituintes majoritários na eficiência do C como elemento de referência, diferentes técnicas analíticas foram empregadas para a determinação de C, N, S e Cl. As determinações foram feitas em triplicata, e a exatidão das determinações foi avaliada a partir da análise de um material de referência certificado de planta (NIST 1515 - *Apple leaves*). Os resultados obtidos para a análise elementar estão mostrados na Tabela 7.

<sup>70</sup> Frick, D. A., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 1294-1303.



**Tabela 7.** Composição elementar das amostras de plantas (n = 3).

Amostra	C (%)	N (%)	S ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Cl ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Anis-estrelado	47,4 $\pm$ 3,2	1,12 $\pm$ 0,02	3042 $\pm$ 193	135 $\pm$ 3
Boldo	38,4 $\pm$ 2,9	0,07 $\pm$ 0,01	443 $\pm$ 16	484 $\pm$ 5
Espinheira-santa	41,0 $\pm$ 2,3	2,06 $\pm$ 0,01	1967 $\pm$ 79	1674 $\pm$ 39
Maracujá	38,9 $\pm$ 1,9	0,38 $\pm$ 0,01	965 $\pm$ 83	1945 $\pm$ 30
Quebra-pedra	32,1 $\pm$ 2,1	1,56 $\pm$ 0,02	1965 $\pm$ 90	2073 $\pm$ 22
NIST 1515 (determinado)	-	1,98 $\pm$ 0,09	1769 $\pm$ 72	544 $\pm$ 16
NIST 1515 (certificado)	n.i.	2,25 $\pm$ 0,19	1800*	579 $\pm$ 23

\* Valor informado.

n.i.: concentração não informada

As concentrações de C, N, S e Cl nas amostras de plantas estão de acordo com os valores informados na literatura.<sup>88,95</sup> No entanto, é importante destacar que as variações observadas entre as amostras estão diretamente relacionadas ao metabolismo vegetal, o tipo de solo e a forma como são cultivadas.

Os resultados obtidos para C nas cinco amostras foram comparados com o valor determinado no papel filtro (41,1  $\pm$  2,1% de C). A partir da avaliação estatística desses resultados (ANOVA,  $P < 0,05$ ), foi possível observar uma diferença considerável, em relação ao papel filtro, apenas para a amostra de quebra-pedra. A análise estatística dos resultados obtidos para o NIST 1515 (*t-Student*,  $P < 0,05$ ) demonstrou que não houve diferença significativa entre os valores determinados e os valores certificados para os demais elementos. Embora o valor para S no CRM seja apenas informado, a exatidão da determinação foi considerada satisfatória.

## 5.2. Otimização das condições de ablação

Os dados obtidos a partir das análises por LA-ICP-MS fornecem um sinal contínuo ou transiente dependendo da forma como o pulso de laser é aplicado durante a ablação, podendo ser pulsado ou contínuo. Diversos fatores são influenciados pela forma de ablação, como tempo de aquisição do sinal (*dwell time*),

<sup>88</sup> Kalra, Y. P., Handbook of Reference Methods for Plant Analysis, **1998**, 291 p.

<sup>95</sup> DalCorso, G., et al., *Metallomics* 6 (**2014**) 1770-1788.

quantidade de material vaporizado, limites de detecção, entre outros.<sup>96</sup> No caso de análise de plantas por LA-ICP-MS, os trabalhos desenvolvidos empregam o modo de ablação contínuo. Esse procedimento é adotado, principalmente, em virtude do uso de equipamentos de ICP-MS sequenciais, e a ablação contínua da amostra possibilita a aquisição de um sinal mais estável, resultando em uma melhor precisão nas determinações, uma vez que esse tipo de material pode ser bastante heterogêneo. Além disso, os procedimentos utilizados para obtenção de imagens da distribuição dos elementos requerem a ablação no modo de linha, o qual pode demorar até 10 h por amostra.<sup>20</sup>

Dessa forma, nesse trabalho foi utilizado o modo de ablação contínua, onde uma linha é traçada ao longo da amostra, com o auxílio de ferramentas do programa do sistema LA. Uma representação da linha traçada e a interação do laser com a amostra é mostrada na Figura 18.



**Figura 18.** Ilustração da linha traçada na imagem da amostra para ablação com laser.

A aquisição do sinal inicia no momento em que o laser é ativado para ablação. Para permitir a obtenção do sinal referente à linha de base do ICP-MS, antes da ablação, foi utilizado um tempo de atraso (*delay*) no laser de 10 s e no ICP-MS de 7 s. Dessa forma, durante 3 s o sinal adquirido pelo ICP-MS foi referente ao ruído do equipamento e ao gás de carregador.

<sup>20</sup> Becker, J. S., et al., *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 63 (2008) 1248-1252.

<sup>96</sup> Tanner, M., et al., *Analytica Chimica Acta* 633 (2009) 19-28.

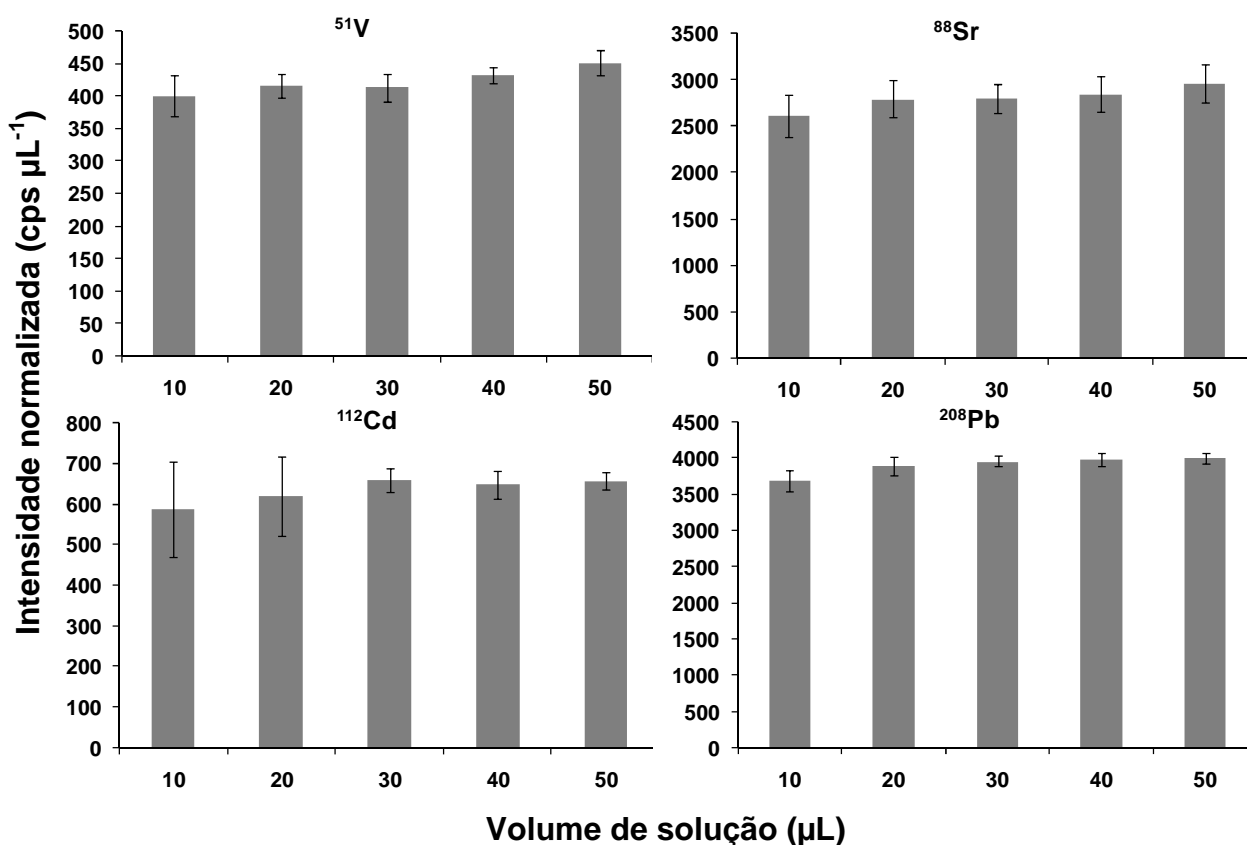
### 5.2.1. Avaliação do volume de solução de referência no papel filtro

A proposta deste trabalho consiste na utilização de discos de papel filtro enriquecidos com soluções de referência como forma de calibração na técnica de LA-ICP-MS. Os trabalhos encontrados na literatura que empregam esse procedimento apresentam algumas variações com relação ao tipo de material usado como suporte e o volume de solução, que pode variar de 1 a 300  $\mu\text{L}$ . Nesse sentido, anteriormente às avaliações das condições de ablação, o volume de solução de referência adicionada ao papel filtro foi avaliado. Nessa avaliação, volumes de 10 a 50  $\mu\text{L}$  de uma solução multielementar (SCP 33 MS) a 5  $\text{mg L}^{-1}$ , preparada em  $\text{HNO}_3$  5% (v/v), foram adicionados sobre discos de papel filtro de 17 mm de diâmetro. A solução foi adicionada no centro do papel, e com o auxílio de uma pinça o papel foi seco a 80 °C sob aquecimento por infravermelho (Figura 11). Após a secagem, o papel filtro foi fixado em uma lâmina de vidro com fita dupla-face (Figura 13).

Para avaliar a homogeneidade da distribuição da solução adicionada ao papel, foi feita uma linha de ablação ao longo de todo o papel, passando pelo centro do disco. Como se tratou de uma avaliação qualitativa, onde foi observado somente o perfil do sinal, as intensidades dos analitos não foram relacionadas com a intensidade do  $^{13}\text{C}$ . A potência de radiofrequência do ICP-MS foi de 1300 W e vazão dos gases principal, auxiliar e de nebulização de 15, 1,20 e 1,20  $\text{L min}^{-1}$ , respectivamente. As condições adotadas para ablação foram adaptadas do trabalho de Becker *et al.*<sup>20</sup> (20% da energia, frequência de pulso de 20 Hz, diâmetro do feixe de 100  $\mu\text{m}$  e velocidade de varredura de 100  $\mu\text{m s}^{-1}$ ).

Como todo o sinal ao longo do papel filtro foi utilizado para integração do sinal, os tempos de *delay* do sistema LA e do instrumento de ICP-MS foram ajustados para que a aquisição tivesse início e fim nas duas extremidades da linha traçada sobre o papel. Cada volume de solução foi avaliado em três papéis diferentes, de forma a obter um valor médio de intensidade para cada condição investigada. Os isótopos  $^{51}\text{V}$ ,  $^{88}\text{Sr}$ ,  $^{112}\text{Cd}$  e  $^{208}\text{Pb}$  foram monitorados para a avaliação da distribuição dos elementos ao longo do papel filtro. Para comparação das condições, as intensidades foram normalizadas em relação ao volume da solução de referência (5  $\text{mg L}^{-1}$ ) e os resultados estão mostrados na Figura 19.

<sup>20</sup> Becker, J. S., *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 63 (2008) 1248-1252.



**Figura 19.** Intensidades normalizadas para avaliação da distribuição de V, Sr, Cd e Pb no papel filtro ( $n = 3$ ).

As intensidades obtidas para os volumes de 10 a 50  $\mu\text{L}$  (Figura 19) foram consideradas estatisticamente semelhantes (ANOVA,  $P < 0,05$ ). No entanto, como pode ser observada nos gráficos, a intensidade média normalizada para o volume de 10  $\mu\text{L}$  foi sempre inferior às intensidades dos demais volumes. Esse comportamento deve-se, possivelmente, ao espalhamento não uniforme da solução ao longo do papel quando foi utilizado esse volume, resultando em uma intensidade menor nas bordas do papel, que contribuiu assim para uma variação maior dos resultados, como pode ser observado nas barras de erro para cada elemento.

Como a quantidade de solução aplicada no papel está diretamente relacionada à intensidade do sinal obtido para cada elemento, volumes maiores são preferenciais, uma vez que contribuem para uma maior relação sinal/ruído e, conseqüentemente, melhores valores de LD. O volume de 50  $\mu\text{L}$  não foi escolhido em virtude da quantidade de solução no papel, que aumentou o tempo de secagem e devido à possibilidade de haver a formação de pontos com maior concentração de elemento, pela formação de áreas com maior acúmulo de solução. Dessa forma, o

volume de 40  $\mu\text{L}$  foi escolhido para os demais procedimentos envolvendo o uso do papel filtro com solução de referência para a obtenção das curvas de calibração.

### 5.2.2. Avaliação da vazão do gás carregador

Nas análises por LA-ICP-MS, tanto o espectrômetro de massa quanto o sistema de ablação devem ser otimizados para obtenção da melhor relação sinal/ruído. No que se refere ao sistema de detecção, uma intensidade de sinal suficiente que permita a quantificação dos analitos, com boa precisão e exatidão, é desejada, sem que haja a saturação da intensidade do sinal nas razões  $m/z$  de interesse. No entanto, o excesso de material ablado pode causar efeitos indesejáveis como efeito de memória, instabilidade do plasma e deposição de material na interface (cones de amostragem e lente iônica).<sup>90</sup>

Em virtude do complexo mecanismo de interação do laser com diferentes tipos de materiais, as condições operacionais do equipamento de ICP-MS devem ser ajustadas de forma a minimizar ou eliminar efeitos de fracionamento, que resultam em atomização/ionização incompleta no plasma. Assim como na análise de soluções com nebulização, as condições do equipamento para análise por LA-ICP-MS são otimizadas para minimizar a formação de íons óxidos e de carga dupla. O ajuste de parâmetros como a vazão do gás carregador, tempo de estabilização do quadrupolo (*settling time*), tempo de leitura em cada  $m/z$  (*dwell time*), número de varreduras em cada leitura (*sweeps per reading*), leituras por replicatas (*readings per replicate*) e número de replicatas (*number of replicates*) auxiliam na obtenção de uma resposta rápida do equipamento de ICP-MS para o aerossol gerado na ablação.<sup>15</sup>

No trabalho de Longerich *et al.*,<sup>55</sup> diversos parâmetros do equipamento de ICP-MS foram avaliados para as análises por LA-ICP-MS e algumas recomendações foram estabelecidas: *i*) o tempo de resposta do detector deve ser rápido quando se deseja a obtenção da informação da distribuição espacial dos elementos na amostra; *ii*) a intensidade do ruído do instrumento deve ser monitorada durante a análise; e *iii*) para equipamentos com tempo de estabilização do quadrupolo (*settling*

<sup>15</sup> Günther, D., *et al.*, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 24 (2005) 255-265.

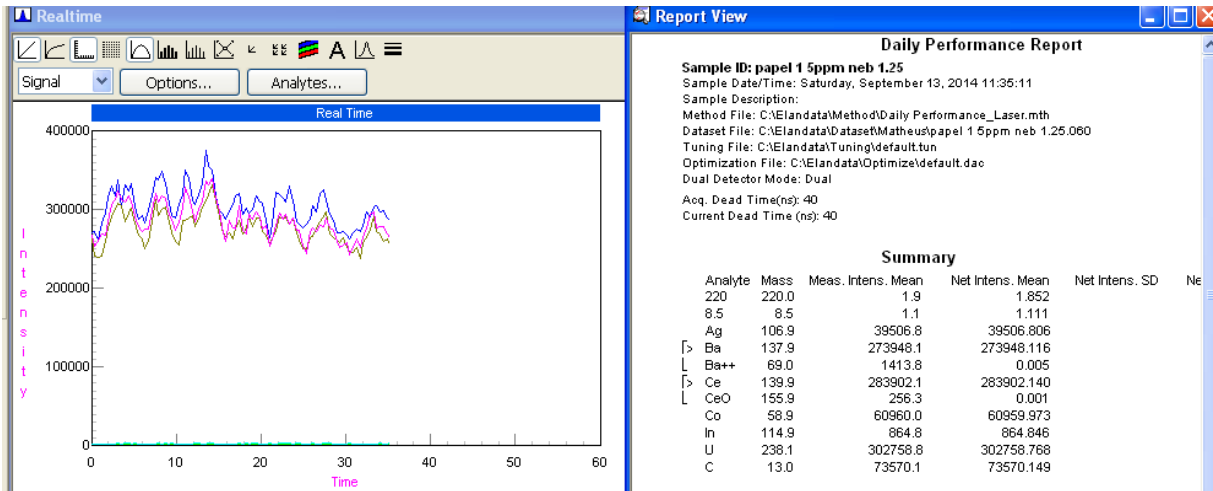
<sup>55</sup> Longerich, H. P., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 11 (1996) 899-904.

<sup>90</sup> Durrant, S. F., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14 (1999) 1385-1403.

*time*) de alguns ms, o tempo de leitura em cada  $m/z$  (*dwell time*) deve ser cerca de 6 vezes o tempo de estabilização.

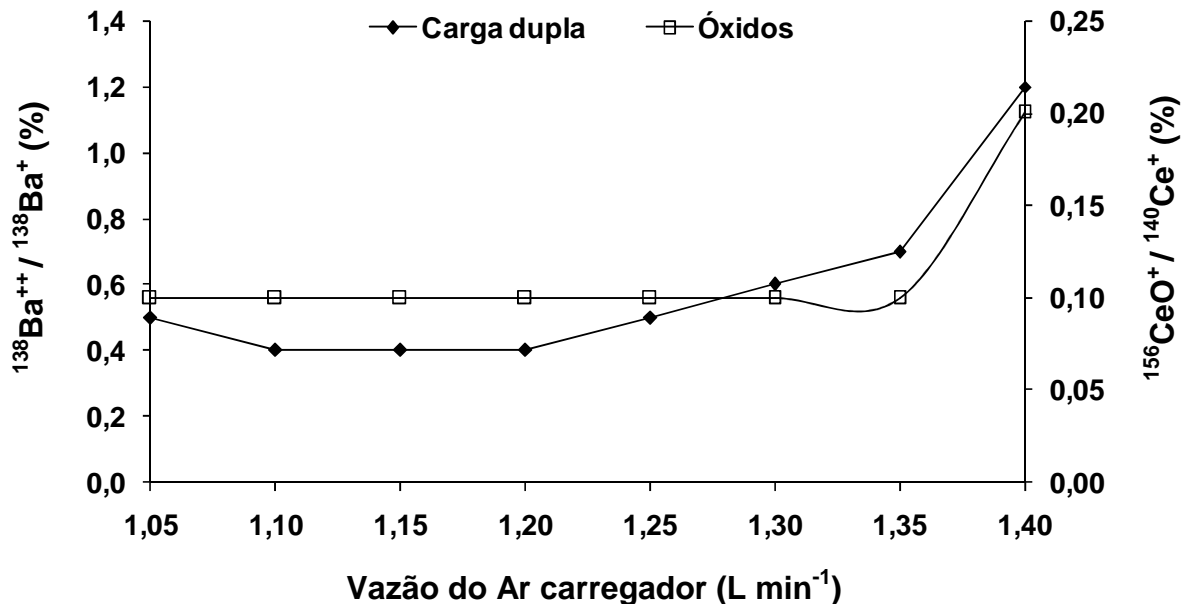
De acordo com essas recomendações, o parâmetro *dwell time* foi ajustado em 30 ms, sendo 6 vezes maior que o tempo de estabilização do quadrupolo do equipamento utilizado (aproximadamente 5 ms). Como o vapor gerado na ablação representa uma concentração pontual dos analitos nas amostras, foi selecionada uma condição de apenas uma varredura de  $m/z$  para cada leitura, assim como uma única replicata. Dessa forma, o tempo de aquisição do sinal pelo equipamento de ICP-MS foi ajustado a partir do número de leituras por replicata, sendo estabelecido em 90 para as análises por LA-ICP-MS no presente trabalho.

A vazão do Ar carregador foi otimizada em função do monitoramento dos isótopos  $^{13}\text{C}$ ,  $^{59}\text{Co}$ ,  $^{115}\text{In}$  e  $^{238}\text{U}$  para avaliação da sensibilidade do equipamento ao longo da faixa de  $m/z$  estudada, assim como a razão entre os íons  $^{156}\text{CeO}^+ / ^{140}\text{Ce}^+$  e  $^{138}\text{Ba}^{++} / ^{138}\text{Ba}^+$ , monitorados para verificação da formação de íons óxidos e de carga dupla, respectivamente. Foram avaliadas as vazões entre 1,05 e 1,40 L  $\text{min}^{-1}$ , com incrementos de 0,05 L  $\text{min}^{-1}$  para cada condição. As demais condições do equipamento de ICP-MS e do sistema de ablação foram as mesmas descritas anteriormente. A avaliação foi feita com um disco de papel filtro contendo 40  $\mu\text{L}$  de uma solução multielementar (SCP 33 MS) de 5 mg  $\text{L}^{-1}$ . Para cada condição de vazão do Ar carregador, foi utilizado um papel filtro e a linha de ablação foi traçada na região central do disco. O tempo de *delay* do equipamento de ICP-MS foi ajustado de forma a monitorar as intensidades somente durante a região de estabilização do sinal. Uma representação do perfil do sinal obtido em tempo real e a forma como os resultados foram reportados estão mostrados na Figura 20.



**Figura 20.** Exemplo do perfil de sinal obtido e resultados reportados durante a avaliação do Ar carregador.

Os resultados obtidos para a avaliação da formação de íons óxidos e de carga dupla no plasma, a partir da análise do papel filtro contendo 40  $\mu\text{L}$  de uma solução multielementar a 5  $\text{mg L}^{-1}$ , por LA-ICP-MS, estão mostrados na Figura 21.



**Figura 21.** Avaliação da formação de óxidos e íons de carga dupla em LA-ICP-MS.

A taxa de formação dos óxidos no plasma nas análises por LA-ICP-MS é consideravelmente menor que os valores observados com a análise de soluções por

nebulização pneumática.<sup>16</sup> Enquanto que na última situação são utilizadas condições com valores médios de 2 a 3% de óxidos, esses valores são geralmente inferiores a 0,5% com o sistema LA. Embora a taxa de íons óxidos tenha se mantido praticamente constante em 0,1% até a vazão de 1,35 L min<sup>-1</sup>, e aumentado para apenas 0,2% em 1,40 L min<sup>-1</sup> de Ar, é necessário considerar que esse valor representa um aumento de 100%, podendo influenciar na sensibilidade do equipamento para alguns elementos, e conseqüente piora nos limites de detecção. Os motivos relacionados à maior formação de óxidos em vazões maiores do gás carregador podem estar associados ao resfriamento do plasma e deslocamento da zona analítica.<sup>97</sup>

Assim como observado para a formação de íons óxidos no plasma, o aumento na vazão do gás carregador resultou em um aumento na taxa de formação de íons de carga dupla, a qual variou de 0,4 a 0,6% até a vazão de 1,30 L min<sup>-1</sup>, e passou a 1,2% na vazão de 1,40 L min<sup>-1</sup>. Embora esse parâmetro possa influenciar nas determinações de alguns elementos, principalmente os alcalinos-terrosos ou elementos com baixas energias de ionização, o aumento na taxa de formação de íons de carga dupla também foi associada à possível formação da espécie poliatômica  $^{40}\text{Ar}^{29}\text{Si}^+$  na razão m/z correspondente à espécie  $^{138}\text{Ba}^{++}$ , onde o Si é proveniente da lâmina de vidro utilizada para suporte do papel filtro.

