



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA

**DANIELLE DA SILVA FRANCISCHINI**

**IMAGEAMENTO MULTIELEMENTAR POR MEIO DE ABLAÇÃO A LASER E  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO  
(LA-ICP-MS) PARA ESPELEOTEMAS E ANÉIS DE ÁRVORES**

**MULTI-ELEMENTAL IMAGING USING LASER ABLATION AND INDUCTIVELY  
COUPLED PLASMA MASS SPECTROMETRY (LA-ICP-MS) FOR SPELEOTHEMS  
AND TREE RINGS**

Campinas

2023

**DANIELLE DA SILVA FRANCISCHINI**

**IMAGEAMENTO MULTIELEMENTAR POR MEIO DE ABLAÇÃO A LASER E  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO  
(LA-ICP-MS) PARA ESPELEOTEMAS E ANÉIS DE ÁRVORES**

Tese apresentada ao Instituto de Química da  
Universidade Estadual de Campinas como  
parte dos requisitos exigidos para a obtenção  
do título de Doutora em Ciências.

**Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda**

**Este trabalho corresponde à versão final da tese defendida pela aluna DANIELLE DA SILVA FRANCISCHINI e orientada pelo Prof. Dr. MARCO AURÉLIO ZEZZI ARRUDA.**

Campinas

2023

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Química  
Simone Luiz Alves - CRB 8/9094

F847i Francischini, Danielle da Silva, 1995-  
Imageamento multielementar por meio de ablação a laser e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (LA-ICP-MS) para espeleotemas e anéis de árvores / Danielle da Silva Francischini. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Marco Aurelio Zezzi Arruda.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. LA-ICP-MS. 2. Imageamento por espectrometria de massas. 3. Quantificação. 4. Calibração. 5. Compatibilização de matriz. I. Arruda, Marco Aurelio Zezzi, 1965-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações Complementares

**Título em outro idioma:** Multi-elemental imaging using laser ablation and inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) for speleothems and tree rings

**Palavras-chave em inglês:**

LA-ICP-MS

Mass spectrometry imaging

Quantification

Calibration

Matrix-matching

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Doutora em Ciências

**Banca examinadora:**

Marco Aurelio Zezzi Arruda [Orientador]

Cassiana Carolina Montagner

Leandro Wang Hantao

Valderi Luiz Dressler

César Ricardo Teixeira Tarley

**Data de defesa:** 18-08-2023

**Programa de Pós-Graduação:** Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3657-7448>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6154141048558091>

## **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda (Orientador)

Profa. Dra. Cassiana Carolina Montagner (Universidade de Campinas – UNICAMP)

Prof. Dr. Leandro Wang Hantao (Universidade de Campinas – UNICAMP)

Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler (Universidade Federal de Santa Maria – UFSM)

Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley (Universidade Estadual de Londrina – UEL)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria de Pós-Graduação do Instituto de Química da Unicamp.

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pela aluna **DANIELLE DA SILVA FRANCISCHINI**, aprovada pela Comissão Julgadora em 18 de agosto de 2023.

## *Dedicatória*

*Aos meus pais Márcio e Ana Maria, à minha irmã Juliana, as minhas sobrinhas Nicole e Alice e ao meu melhor amigo e companheiro de vida Ramon. O amor, confiança, apoio incondicional e a paciência que possuem foram essenciais para tornar este desafio em uma missão cumprida, eu amo vocês. Dedico, também, a mim, para lembrar que eu sou capaz.*

*“Nós vivemos e aprendemos a dar um passo de cada vez. Não é necessário ter pressa. É como aprender a voar ou se apaixonar, vai acontecer quando tiver que acontecer e, então, nós descobrimos a razão de dar um passo de cada vez.”*

*One step at a time – Jordin Sparks*

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho de pesquisa foi realizado com apoio do Processo 2019/00063-9, vinculado ao Projeto Temático PIRE-CREATE (Processo 2017/50085-3) - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), bem como com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Desenvolver e finalizar esta Tese de Doutorado foi uma árdua jornada, na qual muitos desafios foram encontrados para que fosse possível a construção do conhecimento, bem como o meu amadurecimento pessoal e profissional. Por este motivo, agradeço da forma mais profunda e sincera a todas as pessoas que me ajudaram durante todo o processo, esta Tese pertence tanto a vocês, quanto a mim.

Primeiramente, gostaria de agradecer aos principais responsáveis por esta conquista: minha mãe Ana Maria e meu pai Márcio Alberto, obrigada por investir e confiar em mim, sem vocês nada seria possível. À minha irmã Juliana, que nunca duvidou da minha capacidade e sempre foi a minha melhor amiga. Às minhas sobrinhas Nicole e Alice, vocês me tornaram uma pessoa melhor e espero que esta tese sirva para mostrar que vocês podem ser o que quiserem.

Ao meu amor de verão, melhor amigo, meu exemplo e parceiro de vida, Ramon. Não existe palavras para expressar quão grata eu sou por compartilhar a vida com você. Obrigada por me dar forças, por me fazer ver o mundo com outros olhos, pelos chás de camomila, pela paciência, amor, aconchego e conselhos durante todo esse processo. Sem você eu não teria aceitado este desafio e passado por cada obstáculo. Eu amo você, hoje e sempre.

A meu orientador prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda, por todos os momentos de ensinamentos, parceria, oportunidades e confiança durante o desenvolvimento desta pesquisa. Foi uma honra conhecê-lo e tê-lo como orientador.

A todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

Aos membros da banca do Exame Geral, do Exame de Qualificação de Área e da Defesa desta Tese de Doutorado, a contribuição de vocês foi e é essencial para o refinamento desta pesquisa.

Aos amigos que se tornaram família: Brenda, Hélio, Isadora, Matheus, Ana Cláudia e Vitor, obrigada por comemorarem comigo cada etapa conquistada nesta jornada, saibam que a amizade de vocês me deu forças em todos os momentos de dificuldade.

Aos meus colegas do Grupo de Espectrometria, Preparo de Amostra e Mecanização – GEPAM, que tive a oportunidade de conhecer ao longo deste período: Humberto, Jemmyson, Larissa, Luana, Renata, Pedro, Rafael e Rodrigo, Vinnicius, João, Amanda, Lilian, Ketolly, Kelly, e principalmente para àqueles que viraram irmãos de coração: Lucas, Ana Beatriz, Eduarda e Aline, obrigada pela colaboração, risadas, cafés, coragem, força e fofocas durante a minha passagem pelo laboratório.

Às pessoas que Campinas me apresentou e que tornaram minha estadia serena, calma, com muitas conversas e vinhos: Vaneza (e Juve), Fernanda, Camila, Raquel, Beatriz, Mayra e Isabella (com Olga e Nelson), obrigada por me apresentarem novas formas de ver Barão Geraldo para além da Unicamp.

Aos amigos que a UFSCar me proporcionou conhecer e que me ensinam sobre todos os assuntos: Aylon, Karine, Thais, Matheus, Luize, Rosivânia e Higor, obrigada pelas discussões científicas e não tão científicas assim. Também a segunda família que São Carlos me apresentou, conhecida como República Metilaminas, em especial para as pessoas que me fizeram ver o mundo com outros olhos, que me ensinaram sobre a vida dentro e fora da UFSCar e que espero sempre poder chamá-los de amigos: Ana Maria, Gabriela, Rafaela, Patrícia, Natália Rosário, Natália Zamarioli, Giulia, Ana Júlia, Gustavo, João, Mauro, Isabella, vocês são incríveis.

À Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, em especial ao Instituto de Química pela possibilidade de realização desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro no laboratório e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela concessão da bolsa de estudo.

À CPG e aos demais funcionários do Instituto de Química da UNICAMP que colaboraram de alguma maneira para realização deste trabalho.

Sou muito grata a cada uma dessas pessoas que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para que este trabalho se concretizasse.

## RESUMO

Esta tese de doutorado está associada ao projeto “*PIRE-CREATE: Climate research education in the Americas using tree-ring speleothem examples*”. Neste sentido, os anéis de crescimento são considerados camadas de crescimento produzidas pela madeira por certo período de tempo, portanto, são considerados registros biológicos das alterações ocorridas no ambiente. Espeleotemas também são matrizes pré-estabelecidas como arquivos da mudança climática, pois também incorporam elementos traços na matriz de carbonato de cálcio de acordo com as mudanças ocorridas no local. Por serem matrizes que possuem informações ambientais e regiões micrométricas, técnicas que possuam alta resolução espacial são de suma importância para a obtenção de resultados satisfatórios. Neste contexto, o processo de imageamento surge como alternativa que permite a análise da amostra em seu estado sólido, possibilitando o acesso a informações de distribuições espaciais espécies químicas e a comparação com informações ambientais. O método conhecido por ablação a laser e espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (LA-ICP-MS) tem apresentado vantagens no processo de imageamento devido à alta resolução espacial, mínimo preparo de amostra e alta sensibilidade, possibilitando análises qualitativas e quantitativas das informações espaciais. Neste contexto, esta tese teve como objetivos gerais o desenvolvimento de métodos de imageamento qualitativo de Zn, Ba, Mn, Fe, Ni, Sr, Ca e Mg para análise de espeleotemas (Capítulo I), bem como imageamento quantitativo de Pb, Cd e Ba para anéis de crescimento pela técnica LA-ICP-MS (Capítulo II). Para ambas as matrizes, foi realizado a otimização dos parâmetros analíticos, bem como da resolução de imagem de elementos-chave para as amostras de espeleotemas. Para o método o imageamento quantitativo em anéis de crescimento por LA-ICP-MS, foram avaliados àqueles baseados na calibração por compatibilização de matriz: (i) curva analítica e (ii) *one-point*, por meio do uso da espécie *Pinus taeda* como matriz dos padrões analíticos e três materiais de referência para exatidão e precisão analítica. Como resultados do Capítulo I, foi verificado a influência positiva do diâmetro do *spot* e intensidade do laser na intensidade de sinal dos isótopos, bem como a influência da velocidade de ablação e padrão interno na resolução de imagem qualitativa, possibilitando a obtenção de imagens com alta resolução da superfície de amostra real de espeleotema. Com relação aos resultados do Capítulo II, foram obtidos coeficientes de correlação linear acima de 0,99 e recuperação analítica entre 74 e 110% para ambos os métodos de quantificação avaliados, os quais foram aplicados no imageamento quantitativo de amostra de *Araucária araucana*, possibilitando verificar quantitativamente a heterogeneidade dos anéis de crescimento. Ao comparar os resultados de imageamento

quantitativo com os resultados após a decomposição e quantificação total, também foi possível verificar que esta heterogeneidade da matriz influencia na validação dos resultados com técnicas convencionais, assim, alertando para a busca de novas maneiras de se validar resultados de imagem quantitativa para além da quantificação total via ICP-MS.

## ABSTRACT

This PhD Thesis is associated with the project "PIRE-CREATE: Climate research education in the Americas using tree-ring speleothem examples". In this sense, tree rings are considered growth layers produced by wood over a certain period of time, so they are considered biological records of changes in the environment. Speleothems are also pre-established matrices as archives of climate change, as they also incorporate trace elements into the calcium carbonate matrix according to the changes that have occurred at the site. Because they are matrices that have environmental information and micrometric regions, techniques that have high spatial resolution are of utmost importance to obtain satisfactory results. In this context, the imaging process emerges as an alternative that allows the analysis of the sample in its solid state, enabling access to information of chemical species spatial distributions and comparison with environmental information. The method known as laser ablation and inductively coupled plasma source mass spectrometry (LA-ICP-MS) has presented advantages in the imaging process due to the high spatial resolution, minimal sample preparation and high sensitivity, enabling qualitative and quantitative analysis of spatial information. In this context, this thesis had as general objectives the development of qualitative imaging methods of Zn, Ba, Mn, Fe, Ni, Sr, Ca and Mg for speleothems analysis (Chapter I), as well as quantitative imaging of Pb, Cd and Ba for tree rings by LA-ICP-MS technique (Chapter II). For both matrices, optimization of analytical parameters as well as imaging resolution of key elements was performed for the speleothem samples. For the method the quantitative imaging in growth rings by LA-ICP-MS, were evaluated to those based on calibration by matrix compatibility: (i) analytical curve and (ii) one-point, by using the species *Pinus taeda* as matrix of the analytical standards and three reference materials for analytical validation accuracy and precision. As results of Chapter I, the positive influence of spot diameter and laser intensity on the isotope signal intensity was verified, as well as the influence of ablation speed and internal standard on the qualitative image resolution, making it possible to obtain high resolution images of the real speleothem sample surface. Regarding the results of Chapter II, linear correlation coefficients above 0.99 and analytical recovery between 74 and 110% were obtained for both quantification methods evaluated, which were applied in the quantitative imaging of *Araucaria araucana* sample, making it possible to quantitatively verify the heterogeneity of the growth rings. When comparing the quantitative imaging results with the results after decomposition and total quantification, it was also possible to verify that this heterogeneity of the matrix influences the

validation of the results with conventional techniques, thus alerting to the search for new ways to validate quantitative imaging results beyond the total quantification via ICP-MS.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1. 1:</b> Processo de análise via LA-ICP-MS. Fonte: Gundlach-Grahan e Gunther (2016) [17]. Reprodução autorizada pela <i>Springer</i> . .....	23
<b>Figura 1. 2:</b> Imageamento via LA-ICP-MS, sendo (a) ablação da amostra, (b) obtenção dos documentos das linhas de ablação, (c) tratamento de dados via softwares, (d) obtenção da matriz de pixels e (e) a imagem final. Imagem adaptada de: Francischini e Arruda (2021) [14]. Reprodução autorizada pela <i>Elsevier</i> . .....	24
<b>Figura 1. 3:</b> Diferença entre o perfil de ablação empregando lasers em regime de duração de pulso de nano e femtosegundos. Imagem adaptada de: Zhang et. al (2014) [20]. Reprodução autorizada pela <i>American Chemical Society</i> . .....	25
<b>Figura 1. 4:</b> Processo e reações químicas essenciais na formação de espeleotemas. Fonte: autoria própria.....	29
<b>Figura 1. 5:</b> Sinal de $^{88}\text{Sr}$ em NIST 612 de acordo com o planejamento experimental $2^3$ e análise via LA-ICP-MS. ....	34
<b>Figura 1. 6:</b> Gráfico de Pareto dos efeitos analíticos e a Superfície de Resposta para o planejamento fatorial completo $2^3$ para LA-ICP-MS, utilizando a resposta múltipla (MR) como resultado. Figura obtida pelo software Chemoface. ....	35
<b>Figura 1. 7:</b> Imagens qualitativas ao longo da superfície de uma estalagmite, de acordo com a velocidade de ablação avaliada. Imagens obtidas através do <i>software</i> LA-iMageS. ....	37
<b>Figura 1. 8:</b> Avaliação do padrão interno (IS) $^{44}\text{Ca}$ na resolução de imageamento qualitativo na superfície de espeleotema. ....	39

### CAPÍTULO II

<b>Figura 2. 1:</b> Configuração do tronco de árvore. Fonte: autoria própria. ....	46
<b>Figura 2. 2:</b> Aspectos estruturais de anel de crescimento de árvore. Fonte: adaptado de Wheeler (2001) [22]......	46
<b>Figura 2. 3:</b> Imagem qualitativa de $^{13}\text{C}$ na superfície da madeira da espécie <i>Araucaria araucana</i> . Imagem obtida através do software LA-iMageS e análise pela técnica LA-ICP-MS. ....	49
<b>Figura 2. 4:</b> Comparação entre o processo convencional (linha azul) e a liofilização (linha vermelha) no preparo dos pellets.....	55

<b>Figura 2. 5:</b> Imagens quantitativas da superfície do CRM <i>Pinus Needles</i> por meio das estratégias de quantificação avaliadas. ....	61
<b>Figura 2. 6:</b> Distribuição elementar ao longo dos anéis de crescimento da amostra 12-N pela técnica LA-ICP-MS. ....	63
<b>Figura 2. 7:</b> Distribuição elementar ao longo dos anéis de crescimento da amostra 1-E pela técnica LA-ICP-MS. ....	64
<b>Figura 2. 8:</b> Distribuição elementar ao longo dos anéis de crescimento da amostra 11-S pela técnica LA-ICP-MS. ....	65
<b>Figura 2. 9:</b> Imageamento quantitativo da amostra 12-N ( <i>Araucária araucana</i> ) por meio dos métodos de quantificação <i>one-point</i> e curva analítica e LA-ICP-MS (Imagens obtidas pelo software MatLab). ....	67
<b>Figura 2. 10:</b> Imageamento quantitativo da amostra 1-E ( <i>Araucária araucana</i> ) por meio dos métodos de quantificação <i>one-point</i> e curva analítica e LA-ICP-MS (Imagens obtidas pelo software MatLab). ....	68
<b>Figura 2. 11:</b> Imageamento quantitativo da amostra 11-S ( <i>Araucária araucana</i> ) por meio dos métodos de quantificação <i>one-point</i> e curva analítica e LA-ICP-MS (Imagens obtidas pelo software MatLab). ....	69
<b>Figura 2. 12:</b> Comparação entre a imagem quantitativa e qualitativa de <sup>208</sup> Pb em uma amostra de <i>Araucária araucana</i> . ....	71

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1. 1:</b> Planejamento experimental $2^3$ para otimização instrumental da ablação a laser para análise de espeleotema.....	31
<b>Tabela 1. 2:</b> Níveis experimentais dos parâmetros analíticos da ablação a laser. ....	31
<b>Tabela 1. 3:</b> Resultados de intensidade de sinal (cps) para os isótopos avaliados no material certificado (NIST 612) por meio do planejamento fatorial $2^3$ e análise via LA-ICP-MS. ....	33
<b>Tabela 1. 4:</b> Resultados da multi-resposta (MR) para cada variável (V) em NIST 612 por meio do planejamento fatorial $2^3$ e análise via LA-ICP-MS. ....	33
<b>Tabela 1. 5:</b> Parâmetros instrumentais otimizados para análise via LA-ICP-MS em amostra de espeleotemas. ....	36

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 2. 1:</b> Parâmetros instrumentais otimizados para análise via LA-ICP-MS em amostra de madeira. ....	54
<b>Tabela 2. 2:</b> Resultados obtidos para a curva analítica por compatibilização de matriz. ....	55
<b>Tabela 2. 3:</b> Resultados de concentração, recuperação e RSD obtidos para diferentes CRMs por meio de curva analítica e LA-ICP-MS. ....	56
<b>Tabela 2. 4:</b> Valores obtidos do RSF em <i>pellet</i> de <i>P. Taeda</i> para quantificação via <i>one-point</i> . ....	57
<b>Tabela 2. 5:</b> Resultados obtidos utilizando o método de quantificação via <i>one-point</i> e LA-ICP-MS. ....	58
<b>Tabela 2. 6:</b> LD e LQ para o método <i>one-point</i> . ....	59
<b>Tabela 2. 7:</b> Resultado de recuperação analítica considerando o valor médio da área das imagens quantitativas do CRM Pinus Needles. ....	62
<b>Tabela 2. 8:</b> Comparação entre a média da concentração total dos isótopos obtida por meio do imageamento quantitativo pelas técnicas LA-ICP-MS e ICP-MS da área analisada dos anéis de crescimento. ....	72

## SUMÁRIO

<b>I. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO I: IMAGEAMENTO QUALITATIVO DA DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL MULTIELEMENTAR EM ESPELEOTEMAS EMPREGANDO A TÉCNICA LA-ICP- MS .....</b>	<b>21</b>
1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
2. ASPECTOS TEÓRICOS RELEVANTES .....	22
2.2. PROCESSO DE IMAGEAMENTO QUALITATIVO.....	22
2.3. QUIMIOMETRIA E PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL .....	26
2.4. ESPELEOTEMAS .....	28
3. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL .....	30
3.1. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DA TÉCNICA LA-ICP- MS .....	30
3.2. OTIMIZAÇÃO DA VELOCIDADE DE ABLAÇÃO E AVALIAÇÃO DO PADRÃO INTERNO .....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
4.1. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DE LA-ICP-MS.....	32
4.2. OTIMIZAÇÃO DA VELOCIDADE DE ABLAÇÃO E AVALIAÇÃO DO PADRÃO INTERNO .....	36
5. CONCLUSÕES PARCIAIS.....	40
<b>CAPÍTULO II: IMAGEAMENTO QUANTITATIVO DE Pb, Cd e Ba EM AMOSTRAS DE ANÉIS DE CRESCIMENTO DE ÁRVORES POR MEIO DA ANÁLISE POR LA-ICP-MS.....</b>	<b>41</b>
1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	42
2. ASPECTOS TEÓRICOS RELEVANTES .....	42
2.1. ESTRATÉGIAS DE CALIBRAÇÃO E IMAGEAMENTO QUANTITATIVO..	42
2.2. ANÉIS DE CRESCIMENTO DE ÁRVORES .....	45
3. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL .....	48

3.1. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DA TÉCNICA LA-ICP-MS	49
3.2. ESTRATÉGIAS DE QUANTIFICAÇÃO E IMAGEAMENTO QUANTITATIVO PELA TÉCNICA LA-ICP-MS.....	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
4.1. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DA TÉCNICA LA-ICP-MS	53
4.2. ESTRATÉGIAS DE QUANTIFICAÇÃO E IMAGEAMENTO QUANTITATIVO PELA TÉCNICA LA-ICP-MS.....	54
5. CONCLUSÕES PARCIAIS.....	74
<b>II. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>75</b>
<b>III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>77</b>

## I. INTRODUÇÃO GERAL

Esta Tese de Doutorado está associada ao projeto temático “*PIRE-CREATE: Climate research education in the Americas using tree-ring speleothem examples*”, que tem como objetivo a reconstituição paleoclimática ocorrida no último milênio por meio da análise de espeleotemas e anéis de crescimento de árvores, localizadas em regiões sob a ação do Regime de Monções de verão da América do Sul, para verificar anomalias climáticas e as mudanças nas precipitações desta região. Este projeto tem parceria com grupos de pesquisadores da USP (Universidade de São Paulo) e *New York State University*, como também grupos de pesquisa em anéis de árvores da Argentina (IANIGLA Mendoza) e dos Estados Unidos (*Columbia University*). O projeto temático foi dividido em subgrupos, no qual esta Tese pertenceu ao grupo com tema central o desenvolvimento de métodos analíticos para a avaliação química das amostras de interesse ambiental. Detalhes podem ser observados no *website* [www.pirecreate.com](http://www.pirecreate.com).