Além da formação de íons óxidos e de carga dupla no plasma, a otimização da vazão do gás carregador foi feita com base nas intensidades obtidas para alguns isótopos, representativos para m/z baixo, médio e alto. Nessa avaliação, foram observadas as intensidades brutas, assim como aquelas normalizadas em função da intensidade do  $^{13}\text{C}$ . Os resultados obtidos para  $^{59}\text{Co}$ ,  $^{115}\text{In}$  e  $^{238}\text{U}$  estão mostrados nas Figuras 22, 23 e 24, respectivamente. Além disso, a variação da intensidade do isótopo  $^{13}\text{C}$ , nas diferentes vazões estudadas, está mostrada na Figura 25.

<sup>16</sup> Montaser, A., *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, **1998**, 1004 p.

<sup>97</sup> Vaughan, M. A., *et al.*, *Applied Spectroscopy* **40** (1986) 434-444.



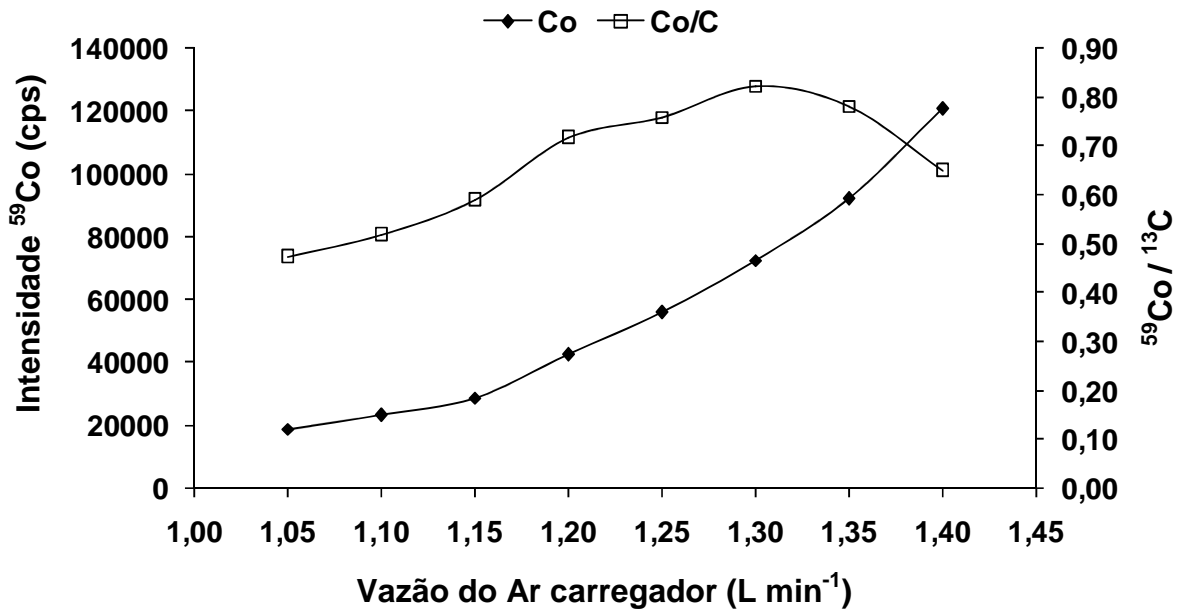


Figura 22. Avaliação da intensidade do <sup>59</sup>Co em diferentes vazões de Ar como gás carregador.

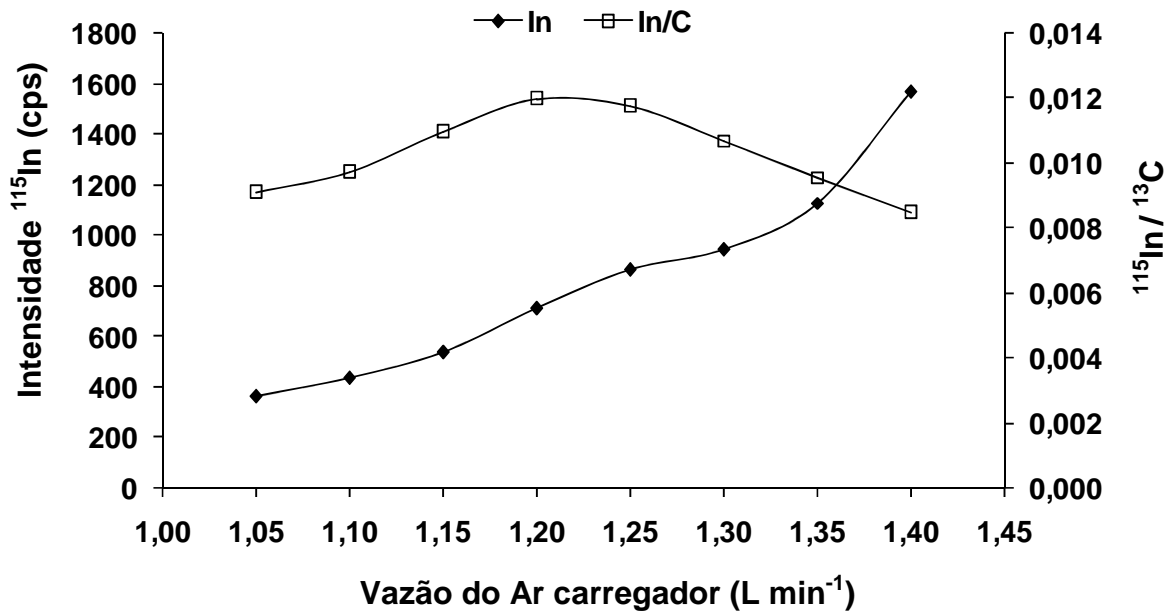


Figura 23. Avaliação da intensidade do <sup>115</sup>In em diferentes vazões de Ar como gás carregador.

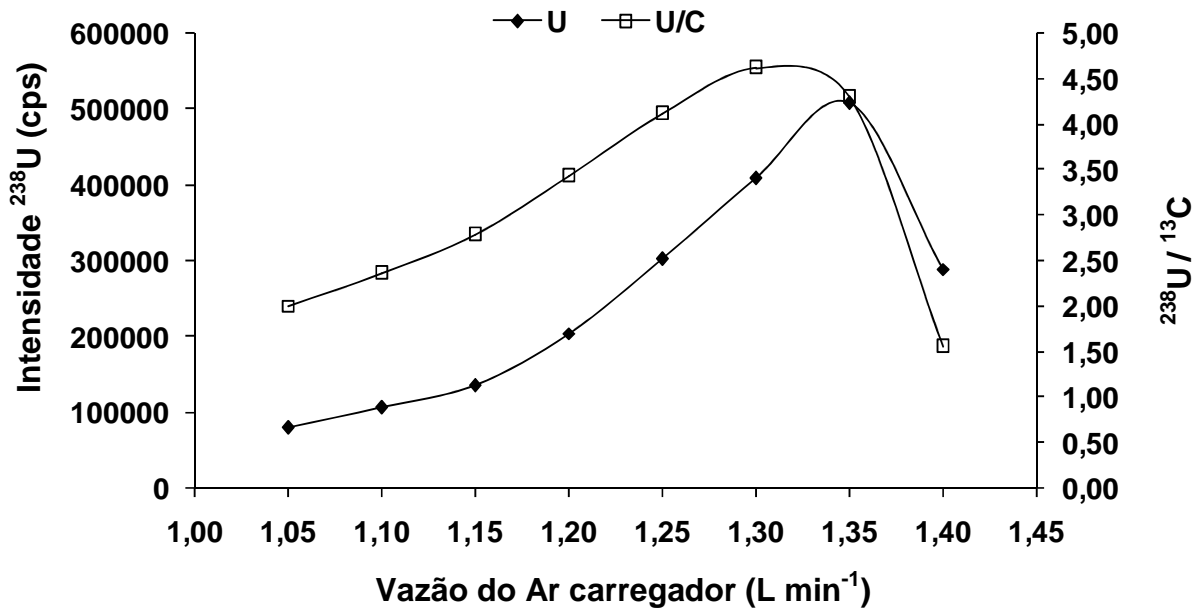


Figura 24. Avaliação da intensidade do <sup>238</sup>U em diferentes vazões de Ar como gás carregador.

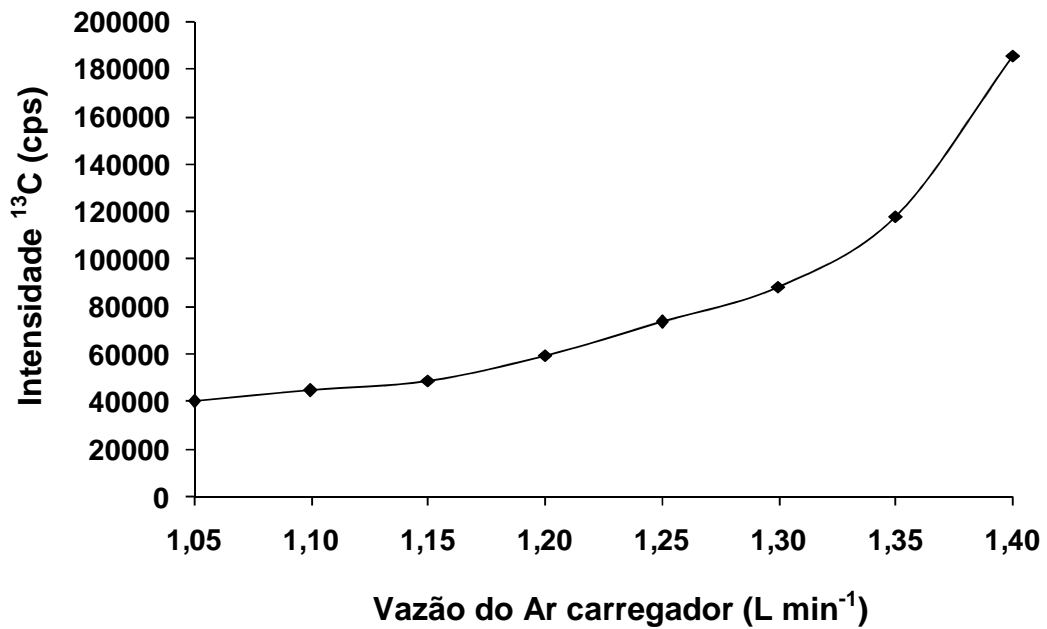


Figura 25. Intensidade do <sup>13</sup>C em diferentes vazões de Ar como gás carregador.

A escolha da vazão do gás carregador é um parâmetro importante para a obtenção de uma condição de máxima eficiência de análise (alta sensibilidade, diminuição de interferências etc.). No entanto, assim como observado em outros estudos relacionados à técnica de LA-ICP-MS, no caso de análises multielementares, uma condição de compromisso é adotada, mesmo que essa condição não seja a que represente a melhor eficiência para todos analitos.<sup>15,90</sup> Como pode ser observado nas Figuras 22, 23 e 24, há um comportamento praticamente similar entre a intensidade dos íons monitorados e a razão com o  $^{13}\text{C}$  até a vazão de  $1,30 \text{ L min}^{-1}$  e um perfil também similar ocorre com o  $^{59}\text{Co}$  e o  $^{115}\text{In}$  ao serem relacionados com a intensidade do  $^{13}\text{C}$ . Embora a intensidade de cada íon tenha aumentado até a vazão de  $1,40 \text{ L min}^{-1}$ , a intensidade normalizada decresce a partir de  $1,35 \text{ L min}^{-1}$ . Esse fato pode estar associado a uma maior eficiência no transporte dos vapores gerados durante a ablação, incluindo o transporte de partículas maiores, o que resultou em um aumento exponencial na intensidade do  $^{13}\text{C}$  a partir da vazão de  $1,30 \text{ L min}^{-1}$ , como pode ser visto na Figura 25, enquanto as intensidades do sinal dos analitos não aumentaram nas mesmas proporções.

O comportamento do  $^{238}\text{U}$  a partir da vazão de  $1,30 \text{ L min}^{-1}$  foi distinto dos outros íons monitorados, uma vez que a partir dessa condição ocorre um decréscimo tanto na intensidade bruta quanto na intensidade normalizada com  $^{13}\text{C}$ . Pode-se relacionar o comportamento observado para o U com o resfriamento do plasma nas vazões mais altas e consequente aumento na formação de íons óxidos. A formação dessas espécies pode ocorrer para todos os íons, mas no caso de Co, In e U, os respectivos óxidos têm energias de dissociação bem distintas, sendo de 3,81, 3,73 e 7,89 eV para  $\text{CoO}^+$ ,  $\text{InO}^+$  e  $\text{UO}^+$ , respectivamente. Conforme observado para Co e In, pode-se concluir que os óxidos possivelmente formados não afetaram a intensidade do sinal bruto, pois as energias de dissociação são relativamente baixas e as espécies são facilmente dissociadas no plasma. Por outro lado, a energia de dissociação do  $\text{UO}^+$  é consideravelmente superior e a sua formação pode contribuir para a diminuição da intensidade bruta do íon  $\text{U}^+$ . Dessa maneira, a queda abrupta nas intensidades do sinal do  $^{238}\text{U}$ , em comparação com  $^{59}\text{Co}$  e  $^{115}\text{In}$ , deve-se, provavelmente, à contribuição da formação do respectivo óxido, somado ao efeito do aumento exponencial na intensidade do  $^{13}\text{C}$ . Um comportamento similar ao

obtido para o  $^{238}\text{U}$  foi observado para os íons  $^{232}\text{Th}^+$  e  $^{238}\text{U}^+$  no trabalho de Hattendorf *et al.*<sup>98</sup> em vazões de  $1,50 \text{ L min}^{-1}$  de He como gás carregador.

De acordo com os resultados mostrados nas Figuras 21 a 25, com o objetivo de otimizar o instrumento de ICP-MS para uma condição de máxima sensibilidade e baixa taxa de formação de íons óxidos e de carga dupla, além de uma condição adequada para a utilização do C como elemento de referência para normalização do sinal, a vazão do gás carregador foi estabelecida em  $1,30 \text{ L min}^{-1}$ . Cabe destacar que assim como é feita a avaliação rotineira do equipamento de ICP-MS para a análise de soluções por nebulização pneumática, buscando uma condição de elevada sensibilidade e baixa formação de íons de carga dupla e óxidos, tal avaliação também foi feita diariamente para o sistema LA-ICP-MS, antes de iniciar as análises. Para essa avaliação, a vazão do gás carregador foi verificada na faixa de  $1,20$  a  $1,40 \text{ L min}^{-1}$ , buscando uma condição de elevada intensidade para  $^{115}\text{In}$  e valores de íons óxidos e de carga dupla de até 0,15 e 0,6%, respectivamente.

### 5.2.3. Avaliação da adição de aerossol no gás carregador

Desde o desenvolvimento da técnica de LA-ICP-MS, diferentes estratégias têm sido estudadas para melhorar a sensibilidade da técnica, além da precisão e exatidão das determinações para a análise *in situ* de elementos traço em diferentes amostras. Nesse sentido, algumas propostas estão relacionadas à combinação do gás carregador com outros gases ou solventes ( $\text{H}_2$ ,  $\text{N}_2$ , metano, metanol e água).<sup>99</sup> Embora essas modificações permitam uma melhora na precisão quando comparada com a forma de introdução mais convencional, baseada nos padrões com ajuste de matriz, a utilização do plasma úmido, assim denominado quando o sistema de ablação é combinado ao aerossol de alguma solução, está diretamente associada a um aumento na formação de óxidos e outras interferências poliatômicas em toda a faixa do espectro de massa. A dessolvatação dessas soluções com nebulizador ultrassônico é uma alternativa para diminuir a formação de interferências no plasma.<sup>100</sup>

<sup>98</sup> Hattendorf, B., *et al.*, *Analytical Chemistry* 75 (2003) 341A-347A.

<sup>99</sup> Liu, S. H., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 536-544.

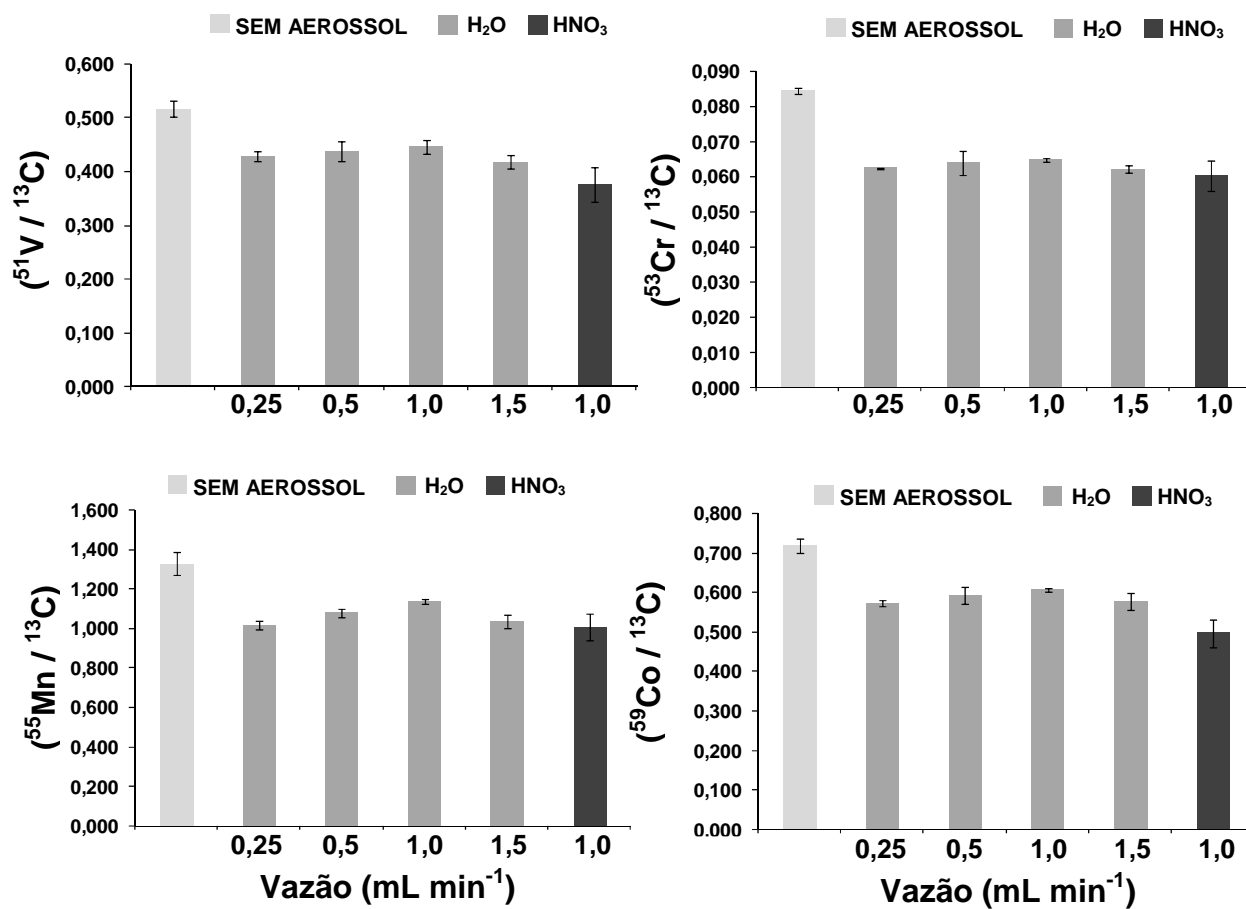
<sup>100</sup> Doherty, W., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 11 (1996) 1123-1126.

Connor *et al.*<sup>101</sup> e Alary *et al.*<sup>102</sup> demonstraram que a introdução de pequenas quantidades de vapor de água resultaram em um aumento na intensidade dos sinais para Cu, Pb, Sb e Zn, determinados por LA-ICP-MS e ETV-ICP-MS, respectivamente.

Dessa forma, o efeito da adição de aerossol de água e de uma solução de HNO<sub>3</sub> 5% (v/v) foi investigado no presente trabalho. O procedimento consistiu na passagem do Ar carregador, na vazão de 1,30 L min<sup>-1</sup>, por um nebulizador ultrassônico equipado com sistema de dessolvatação em temperaturas de aquecimento e resfriamento de 140 e -2 °C, respectivamente. O aerossol produzido foi introduzido na câmara de ablação e transportado até o plasma juntamente com o material vaporizado pelo laser. Nesse estudo, foram investigadas vazões de água de 0,25, 0,50, 1,0 e 1,5 mL min<sup>-1</sup>, além da vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> de HNO<sub>3</sub> 5%. As intensidades dos sinais foram normalizadas em relação ao sinal do <sup>13</sup>C e os resultados foram comparados com uma condição sem utilização de aerossol úmido. A avaliação foi feita com um disco de papel filtro contendo 40 µL de uma solução multielementar (SCP 33 MS) de 5 mg L<sup>-1</sup>. Para cada condição de vazão das soluções estudadas, foi utilizado um papel filtro. Foram traçadas três linhas de ablação na região central do disco, contendo cerca de 5 mm de comprimento cada uma. O sinal correspondente a cada linha foi adquirido individualmente e posteriormente processado para a obtenção de um valor médio de intensidade. Conforme os resultados obtidos para a avaliação do efeito da adição de aerossol úmido nas análises por LA-ICP-MS, foi possível separar os analitos monitorados em três grupos: *i*) diminuição da sensibilidade com a adição de aerossol no plasma, para V, Cr, Mn e Co; *ii*) aumento da sensibilidade com a adição de aerossol no plasma, para Zn, As, Se, Cd, La e Ce; e *iii*) nenhum efeito considerável com a adição de aerossol no plasma, para Ba, Cu, Tl, Ni, Sr e Pb. Os resultados obtidos para os grupos *i*, *ii* e *iii* estão mostrados nas Figuras 26, 27 e 28, respectivamente.

<sup>101</sup> Connor, C. O., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 21 (2006) 556-565.

<sup>102</sup> Alary, J.-F., *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 53 (1998) 1705-1721.



**Figura 26.** Efeito da adição de aerossol úmido sobre a intensidade do sinal do V, Cr, Mn e Co, em LA-ICP-MS (n = 3).

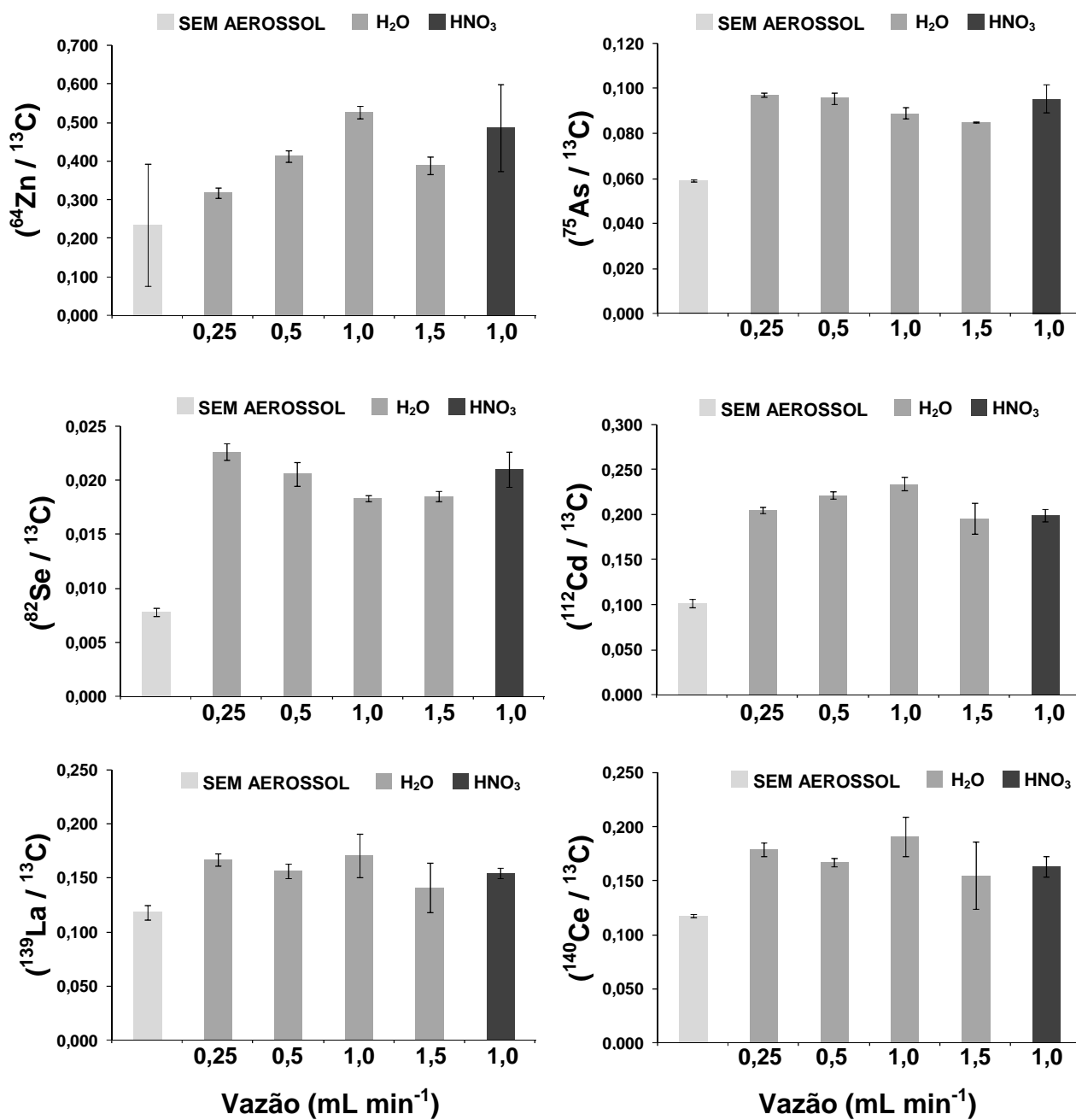
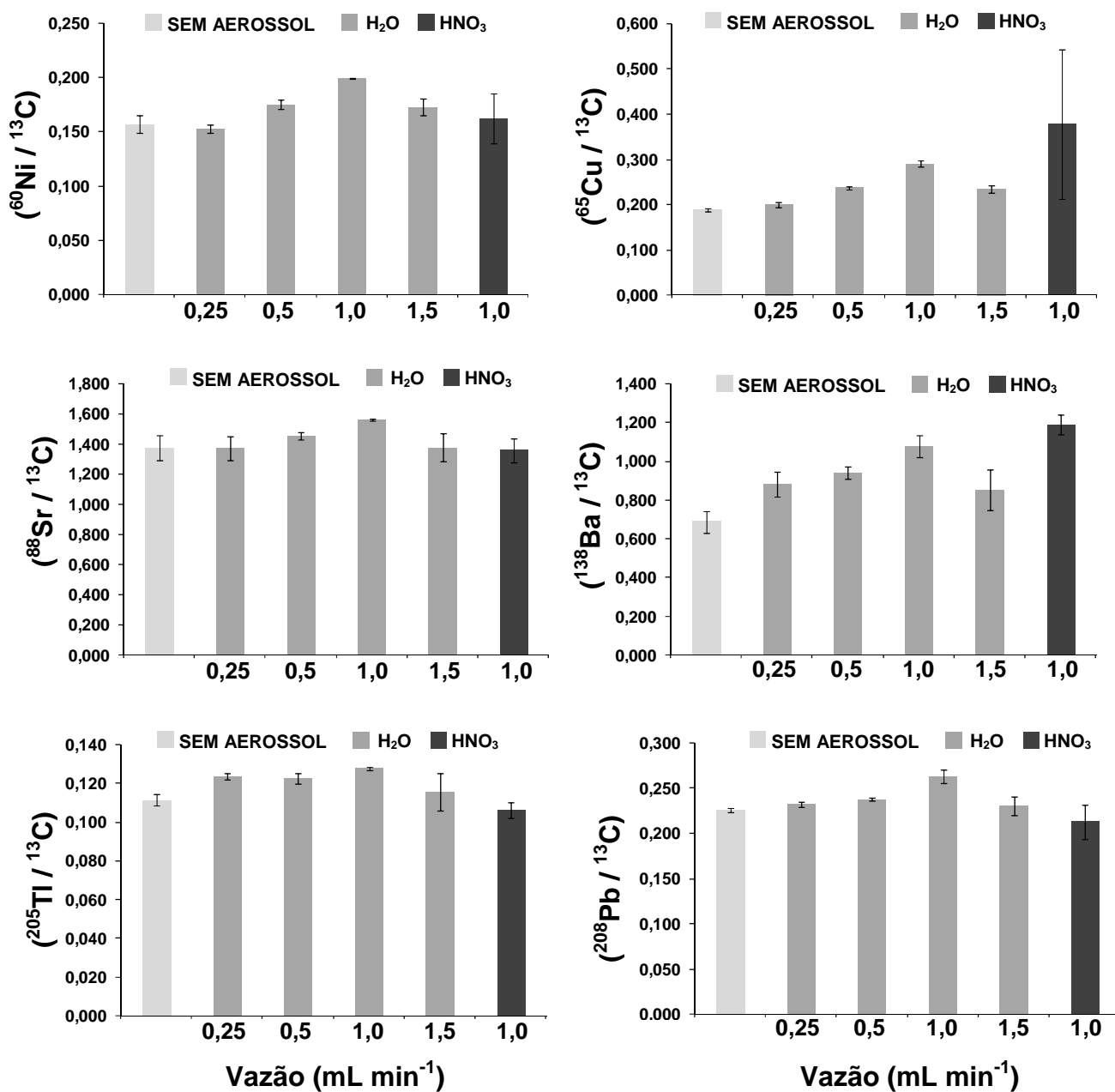


Figura 27. Efeito da adição de aerossol úmido sobre a intensidade do sinal do Zn, As, Se, Cd, La e Ce, em LA-ICP-MS (n = 3).



**Figura 28.** Efeito da adição de aerossol úmido sobre a intensidade do sinal do Ni, Cu, Sr, Ba, Tl e Pb, em LA-ICP-MS ( $n = 3$ ).

A combinação de aerossol úmido com a técnica de ablação com laser tem sido proposta principalmente para melhorar a sensibilidade da técnica de LA-ICP-MS. A melhora associada à introdução de água no plasma está relacionada com a formação de íons  $\text{H}^+$  no plasma, aumentando assim a condutividade térmica do



plasma e melhorando a transferência de energia do plasma para os analitos.<sup>101</sup> Conforme os resultados mostrados nas Figuras 26 a 28, diferentes comportamentos foram observados para os isótopos monitorados. A diminuição na intensidade de V, Cr, Mn e Co com o aumento da vazão de água ou utilização de HNO<sub>3</sub> 5% pode estar associada à formação dos respectivos óxidos, assim como o resfriamento do plasma com a adição do aerossol.

Em relação aos isótopos <sup>64</sup>Zn, <sup>75</sup>As, <sup>82</sup>Se, <sup>112</sup>Cd, <sup>139</sup>La e <sup>140</sup>Ce foi observado um aumento de 1,4 (para La) a 2,8 (para Se) vezes nas intensidades obtidas com a adição de aerossol úmido através da câmara de ablação, onde as melhores condições de vazão foram diferentes para cada analito, mas com uma tendência em torno da condição de 1,0 mL min<sup>-1</sup> de água. O aumento na intensidade para alguns desses isótopos pode estar relacionado ao aumento da energia do plasma, conforme discutido anteriormente, melhorando a eficiência de ionização de elementos com elevada energia de ionização (Zn = 9,39 eV, As = 9,79 eV, Se = 9,75 eV e Cd = 8,99 eV). Um aumento na intensidade de elementos com elevada energia de ionização também foi observado no trabalho de Fliegel *et al.*,<sup>103</sup> ao adicionar aerossol de água e metanol no Ar carregador para a análise de vidro por LA-ICP-MS.

Liu *et al.*<sup>104</sup> avaliaram a adição de aerossol de água ou mistura água/etanol para a análise de vidro (NIST 610) por LA-ICP-MS. De acordo com os resultados obtidos pelos autores, a adição de água durante a ablação resultou em um aumento de apenas 1,2 a 1,5 vezes na intensidade dos 60 elementos investigados. No trabalho de Connor *et al.*,<sup>101</sup> a utilização de aerossol de água na análise de vidro, polietileno e liga metálica por LA-ICP-MS (Nd:YAG, 213 nm), foi comparada com a eficiência da mesma análise empregando vapor seco (sem aerossol). De acordo com os resultados, a adição do aerossol úmido na câmara de ablação resultou no aumento da precisão nas determinações, mas nenhuma melhora significativa na sensibilidade foi observada.

Conforme mostrado na Figura 28, um comportamento similar também foi obtido neste trabalho para alguns dos elementos investigados. Em virtude desses resultados, onde de maneira geral não foi observada uma melhora significativa nas

<sup>101</sup> Connor, C. O., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 21 (2006) 556-565.

<sup>103</sup> Fliegel, D., *et al.*, *Analyst* 136 (2011) 4925-4934.

<sup>104</sup> Liu, S., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 536-544.

intensidades dos sinais para os elementos estudados, após a adição de aerossol, o procedimento de ablação para calibração com papel filtro e análise de amostras de plantas foi feito sem a utilização de aerossol dessolvado na câmara de ablação, tornando o procedimento mais simplificado, sem a necessidade de utilizar instrumentação adicional para nebulização.

#### 5.2.4. Avaliação dos parâmetros do laser

A obtenção de informações referentes à distribuição espacial dos elementos, que pode ser obtida com as análises por LA-ICP-MS, é diretamente dependente da utilização de condições otimizadas para a aquisição dos sinais dos elementos. Em relação às condições de ablação, aquelas que podem ter maior influência e, portanto, devem ser avaliadas, são a energia do laser, o diâmetro do feixe e a velocidade de varredura do laser, sendo que a última condição é crucial no caso da aplicação da técnica para a obtenção de imagens da distribuição espacial dos elementos.<sup>105</sup>

A energia do laser utilizada nos procedimentos envolvendo o uso do papel filtro foi mantida em 20%, tendo em vista que essa energia é suficiente para a completa remoção do papel na região marcada para ablação, e energias maiores poderiam contribuir para o transporte de uma maior quantidade de material particulado proveniente do vidro utilizado como suporte. Para avaliação do efeito da velocidade de varredura do laser na qualidade do sinal obtido usando a ablação contínua, foi utilizado um papel filtro enriquecido com 40 µL de uma solução multielementar (SCP 33 MS) a 5 mg L<sup>-1</sup>. O sistema de ablação e o equipamento de ICP-MS foram mantidos nas condições previamente descritas. Foram avaliadas velocidades de varredura de 20, 50, 100 e 150 µm s<sup>-1</sup> em uma linha com aproximadamente 5 mm de comprimento. As intensidades dos sinais adquiridos foram normalizadas em relação à intensidade do <sup>13</sup>C. Para avaliação de toda faixa de m/z estudada, foram monitorados os isótopos <sup>55</sup>Mn, <sup>112</sup>Cd e <sup>208</sup>Pb e os resultados obtidos para cada isótopo estão mostrados nas Figuras 29, 30 e 31, respectivamente.

<sup>105</sup> Lear, J., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 159-164.

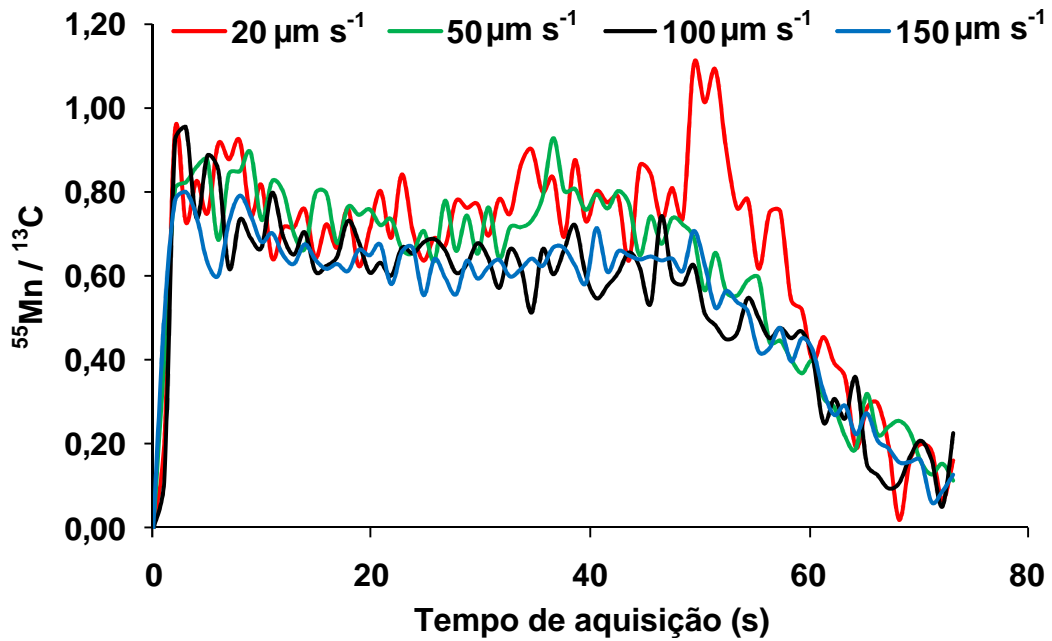


Figura 29. Efeito da velocidade de varredura na aquisição do sinal para  $^{55}\text{Mn}$  por LA-ICP-MS.

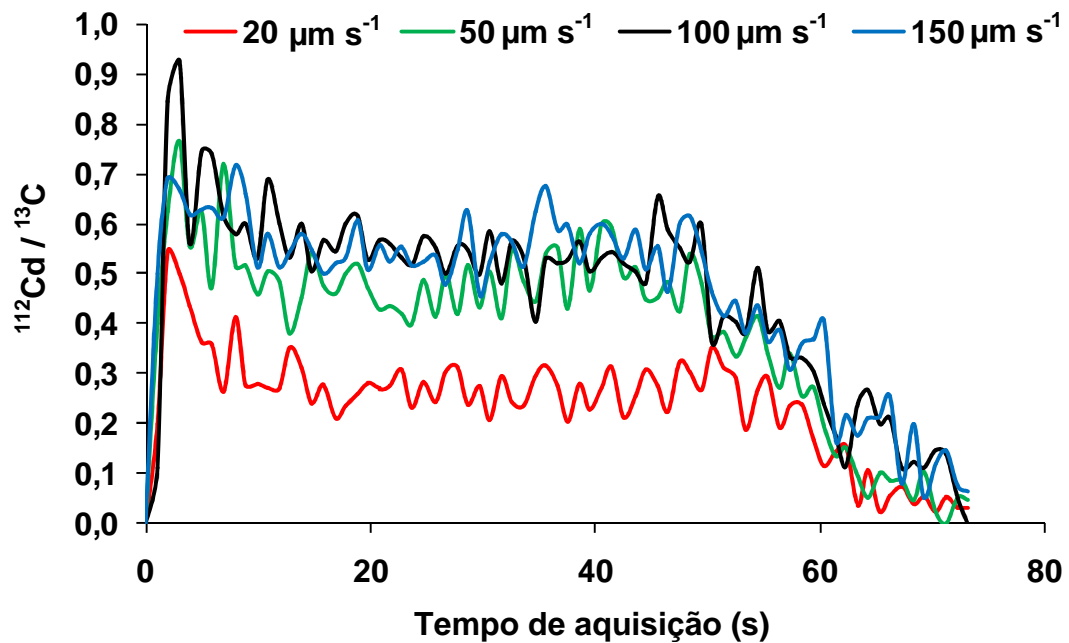
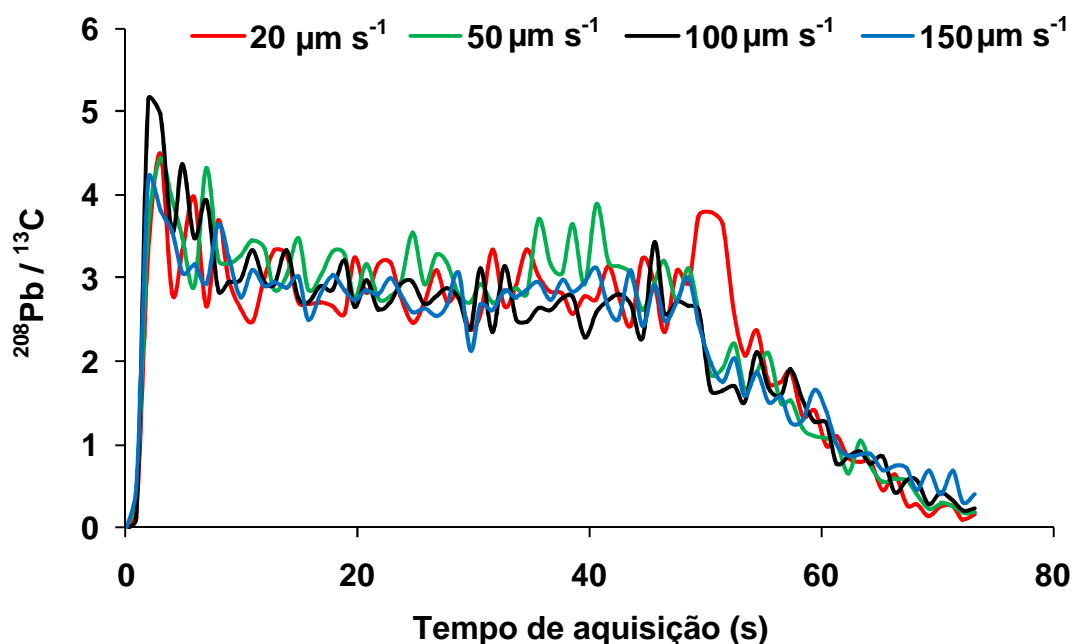


Figura 30. Efeito da velocidade de varredura na aquisição do sinal para  $^{112}\text{Cd}$  por LA-ICP-MS.



**Figura 31.** Efeito da velocidade de varredura na aquisição do sinal para  $^{208}\text{Pb}$  por LA-ICP-MS.

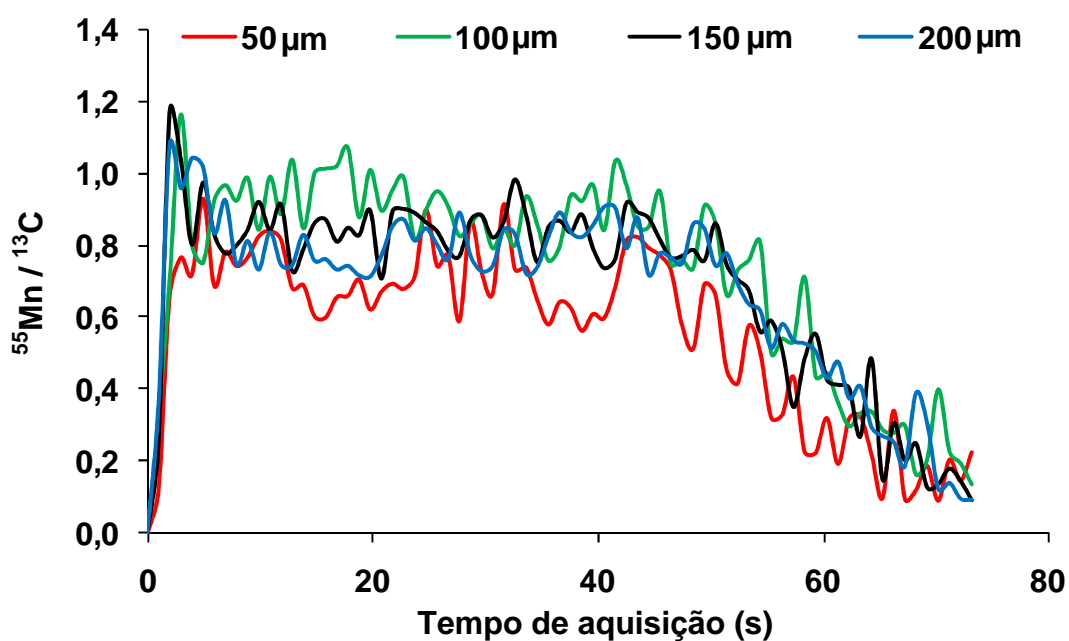
De acordo com os sinais normalizados para os três isótopos monitorados, foi possível observar nas Figuras 29, 30 e 31 que não houve uma variação considerável das intensidades em relação às diferentes velocidades de varredura do sistema de ablação. Um comportamento distinto foi observado para Cd na condição de  $20 \mu\text{m s}^{-1}$ , na qual a intensidade normalizada foi visivelmente inferior.