Nos últimos anos, foram observados importantes avanços nas técnicas de análise química com o objetivo de aprimorar, não só a capacidade de identificação e quantificação de espécies químicas, mas também de obter informações da localização espacial de tais compostos que facilitem a obtenção de respostas de sistemas químicos complexos em diferentes tipos de amostras, até mesmo a nível de célula [1] ou partícula única [2]. As técnicas baseadas nas espectrometrias de massas e óptica representam aquelas mais amplamente utilizadas em análises multielementares, como, por exemplo, a espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e a espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) [3,4]. No entanto, embora apresentem boa eficiência e robustez, tais técnicas usualmente requerem etapas de preparo de amostra (decomposição e/ou extração) que consomem de 40 a 70% do tempo da análise [5], causando perda da informação da distribuição espacial dos analitos.

Nesse sentido, o processo de imageamento surge como alternativa que permite a análise da amostra em seu estado sólido, possibilitando o acesso a informações de distribuições espaciais e de distribuição de espécies químicas na superfície, dispensando a necessidade de procedimentos mais clássicos de preparo de amostra, tais como decomposições ou extrações [6]. O imageamento é o processo pelo qual ocorre a transformação de informações químicas, obtidas por meio de certas técnicas espectroanalíticas, em uma imagem de alta resolução da distribuição espacial elementar [7] e/ou molecular [8]. Para o processo de imageamento é

necessário o uso de técnicas capazes de excitar e/ou ionizar, eficientemente, átomos e/ou moléculas, obtendo espectros que são capturados e processados por específicos softwares que geram imagens próximas da realidade da amostra analisada por coordenadas específicas [9,10].

Diferentes técnicas para imageamento podem ser observadas na literatura [6], principalmente baseadas em espectrometria de massas e espectroscopia óptica, cada uma com suas especificidades em relação à informação fornecida, bem como, também, ao mecanismo de ação e interação com a matriz [11–13]. Como exemplos temos MALDI-MS (do inglês *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*), DESI-MS (do inglês *Desorption electrospray ionization*), e a espectroscopia Raman para análises de imageamento molecular e, LIBS (do inglês *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*) e SIMS (do inglês *Secondary Ionization Mass Spectrometry*) e SXFM (do inglês *Synchrotron X-ray Fluorescence*) para análises de imageamento elementar. A técnica conhecida como ablação a laser e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (LA-ICP-MS) é considerada uma das mais versáteis para análise multielementar, via imageamento, pois é de fácil manuseio, compatível com diferentes tipos de amostras sólidas, necessita de mínimo preparo de amostra, bem como apresenta alta resolução espacial e sensibilidade do ICP-MS [14–18].

Pela ação de um laser de alta potência em coordenadas específicas (eixos x,y) na superfície da amostra, a técnica LA-ICP-MS promove a formação de um aerossol seco da amostra no local incidente, sendo este transportado para o interior do ICP-MS em que um plasma de alta temperaturas promove a ionização dos elementos químicos presentes na amostra. Após a ionização, cada íon será separado de acordo com a razão  $m/z$  e a intensidade de sinal (eixo z) é detectada [6]. Devido a quantidade e a complexidade dos dados gerados pela técnica de LA-ICP-MS, softwares de tratamento de dados e geração de imagem química são requisitos para a obtenção de resultados de alta qualidade [19,20]. Portanto, muita atenção é requerida em todas as etapas do processo de imageamento químico.

A imagem química pela técnica LA-ICP-MS é formada por uma matriz de pixels, considerados os menores pontos formadores da imagem, representados por  $I_{(x,y,z)}$ , os quais apresentam a informação da intensidade de sinal ou concentração (z) em uma determinada direção e local (x,y) da imagem da superfície da amostra. Logo, a qualidade de uma imagem determina a quantidade de informações que podem ser extraídas, e, também, está diretamente relacionada com a resolução espacial [9,11].

A técnica LA-ICP-MS permite tanto análise qualitativa, como quantitativa, sendo esta aplicação para quantificação total ou para imageamento quantitativo [19]. Porém, uma das grandes dificuldades em análises quantitativas é a obtenção de um método de quantificação adequado devido ao efeito matriz e de fracionamento causado pela interação laser-amostra e devido ao transporte ao ICP-MS, bem como a limitação de materiais de referência certificado (CRM) para etapas de calibração e validação analítica [15,18]. Neste sentido, diferentes métodos de calibração podem ser observados na literatura, como calibração externa via curva analítica e compatibilização de matriz, padronização interna (do inglês *internal standard*, IS), adição de analito, entre outros [21,22], a fim de minimizar possíveis limitações. Entretanto, esses métodos consomem muito tempo de análise, bem como, em se tratando da técnica de LA-ICP-MS, espaço na câmara de ablação, limitando o tamanho e número de amostras que podem ser analisadas.

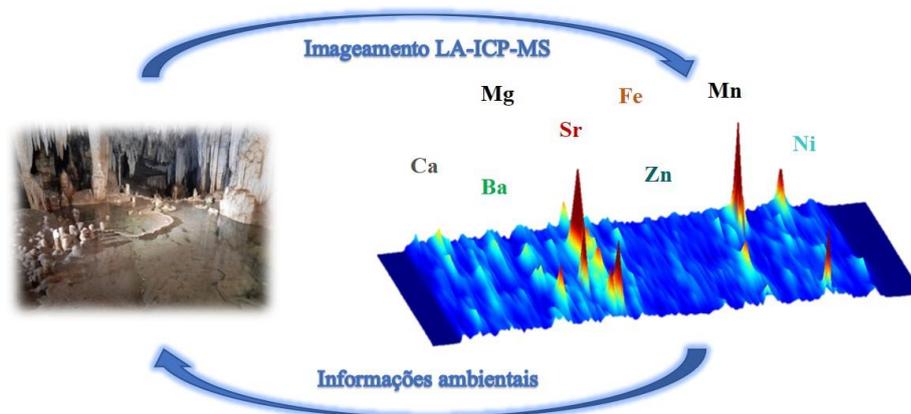
Neste sentido, o método de calibração externa conhecido como *one-point* (*um ponto* ou *single-point*) surge como alternativa viável a ser aplicado, tanto para quantificação total, como para imageamento quantitativo, pois consiste na utilização de apenas um ponto analítico, com concentração conhecida dos elementos, a fim de se obter a concentração elementar na matriz de interesse e minimizar efeitos de matriz causados na interação entre o laser-amostra, bem como necessita de menor tempo de análise e espaço [23].

A técnica LA-ICP-MS vem sendo aplicada na análise de diferentes tipos de amostras ambientais [6]. Neste sentido, os anéis de crescimento ganham destaque, pois são considerados camadas de crescimento produzidas pela madeira por certo período de tempo, portanto, podem conter o registro biológico das alterações ocorridas no ambiente por meio da absorção dos elementos pela raiz e folhas [24]. Logo, a possibilidade em estudar a distribuição espacial dos elementos ao longo dos anéis de crescimento é de suma importância em análises ambientais. Além dos anéis de crescimento, espeleotemas (*i.e.* estalagmites) também são matrizes pré-estabelecidas como arquivos da mudança climática, pois também incorporam elementos traços como Pb, Mg, Ba e Sr na matriz de carbonato de cálcio, que podem ser derivados de diferentes fontes, como natural e antropogênica, rochas hospedeiras e cobertura do solo adjacente [25,26]

Portanto, a presente Tese de Doutorado têm como objetivo otimizar os parâmetros analíticos de LA-ICP-MS para a obtenção de imagens qualitativas para os elementos Zn, Ba, Mn, Fe, Sr, Ni, Mg e Ca ao longo de estalagmites, bem como a avaliação dos métodos de quantificação elementar, conhecidos como calibração externa e *one-point* baseados na

compatibilização de matriz, para a obtenção de imagens quantitativas de Pb, Cd, Ba e C (como padrão interno) ao longo de anéis de crescimento.

**CAPÍTULO I: IMAGEAMENTO QUALITATIVO DA DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL  
MULTIELEMENTAR EM ESPELEOTEMAS EMPREGANDO A TÉCNICA LA-ICP-  
MS**



Os resultados apresentados neste capítulo também podem ser observados na publicação de Francischini *et al.* (2023) [27].

## 1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O Capítulo 1 da presente Tese de Doutorado teve como objetivo geral o desenvolvimento do processo de imageamento multielementar qualitativo ao longo da superfície de espeleotemas por meio da técnica LA-ICP-MS. Neste caso, os objetivos específicos foram:

- Otimizar os parâmetros instrumentais de ablação a laser para análise de espeleotemas;
- Avaliar a velocidade de ablação na resolução de imagem da superfície de espeleotema;
- Avaliar o uso do padrão interno (IS) na resolução de imagem da superfície de espeleotema;
- Utilizar o software LA -iMageS para geração de imagem qualitativa.

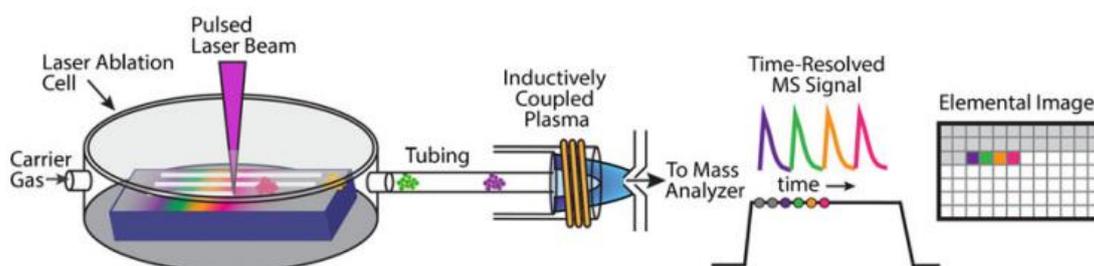
## 2. ASPECTOS TEÓRICOS RELEVANTES

### 2.2. PROCESSO DE IMAGEAMENTO QUALITATIVO

LA-ICP-MS é uma técnica hifenada, constituída por uma fonte de *laser* na região UV (266, 213 e 193 nm), uma célula de ablação pressurizada, um caminho de transporte ao ICP-MS e um detector. É considerada uma das mais versáteis para análise multielementar, pois é de fácil manuseio, compatível com diferentes tipos de amostras sólidas, necessita mínimo preparo de amostra, possui alta resolução espacial (5 – 250  $\mu\text{m}$ ) e alta sensibilidade relacionada ao ICP-MS (limite de detecção de 0,01  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) [28], permitindo, assim, análises qualitativas e quantitativas de elementos em baixas concentrações, conhecidos como elementos-traços [14–18]. Neste sentido, esta técnica vem sendo aplicada com diferentes finalidades, como análise de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em amostras ambientais [29,30], análise em nível de *single-cell* [31], doenças neurodegenerativas [32,33] e câncer [34]. Na recente revisão bibliográfica realizada por Francischini e Arruda (2021) é possível observar diferentes aplicações de imageamento por LA-ICP-MS em análises ambientais [6].