No trabalho de Bonta *et al.*,<sup>86</sup> a velocidade de varredura do laser foi investigada para a determinação de Pt em tecidos celulares por LA-ICP-MS (Nd:YAG, 213 nm). De acordo com a observação dos autores, velocidades superiores ao diâmetro do feixe resultaram em um alargamento do sinal adquirido, além do sinal não retornar à linha de base antes da próxima ablação. Esses fatores poderiam afetar a resolução das imagens nas análises de distribuição espacial dos elementos, além de gerar resultados errôneos de concentração em virtude do alargamento do sinal. Dessa forma, a condição utilizada para a determinação de Pt em tecidos celulares foi de um feixe de  $50 \mu\text{m}$  e velocidade de varredura de  $50 \mu\text{m s}^{-1}$ . Com relação às velocidades de varredura inferiores, o tempo de análise foi maior, além de não ter sido observada nenhuma melhora nessas condições.

<sup>86</sup> Bonta, M., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 2159-2167.

A partir dessas observações, a velocidade de varredura utilizada para a ablação do papel filtro e das amostras de plantas foi fixada em  $100 \mu\text{m s}^{-1}$ .

Posteriormente, um procedimento similar foi feito para avaliar o efeito do diâmetro do feixe de laser nas intensidades dos sinais de  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{112}\text{Cd}$  e  $^{208}\text{Pb}$ , normalizadas em relação ao  $^{13}\text{C}$ . Foram avaliados feixes de 50, 100, 150 e 200  $\mu\text{m}$  de diâmetro, sendo mantidas todas as condições estabelecidas na avaliação da velocidade de varredura. Os resultados obtidos para esse estudo estão mostrados nas Figuras 32, 33 e 34.



**Figura 32.** Efeito do diâmetro do feixe de laser no sinal para  $^{55}\text{Mn}$  por LA-ICP-MS.

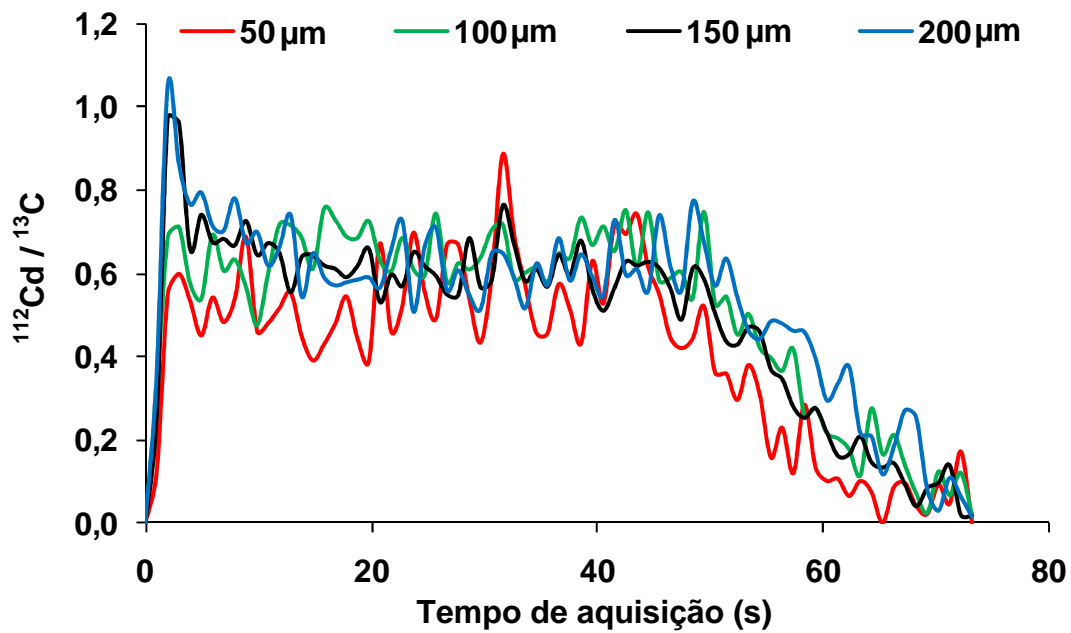


Figura 33. Efeito do diâmetro do feixe de laser no sinal para  $^{112}\text{Cd}$  por LA-ICP-MS.

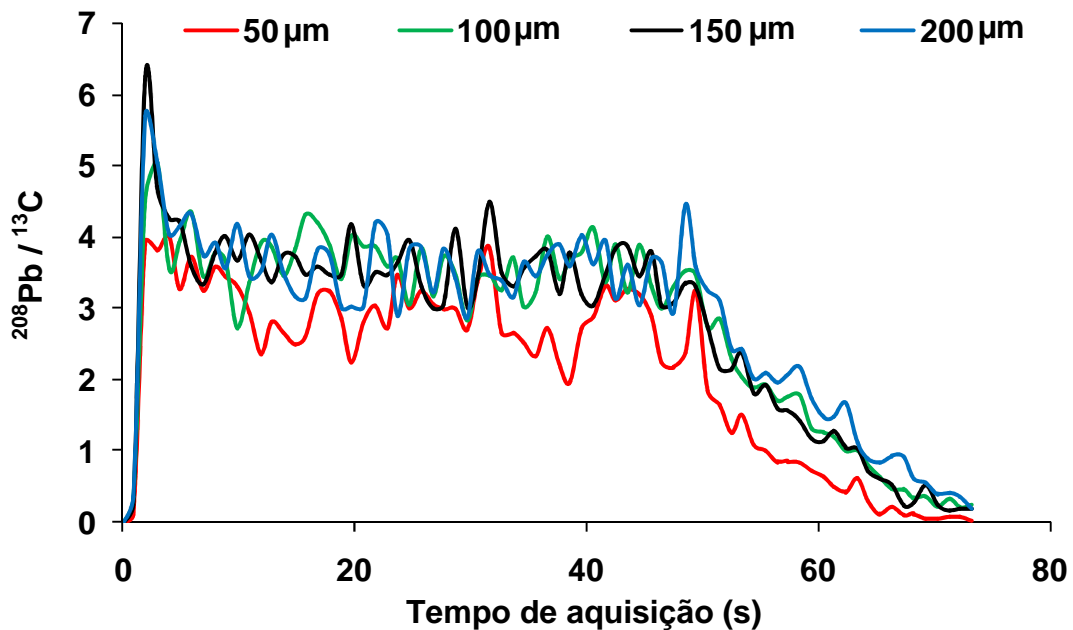


Figura 34. Efeito do diâmetro do feixe de laser no sinal para  $^{208}\text{Pb}$  por LA-ICP-MS.

O diâmetro do feixe de laser tem uma influência direta na quantidade de material que é removido durante a ablação, estando relacionado com a área da amostra que entra em contato com a radiação, ainda que feixes maiores possuam densidades energéticas menores ( $\text{W cm}^{-2}$ ). Isso se deve principalmente à maior

dissipação do calor gerado durante a interação laser-sólido, quando feixes menores são utilizados.<sup>32</sup> A volatilização de uma maior quantidade de material pode melhorar os limites de detecção na técnica de LA-ICP-MS. No trabalho de Günther *et al.*<sup>106</sup> foi demonstrada a dependência dos limites de detecção com o diâmetro do feixe de laser de 193 nm para a análise de vidro. Segundo os resultados mostrados, os limites de detecção foram melhorados por um fator de 100 vezes, para vários elementos, quando o diâmetro do feixe foi aumentado de 4 para 80  $\mu\text{m}$ , mantendo as demais condições inalteradas.

De acordo com os resultados mostrados nas Figuras 32 a 34, a variação do diâmetro do feixe de laser não alterou a intensidade normalizada para os isótopos monitorados. A partir desses resultados é possível supor que a composição do material ablado manteve a mesma proporção em todos os diâmetros avaliados, sendo fundamental para que não ocorram fenômenos de fracionamento durante as análises. Além disso, como as intensidades são normalizadas em relação à intensidade do  $^{13}\text{C}$ , e todas as intensidades aumentaram proporcionalmente, os resultados obtidos se mantiveram praticamente inalterados nos quatro diâmetros avaliados. Como o perfil dos sinais obtidos para o diâmetro de 50  $\mu\text{m}$  foi mais ruidoso, devido à maior resolução espacial com diâmetros menores, além da intensidade do sinal bruto ser menor, e entre 100 e 200  $\mu\text{m}$  os perfis foram semelhantes, o diâmetro de 100  $\mu\text{m}$  foi escolhido para os experimentos posteriores com a técnica de LA-ICP-MS, mantendo a proporção recomendada por Bonta *et al.*<sup>86</sup>

### 5.3. Calibração por LA-ICP-MS utilizando papel filtro

Como já foi discutido anteriormente no item “3.4.2. Calibração por LA-ICP-MS”, diferentes estratégias de calibração têm sido propostas para a análise de amostras com diferentes composições por LA-ICP-MS.<sup>14</sup> Entretanto, o procedimento proposto no presente trabalho, utilizando soluções de referência e papel filtro como forma de calibração para a análise de amostras vegetais, ainda é inédito.

Após as otimizações de ablação e detecção, o sistema LA-ICP-MS foi utilizado para a obtenção das curvas de calibração para os analitos estudados. O

<sup>14</sup> Miliszkievicz, N., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 30 (2015) 327-338.

<sup>32</sup> Darke, S. A., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 8 (1993) 145-209.

<sup>86</sup> Bonta, M., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 2159-2167.

<sup>106</sup> Günther, D., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 12 (1997) 939-944.

procedimento consistiu na adição de 40  $\mu\text{L}$  de uma solução de referência multielementar (SCP 33 MS) com concentrações de 0,25 a 10,0  $\text{mg L}^{-1}$  em  $\text{HNO}_3$  5%, onde o último ponto corresponde à concentração original da solução estoque. Foi utilizado um disco de papel filtro, previamente pesado, para cada ponto da curva de calibração. A concentração correspondente a cada ponto, expressa em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , foi determinada a partir da massa do papel filtro e da quantidade de analito presente nos 40  $\mu\text{L}$  de cada solução de referência. O ponto correspondente ao branco da calibração foi preparado a partir da adição de 40  $\mu\text{L}$  de uma solução de  $\text{HNO}_3$  5% sobre um disco de papel filtro também pesado.

Cada papel filtro foi inserido individualmente na câmara de ablação, após fixação com fita dupla-face sobre uma lâmina de vidro. Para cada ponto da curva de calibração, foram marcadas três linhas de aproximadamente 5 mm de comprimento sobre o papel. Cada linha foi ablada nas condições de 1300 W de potência de radiofrequência do equipamento de ICP-MS, vazões dos gases principal, auxiliar e carregador de 15, 1,20 e 1,30  $\text{L min}^{-1}$ , respectivamente. As condições de ablação foram mantidas em 20% de energia do laser, frequência de pulso do laser de 20 Hz, diâmetro do feixe de 100  $\mu\text{m}$  e velocidade de varredura de 100  $\mu\text{m s}^{-1}$ . Todas as intensidades foram processadas para obtenção das curvas de calibração com e sem a normalização com  $^{13}\text{C}$ , considerando as intensidades médias das três linhas de ablação. As curvas de calibração obtidas para cada um dos isótopos monitorados estão mostradas na Figura 35.



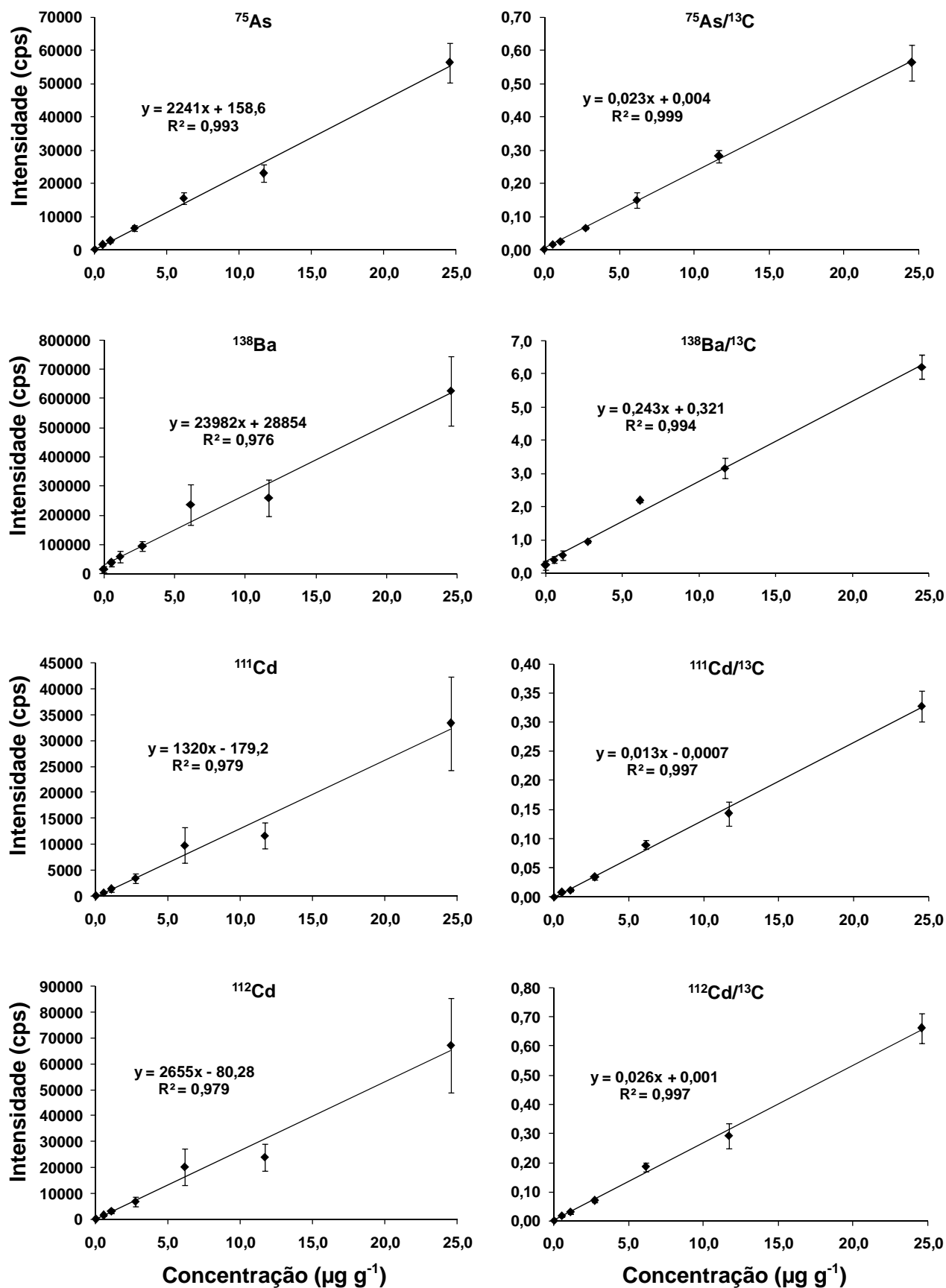


Figura 35. Curvas de calibração obtidas por LA-ICP-MS utilizando os procedimentos sem normalização e com normalização com  $^{13}\text{C}$  ( $n = 3$ ).

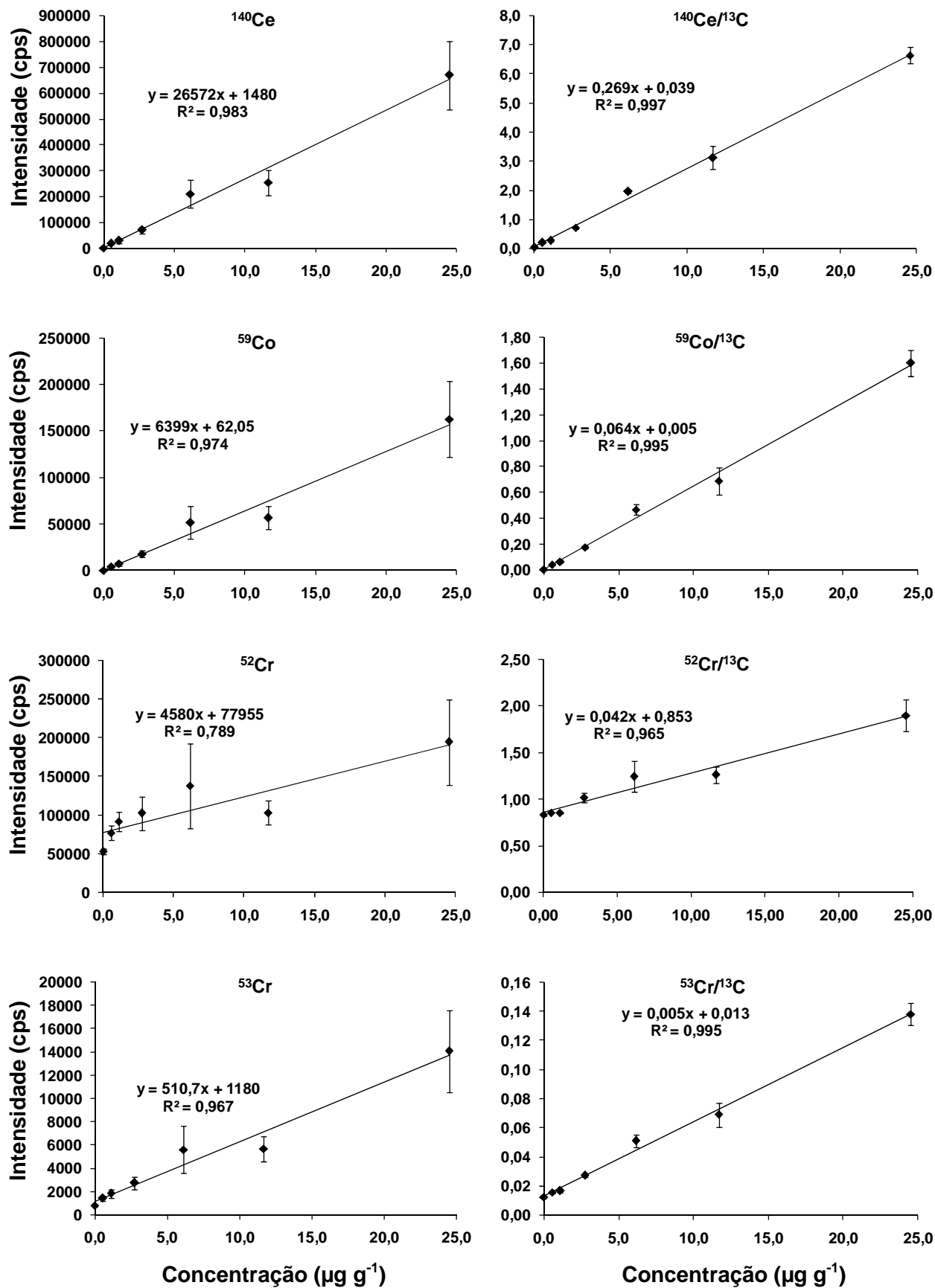


Figura 35. Continuação.

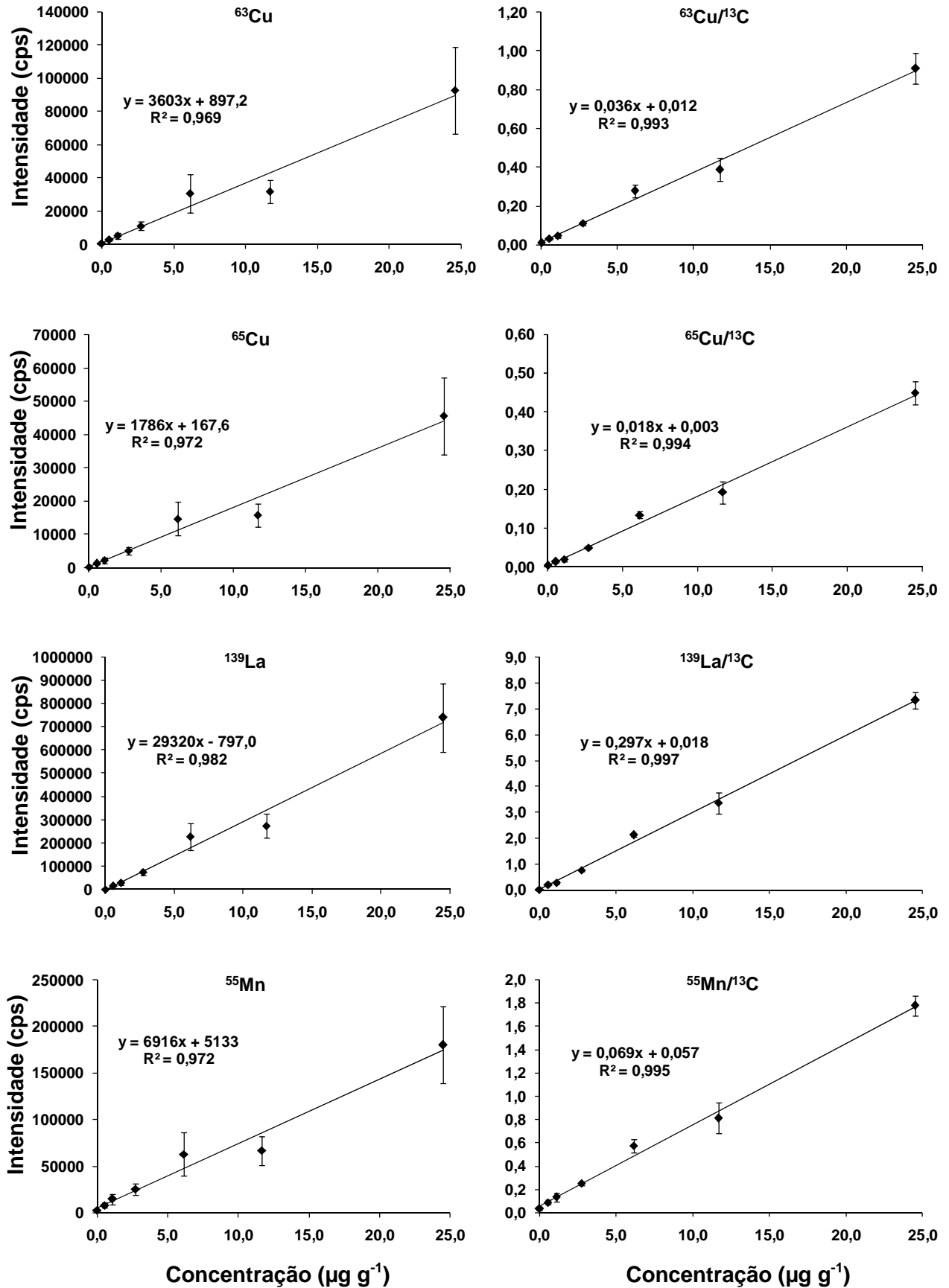


Figura 35. Continuação.

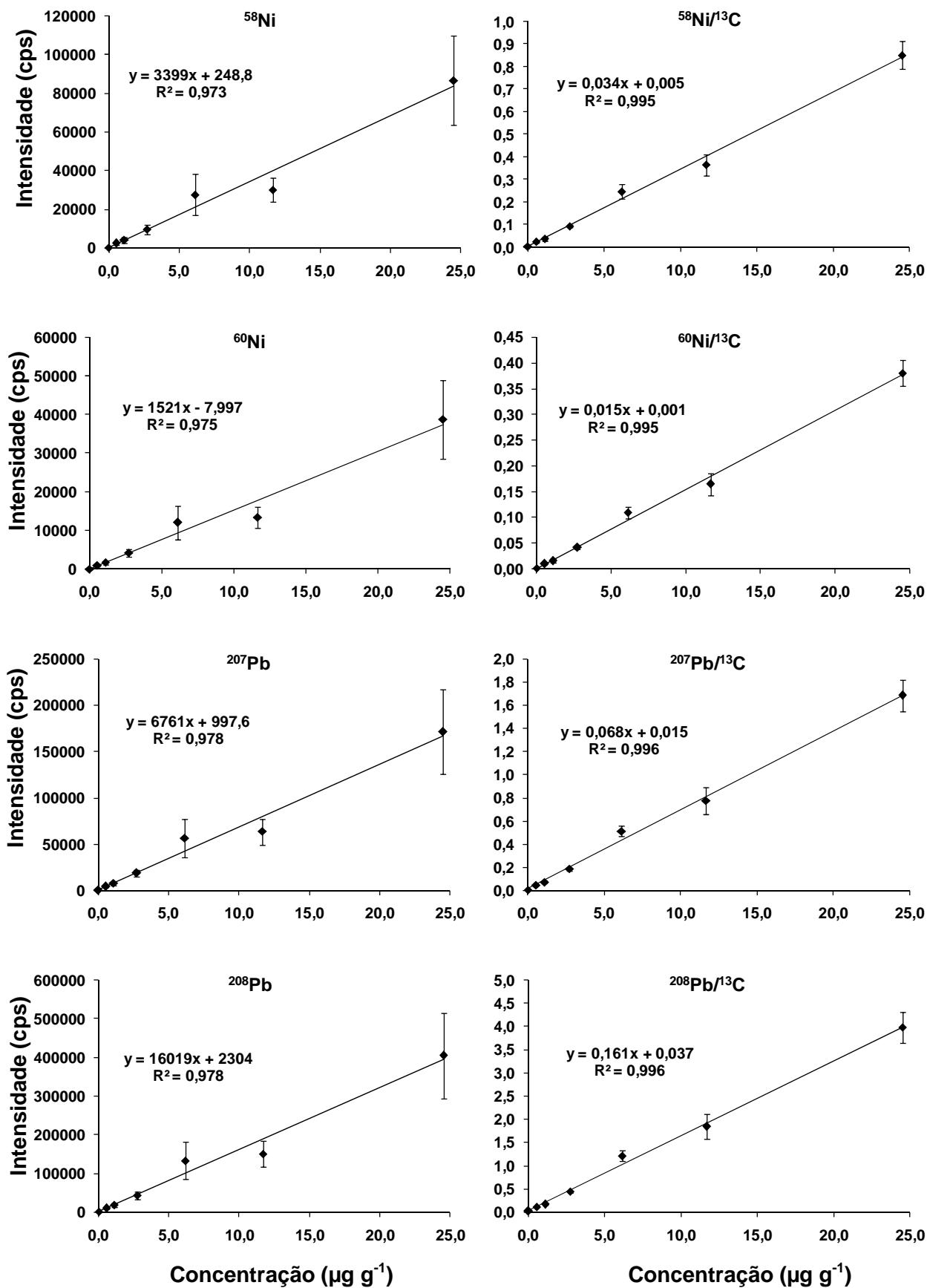


Figura 35. Continuação.

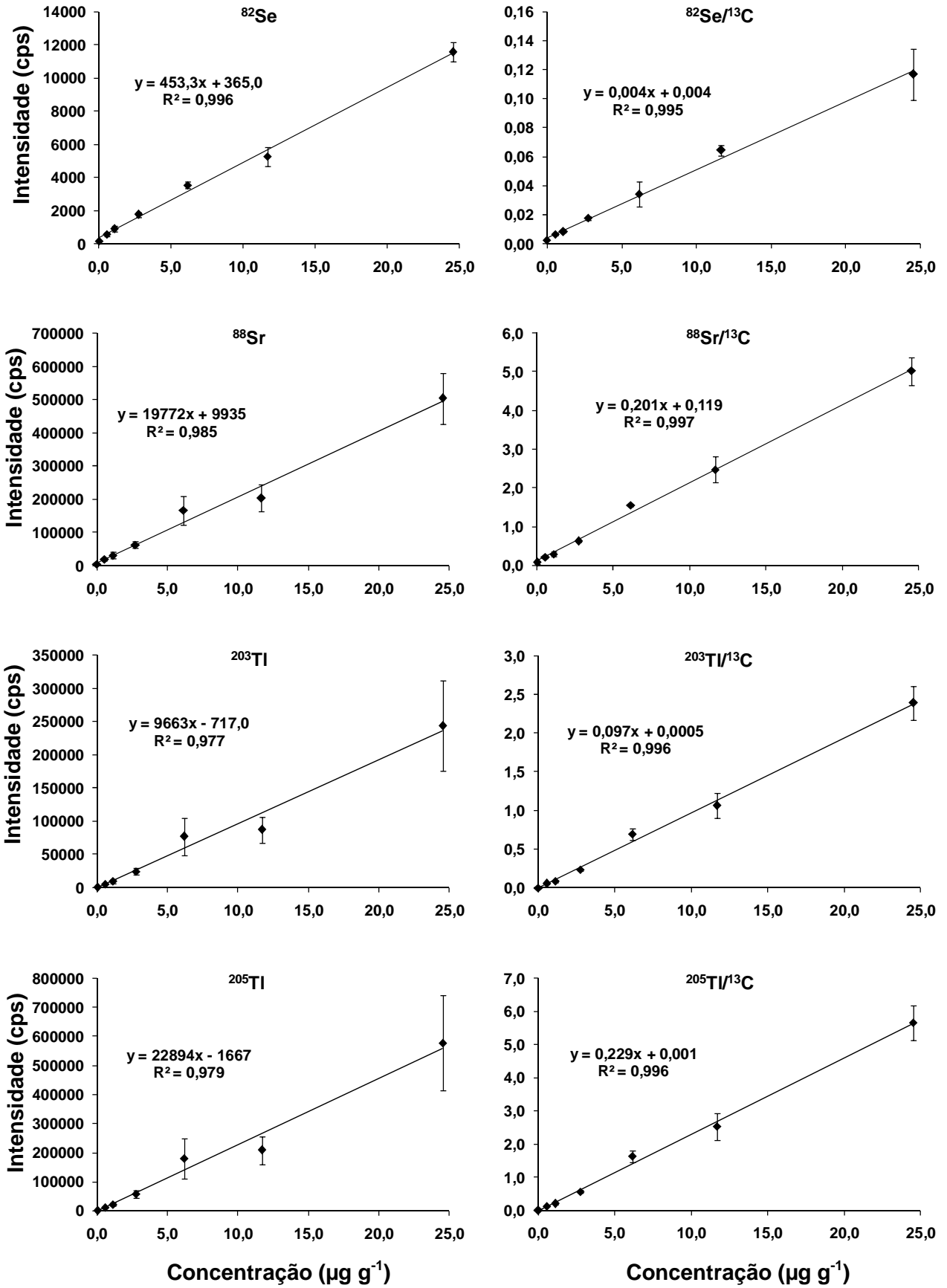


Figura 35. Continuação.

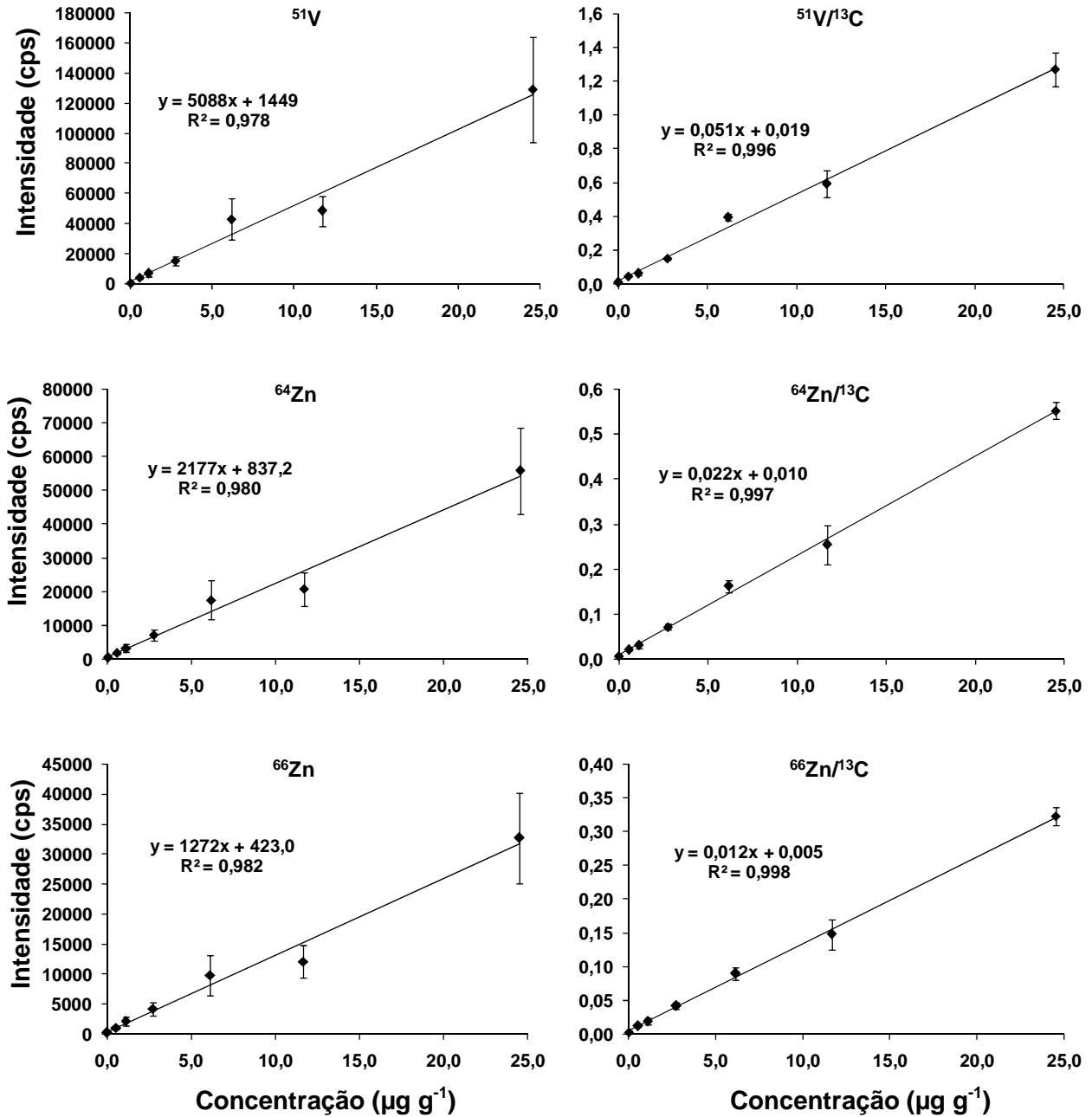


Figura 35. Continuação.

De acordo com as curvas de calibração obtidas para cada isótopo, é possível observar que a utilização do procedimento de normalização da intensidade do sinal em função do <sup>13</sup>C resultou em melhores coeficientes de determinação ( $R^2$ ), com valores superiores a 0,99 para quase todos os analitos estudados, com exceção de <sup>52</sup>Cr, em virtude da elevada quantidade de carbono no papel filtro e provável formação da interferência poliatômica na  $m/z$  52 (<sup>40</sup>Ar<sup>12</sup>C). Outro fator, também associado ao procedimento de normalização, é a melhora da precisão das medidas,

verificada principalmente nos pontos a partir de  $5 \mu\text{g g}^{-1}$  nas curvas de calibração com normalização. Como pode ser observado em grande parte das curvas de calibração sem normalização, os pontos correspondentes a  $5$  e  $10 \mu\text{g g}^{-1}$  tiveram um desvio maior em relação à linearidade, quando comparados aos demais pontos. Essa variação pode estar associada, principalmente, à diferença de espessura do papel em alguns pontos onde houve a incidência do laser, resultando em uma maior ou menor quantidade de material ablado e, conseqüentemente, em uma intensidade superior ou inferior à esperada, respectivamente. Outras possibilidades estão relacionadas a alterações nas condições de transporte ou no plasma. No entanto, quando foi feita a normalização com  $^{13}\text{C}$ , a variação nesses pontos foi minimizada, sugerindo assim que esses efeitos ocorreram tanto para os elementos avaliados como para o carbono.

Cabe destacar ainda que a sensibilidade do instrumento de ICP-MS para diferentes isótopos de um mesmo elemento foi coerente com a abundância isotópica das respectivas  $m/z$ , observada a partir dos coeficientes angulares das curvas de calibração. Essa informação permite concluir que pequenas variações entre as sensibilidades estão relacionadas à resolução do equipamento, e não à ocorrência de interferências isobáricas ou poliatômicas para isótopos específicos.

### 5.3.1. Limites de detecção e quantificação por LA-ICP-MS

Além da linearidade das curvas de calibração, uma técnica analítica também deve ser caracterizada quanto aos limites de detecção. Esse parâmetro corresponde à concentração de analito que produz uma intensidade de sinal significativamente diferente do ponto correspondente ao branco ou da linha de base do instrumento.<sup>107</sup> No entanto, não há um procedimento estabelecido para a determinação do LD nas análises por LA-ICP-MS. Procedimentos baseados no desvio-padrão (SD) da intensidade do sinal para o gás carregador ou o SD da resposta do branco numa determinada  $m/z$ , são algumas das maneiras utilizadas.<sup>90,108</sup>

Dessa forma, os LDs e LQs do método de LA-ICP-MS foram estimados a partir da ablação de 10 linhas em um papel filtro contendo  $40 \mu\text{L}$  de uma solução de

<sup>90</sup> Durrant, S. F., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14 (1999) 1385-1403.

<sup>107</sup> Miller, J. N., *et al.*, *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, 5<sup>th</sup> ed., 2005, 285 p.

<sup>108</sup> Durrant, S. F., *Analyst* 117 (1992) 1585-1592.

HNO<sub>3</sub> 5% (v/v). O LD e o LQ foram calculados como  $I + 3s$  e  $I + 10s$ , respectivamente, onde “I” é a intensidade média das 10 linhas e “s” é o desvio padrão das intensidades médias. Os valores de intensidade obtidos para cada analito, com e sem correção com o <sup>13</sup>C, foram interpolados nas curvas de calibração correspondentes e os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 8.

**Tabela 8.** LD e LQ determinados para a técnica de LA-ICP-MS empregando papel filtro para calibração e para ICP-MS com nebulização pneumática (n = 10).

Isótopo	Sem normalização		Normalização com <sup>13</sup> C		ICP-MS
	LD (µg g <sup>-1</sup> )	LQ (µg g <sup>-1</sup> )	LD (µg g <sup>-1</sup> )	LQ (µg g <sup>-1</sup> )	LD (µg g <sup>-1</sup> )
<sup>75</sup> As	0,05	0,15	0,05	0,18	0,010
<sup>138</sup> Ba	1,24	4,08	1,69	5,58	0,330
<sup>111</sup> Cd	0,17	0,58	0,11	0,36	0,005
<sup>112</sup> Cd	0,09	0,31	0,05	0,18	0,004
<sup>140</sup> Ce	0,12	0,40	0,15	0,51	0,016
<sup>59</sup> Co	0,09	0,31	0,07	0,25	0,002
<sup>52</sup> Cr	2,76	9,12	0,86	2,84	0,020
<sup>53</sup> Cr	0,49	1,62	0,45	1,50	0,009
<sup>63</sup> Cu	0,30	0,99	0,41	1,34	0,003
<sup>65</sup> Cu	0,15	0,50	0,19	0,62	0,001
<sup>139</sup> La	0,14	0,47	0,10	0,34	0,010
<sup>55</sup> Mn	0,53	1,76	0,81	2,68	0,004
<sup>58</sup> Ni	0,16	0,52	0,19	0,64	0,006
<sup>60</sup> Ni	0,08	0,27	0,05	0,16	0,002
<sup>207</sup> Pb	0,15	0,48	0,20	0,67	0,010
<sup>208</sup> Pb	0,15	0,49	0,20	0,67	0,010
<sup>82</sup> Se	0,06	0,21	0,09	0,31	0,020
<sup>88</sup> Sr	0,50	1,65	0,68	2,25	0,014
<sup>203</sup> Tl	0,09	0,31	0,08	0,26	0,021
<sup>205</sup> Tl	0,09	0,30	0,07	0,23	0,020
<sup>51</sup> V	0,08	0,26	0,10	0,33	0,020
<sup>64</sup> Zn	0,33	1,10	0,48	1,59	0,030
<sup>66</sup> Zn	0,29	0,95	0,41	1,34	0,026



Para comparação, são mostrados na Tabela 8 os valores de LD para o procedimento de decomposição das amostras e análise por ICP-MS com nebulização pneumática. Conforme reportado no item 3.4.1. “*Limite de detecção em LA-ICP-MS*”, os valores de LD da técnica de LA-ICP-MS são, geralmente, superiores aos valores observados para a determinação de soluções por ICP-MS com nebulização pneumática. Os resultados mostrados na Tabela 8 corroboram com essa informação, e de acordo com os valores calculados, as concentrações referentes ao LD e LQ do procedimento proposto são da ordem de 1 a 2 ordens de magnitude superiores aos valores informados para a técnica de ICP-MS.<sup>16</sup> Apesar desses valores serem superiores, eles estão de acordo com os LDs e LQs determinados em trabalhos empregando a técnica de LA-ICP-MS utilizando a calibração em papel filtro ou para a análise de amostras vegetais.<sup>80,81</sup>

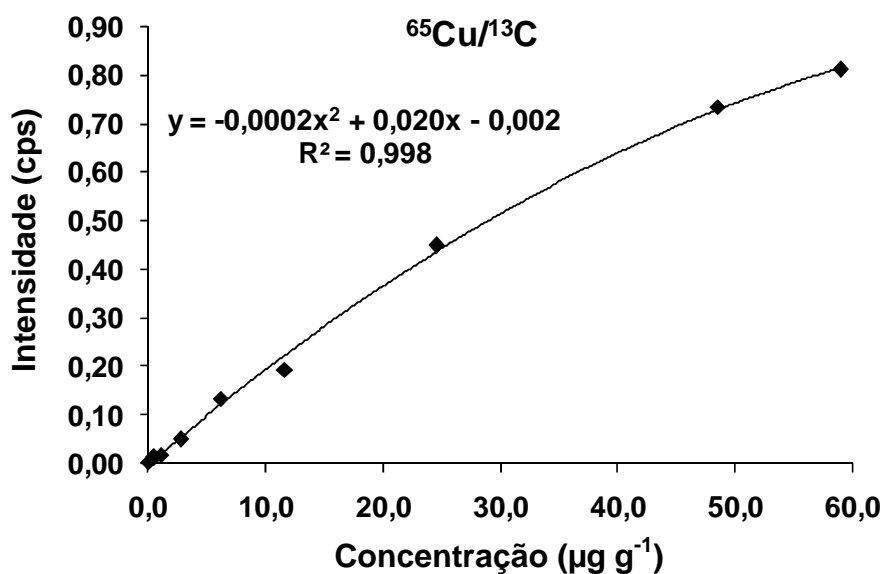
### 5.3.2. Determinação da faixa de calibração por LA-ICP-MS

Com o objetivo de ampliar a faixa de calibração e avaliar a faixa linear para o procedimento proposto, foram feitos experimentos com adições sucessivas de 40  $\mu\text{L}$  da solução de referência (SCP33MS) de 10  $\text{mg L}^{-1}$  sobre o mesmo papel filtro. Nesse procedimento, a primeira alíquota de solução de referência foi adicionada ao papel filtro, o qual foi submetido à secagem a 80 °C antes da adição da próxima alíquota. Foram preparados papéis com a adição de duas e três alíquotas de 40  $\mu\text{L}$ , correspondendo a uma concentração final de cada analito de cerca de 40 e 60  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente. Uma representação da curva de calibração obtida para  $^{65}\text{Cu}$ , com normalização com  $^{13}\text{C}$ , está mostrada na Figura 36.

<sup>16</sup> Montaser, A., *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, **1998**, 1004 p.