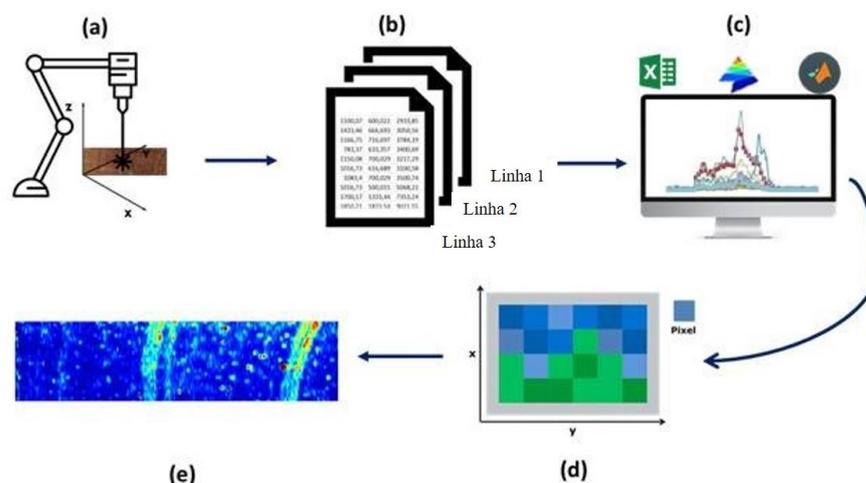
Já o processo de imageamento elementar se baseia na transformação de informações químicas em uma imagem de alta qualidade da distribuição espacial elementar [7,35]. Neste caso, o maior desafio nesse processo é fazer com que todo o sistema resulte em imagens

representativas, ou seja, que possua alta resolução espacial. Para a técnica LA-ICP-MS, o processo de imageamento (Fig. 1.1) consiste na aplicação de pulsos de *laser* direcionados em regiões específicas da amostra, por meio de coordenadas  $x,y,z$ , realizando uma leitura da superfície por pontos ou linhas de ablação [15]. Ao entrar em contato com a amostra, os fótons do laser promovem a evaporação de pequena porção ( $\sim 0,1 \mu\text{g s}^{-1}$ ) [16] do local de incidência, fazendo com que haja a formação de um aerossol sólido. Este aerossol é transportado, por um fluxo de gás inerte (Ar ou He) para o interior do ICP-MS, no qual um plasma (6000 – 10.000K) promove a ionização dos componentes da amostra, formando, majoritariamente, íons monovalentes de metais e metalóides. Após a ionização, os íons são focalizados e direcionados ao analisador de massa, nos quais são separados de acordo com a razão  $m/z$ , sendo detectada a intensidade de sinal de cada íon [32,35].



**Figura 1. 1:** Processo de análise via LA-ICP-MS. Fonte: Gundlach-Grahan e Gunther (2016) [36]. Reprodução autorizada pela Springer.

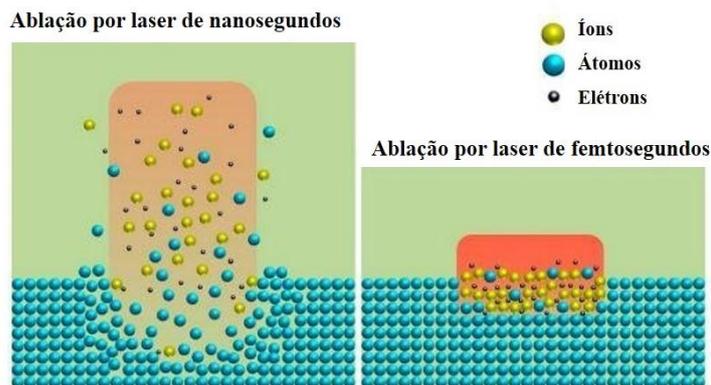
Assim, a imagem da distribuição espacial, qualitativa ou quantitativa, é criada por meio do tratamento de dados por *softwares* adequados, criando uma matriz de *pixels* (menores pontos formadores da imagem), formados pelas coordenadas  $x,y$  e pela intensidade de sinal ou concentração de cada razão  $m/z$  analisada (Fig. 1.2). Pessoa *et al.* (2016) desenvolveram um guia prático para ajudar a obter imagens por LA-ICP-MS, no qual foram descritas todas as etapas, desde o preparo da amostra, a calibração dos parâmetros instrumentais, até como construir a imagem final usando *software* [19]. Entre os softwares encontrados para o tratamento e obtenção das imagens, aquele conhecido por LA-iMageS [20] é gratuito e foi desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, criando imagens 2D e 3D comparáveis à qualidade do MatLab. Portanto, o número de *pixels* que dará origem à imagem final estará diretamente relacionado à quantidade de informações que o método de imageamento fornece, bem como com a resolução de imagem [6,35].



**Figura 1. 2:** Imageamento via LA-ICP-MS, sendo (a) ablação da amostra, (b) obtenção dos documentos das linhas de ablação, (c) tratamento de dados via softwares, (d) obtenção da matriz de pixels e (e) a imagem final. Imagem adaptada de: Francischini e Arruda (2021) [6]. Reprodução autorizada pela Elsevier.

A técnica LA-ICP-MS fornece alta resolução espacial, a qual depende de diferentes fatores, como o diâmetro do *spot* do laser, a velocidade e a distância entre as linhas ou pontos de ablação [36]. Uma das vantagens desta técnica em relação às demais é a análise do aerossol seco, pois há minimização de interferência espectral causada pela adição de matriz ou solvente utilizado no preparo de amostra. Porém, interferências espectrais, como isobáricas ou poliatômicas, podem ser observadas, dependendo da composição da amostra. Neste caso, uso de cela de reação e/ou colisão no analisador de massas, pode minimizar ou evitar tais interferências [15].

O tipo de duração do pulso do laser (pico, nano ou femtosegundo) também impacta na resposta analítica, em razão da interação laser-amostra e, conseqüentemente, na resolução espacial, pois pode ocorrer uma expansão do plasma criado ao entrar em contato com a superfície (Fig. 1.3), criando imperfeições na região de ablação, bem como fusão e deposição de material ao longo da linha ou ponto de ablação. Este efeito é conhecido como “*plasma-shielding*” [16,20], e, devido a ele, há necessidade em se preservar uma distância de segurança entre linhas e pontos de ablação pela técnica LA-ICP-MS.



**Figura 1. 3:** Diferença entre o perfil de ablação empregando lasers em regime de duração de pulso de nano e femtosegundos. Imagem adaptada de: Zhang et. al (2014) [37]. Reprodução autorizada pela *American Chemical Society*.

Em LA-ICP-MS, os parâmetros como o diâmetro de *spot*, a frequência e a velocidade do laser estão diretamente relacionadas com a eficiência de ablação e, logo, com a veracidade da imagem gerada, sendo necessária, portanto, a otimização experimental para cada tipo de amostra sólida [15,18]. O fracionamento elementar, sendo este a variação não estequiométrica do sinal detectado, pode ser um dos efeitos adversos causados por flutuações da energia do laser [15]. Neste sentido, Pozebon et al. (2017) mencionam o uso de padrão interno para corrigir esta variação e demais flutuações instrumentais [38], devendo ser utilizado, tanto em análise qualitativa, como quantitativa [30].

O padrão interno é um elemento composicional ou adicionado à amostra e que deve apresentar uma distribuição homogênea em todas as amostras reais e de calibração avaliadas no processo, como também deve apresentar características similares às do analito, como potencial de ionização e  $m/z$  próximos. Em estudo realizado por Chacón-Madrid e Arruda (2018), os isótopos  $^{12}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{28}\text{Si}$  e  $^{31}\text{P}$  foram avaliados como padrões internos para aquisição de imagens de  $^{107}\text{Ag}$ ,  $^{55}\text{Mn}$  e  $^{63}\text{Cu}$  em folhas de soja cultivadas em solo com nanopartículas de prata. Neste caso, constataram a melhor homogeneidade dos isótopos  $^{12}\text{C}$  e  $^{13}\text{C}$ , bem como foram obtidos melhores resultados quando o  $^{13}\text{C}$  era aplicado na correção dos sinais analíticos [30].

A resolução espacial em análises pela técnica LA-ICP-MS é mensurada pela resolução em  $x$  (relação entre velocidade e tempo de aquisição dos dados) e  $y$  (distância entre as linhas de ablação) [35], portanto, irá variar de acordo com os parâmetros instrumentais [35,39]. Porém, para amostras com grandes dimensões, as informações obtidas por meio de linhas de ablação tendem a ser mais utilizadas em razão da praticidade e rapidez na análise, como aplicado por Weber et al. (2017), que compararam a ablação por linhas e pontos via LA-ICP-MS para avaliar

o perfil de Sr em amostras de estalagmites, constatando maior precisão nas análises via linhas de ablação [40].

Essa limitação em aplicação de imageamento via LA-ICP-MS pode estar relacionada com uma das principais limitações deste método: o tempo necessário de análise. Neumann *et al.* (2020), ao pesquisarem anticorpos marcados com metais em tecido cerebral, com método considerado de alta resolução de imagem (35  $\mu\text{m}$  de diâmetro de spot e a velocidade de ablação de 50  $\mu\text{m s}^{-1}$ ), constataram oito horas de análise, fazendo com que escolhessem apenas amostras-chave para aplicação desta técnica [41]. Mas é possível verificar que há uma tendência crescente em aplicar imageamento via LA-ICP-MS, principalmente em amostras de cunho ambiental, como espeleotemas [6,27]. Por exemplo, Amais *et al.* (2021) recentemente apresentaram o imageamento elementar qualitativo por LA-ICP-MS em quatro diferentes espécies de árvores, demonstrando a potencialidade da técnica e a relação entre os elementos e o tipo de estrutura celular analisada [42].

### 2.3. QUIMIOMETRIA E PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A Quimiometria se destaca nas pesquisas acadêmicas, pois é uma área da química que, por meio dos conhecimentos matemáticos e estatísticos, permite a identificação de informações experimentais relevantes e o emprego do planejamento fatorial para o estudo das condições ideais na resolução de um problema. Assim, por meio do uso de dados multivariados e planejamento fatorial, menores quantidades de ensaios, diminuição do tempo laboratorial, bem como redução no desperdício dos recursos financeiros e da amostra em questão podem ser obtidos, além da condição ótima experimental [43].