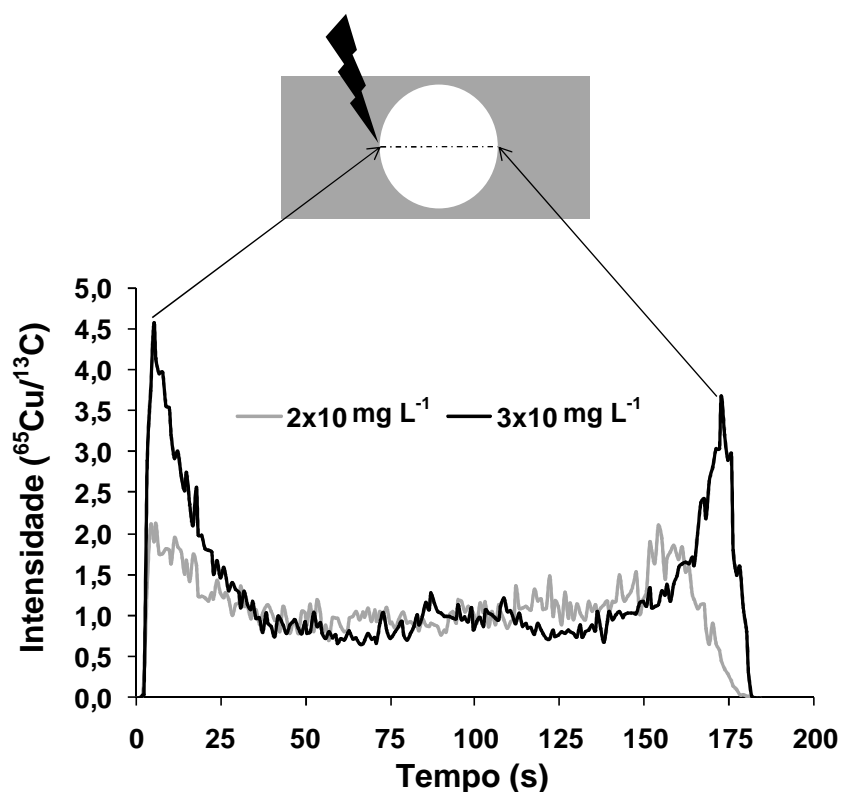
<sup>80</sup> Cizdziel, J. V., *et al.*, *Analytical Methods* **4** (2012) 564-569.

<sup>81</sup> Kumtabtim, U., *et al.*, *International Journal of Mass Spectrometry* **307** (2011) 174-181.



**Figura 36.** Curva de calibração para  $^{65}\text{Cu}$  obtida por LA-ICP-MS com normalização do sinal em relação ao  $^{13}\text{C}$ .

O perfil obtido para a curva de calibração para  $^{65}\text{Cu}$  foi semelhante ao observado para os demais isótopos, e o desvio da linearidade para os pontos preparados com a adição de mais de uma alíquota de solução de referência no mesmo papel filtro pode ser explicado a partir da Figura 37, onde são mostradas as intensidades para  $^{65}\text{Cu}$ , normalizadas em relação à intensidade do  $^{13}\text{C}$ , obtidas após a ablação de uma linha ao longo de todo o papel filtro, passando exatamente pelo centro do disco, com a adição de duas e três alíquotas de  $40 \mu\text{L}$  de solução de referência de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ .



**Figura 37.** Perfil dos sinais obtidos para  $^{65}\text{Cu}/^{13}\text{C}$  com adições de duas e três alíquotas de  $40\ \mu\text{L}$  da solução de referência de  $10\ \text{mg L}^{-1}$  sobre o mesmo papel filtro.

De acordo com a Figura 37, é possível verificar uma maior intensidade nas regiões correspondentes à borda do papel filtro, conforme a ilustração da região ablada. Uma difusão heterogênea dos constituintes de extratos de fermentação e sangue, após a adição em um disco de papel filtro, foi observada nos trabalhos de Nischkauer *et al.*<sup>85</sup> e Aramendía *et al.*,<sup>42</sup> respectivamente. No entanto, nenhum trabalho até o momento reporta esse efeito com a adição de soluções de referência. Como foi observada uma distribuição homogênea da solução ao longo do papel filtro com a adição de apenas uma alíquota de  $40\ \mu\text{L}$ , é provável que a adição das outras alíquotas no mesmo papel tenham um efeito na dispersão dos elementos no mesmo sentido da propagação do solvente ( $\text{HNO}_3$  5% v/v). Como a solução de referência é depositada na região central do papel e dispersa-se até as bordas por capilaridade, esse processo acaba provocando o arraste dos elementos no mesmo sentido, uma vez que eles são solúveis no  $\text{HNO}_3$ .

<sup>42</sup> Aramendia, M., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 30 (2015) 296-309.

<sup>85</sup> Nischkauer, W., *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 101 (2014) 123-129.

Tendo em vista que alguns dos elementos investigados podem estar presentes em amostras de plantas em uma faixa de concentração acima da faixa de calibração, foi avaliada a possibilidade de combinar outra solução multielementar (MERCK IV), em HNO<sub>3</sub> 5%, cuja concentração da solução estoque é de 1000 mg L<sup>-1</sup>, para a obtenção de pontos de calibração com concentrações de até 250 µg g<sup>-1</sup>. O procedimento de adição da solução de referência sobre o papel filtro e a etapa de secagem foram feitos da mesma forma como descrito anteriormente. Considerando os elementos constituintes da solução MERCK IV e os possíveis analitos presentes nas amostras em concentrações acima de 25 µg g<sup>-1</sup>, a calibração foi feita para <sup>138</sup>Ba, <sup>55</sup>Mn, <sup>88</sup>Sr e <sup>64</sup>Zn. Foram utilizadas soluções de referência de 10 a 100 mg L<sup>-1</sup> em HNO<sub>3</sub> 5% (v/v). O ponto correspondente ao branco da calibração foi preparado a partir da adição de 40 µL de uma solução de HNO<sub>3</sub> 5% (v/v) sobre um disco de papel filtro. Cada papel filtro foi inserido individualmente na câmara de ablação, após fixação com fita dupla-face sobre uma lâmina de vidro. As condições operacionais do sistema de ablação e do equipamento de ICP-MS foram as mesmas descritas anteriormente. As intensidades de cada isótopo foram processadas para obtenção das curvas de calibração com e sem a normalização com <sup>13</sup>C, considerando as intensidades médias das três linhas de ablação. As curvas de calibração obtidas para cada um dos isótopos monitorados estão mostradas na Figura 38.

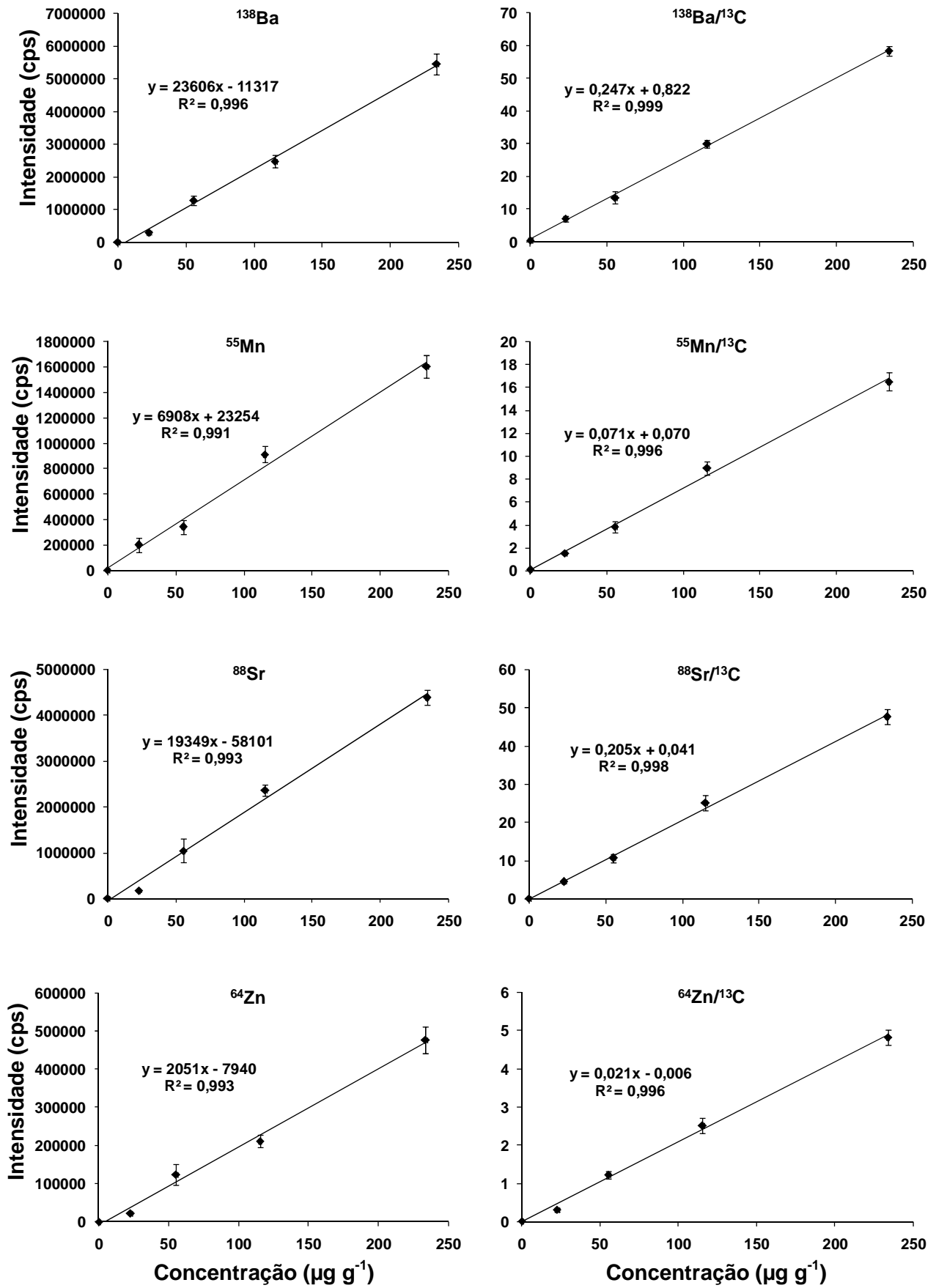


Figura 38. Curvas de calibração obtidas por LA-ICP-MS para  $^{138}\text{Ba}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{88}\text{Sr}$  e  $^{64}\text{Zn}$ .

As curvas de calibração obtidas para os quatro isótopos avaliados, para uma maior faixa de concentração, confirmam que a normalização em função da intensidade do sinal do  $^{13}\text{C}$  permite a obtenção de melhores valores de  $R^2$ , corrigindo possíveis alterações relacionadas à quantidade de material ablado. Além disso, a partir dos valores dos coeficientes angulares, foi possível verificar que a sensibilidade do equipamento manteve-se praticamente constante para concentrações mais elevadas, com uma concordância de 100 a 106% entre os coeficientes angulares das curvas sem normalização e de 97 a 105% entre os coeficientes angulares das curvas obtidas após a normalização com  $^{13}\text{C}$ , quando comparados com os coeficientes obtidos na faixa de 0,5 a 20  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Dessa maneira, foi possível verificar a viabilidade de combinar diferentes soluções de referência para a obtenção de uma faixa mais ampla de calibração para as análises por LA-ICP-MS.

#### **5.4. Efeito da pressão de compactação dos comprimidos para análise por LA-ICP-MS**

Previamente à análise quantitativa das amostras de plantas por LA-ICP-MS, a influência da pressão utilizada para obtenção dos comprimidos das amostras foi investigada para a amostra de quebra-pedra. Essa amostra foi escolhida em virtude da maior dispersão do tamanho das partículas, conforme mostrado na Figura 16. Foram preparados comprimidos de cerca de 250 mg, obtidos após compressão durante 3 min nas pressões de 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 e 10 ton. Foram traçadas três linhas de 5 mm cada, para ablação com laser. As intensidades obtidas após a ablação de cada linha foram utilizadas para a determinação da intensidade média normalizada com  $^{13}\text{C}$ , a qual foi interpolada na equação de calibração correspondente.

Foram utilizadas as condições de ablação previamente estabelecidas, e as concentrações determinadas após a normalização com  $^{13}\text{C}$  foram utilizados para comparação com os resultados obtidos após decomposição de 350 mg da amostra de quebra-pedra com 6 mL de  $\text{HNO}_3$  7 mol  $\text{L}^{-1}$ , sob radiação micro-ondas e determinação por ICP-MS ou ICP OES com nebulização pneumática. A exatidão das determinações das amostras decompostas foi avaliada a partir da análise do NIST 1515 (*Apple leaves*), nas mesmas condições da amostra. As concentrações

determinadas por ICP-MS e ICP OES para a amostra de quebra-pedra e NIST 1515 estão mostradas na Tabela 9.

**Tabela 9.** Resultados obtidos por ICP-MS e ICP OES em material de referência certificado e amostra de quebra-pedra após decomposição ácida assistida por micro-ondas (n = 3).

Elemento	Quebra-pedra ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	NIST 1515 ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	
		Certificado	Determinado
As	4,87 $\pm$ 0,12	0,038 $\pm$ 0,007	0,05 $\pm$ 0,01
Ba*	95,6 $\pm$ 1,4	49 $\pm$ 2	45,9 $\pm$ 0,5
Cd	3,36 $\pm$ 0,02	0,013 $\pm$ 0,002	0,012 $\pm$ 0,001
Ce	21,1 $\pm$ 0,4	3	2,79 $\pm$ 0,28
Co	2,06 $\pm$ 0,07	0,09	0,10 $\pm$ 0,01
Cr	9,51 $\pm$ 0,43	0,3	0,31 $\pm$ 0,02
Cu*	19,5 $\pm$ 0,7	5,64 $\pm$ 0,24	5,51 $\pm$ 0,10
La	10,0 $\pm$ 0,2	20	19,0 $\pm$ 0,3
Mn*	471 $\pm$ 14	54 $\pm$ 3	51,0 $\pm$ 0,4
Ni	6,29 $\pm$ 0,20	0,91 $\pm$ 0,12	1,09 $\pm$ 0,02
Pb	10,4 $\pm$ 0,4	0,47 $\pm$ 0,02	0,41 $\pm$ 0,04
Se	< 0,70	0,05 $\pm$ 0,009	< 0,70
Sr*	28,4 $\pm$ 0,5	25 $\pm$ 2	22,9 $\pm$ 0,6
Tl	0,32 $\pm$ 0,02	n.i.	0,16 $\pm$ 0,02
V	13,6 $\pm$ 0,5	0,26 $\pm$ 0,03	0,29 $\pm$ 0,02
Zn*	118 $\pm$ 3	12,5 $\pm$ 0,3	13,6 $\pm$ 1,4

(\*) Determinação por ICP OES; (n.i.) valor não informado.

A avaliação estatística (*t-Student*, nível  $P < 0,05$ ) dos resultados obtidos por ICP-MS após decomposição ácida do CRM e da amostra de quebra-pedra, mostrou que não houve diferença significativa entre os valores de concentração certificados e os valores determinados para o CRM. O RSD foi inferior a 10% para a maioria dos elementos, sendo superior apenas para As (20%) e Tl (12%). Dessa forma, as concentrações determinadas para a amostra de quebra-pedra por ICP-MS foram utilizadas para comparação e avaliação dos resultados obtidos por LA-ICP-MS, em diferentes pressões utilizadas para a obtenção dos comprimidos. Os resultados

obtidos para  $^{51}\text{V}$ ,  $^{138}\text{Ba}$  e  $^{208}\text{Pb}$  por LA-ICP-MS, selecionados para representar toda a faixa de m/z estudada, estão mostrados na Figura 39.

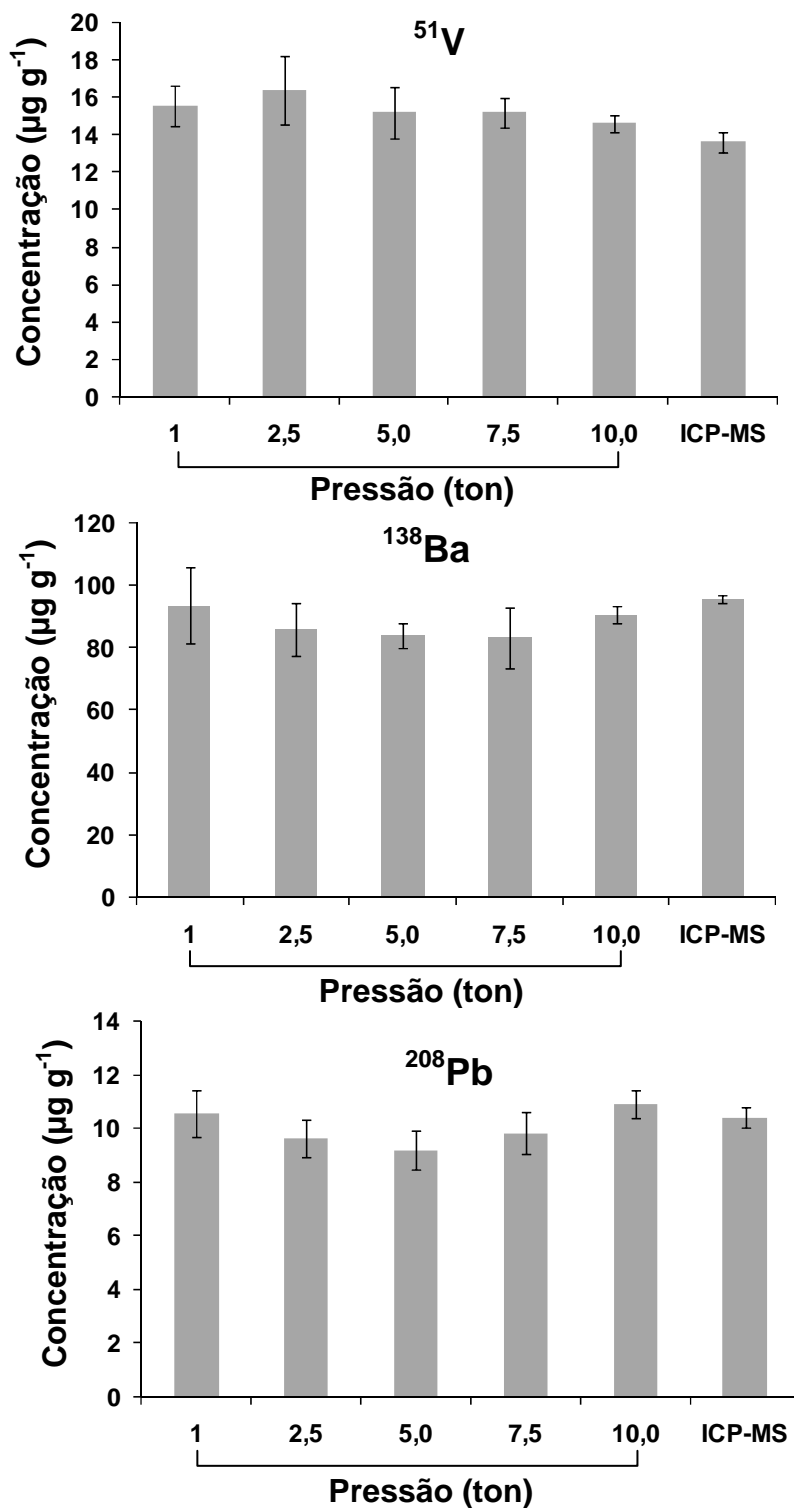


Figura 39. Efeito da pressão de compactação para obtenção dos comprimidos de quebra-pedra nos resultados de  $^{51}\text{V}$ ,  $^{138}\text{Ba}$  e  $^{208}\text{Pb}$  por LA-ICP-MS ( $n = 3$ ).



A partir da avaliação estatística dos resultados mostrados na Figura 39, foi possível estabelecer que não houve diferença significativa (ANOVA,  $P < 0,05$ ) entre as concentrações determinadas sob diferentes condições de pressão para obtenção dos comprimidos. Os perfis obtidos para V, Ba e Pb foram similares aos demais analitos estudados, e como pode ser observado nos três gráficos, é possível verificar que houve uma diminuição no desvio-padrão dos valores nas determinações para a condição de 10 ton. No trabalho de Arroyo *et al.*,<sup>109</sup> que trata do desenvolvimento de um procedimento para a análise de solos e sedimentos por LA-ICP-MS, foi destacado pelos autores uma maior precisão nas determinações, possivelmente associada à maior coesão e diminuição da porosidade dos comprimidos, a partir de uma maior pressão de prensagem.

Dessa forma, a pressão de 10 ton foi escolhida para o preparo dos comprimidos das demais amostras de plantas utilizadas nesse trabalho, assim como para o preparo dos materiais de referência certificados, também utilizados na forma de comprimidos, para as análises por LA-ICP-MS.

## 5.5. Análise de plantas por LA-ICP-MS

Após a definição das condições de preparo dos comprimidos para a análise por LA-ICP-MS, as amostras de anis-estrelado, boldo, espinheira-santa e maracujá foram submetidas ao mesmo procedimento de prensagem descrito anteriormente, assim como as condições de análise por LA-ICP-MS foram mantidas em 1300 W de potência de radiofrequência do ICP-MS, 20% de energia do laser, frequência de pulso do laser de 20 Hz, diâmetro do feixe de 100  $\mu\text{m}$  e velocidade de varredura de 100  $\mu\text{m s}^{-1}$ .

Cada comprimido de amostra e CRM foram ablados em três linhas de 5 mm de comprimento cada. Uma imagem do comprimido após a ablação com laser é mostrada na Figura 40.

<sup>109</sup> Arroyo, L., *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 64 (2009) 16-25.



**Figura 40.** Fotografia do comprimido de uma amostra após a ablação com laser.

As intensidades dos sinais dos analitos foram normalizadas em relação à intensidade do sinal do  $^{13}\text{C}$ , e as concentrações determinadas para cada elemento foram comparadas com os resultados obtidos após decomposição assistida por micro-ondas, de cerca de 350 mg de cada amostra, com 6 mL de  $\text{HNO}_3$  7 mol  $\text{L}^{-1}$  e determinação por ICP-MS com nebulização pneumática. Os resultados obtidos por ICP-MS com nebulização pneumática e por LA-ICP-MS estão mostrados na Tabela 10. É importante destacar que, embora os resultados não estejam mostrados na Tabela 10, as concentrações dos elementos nas amostras de plantas também foram determinadas sem o procedimento de normalização com  $^{13}\text{C}$ . No entanto, como era esperado, foram obtidas concentrações na faixa de 1,5 a 4 vezes superiores às aquelas determinadas por ICP-MS ou LA-ICP-MS com normalização com  $^{13}\text{C}$ , para todos os elementos. Isso se deve à quantidade de material ablado nos comprimidos, que foi superior em relação ao papel filtro devido à maior espessura, resultando em intensidades do sinal também superiores.

Tabela 10. Resultados, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , obtidos por ICP-MS e LA-ICP-MS para as amostras de plantas (n = 3).

Elemento		Anis-estrelado	Boldo	Espinheira-santa	Maracujá	Quebra-pedra
<sup>75</sup> As	ICP-MS	0,20 ± 0,01	< 0,01	0,44 ± 0,04*	0,17 ± 0,01*	4,87 ± 0,12*
	LA-ICP-MS	0,24 ± 0,03	< 0,05	0,63 ± 0,09	0,09 ± 0,03	6,66 ± 0,44
<sup>138</sup> Ba	ICP-MS	14,6 ± 0,4*	< 0,33	65,7 ± 4,9	5,27 ± 0,15	95,6 ± 1,4
	LA-ICP-MS	10,6 ± 2,1	< 1,69	75,2 ± 18,4	5,53 ± 0,58	104,4 ± 10,4
<sup>112</sup> Cd	ICP-MS	0,034 ± 0,001	< 0,004	0,16 ± 0,02	0,007 ± 0,001	3,36 ± 0,02
	LA-ICP-MS	< 0,05	< 0,05	0,09 ± 0,06	< 0,05	2,81 ± 0,37
<sup>140</sup> Ce	ICP-MS	0,36 ± 0,04*	< 0,016	7,98 ± 1,40	0,09 ± 0,01	21,1 ± 0,4
	LA-ICP-MS	0,21 ± 0,06	< 0,15	6,51 ± 0,92	< 0,15	20,9 ± 4,9
<sup>59</sup> Co	ICP-MS	0,06 ± 0,01	0,007 ± 0,001	0,74 ± 0,07*	0,08 ± 0,01	2,06 ± 0,07*
	LA-ICP-MS	< 0,07	< 0,07	1,10 ± 0,16	0,07 ± 0,02	2,99 ± 0,57
<sup>53</sup> Cr	ICP-MS	0,21 ± 0,02	0,23 ± 0,03	2,97 ± 0,19*	0,29 ± 0,03	9,51 ± 0,43
	LA-ICP-MS	< 0,45	< 0,45	4,19 ± 0,56	< 0,45	11,55 ± 1,36
<sup>65</sup> Cu	ICP-MS	9,07 ± 0,23*	0,22 ± 0,05	13,3 ± 0,2*	1,16 ± 0,09*	19,5 ± 0,7
	LA-ICP-MS	11,22 ± 0,37	< 0,41	15,4 ± 1,2	1,67 ± 0,27	24,5 ± 3,3
<sup>139</sup> La	ICP-MS	0,16 ± 0,01	< 0,01	4,63 ± 0,75	0,11 ± 0,01*	10,03 ± 0,20*
	LA-ICP-MS	0,11 ± 0,07	< 0,10	3,65 ± 1,03	0,07 ± 0,01	8,68 ± 0,25
<sup>55</sup> Mn	ICP-MS	276 ± 7	0,16 ± 0,01	1329 ± 80	37,8 ± 0,5*	471 ± 14
	LA-ICP-MS	249 ± 25	< 0,81	1551 ± 157	31,9 ± 3,1	522 ± 41
<sup>60</sup> Ni	ICP-MS	5,24 ± 0,02*	0,050 ± 0,002	2,58 ± 0,26*	0,88 ± 0,04*	6,29 ± 0,20*
	LA-ICP-MS	7,29 ± 0,89	< 0,05	4,06 ± 0,78	1,41 ± 0,23	7,56 ± 0,30
<sup>208</sup> Pb	ICP-MS	1,17 ± 0,04	< 0,01	3,78 ± 0,35	< 0,01	10,4 ± 0,4*
	LA-ICP-MS	1,16 ± 0,49	< 0,20	3,57 ± 0,49	< 0,20	11,2 ± 0,2
<sup>82</sup> Se	ICP-MS	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
	LA-ICP-MS	< 0,09	< 0,09	< 0,09	< 0,09	< 0,09
<sup>88</sup> Sr	ICP-MS	5,18 ± 0,04	0,17 ± 0,04	90,5 ± 10,2	4,08 ± 0,03*	28,4 ± 0,5
	LA-ICP-MS	5,26 ± 2,17	< 0,68	108,4 ± 4,5	5,12 ± 0,30	30,0 ± 1,3
<sup>205</sup> Tl	ICP-MS	< 0,02	< 0,02	0,032 ± 0,002	< 0,02	0,32 ± 0,02
	LA-ICP-MS	< 0,07	< 0,07	< 0,07	< 0,07	0,47 ± 0,12
<sup>51</sup> V	ICP-MS	0,23 ± 0,02*	< 0,02	5,94 ± 0,60	0,13 ± 0,01	13,6 ± 0,5*
	LA-ICP-MS	0,16 ± 0,02	< 0,10	7,21 ± 0,87	< 0,10	16,4 ± 1,1
<sup>64</sup> Zn	ICP-MS	16,4 ± 0,4	0,81 ± 0,07	47,3 ± 2,0	9,08 ± 0,42*	118 ± 3*
	LA-ICP-MS	16,4 ± 2,9	0,94 ± 0,11	48,6 ± 3,5	13,35 ± 1,09	91,8 ± 13,0

\* Valores com diferença significativa entre as técnicas de ICP-MS e LA-ICP-MS (*t-Student*, P < 0,05).

A partir dos resultados mostrados na Tabela 10 foi possível avaliar a viabilidade do procedimento proposto, para a finalidade de calibração e determinação de diversos elementos por LA-ICP-MS. A comparação entre os resultados obtidos por LA-ICP-MS e as concentrações determinadas por ICP-MS nas amostras decompostas foi feita a partir da avaliação estatística (*t-Student*,  $P < 0,05$ ). De acordo com os resultados obtidos, é possível considerar que grande parte dos valores obtidos por LA-ICP-MS não têm diferença significativa em relação aos resultados obtidos por ICP-MS. No entanto, diferenças significativas foram observadas para alguns elementos presentes tanto em baixas como em altas concentrações, motivo pelo qual a variação pode estar associada, principalmente, a variações na homogeneidade das partículas em cada amostra, assim como à diferente distribuição dos elementos nas partículas que constituem os comprimidos.

Adicionalmente, a avaliação da exatidão das determinações por LA-ICP-MS foi feita a partir da análise de três materiais de referência certificados de plantas (Tabela 11). Da mesma forma como foi observado anteriormente, grande parte dos resultados determinados não apresentou diferença significativa em relação aos valores certificados (*t-Student*,  $P < 0,05$ ). Embora valores de RSD inferiores a 15% tenham sido obtidos para a maioria dos analitos determinados nos CRMs, foram obtidos valores na faixa de 2 a 37%, onde as variações superiores podem estar relacionadas à diferença de homogeneidade dos CRMs utilizados, que não foram avaliados quanto à distribuição do tamanho de partículas, além de concentrações distintas de carbono, que resultam em resultados errôneos com a aplicação do procedimento de normalização com  $^{13}\text{C}$ .

**Tabela 11.** Resultados obtidos por LA-ICP-MS, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , para os materiais de referência certificados de plantas ( $n = 3$ ).

Elemento	NIST 1515		NIST 1575		BCR 60	
	Certificado	Determinado	Certificado	Determinado	Certificado	Determinado
<sup>75</sup> As	0,038 ± 0,007	< 0,05	0,21 ± 0,04	0,17 ± 0,03	8**	7,01 ± 0,30
<sup>138</sup> Ba	49 ± 2	44,9 ± 2,8	n.i.	7,95 ± 1,12	n.i.	61,2 ± 4,6
<sup>112</sup> Cd	0,013 ± 0,002	< 0,05	< 0,5**	0,66 ± 0,12	2,2 ± 0,1	2,15 ± 0,29
<sup>140</sup> Ce	3**	4,76 ± 0,53	0,4**	0,51 ± 0,17	4**	5,11 ± 0,24
<sup>59</sup> Co	0,09**	< 0,07	0,1**	0,08 ± 0,03	4**	3,12 ± 0,37
<sup>53</sup> Cr	0,3**	< 0,45	2,6 ± 0,2	2,60 ± 0,74	26**	19,9 ± 2,3
<sup>65</sup> Cu	5,64 ± 0,24	5,55 ± 0,90	3 ± 0,3	3,15 ± 0,81	51,2 ± 1,9	47,7 ± 1,9
<sup>139</sup> La	20**	21,7 ± 1,9	0,2**	0,41 ± 0,11	2**	1,90 ± 0,22
<sup>55</sup> Mn	54 ± 3	44,4 ± 4,9	675 ± 15	715 ± 32	1759 ± 51	1489 ± 146*
<sup>60</sup> Ni	0,91 ± 0,12	0,76 ± 0,10	3,5**	2,85 ± 0,38	40**	37,4 ± 3,5
<sup>208</sup> Pb	0,47 ± 0,02	0,43 ± 0,07	10,8 ± 0,5	12,64 ± 1,21	63,8 ± 3,2	65,9 ± 4,7
<sup>82</sup> Se	0,05 ± 0,009	< 0,09	n.i.	< 0,09	0,7**	0,58 ± 0,05
<sup>88</sup> Sr	25 ± 2	23,8 ± 0,5	4,8 ± 0,2	4,76 ± 1,13	n.i.	115 ± 8
<sup>205</sup> Tl	n.i.	< 0,07	n.i.	< 0,07	0,24**	0,31 ± 0,08
<sup>51</sup> V	0,26 ± 0,03	0,22 ± 0,30	n.i.	0,46 ± 0,06	6**	4,9 ± 0,6
<sup>64</sup> Zn	12,5 ± 0,3	15,4 ± 1,7*	n.i.	68,9 ± 7,9	313 ± 8	289 ± 10*

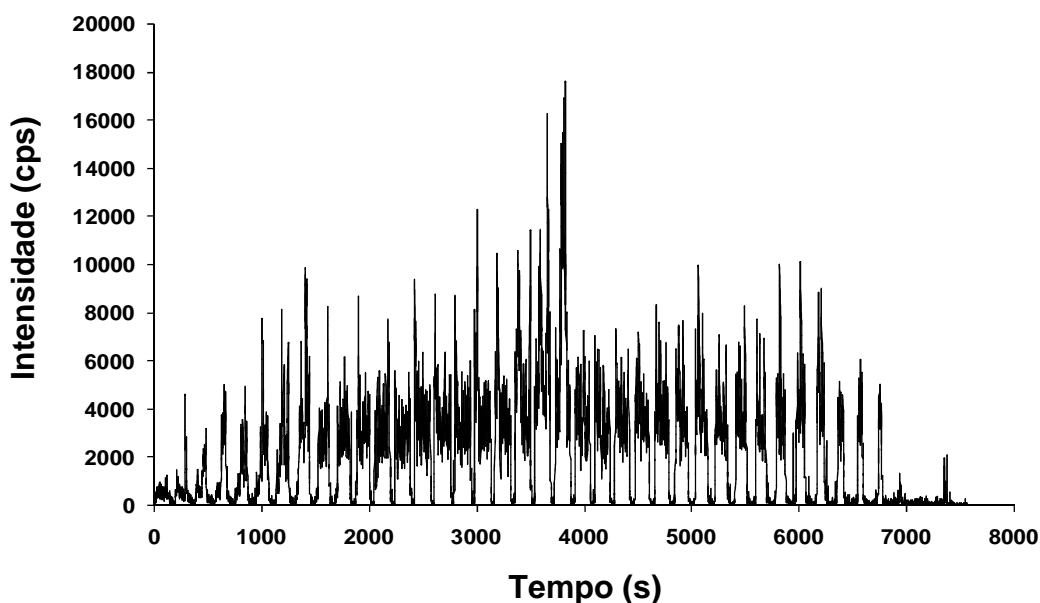
\* Valores com diferença significativa entre as técnicas de ICP-MS e LA-ICP-MS (*t-Student*,  $P < 0,05$ ).

(\*\*) Concentração informada; (n.i.) valor não informado.

A partir dessas considerações, o procedimento foi considerado adequado para a determinação de As, Ba, Cd, Ce, Co, Cr, Cu, La, Mn, Ni, Pb, Se, Sr, Tl, V e Zn em amostras de plantas por LA-ICP-MS, sendo que a eficiência dos processos de moagem e homogeneidade das amostras deve estar de acordo com as condições e finalidades da análise, seja para fins semi-quantitativos ou quantitativos. Adicionalmente, a utilização do papel filtro com soluções de referência possibilitou a simplificação do procedimento de calibração, além da aplicação para uma ampla faixa de concentrações e diversos elementos. Esses fatores são críticos nas aplicações envolvendo LA-ICP-MS, pois o uso de CRMs para calibração é uma das principais estratégias empregadas, mas a aplicabilidade do procedimento é limitada pela quantidade de elementos certificados, além da necessidade de concentrações distintas de um mesmo elemento em cada CRM utilizado, de forma a obter curvas de calibração com uma ampla faixa de concentração.

#### **5.6. Determinação da distribuição elementar em folha de sene**

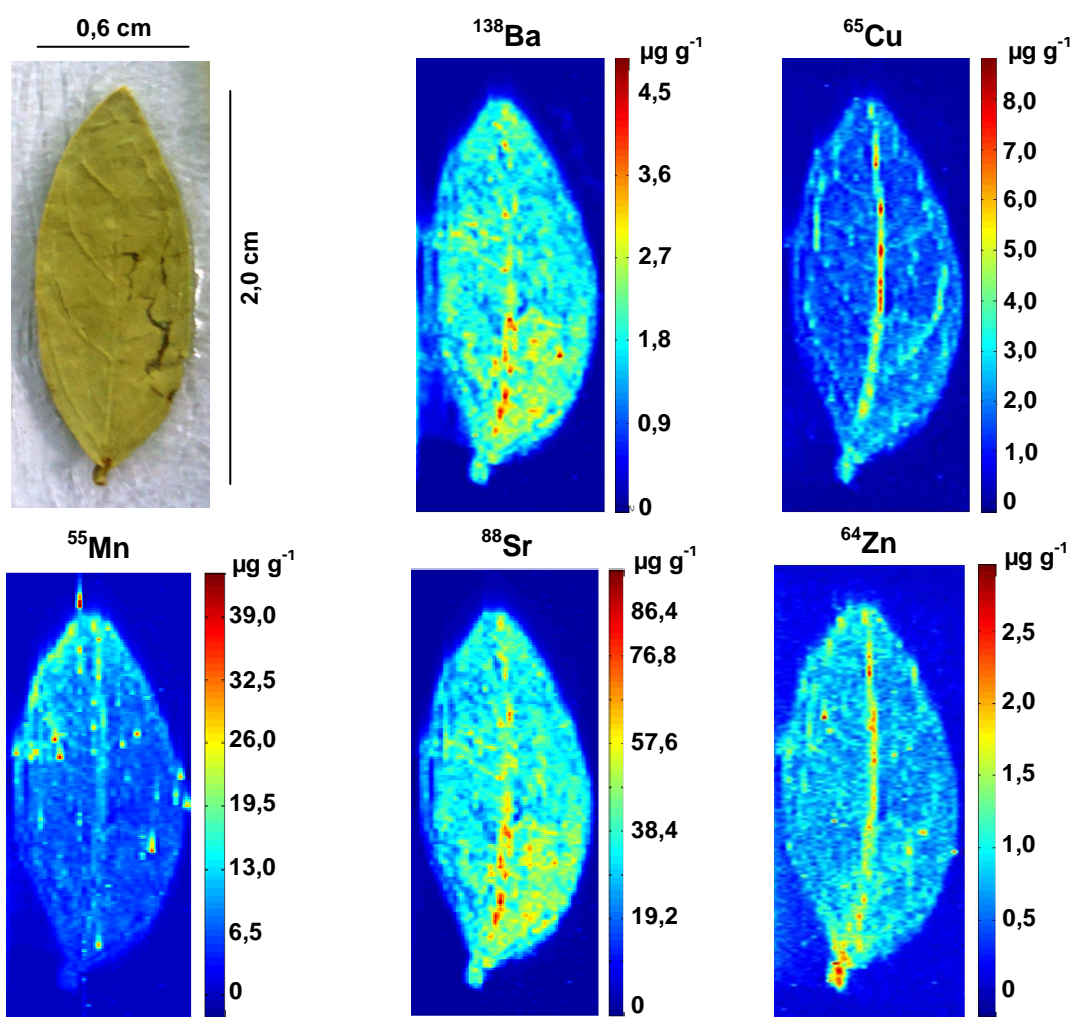
O procedimento desenvolvido para a análise de plantas por LA-ICP-MS foi aplicado para a determinação da distribuição dos analitos investigados em folhas de sene (*Cassia angustifolia*). Para fixação da folha na lâmina de vidro, foi utilizada uma cola instantânea em toda a base do vidro. A aquisição dos sinais foi feita nas condições operacionais previamente estabelecidas para o sistema LA-ICP-MS. Para ablação de toda a folha, foi empregado o modo de ablação com múltiplas linhas, na qual foram marcadas na imagem da folha 40 linhas de 100 µm de largura cada e com um espaçamento de 50 µm entre cada uma. As intensidades foram monitoradas ininterruptamente para todas as linhas, e o tempo total de análise foi de 120 min. Uma representação do perfil do sinal obtido para  $^{138}\text{Ba}$  está mostrado na Figura 41.



**Figura 41.** Perfil do sinal obtido para  $^{138}\text{Ba}$  na folha de sene durante a análise da distribuição elemental por LA-ICP-MS.

Como a quantificação dos analitos foi feita a partir da normalização em relação ao  $^{13}\text{C}$ , a intensidade média do  $^{13}\text{C}$  correspondente a uma região contendo somente a cola foi descontada de todas as intensidades do  $^{13}\text{C}$  ao longo da análise da folha. Posteriormente, os sinais foram normalizados em relação à intensidade corrigida do  $^{13}\text{C}$  e foi feita a interpolação nas respectivas equações de calibração.

Para a obtenção das imagens, as intensidades dos sinais foram adquiridas para todos os analitos, e posteriormente interpoladas nas respectivas curvas de calibração para obtenção dos valores em  $\mu\text{g g}^{-1}$ . As imagens da distribuição dos elementos foram obtidas a partir do processamento dos dados no programa MATLAB, a partir do desenvolvimento de uma sequência de comandos para tratamento das informações. As imagens geradas para alguns dos elementos estudados estão mostradas na Figura 42, assim como uma fotografia da folha utilizada para ablação.



**Figura 42.** Imagens da distribuição de diferentes elementos em folha de sene.

De acordo com as imagens da distribuição de alguns analitos em folha de sene (Figura 42), a aplicação da técnica de LA-ICP-MS é uma ferramenta útil na investigação do comportamento de diversos elementos no metabolismo vegetal. A partir da análise da distribuição elementar em folhas de girassol, por LA-ICP-MS, Kötschau *et al.*<sup>18</sup> relacionaram as imagens obtidas com o transporte dos elementos ao longo das folhas. Elementos como Cd, Cu, Mn e Zn foram observados principalmente nas nervuras e pontas das folhas, como uma forma de proteção do vegetal contra o espalhamento desses elementos no tecido e organelas participantes da fotossíntese.

No caso das imagens de <sup>138</sup>Ba e <sup>88</sup>Sr (Figura 42), foi observada uma possível relação na distribuição desses elementos na folha, os quais pertencem à mesma

<sup>18</sup> Kötschau, A., *et al.*, *Microchemical Journal* 110 (2013) 783-789.



família da tabela periódica e possuem raios iônicos semelhantes (118 e 135 pm, respectivamente),<sup>110</sup> sugerindo assim o desenvolvimento de futuros experimentos relacionados à translocação de elementos em amostras vegetais e obtenção das imagens por LA-ICP-MS.

---

<sup>110</sup> King, R. B., Encyclopedia of Inorganic Chemistry, 2<sup>nd</sup> ed., **2005**, 6696 p.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

O principal objetivo do trabalho foi apresentar uma nova metodologia de calibração para a análise quantitativa de materiais vegetais por LA-ICP-MS. Muitas estratégias têm sido desenvolvidas para diferentes tipos de aplicações, mas nenhuma delas ainda pode ser considerada universal. A utilização do papel filtro como uma forma de representar a matriz celulósica de materiais vegetais, servindo ainda como suporte para a calibração com soluções de referência, mostrou-se adequada para a finalidade desejada. Após as avaliações e otimizações das condições de análise por LA-ICP-MS, foi possível verificar o efeito das condições de preparo da amostra (tamanho de partícula e condições de prensagem) na precisão e exatidão dos resultados obtidos, assim como a necessidade de utilização do  $^{13}\text{C}$  como elemento de referência para correção de efeitos relacionados à quantidade de material ablado, resultando em um melhoramento dos coeficientes de determinação das curvas de calibração.

Os limites de detecção do procedimento proposto foram da ordem de 10 a 100 vezes superiores àqueles normalmente obtidos pelos procedimentos de rotina envolvendo o uso do equipamento de ICP-MS, empregando a nebulização pneumática para a introdução de soluções obtidas de amostras decompostas. No entanto, o método desenvolvido permitiu a simplificação do procedimento de preparo das amostras, uma vez que após a moagem, o único procedimento necessário antes da determinação foi a obtenção de um comprimido da amostra. Adicionalmente, para a análise relacionada à distribuição dos elementos ao longo da folha, a mesma é somente seca e fixada na lâmina de vidro.