Assim, a otimização analítica visa estabelecer as melhores condições experimentais de análise, do preparo de amostra até os parâmetros instrumentais. Existem duas estratégias que podem ser aplicadas para realizar a otimização: a univariada e a multivariada. No método univariado há a variação de um parâmetro por vez para avaliar sua influência no sistema, sendo considerado um método simples e de fácil análise [43]. Chacón-Madrid e Arruda (2018) [30] e Pessoa *et al.* (2017) [22] aplicaram o método univariado na otimização dos parâmetros da técnica LA-ICP-MS, como frequência, diâmetro de *spot*, velocidade de ablação e vazões dos gases de plasma para obtenção de imagens multielementares de amostras ambientais, respectivamente, assim obtendo as melhores condições para as análises [30]. Em ambos os

trabalhos é possível observar que a otimização univariada possibilitou explorar faixas extensas dos valores para cada parâmetro avaliado, porém a limitação de métodos univariados é a não obtenção da interação entre os fatores e a influência na resposta analítica, bem como apresentar maior tempo de análise e de possuir maior consumo de reagentes.

Já no método de otimização multivariado os fatores são variados simultaneamente, por meio de um planejamento experimental, sendo possível observar a interação entre os parâmetros e a melhor condição analítica por meio de tratamentos estatísticos, bem como apresenta menor tempo de análise. Entretanto, o tratamento dos dados requer maior atenção, bem como o uso de softwares especializados [44], como Octave, Chemoface e Statistica. Existem diferentes planejamentos experimentais que podem ser aplicados na otimização, dos quais os métodos mais utilizados são o Planejamento Fatorial Completo ou Composto Central, Box-Behnken e Matrix Doehlert, que são aplicados de acordo com objetivos analíticos e número de variáveis [43,44].

Para análises multivariadas, a função multi-resposta (MR) vem sendo de grande aplicabilidade, a qual propõe a otimização dos parâmetros analíticos para a determinação multielementar por meio de uma resposta em conjunto. A função MR é definida pela média da soma da normalização das respostas individuais dos analitos pela resposta mais alta obtida no planejamento experimental [43,45].

Devido às vantagens da Quimiometria já mencionadas, esta área do conhecimento vem sendo explorada em diferentes trabalhos para a otimização de parâmetros analíticos. Andrade *et al.* (2017) utilizaram da Matrix Doehlert e a função multi-resposta para a otimização das condições de análise da técnica LIBS, como energia do laser e diâmetro de *spot*, a fim de avaliar macronutrientes e elementos tóxicos em amostras de fertilizantes, sendo possível a obtenção de respostas analíticas com condições experimentais únicas (condição de compromisso) e com mínima influência de sinal de fundo [46]. Para a otimização de tais parâmetros da técnica LIBS, Fortunato *et al.* (2019) aplicaram o planejamento experimental Composto Central, também utilizando da função multi-resposta para a obtenção de condições de compromisso na avaliação de Cr e Ni em amostras de minério [47].

Em análises pela técnica ICP, o planejamento fatorial  $2^3$  e o composto central foram aplicados para otimizar a potência de radiofrequência, vazão do gás de nebulização e vazão da amostra para a avaliação multielementar em amostras de refrigerante por ICP OES [48]. A

potência de radiofrequência, a vazão do gás de nebulização e o gás auxiliar do ICP OES também foram otimizados via planejamento composto central  $2^3$  para determinação multielementar em achocolatados [49]. Tais parâmetros, juntamente com o fluxo de gás do plasma, foram avaliados por meio do planejamento fatorial  $2^4$  e a matriz Box Behnken, para avaliar o desempenho da função multi-resposta e desejabilidade de diferentes elementos, das quais ambos os planejamentos apresentaram respostas similares para análises via ICP OES [45].

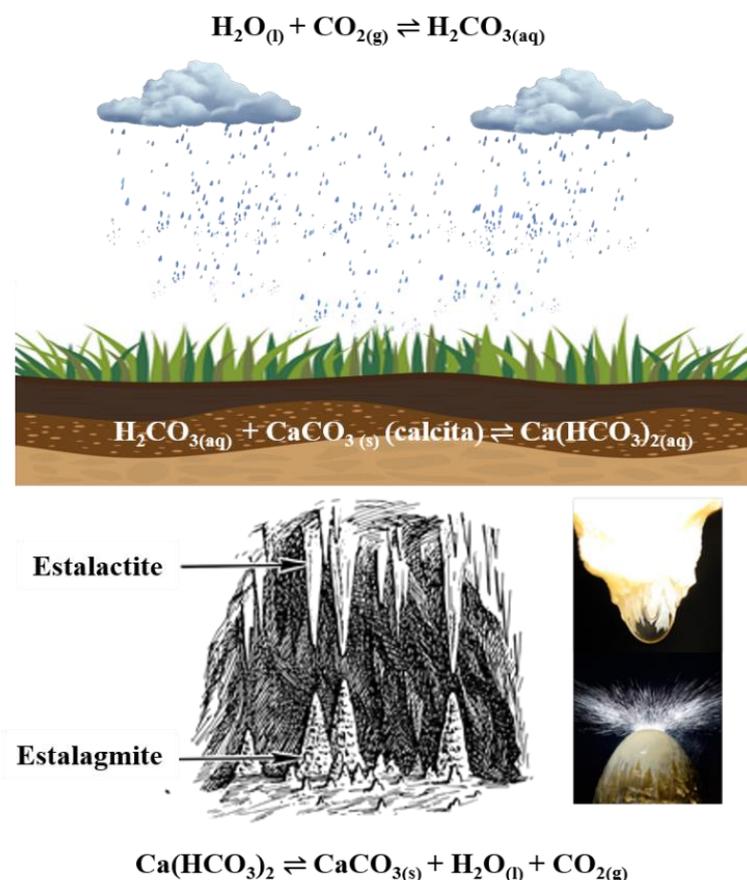
#### **2.4. ESPELEOTEMAS**

Em razão de mudanças climáticas, intensidade no transporte terrestre e impactos ambientais, o número de pesquisas paleoclimáticas vêm aumentando, tanto para o entendimento sobre as causas, como, também, sobre os impactos causados no meio ambiente. Diferentes tipos de matrizes podem ser utilizados em estudos paleoclimáticos, como corais, vegetação local e geleiras, a depender da resposta analítica requerida e do objetivo da pesquisa [50–54]. Neste sentido, espeleotemas são depósitos minerais, com calcita e aragonita, formados no interior de cavernas, os quais são amplamente estabelecidos como um dos mais valiosos recursos ambientais para o entendimento de mudanças e condições climáticas ocorridas na superfície terrestre [55–57].

Existem duas principais formas de espeleotemas: (I) estalactites e (II) estalagmites. As estalactites são os depósitos formados na cobertura da caverna e possuem o interior com uma abertura cilíndrica na qual percorre a água do solo superior. Já as estalagmites são os depósitos formados no piso da caverna, as quais são depósitos mais contínuos, formadas por micro camadas e com estrutura interna mais simples quando comparada à estalactite, sendo assim mais utilizada em estudos geoquímicos e geocronológicos [58].

Resumidamente, a água acidificada que percorre o solo superior à caverna é enriquecida com minerais presentes no carbonato de cálcio do solo que, ao penetrar pelas fraturas e chegar ao teto da caverna, ocorre a liberação de  $\text{CO}_2$  e evaporação da água devido a diferença de  $P_{\text{CO}_2}$  e temperatura entre a água de cotejamento e o interior da caverna, assim gerando a precipitação de carbonato de cálcio e demais elementos químicos presentes na solução. Devido a tais parâmetros de formação das espeleotemas, ou seja, o cotejamento de água do solo, temperatura e pressão interna de  $\text{CO}_2$ , tais amostras geram registros ambientais que ocorrem no ambiente

[58,59]. Os tipos de espeleotemas e os processos químicos essenciais são apresentados na Figura 1.4.



**Figura 1. 4:** Processo e reações químicas essenciais na formação de espeleotemas. Fonte: autoria própria.

Este tipo de matriz é considerado um *proxy* ambiental, ou seja, uma matriz que possui parâmetros que podem ser mensurados e modificados de acordo com variações ambientais, como temperatura, precipitação e tipo de vegetação, por exemplo [60]. Para espeleotemas, a temperatura, a concentração de Ca, Sr, Ba e Mg, bem como os isótopos de U-Pb, são *proxies* importantes em serem avaliados em estudos paleoclimáticos, pois estarão diretamente relacionadas com a taxa de precipitação de calcita e com a datação de espeleotemas [61–63].

Vansteenberge et al. (2020) observaram a mesma covariação de Sr, Ba, e Mg numa amostra de espeleotema da caverna Han-sur-Lesse (Bélgica), e perceberam que o resultado obtido reflete a precipitação prévia de calcita (do inglês *Prior Calcite Precipitation* - PCP), processo correlacionado com uma menor disponibilidade de água no verão [63].

Porém, para amostras com diferentes e altas dimensões de tamanho, como as espeleotemas, as informações obtidas por meio de linhas de ablação pela técnica LA-ICP-MS,

ou por análises de solução pela técnica ICP OES [64], tendem a ser mais utilizadas em razão da praticidade e rapidez na análise. Weber *et al.* (2017) compararam a ablação por linhas e pontos via LA-ICP-MS para avaliar o perfil de Sr em amostras de estalagmites, constatando maior precisão em análises via linhas de ablação [40].

Neste sentido, esta Tese de Doutorado, no Capítulo I, teve como objetivo desenvolver um método de imageamento qualitativo pela técnica LA-ICP-MS, mapeando elementos de importância ambiental em espeleotemas, tais como Zn, Ba, Mn, Fe, Ni, Sr, Ca e Mg, a fim de contribuir na obtenção de resultados precisos em amostras que possuam informações valiosas em regiões micrométricas, que em técnicas convencionais não são obtidas.

### **3. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL**

O sistema de ablação a laser da New Wave UP-213, com fonte de laser Nd:YAG (213 nm), foi acoplado a um analisador de massas quadrupolo com fonte de plasma indutivamente acoplado (PerkinElmer ELAN DRC-e) e utilizado para as análises via LA-ICP-MS, sendo localizado em uma sala limpa, classe 10000, com número de partículas, temperatura e umidade controlados. Antes da realização dos experimentos, as condições experimentais do ICP-MS foram avaliadas por meio de uma solução multielementar (Mg, In, U, Ce e Ba) para o monitoramento da formação de óxidos e espécies com dupla carga, os quais devem apresentar valores abaixo de 3%. Para garantir a confiabilidade dos resultados, um período de 45 min. de estabilização do plasma formado por argônio, também foi realizado, no qual há o monitoramento da estabilidade dos isótopos  $^{12}\text{C}^+$  e  $^{13}\text{C}^+$ .