Com relação às demais estratégias já desenvolvidas para a análise de plantas por LA-ICP-MS, o procedimento proposto neste trabalho possibilitou contornar algumas limitações comumente mencionadas em outros procedimentos, como a indisponibilidade de CRMs com uma ampla faixa de concentração para diversos elementos, limitando a faixa de calibração; ou os procedimentos geralmente morosos para o preparo de padrões sólidos, a partir de amostras previamente caracterizadas e enriquecidas com os elementos de interesse, uma vez que o procedimento de calibração com papel filtro e padrões aquosos mostrou-se bastante simples e rápido. Somada à análise quantitativa das amostras moídas, o mesmo

procedimento de calibração foi utilizado para a determinação da distribuição de vários elementos em uma folha de planta medicinal. Os resultados obtidos são promissores em relação à análise da distribuição elementar nesse tipo de amostra, possibilitando o desenvolvimento de trabalhos futuros relacionados ao comportamento de diferentes elementos no metabolismo vegetal.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Wu, B., Becker, J. S., Imaging techniques for elements and element species in plant science, *Metallomics* 4 (2012) 403-416.
2. Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., Sreekanth, T. V. M., Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review, *Environmental Chemistry Letters* 8 (2010) 199-216.
3. Bizzi, C. A., Barin, J. S., Muller, E. I., Schmidt, L., Nobrega, J. A., Flores, E. M. M., Evaluation of oxygen pressurized microwave-assisted digestion of botanical materials using diluted nitric acid, *Talanta* 83 (2011) 1324-1328.
4. Shirisha, K., Sahrawat, K. L., Devi, B. P., Wani, S. P., Simple and Accurate Method for Routine Analysis of Heavy Metals in Soil, Plant, and Fertilizer, *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 45 (2014) 2201-2206.
5. Rechcigl, J. E., Payne, G. G., Comparison of a microwave digestion system to other digestion methods for plant-tissue analysis, *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 21 (1990) 2209-2218.
6. Fragoso, M. A. C., Van Beusichem, M. L., Houwers, A., A rapid wet digestion method for plant analysis, *Optimization of Plant Nutrition*, Springer Netherlands, 1993, Chapter 1, pp. 3-6.
7. Virgilio, A., Nóbrega, J. A., Rego, J. F., Gomes Neto, J. A., Evaluation of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for direct determination of chromium in medicinal plants, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 78 (2012) 58-61.
8. Masson, P., Dauthieu, M., Trolard, F., Denaix, L., Application of direct solid analysis of plant samples by electrothermal vaporization-inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: Determination of Cd and Si for environmental purposes, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62 (2007) 224-230.
9. Pisonero, J., Fernandez, B., Günther, D., Critical revision of GD-MS, LA-ICP-MS and SIMS as inorganic mass spectrometric techniques for direct solid analysis, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24 (2009) 1145-1160.
10. Voellkopf, U., Paul, M., Denoyer, E. R., Analysis of solid samples by ICP-mass spectrometry, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 342 (1992) 917-923.
11. Darke, S. A., Tyson, J. F., Review of solid sample introduction for plasma spectrometry and a comparison of results for laser ablation, electrothermal vaporization, and slurry nebulization, *Microchemical Journal* 50 (1994) 310-336.
12. Russo, R. E., Mao, X. L., Liu, H. C., Gonzalez, J., Mao, S. S., Laser ablation in analytical chemistry - a review, *Talanta* 57 (2002) 425-451.

13. Russo, R. E., Mao, X. L., Borisov, O. V., Laser ablation sampling, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 17 (1998) 461-469.
14. Miliszkiewicz, N., Walas, S., Tobiasz, A., Current approaches to calibration of LA-ICP-MS analysis, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 30 (2015) 327-338.
15. Günther, D., Hattendorf, B., Solid sample analysis using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 24 (2005) 255-265.
16. Montaser, A., Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Wiley-VCH, 1998, pp. 1004.
17. Frick, D. A., Günther, D., Fundamental studies on the ablation behaviour of carbon in LA-ICP-MS with respect to the suitability as internal standard, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 1294-1303.
18. Kötschau, A., Buechel, G., Einax, J. W., Fischer, C., von Tuempling, W., Merten, D., Mapping of macro and micro elements in the leaves of sunflower (*Helianthus annuus*) by Laser Ablation-ICP-MS, *Microchemical Journal* 110 (2013) 783-789.
19. Hanc, A., Piechalak, A., Tomaszewska, B., Baralkiewicz, D., Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry in quantitative analysis and imaging of plant's thin sections, *International Journal of Mass Spectrometry* 363 (2014) 16-22.
20. Becker, J. S., Dietrich, R. C., Matusch, A., Pozebon, D., Dressler, V. L., Quantitative images of metals in plant tissues measured by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 63 (2008) 1248-1252.
21. Cizdziel, J. V., Determination of lead in blood by laser ablation ICP-TOF-MS analysis of blood spotted and dried on filter paper: a feasibility study, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388 (2007) 603-611.
22. Silfvast, W. T., Laser Fundamentals, 2<sup>nd</sup> ed., Cambridge University Press, 2008, pp. 674.
23. Young, M., Óptica e Lasers, Editora da Universidade São Paulo, 1998, pp. 448.
24. Ohata, M., Tabersky, D., Glaus, R., Koch, J., Hattendorf, B., Günther, D., Comparison of 795 nm and 265 nm femtosecond and 193 nm nanosecond laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry for the quantitative multi-element analysis of glass materials, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 1345-1353.
25. Meyers, R. A., Encyclopedia of Analytical Chemistry - Applications, Theory and Instrumentation, Wiley, 2010, pp. 14484.

26. Gonzalez, J., Mao, X. L., Roy, J., Mao, S. S., Russo, R. E., Comparison of 193, 213 and 266 nm laser ablation ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 17 (2002) 1108-1113.
27. Günther, D., Longerich, H. P., Forsythe, L., Jackson, S. E., Laser-ablation microprobe-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *American Laboratory* 27 (1995) 24-29.
28. Kuhn, H. R., Günther, D., Laser ablation-ICP-MS: particle size dependent elemental composition studies on filter-collected and online measured aerosols from glass, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 19 (2004) 1158-1164.
29. Russo, R. E., Mao, X., Gonzalez, J. J., Mao, S. S., Femtosecond laser ablation ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 17 (2002) 1072-1075.
30. Koch, J., von Bohlen, A., Hergenroder, R., Niemax, K., Particle size distributions and compositions of aerosols produced by near-IR femto- and nanosecond laser ablation of brass, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 19 (2004) 267-272.
31. Poitrasson, F., Mao, X. L., Mao, S. S., Freydier, R., Russo, R. E., Comparison of ultraviolet femtosecond and nanosecond laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry analysis in glass, monazite, and zircon, *Analytical Chemistry* 75 (2003) 6184-6190.
32. Darke, S. A., Tyson, J. F., Interaction of laser radiation with solid materials and its significance to analytical spectrometry. A review, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 8 (1993) 145-209.
33. Garcia, C. C., Lindner, H., Niemax, K., Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry-current shortcomings, practical suggestions for improving performance, and experiments to guide future development, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24 (2009) 14-26.
34. Horn, I., Günther, D., The influence of ablation carrier gasses Ar, He and Ne on the particle size distribution and transport efficiencies of laser ablation-induced aerosols: implications for LA-ICP-MS, *Applied Surface Science* 207 (2003) 144-157.
35. Russo, R. E., Mao, X., Gonzalez, J. J., Yoo, J., Femtosecond vs. nanosecond laser pulse duration for laser ablation chemical analysis, *Spectroscopy* 28 (2013) 1-6.
36. Verhoff, B., Harilal, S. S., Freeman, J. R., Diwakar, P. K., Hassanein, A., Dynamics of femto- and nanosecond laser ablation plumes investigated using optical emission spectroscopy, *Journal of Applied Physics* 112 (2012) 1-9.
37. Koch, J., Günther, D., Review of the State-of-the-Art of Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Applied Spectroscopy* 65 (2011) 155A-162A.

38. Chichkov, B. N., Momma, C., Nolte, S., von Alvensleben, F., Tünnermann, A., Femtosecond, picosecond and nanosecond laser ablation of solids, *Applied Physics A* 63 (1996) 109-115.
39. LaHaye, N. L., Harilal, S. S., Diwakar, P. K., Hassanein, A., Characterization of laser ablation sample introduction plasma plumes in fs-LA-ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 2267-2274.
40. Gray, A. L., Solid sample introduction by laser ablation for inductively coupled plasma source mass spectrometry, *Analyst* 110 (1985) 551-556.
41. O'Reilly, J., Douglas, D., Braybrook, J., So, P. W., Vergucht, E., Garrevoet, J., Vekemans, B., Vincze, L., Goenaga-Infante, H., A novel calibration strategy for the quantitative imaging of iron in biological tissues by LA-ICP-MS using matrix-matched standards and internal standardisation, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 1378-1384.
42. Aramendia, M., Rello, L., Berail, S., Donard, A., Pecheyran, C., Resano, M., Direct analysis of dried blood spots by femtosecond-laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. Feasibility of split-flow laser ablation for simultaneous trace element and isotopic analysis, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 30 (2015) 296-309.
43. Jurowski, K., Walas, S., Piekoszewski, W., A calibration strategy in bioimaging trace elements in rat brain tissue by LA ICP-TOF-MS method, *Talanta* 115 (2013) 195-199.
44. Russo, R. E., Mao, X. L., Mao, S. S., The physics of laser ablation in microchemical analysis, *Analytical Chemistry* 74 (2002) 70A-77A.
45. Motelica-Heino, M., Le Coustumer, P., Donard, O. F. X., Micro- and macro-scale investigation of fractionation and matrix effects in LA-ICP-MS at 1064 nm and 266 nm on glassy materials, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 16 (2001) 542-550.
46. Rodushkin, I., Axelsson, M. D., Malinovsky, D., Baxter, D. C., Analyte- and matrix-dependent elemental response variations in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry - Part 1. The roles of plasma and ion sampling conditions, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 17 (2002) 1223-1230.
47. Rodushkin, I., Axelsson, M. D., Malinovsky, D., Baxter, D. C., Analyte- and matrix-dependent elemental response variations in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry - Part 2. Implications for multi-element analyses, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 17 (2002) 1231-1239.
48. Mochizuki, T., Sakashita, A., Iwata, H., Laser ablation for direct elemental analysis of solid samples by ICP-atomic emission spectrometry and ICP-mass spectrometry, *Nippon Kagaku Kaishi* 58 (1990) 19-27.

49. Garcia, C. C., Waelle, M., Lindner, H., Koch, J., Niemax, K., Günther, D., Femtosecond laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: Transport efficiencies of aerosols released under argon atmosphere and the importance of the focus position, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 63 (2008) 271-276.
50. Liu, X. R., Horlick, G., In-situ laser-ablation sampling for inductively-coupled plasma-atomic emission-spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 50 (1995) 537-548.
51. Günther, D., Longerich, H. P., Jackson, S. E., Forsythe, L., Effect of sampler orifice diameter on dry plasma inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS) backgrounds, sensitivities, and limits of detection using laser ablation sample introduction, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 355 (1996) 771-773.
52. Pozebon, D., Scheffler, G. L., Dressler, V. L., Nunes, M. A. G., Review of the applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) to the analysis of biological samples, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 2204-2228.
53. Guillong, M., Günther, D., Effect of particle size distribution on ICP-induced elemental fractionation in laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 17 (2002) 831-837.
54. Frick, D. A., Giesen, C., Hemmerle, T., Bodenmiller, B., Günther, D., An internal standardisation strategy for quantitative immunoassay tissue imaging using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 30 (2015) 254-259.
55. Longerich, H. P., Jackson, S. E., Günther, D., Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometric transient signal data acquisition and analyte concentration calculation, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 11 (1996) 899-904.
56. Krosiakova, I., Günther, D., Elemental fractionation in laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry: evidence for mass load induced matrix effects in the ICP during ablation of a silicate glass, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 22 (2007) 51-62.
57. Bonta, M., Lohninger, H., Marchetti-Deschmann, M., Limbeck, A., Application of gold thin-films for internal standardization in LA-ICP-MS imaging experiments, *Analyst* 139 (2014) 1521-1531.
58. Becker, J. S., Zoriy, M. V., Pickhardt, C., Palomero-Gallagher, N., Zilles, K., Imaging of copper, zinc, and other elements in thin section of human brain samples



- (Hippocampus) by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 77 (2005) 3208-3216.
59. Becker, J. S., Applications of inductively coupled plasma mass spectrometry and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry in materials science, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 57 (2002) 1805-1820.
60. Pickhardt, C., Becker, J. S., Dietze, H. J., A new strategy of solution calibration in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry for multielement trace analysis of geological samples, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 368 (2000) 173-181.
61. Pearce, N. J. G., Perkins, W. T., Westgate, J. A., Gorton, M. P., Jackson, S. E., Neal, C. R., Chenery, S. P., A compilation of new and published major and trace element data for NIST SRM 610 and NIST SRM 612 glass reference materials, *Geostandards Newsletter-the Journal of Geostandards and Geoanalysis* 21 (1997) 115-144.
62. Liu, Y., Hu, Z., Li, M., Gao, S., Applications of LA-ICP-MS in the elemental analyses of geological samples, *Chinese Science Bulletin* 58 (2013) 3863-3878.
63. Ulrich, T., Kamber, B. S., Natural obsidian glass as an external accuracy reference material in laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Geostandards and Geoanalytical Research* 37 (2013) 169-188.
64. Pickhardt, C., Brenner, I. B., Becker, J. S., Dietze, H. J., Determination of trace elements in zeolites by laser ablation ICP-MS, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 368 (2000) 79-87.
65. Souders, A. K., Sylvester, P. J., Accuracy and precision of non-matrix-matched calibration for lead isotope ratio measurements of lead-poor minerals by LA-MC-ICPMS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 25 (2010) 975-988.
66. Motelica-Heino, M., F. X. Donard, O., M. Mermet, J., Laser ablation of synthetic geological powders using ICP-AES detection: effects of the matrix, chemical form of the analyte and laser wavelength, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14 (1999) 675-682.
67. Wu, B., Zoriy, M., Chen, Y., Becker, J. S., Imaging of nutrient elements in the leaves of *Elsholtzia splendens* by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS), *Talanta* 78 (2009) 132-137.
68. Oliveira, S. R., Arruda, M. A. Z., Application of laser ablation (imaging) inductively coupled plasma mass spectrometry for mapping and quantifying Fe in transgenic and non-transgenic soybean leaves, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 30 (2015) 389-395.

69. Todoli, J. L., Mermet, J. M., Study of polymer ablation products obtained by ultraviolet laser ablation inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 53 (1998) 1645-1656.
70. Frick, D. A., Günther, D., Fundamental studies on the ablation behaviour of carbon in LA-ICP-MS with respect to the suitability as internal standard, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 1294-1303.
71. Shi, J., Gras, M., Silk, W., Laser ablation ICP-MS reveals patterns of copper differing from zinc in growth zones of cucumber roots, *Planta* 229 (2009) 945-954.
72. Narewski, U., Werner, G., Schulz, H., Vogt, C., Application of laser ablation inductively coupled mass spectrometry (LA-ICP-MS) for the determination of major, minor, and trace elements in bark samples, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 366 (2000) 167-170.
73. Kaiser, J., Galiová, M., Novotný, K., Červenka, R., Reale, L., Novotný, J., Liška, M., Samek, O., Kanický, V., Hrdlička, A., Stejskal, K., Adam, V., Kizek, R., Mapping of lead, magnesium and copper accumulation in plant tissues by laser-induced breakdown spectroscopy and laser-ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 64 (2009) 67-73.
74. Punshon, T., Jackson, B. P., Bertsch, P. M., Burger, J., Mass loading of nickel and uranium on plant surfaces: application of laser ablation-ICP-MS, *Journal of Environmental Monitoring* 6 (2004) 153-159.
75. Meharg, A. A., Lombi, E., Williams, P. N., Scheckel, K. G., Feldmann, J., Raab, A., Zhu, Y., Islam, R., Speciation and Localization of Arsenic in White and Brown Rice Grains, *Environmental Science & Technology* 42 (2008) 1051-1057.
76. Moradi, A. B., Swoboda, S., Robinson, B., Prohaska, T., Kaestner, A., Oswald, S. E., Wenzel, W. W., Schulin, R., Mapping of nickel in root cross-sections of the hyperaccumulator plant *Berkheya coddii* using laser ablation ICP-MS, *Environmental and Experimental Botany* 69 (2010) 24-31.
77. Debeljak, M., van Elteren, J. T., Vogel-Mikus, K., Development of a 2D laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry mapping procedure for mercury in maize (*Zea mays* L.) root cross-sections, *Analytica Chimica Acta* 787 (2013) 155-162.
78. Wu, B., Chen, Y., Becker, J. S., Study of essential element accumulation in the leaves of a Cu-tolerant plant *Elsholtzia splendens* after Cu treatment by imaging laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS), *Analytica Chimica Acta* 633 (2009) 165-172.
79. Siebold, M., Leidich, P., Bertini, M., Deflorio, G., Feldmann, J., Krupp, E. M., Halmschlager, E., Woodward, S., Application of elemental bioimaging using laser ablation ICP-MS in forest pathology: distribution of elements in the bark of *Picea*

- sitchensis following wounding, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402 (2012) 3323-3331.
80. Cizdziel, J. V., Bu, K., Nowinski, P., Determination of elements in situ in green leaves by laser ablation ICP-MS using pressed reference materials for calibration, *Analytical Methods* 4 (2012) 564-569.
81. Kumtabtim, U., Siripinyanond, A., Auray-Blais, C., Ntwari, A., Becker, J. S., Analysis of trace metals in single droplet of urine by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *International Journal of Mass Spectrometry* 307 (2011) 174-181.
82. Hsieh, H.-F., Chang, W.-S., Hsieh, Y.-K., Wang, C.-F., Using dried-droplet laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry to quantify multiple elements in whole blood, *Analytica Chimica Acta* 699 (2011) 6-10.
83. Resano, M., Aramendia, M., Rello, L., Luisa Calvo, M., Berail, S., Pecheyran, C., Direct determination of Cu isotope ratios in dried urine spots by means of fs-LA-MC-ICPMS. Potential to diagnose Wilson's disease, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 28 (2013) 98-106.
84. Aramendia, M., Rello, L., Vanhaecke, F., Resano, M., Direct trace-elemental analysis of urine samples by laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry after sample deposition on clinical filter papers, *Analytical Chemistry* 84 (2012) 8682-8690.
85. Nischkauer, W., Vanhaecke, F., Bernacchi, S., Herwig, C., Limbeck, A., Radial line-scans as representative sampling strategy in dried-droplet laser ablation of liquid samples deposited on pre-cut filter paper disks, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 101 (2014) 123-129.
86. Bonta, M., Lohninger, H., Laszlo, V., Hegedus, B., Limbeck, A., Quantitative LA-ICP-MS imaging of platinum in chemotherapy treated human malignant pleural mesothelioma samples using printed patterns as standard, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 2159-2167.
87. Hoesl, S., Neumann, B., Techritz, S., Linscheid, M., Theuring, F., Scheler, C., Jakubowski, N., Mueller, L., Development of a calibration and standardization procedure for LA-ICP-MS using a conventional ink-jet printer for quantification of proteins in electro- and Western-blot assays, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 1282-1291.
88. Kalra, Y. P., Handbook of Reference Methods for Plant Analysis, Taylor and Francis, 1998, pp. 291.
89. Thomas, S. C., Martin, A. R., Carbon Content of Tree Tissues: A Synthesis, *Forests* 3 (2012) 332-352.

90. Durrant, S. F., Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: achievements, problems, prospects, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14 (1999) 1385-1403.
91. Radomski, M. I., Teores foliares de silício, taninos e lignina, em *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reiss (espinheira-santa), em função de variáveis ambientais e genéticas, Tese de doutorado em Agronomia (Horticultura), Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2006, pp. 104.
92. Gomes, M. S., Schenk, E. R., Santos, D., Jr., Krug, F. J., Almirall, J. R., Laser ablation inductively coupled plasma optical emission spectrometry for analysis of pellets of plant materials, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 94-95 (2014) 27-33.
93. de Carvalho, G. G. A., Santos Jr, D., da Silva Gomes, M., Nunes, L. C., Guerra, M. B. B., Krug, F. J., Influence of particle size distribution on the analysis of pellets of plant materials by laser-induced breakdown spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* (2015), IN PRESS.
94. Kuhn, H. R., Guillong, M., Günther, D., Size-related vaporisation and ionisation of laser-induced glass particles in the inductively coupled plasma, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378 (2004) 1069-1074.
95. DalCorso, G., Manara, A., Piasentin, S., Furini, A., Nutrient metal elements in plants, *Metallomics* 6 (2014) 1770-1788.
96. Tanner, M., Günther, D., Short transient signals, a challenge for inductively coupled plasma mass spectrometry, a review, *Analytica Chimica Acta* 633 (2009) 19-28.
97. Vaughan, M. A., Horlick, G., Oxide, hydroxide, and doubly charged analyte species in inductively coupled plasma/mass spectrometry, *Applied Spectroscopy* 40 (1986) 434-444.
98. Hattendorf, B., Latkoczy, C., Günther, D., Laser ablation-ICPMS, *Analytical Chemistry* 75 (2003) 341A-347A.
99. Liu, S. H., Hu, Z. C., Günther, D., Ye, Y. H., Liu, Y. S., Gao, S., Hu, S. H., Signal enhancement in laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry using water and/or ethanol vapor in combination with a shielded torch, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 536-544.
100. Doherty, W., Outridge, P. M., Gregoire, D. C., Communication. Technique for the introduction of dry atomic vapours for improved optimization and diagnostic studies of laser ablation inductively coupled plasma spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 11 (1996) 1123-1126.
101. Connor, C. O., Sharp, B. L., Evans, P., On-line additions of aqueous standards for calibration of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: theory

- and comparison of wet and dry plasma conditions, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 21 (2006) 556-565.
102. Alary, J.-F., Salin, E. D., Quantification of water and plasma diagnosis for electrothermal vaporization–inductively coupled plasma–mass spectrometry: the use of argon and argide polyatomics as probing species, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 53 (1998) 1705-1721.
  103. Fliegel, D., Frei, C., Fontaine, G., Hu, Z., Gao, S., Günther, D., Sensitivity improvement in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry achieved using a methane/argon and methanol/water/argon mixed gas plasma, *Analyst* 136 (2011) 4925-4934.
  104. Liu, S., Hu, Z., Günther, D., Ye, Y., Liu, Y., Gao, S., Hu, S., Signal enhancement in laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry using water and/or ethanol vapor in combination with a shielded torch, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 536-544.
  105. Lear, J., Hare, D., Adlard, P., Finkelstein, D., Doble, P., Improving acquisition times of elemental bio-imaging for quadrupole-based LA-ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 159-164.
  106. Günther, D., Frischknecht, R., Heinrich, C. A., Kahlert, H.-J., Capabilities of an argon fluoride 193 nm excimer laser for laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry microanalysis of geological materials, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 12 (1997) 939-944.
  107. Miller, J. N., Miller, J. C., Statistics and chemometrics for analytical chemistry, 5<sup>th</sup> ed., Pearson, 2005, pp. 285.
  108. Durrant, S. F., Multielemental analysis of environmental matrices by laser ablation inductively coupled plasma mass-spectrometry, *Analyst* 117 (1992) 1585-1592.
  109. Arroyo, L., Trejos, T., Gardinali, P. R., Almirall, J. R., Optimization and validation of a Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry method for the routine analysis of soils and sediments, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 64 (2009) 16-25.
  110. King, R. B., Encyclopedia of Inorganic Chemistry, 2<sup>nd</sup> ed., Wiley, 2005, pp. 6696.