Todos os dados brutos obtidos foram tratados por meio do programa Microsoft Excel<sup>®</sup> e as imagens qualitativas geradas via *software* LA-iMageS [20].

#### **3.1. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DA TÉCNICA LA-ICP-MS**

Para o imageamento qualitativo de espeleotemas, os parâmetros de LA conhecidos como diâmetro do spot do laser ( $\mu\text{m}$ ), frequência (Hz) e intensidade do laser (%) de ablação foram otimizados, no qual um planejamento fatorial completo  $2^3$  (Tabela 1.1) foi aplicado, com três variáveis estudadas em dois níveis: -1 e +1, sendo o ponto central (0) realizado em triplicata, como observado na Tabela 1.2, totalizando 11 experimentos realizados em ordem aleatória. Os

parâmetros analíticos utilizados no ICP-MS foram: 1300 W de potência de radiofrequência, 1,2 e 1,6 L min<sup>-1</sup> as vazões do gás de nebulização e gás auxiliar, respectivamente.

**Tabela 1. 1:** Planejamento experimental 2<sup>3</sup> para otimização instrumental da ablação a laser para análise de espeleotema.

Exp.	Spot (µm)	Freq. (Hz)	Intensidade (%)
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

**Tabela 1. 2:** Níveis experimentais dos parâmetros analíticos da ablação a laser.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Spot (µm)	20	60	100
Freq (Hz)	10	15	20
Intensidade (%)	30	60	90

O sinal analítico (cps) foi obtido como resposta para cada isótopo avaliado e os dados foram tratados no software Excel para obtenção da função multi-resposta (MR) [45], calculado utilizando a somatória da razão entre a intensidade de sinal dividido pelo maior valor encontrado, para cada analito, como observado na equação 1. Foi analisado o material de referência certificado NIST 612 (*Trace elements in glass*), no qual foram avaliados os isótopos <sup>66</sup>Zn, <sup>137</sup>Ba, <sup>55</sup>Mn, <sup>57</sup>Fe, <sup>60</sup>Ni, <sup>88</sup>Sr, <sup>44</sup>Ca e <sup>26</sup>Mg. Os *softwares* Excel e Chemoface foram utilizados no tratamento de dados para a obtenção dos efeitos analíticos e superfície de resposta.

$$MR = \left( \frac{I_i}{I_{máx.i}} \right) \quad \text{Equação 1}$$

$I_i$  = intensidade de sinal do elemento

$I_{máx_i}$  = intensidade de sinal máxima do elemento

### **3.2. OTIMIZAÇÃO DA VELOCIDADE DE ABLAÇÃO E AVALIAÇÃO DO PADRÃO INTERNO**

Nesta etapa, três velocidades de ablação foram utilizadas: 20, 40 e 60  $\mu\text{m s}^{-1}$ , as quais influenciam diretamente o tamanho do pixel ( $\mu\text{m}$ ) de uma imagem, calculado por meio da multiplicação entre a velocidade ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ) e o tempo de aquisição (s). Assim, dez linhas de ablação com 3 mm de comprimento, 137,5  $\mu\text{m}$  de distância entre os centros de cada linha, 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro de spot, 20 Hz de frequência e 90% de intensidade foram feitas para cada velocidade. O isótopo  $^{44}\text{Ca}$  foi utilizado como IS. Uma amostra exploratória de espeleotema (estalagmite) coletada no Parque Nacional do Peruaçu (MG) foi gentilmente doada, já cortada com auxílio de dupla-serra circular, com dimensões 1 cm x 1 cm x 2 mm, pelo Prof. Nicolás Strikis (Universidade Federal Fluminense, RJ), a qual foi utilizada nesta etapa.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DE LA-ICP-MS**

O laser é a amplificação da luz por emissão estimulada por radiação que faz com que ocorra o processo de ablação, o qual envolve aquecimento, fusão e evaporação do material a temperaturas e pressões extremamente altas [18]. Assim, os parâmetros de ablação irão influenciar na quantidade de amostra que será retirada da superfície da matriz, influenciando, também, na intensidade de sinal, na sensibilidade, na exatidão e na precisão dos resultados analíticos. Tais parâmetros variam de acordo com o tipo de amostra estudada em razão da interação do feixe do laser com as propriedades da superfície da matriz [65,66].

O primeiro parâmetro de avaliação foi a intensidade do laser, a qual está diretamente relacionada com a remoção de maiores quantidades de material via ablação, assim podendo influenciar positivamente no sinal analítico. O segundo parâmetro analisado no sistema de ablação a laser é conhecido como frequência (Hz), sendo o número de pulsos do laser que atinge a superfície da amostra por unidade de tempo [19]. Já o terceiro parâmetro avaliado foi o tamanho do *spot*, o qual é o diâmetro do laser que faz a interação com a superfície do material analisado [19]. Os resultados de intensidade de sinal (cps) para cada isótopo pode ser observado na Tabela 1.3.

**Tabela 1. 3:** Resultados de intensidade de sinal (cps) para os isótopos avaliados no material certificado (NIST 612) por meio do planejamento fatorial  $2^3$  e análise via LA-ICP-MS.

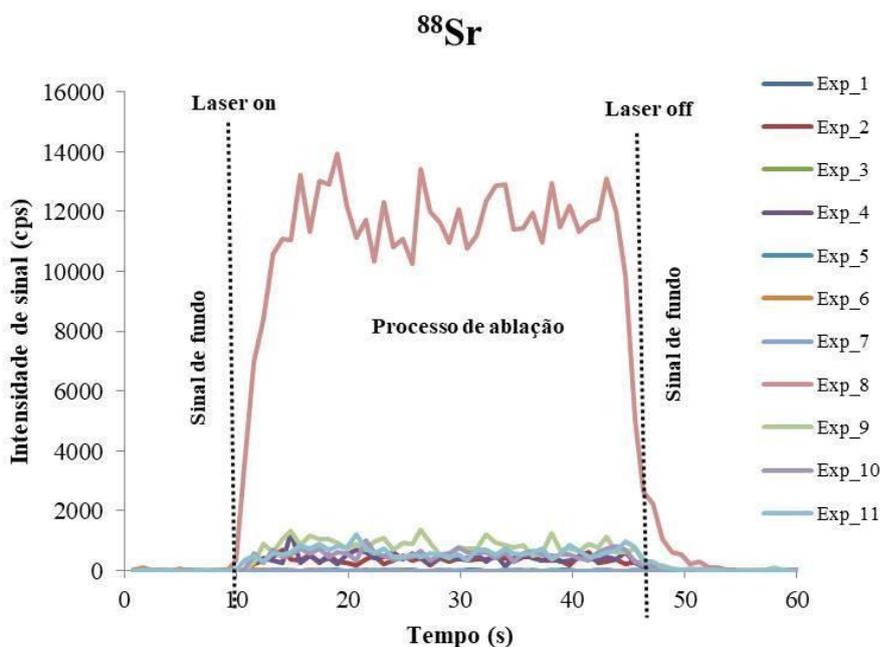
Exp.	Intensidade de sinal (cps)							
	$^{66}\text{Zn}$	$^{137}\text{Ba}$	$^{55}\text{Mn}$	$^{57}\text{Fe}$	$^{88}\text{Sr}$	$^{60}\text{Ni}$	$^{44}\text{Ca}$	$^{26}\text{Mg}$
1	450,0	2,2	360,2	46,2	3,8	12,9	17075,0	1566,3
2	505,5	33,9	495,8	70,4	356,0	48,9	23906,2	2073,4
3	350,6	3,2	314,0	53,8	4,8	16,7	13791,0	1126,4
4	417,8	43,0	439,3	67,7	429,6	40,9	19719,1	1243,1
5	444,6	5,9	353,2	54,8	3,8	23,7	16086,5	1301,2
6	870,6	459,2	2195,3	133,3	4868,7	359,2	89516,9	1546,9
7	425,3	4,8	390,3	60,2	6,5	20,4	17623,5	1714,7
<b>8</b>	<b>1223,8</b>	<b>1056,0</b>	<b>4924,0</b>	<b>230,7</b>	<b>11450,6</b>	<b>826,9</b>	<b>190946,7</b>	1900,2
9	533,4	89,8	651,1	83,9	824,2	73,7	26215,2	1452,8
10	525,3	64,0	548,9	78,0	549,5	63,4	22010,6	1271,1
11	670,5	75,8	703,3	91,4	617,2	72,6	27503,8	<b>2306,8</b>

Por meio dos resultados, verifica-se que o experimento 8 apresentou os maiores valores de intensidade de sinal para, praticamente, todos os isótopos (em destaque), menos para  $^{26}\text{Mg}$ , sendo seu maior valor *cps* observado no experimento 10 (em destaque). Neste caso, para verificar e confirmar quais as condições de compromisso experimentais devem ser utilizadas para analisar espeleotemas pela técnica de LA-ICP-MS, utilizou-se o método MR. Os parâmetros de ablação a laser e os resultados de MR para cada experimento podem ser observados na Tabela 1.4, confirmando que as condições experimentais do experimento 8 (em negrito) proporcionou o maior valor de MR, ou seja, as melhores condições para uma análise multielementar em amostras de espeleotemas.

**Tabela 1. 4:** Resultados da multi-resposta (MR) para cada variável (V) em NIST 612 por meio do planejamento fatorial  $2^3$  e análise via LA-ICP-MS.

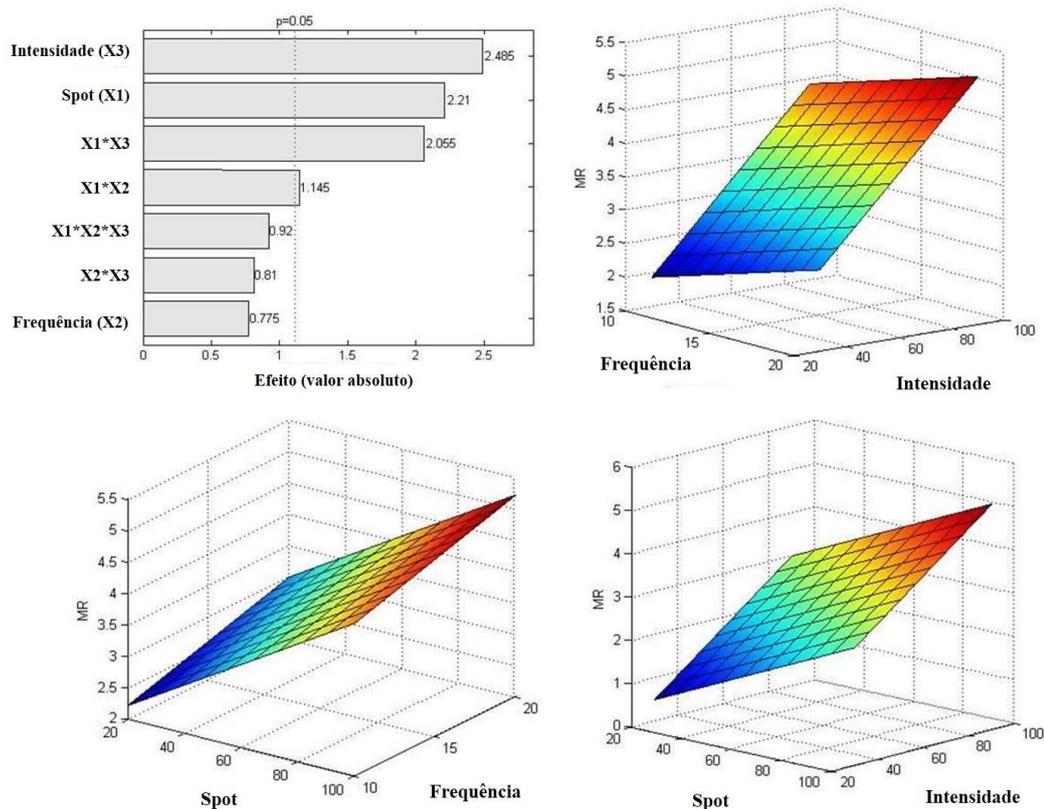
Exp.	V1	V2	V3	MR
	Spot ( $\mu\text{m}$ )	Frequência (Hz)	Intensidade (%)	
1	20	10	30	1,43
2	20	10	90	1,97
3	20	20	30	1,17
4	20	20	90	1,49
5	100	10	30	1,36
6	100	10	90	4,17
7	100	20	30	1,55
<b>8</b>	<b>100</b>	<b>20</b>	<b>90</b>	<b>7,82</b>
9	60	15	60	1,94
10	60	15	60	1,73
11	60	15	60	2,44

Também foi possível observar que a alteração dos parâmetros de ablação a laser não influenciou no sinal de fundo (argônio), mas apenas na intensidade de sinal dos isótopos, como apresentado na Figura 1.5.



**Figura 1. 5:** Sinal de  $^{88}\text{Sr}$  em NIST 612 de acordo com o planejamento experimental  $2^3$  e análise via LA-ICP-MS.

Os resultados de MR foram inseridos no software gratuito *Chemoface* para o cálculo de efeito das variáveis e as interações entre si na análise. A Figura 1.6 apresenta o resultado para a significância das variáveis por meio do Gráfico de Pareto, considerando 95% de nível de confiança, na qual é possível verificar que a intensidade (3) e o diâmetro do *spot* do laser (1), assim como a interação entre 1 e 3, bem como entre 1 e 2 (frequência), apresentam efeitos positivos estatisticamente (95% de nível de confiança). A superfície de resposta também indica que quanto maior o diâmetro do spot e a intensidade do laser, maiores são os sinais analíticos, assim resultando em melhorias na sensibilidade do método.



**Figura 1. 6:** Gráfico de Pareto dos efeitos analíticos e a Superfície de Resposta para o planejamento fatorial completo  $2^3$  para LA-ICP-MS, utilizando a resposta múltipla (MR) como resultado. Figura obtida pelo software Chemoface.

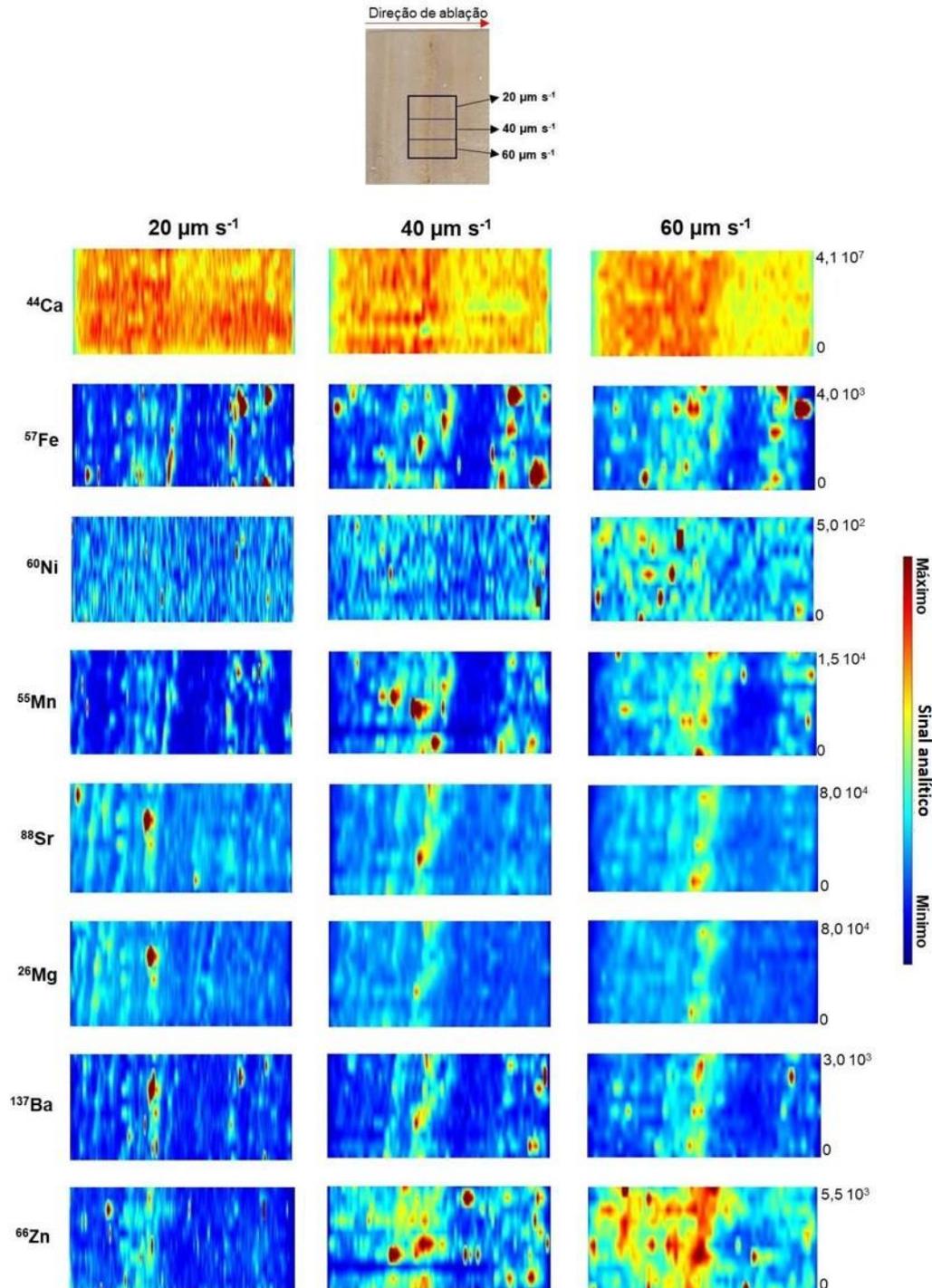
O aumento da intensidade de sinal é explicado considerando a intensidade e fluência do laser (energia por unidade de área) na superfície da amostra. Uma maior intensidade e fluência do laser resultam em maiores quantidades de amostra retiradas (ou ablasadas), impactando, proporcionalmente, no aumento do sinal analítico. Em relação à frequência de ablação, definida como o número de pulsos por unidade de tempo, o aumento da frequência (de 10 para 20 Hz) promoveu um aumento da intensidade do sinal do analito, tornando mais viável a ocorrência da ablação do material a partir do feixe do laser, mesmo que a proporção de influência deste parâmetro não seja significativa em nível de confiança de 95%, como verificado no Gráfico de Pareto (Fig. 1.6). O aumento do diâmetro do *spot* também proporciona maior sensibilidade, pois uma maior área de amostra (e uma maior quantidade de analito) foi ablada [19]. Portanto, as condições instrumentais finais e otimizadas para análise de espeleotemas por meio da técnica LA-ICP-MS podem ser observadas na Tabela 1.5.

**Tabela 1. 5:** Parâmetros instrumentais otimizados para análise via LA-ICP-MS em amostra de espeleotemas.

<b>ICP-MS (PerkinElmer ELAN DRC-e)</b>	
Potência de radiofrequência (W)	1300
Vazão de gás de nebulização (L min <sup>-1</sup> )	1,2
Vazão de gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	1,6
<b>LA (New Wave UP-213)</b>	
Nd:YAG (nm)	213
Intensidade de ablação (%)	90
Frequência (Hz)	20
Diâmetro de <i>spot</i> (µm)	100
Velocidade de ablação (µm s <sup>-1</sup> )	60
Pulso (mJ)	1,80
Densidade energética (J cm <sup>-2</sup> )	25,6

#### **4.2. OTIMIZAÇÃO DA VELOCIDADE DE ABLAÇÃO E AVALIAÇÃO DO PADRÃO INTERNO**

Como destacado por Francischini e Arruda (2021), a velocidade de ablação desempenha um papel importante na resolução das imagens de distribuição elementar, especialmente para a análise de amostras com alta heterogeneidade em uma pequena área superficial, como as espeleotemas, pois irá impactar diretamente na resolução em  $x$ , correspondente à direção da linha de ablação [6]. Nesta etapa, três velocidades de ablação foram utilizadas: 20, 40 e 60  $\mu\text{m s}^{-1}$ . Os resultados obtidos do imageamento qualitativo podem ser observados na Figura 1.7.



**Figura 1. 7:** Imagens qualitativas ao longo da superfície de uma estalagmite, de acordo com a velocidade de ablação avaliada. Imagens obtidas através do *software* LA-iMageS.

Ao aumentar a velocidade de ablação, o tamanho do *pixel* aumenta, impactando negativamente na resolução da imagem em geral, pois uma mesma área avaliada apresentará menor quantidade de *pixels* por área quando maiores velocidades de ablação são empregadas. Isto pode ser claramente observado para a imagem de  $^{137}\text{Ba}$ , por exemplo, e, ao avaliar os outros isótopos, como Ni, Mn, Zn e Fe, aparenta ocorrer uma sobreposição dos dados na distribuição

espacial quando há maior velocidade de varredura. As imagens obtidas com 40 e 20  $\mu\text{m s}^{-1}$  são muito semelhantes umas às outras, embora apresentem valores diferentes de tamanho de *pixel* (2,4 e 1,2  $\mu\text{m}$ , respectivamente). Assim, pode-se concluir que quanto menor for a velocidade de varredura, maior será a resolução da imagem.

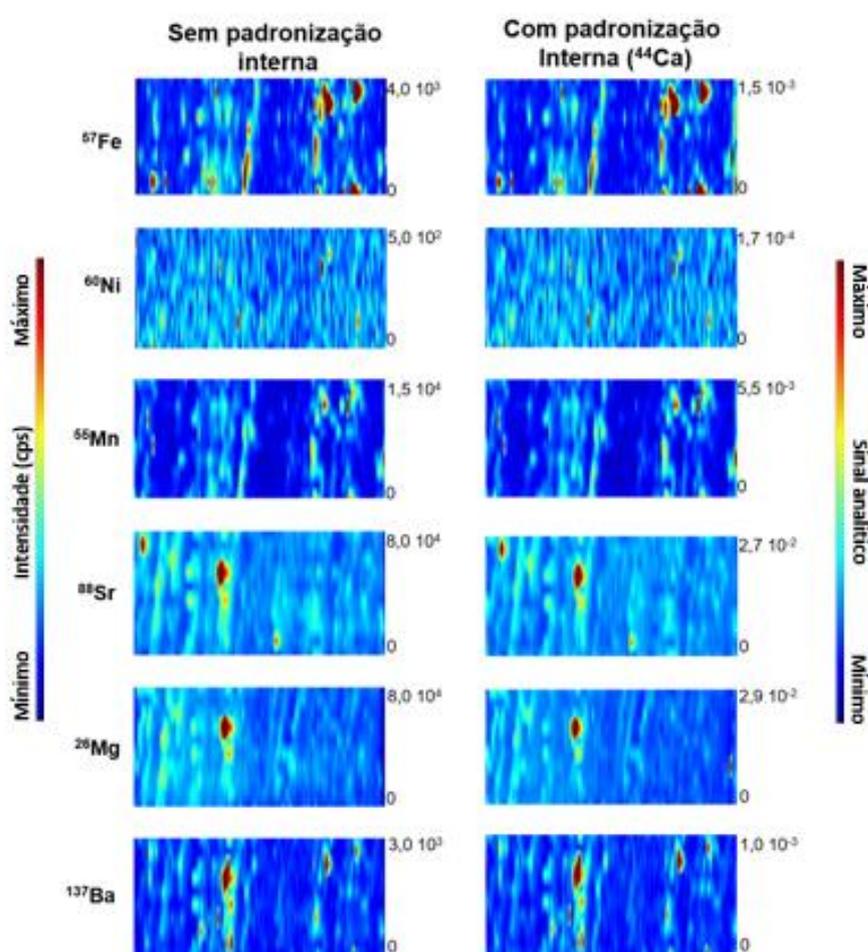
Contudo, outro fator limitante em imageamento pela técnica de LA-ICP-MS deve ser considerado: o tempo de análise. Considerando a ablação sequencial das 10 linhas de 0,2 mm ao aplicar a velocidade 60  $\mu\text{m s}^{-1}$ , o tempo gasto é de aproximadamente 9 min., sem contar o tempo gasto para a focalização manual do laser. Quando se aplicam 40 ou 20  $\mu\text{m s}^{-1}$ , o tempo necessário aumenta para 13 e 26 min, respectivamente, um aumento de 1,4 e 2,8 vezes no tempo total da análise. Portanto, a avaliação da resolução da imagem deve levar em consideração o tempo, uma vez que representa custos mais elevados devido ao aumento do consumo de gás de arraste, sendo, ainda, de alta pureza.

Por meio dos resultados, também foi observado uma correlação entre os locais em que os isótopos apresentam maiores intensidades de sinais, especialmente para Sr, Mg, e Ba, elementos que possuem grande importância na análise ambiental das alterações climáticas. No trabalho publicado por Vansteenberge *et al.* (2020), os autores também observaram a mesma covariação de Sr, Ba, e Mg numa amostra de espeleotema da caverna Han-sur-Lesse (Bélgica), e perceberam que o resultado obtido reflete a precipitação prévia de calcita (do inglês *Prior Calcite Precipitation* - PCP), processo esse correlacionado com uma menor disponibilidade de água no verão [63]. Vadillo *et al.* (1998) também avaliaram Mg e Sr via imageamento pela técnica LIBS, e salientaram a importância de observar a distribuição espacial em amostras de espeleotemas e a variação da concentração elementar, pois podem ser correlacionadas com a temperatura e o tempo de deposição de carbonato no local avaliado [67].

Desta forma, como condição de compromisso entre a resolução e a velocidade de ablação, bem como os custos envolvidos na análise, devem ser aplicados valores de velocidade mais baixos, como 40 e 20  $\mu\text{m s}^{-1}$ .

Na técnica de LA-ICP-MS, é comum a utilização de padrão interno (IS), sendo este um elemento que deve apresentar uma distribuição homogênea na matriz e apresentar características semelhantes às dos analitos em estudo, podendo, assim, ser utilizado para normalizar as intensidades de sinal analítico e minimizar as oscilações experimentais [30,66,68]. No caso dos espeleotemas, uma matriz que contém abundância de carbonato de

cálcio, o cálcio é o elemento principal que poderia ser considerado IS devido a homogeneidade na amostra, sendo esta, uma exigência de um IS. No entanto, numa análise em que há Ar como gás de plasma, bem como a baixa resolução de um quadrupolo, ocorre uma interferência isobárica entre Ca e Ar, pois ambos possuem uma razão  $m/z$  de 40. Como esse tipo de interferência requer altíssima resolução do analisador de massas, a única alternativa viável é a avaliação de um outro isótopo, sendo que, nesse caso, o isótopo  $^{44}\text{Ca}$  foi avaliado como IS. Os resultados e a comparação das imagens normalizadas e não normalizadas com IS, utilizando  $20\ \mu\text{m s}^{-1}$  como velocidade de ablação, podem ser vistos na Figura 1.8.



**Figura 1. 8:** Avaliação do padrão interno (IS)  $^{44}\text{Ca}$  na resolução de imageamento qualitativo na superfície de espeleotema.

Como observado, ambas as estratégias apresentam imagens semelhantes para todos os isótopos avaliados. No caso da resolução espacial, a normalização com IS  $^{44}\text{Ca}$  pode ser considerada opcional na análise. Contudo, em estudos ambientais, a relação entre a concentração de elementos e do Ca, quando as estratégias de calibração são aplicadas à análise LA-ICP-MS para fins quantitativos, pode fornecer informação importante sobre a formação de

espeleotemas e alterações paleoclimáticas, sem prejudicar a resolução e informação espacial que a imagem fornece [69,70].

## 5. CONCLUSÕES PARCIAIS

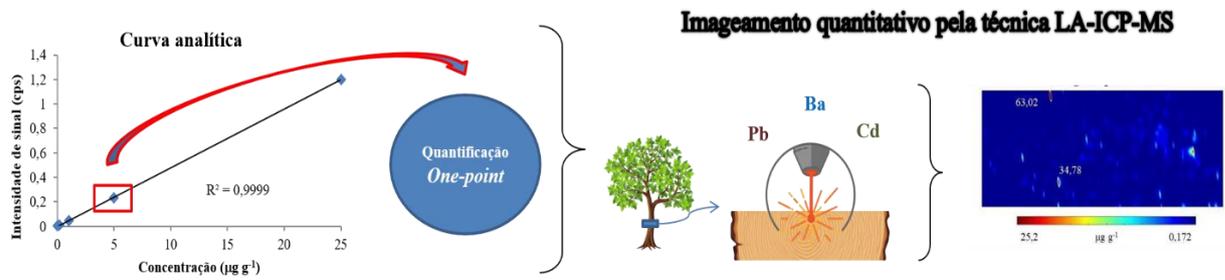
O Capítulo I desta Tese de Doutorado visou otimizar os parâmetros de LA, conhecidos como intensidade de ablação, frequência, e diâmetro de *spot*, utilizando planejamento experimental multivariado e dados de multi-respostas, bem como avaliou a influência da velocidade de ablação e os efeitos do isótopo  $^{44}\text{Ca}$  quando utilizado como IS na resolução de imagem de  $^{66}\text{Zn}$ ,  $^{137}\text{Ba}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{57}\text{Fe}$ ,  $^{88}\text{Sr}$ ,  $^{60}\text{Ni}$ , e  $^{26}\text{Mg}$  em amostras de espeleotemas. A quimiometria, por meio do planejamento experimental foi amplamente aplicada neste trabalho, ajudando na otimização dos parâmetros analíticos para análise de espeleotemas via imageamento pela técnica LA-ICP-MS. Neste caso, foi possível verificar que, quanto maior o diâmetro do *spot* e maior a intensidade do laser, maiores os sinais analíticos, resultando, assim, em aumento na sensibilidade do método.

O estudo da avaliação da velocidade de ablação demonstrou a influência deste parâmetro na resolução de imagem, onde há um aumento na resolução quando são aplicados valores menores de velocidade (40 e 20  $\mu\text{m s}^{-1}$ ). Portanto, quanto menor for a velocidade de ablação, maior será a resolução espacial da imagem obtida, porém, maior será o tempo de análise.

Quanto à utilização de  $^{44}\text{Ca}$  como IS, verificou-se que este isótopo não influencia negativamente na resolução de imagem para os demais isótopos avaliados, logo a relação entre diferentes elementos e o Ca pode ser utilizada para estudos quantitativos, sem prejudicar a resolução espacial do processo de imageamento.

Portanto, os resultados obtidos neste Capítulo contribuem para o avanço das aplicações do processo de imageamento pela técnica LA-ICP-MS, bem como demonstra a importância da otimização dos parâmetros analíticos para a análise de amostras que apresentam micro-camadas na superfície, como espeleotemas. De fato, este tipo de amostra requer uma alta resolução de imagem para obter resultados mais próximos à realidade, assim contribuindo para a aplicação de imageamento em análises ambientais.

**CAPÍTULO II: IMAGEAMENTO QUANTITATIVO DE Pb, Cd e Ba EM AMOSTRAS DE ANÉIS DE CRESCIMENTO DE ÁRVORES POR MEIO DA ANÁLISE POR LA-ICP-MS**



## 1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O Capítulo II desta Tese de Doutorado tem como objetivo geral a avaliação dos métodos de quantificação elementar para a obtenção de imagens quantitativas de Pb, Cd e Ba ao longo da superfície de anéis de crescimento. Neste sentido, os objetivos específicos foram:

- Otimizar os parâmetros analíticos da técnica LA-ICP-MS para análise e quantificação de Pb, Cd, Ba e C (IS) em anéis de crescimento;
- Preparar amostra para obtenção de padrões analíticos aplicados nos métodos de quantificação elementar em anéis de crescimento;
- Desenvolver e avaliar os métodos de quantificação conhecidos como calibração externa e *one-point*, via compatibilização de matriz, para quantificação total em anéis de crescimento;
- Desenvolver e aplicar o processo de imageamento quantitativo ao longo de anéis de crescimento;
- Comparar os resultados de imageamento quantitativo pela técnica de LA-ICP-MS e quantificação total pela técnica ICP-MS.

## 2. ASPECTOS TEÓRICOS RELEVANTES

### 2.1. ESTRATÉGIAS DE CALIBRAÇÃO E IMAGEAMENTO QUANTITATIVO

Como mencionado no item 2.1. do Capítulo 1 desta Tese de Doutorado, a técnica LA-ICP-MS possibilita a obtenção de imagens químicas e representativas da superfície de amostras sólidas ao correlacionar as coordenadas  $x,y,z$ , que regem a locomoção da ablação a laser, com os resultados da intensidade de sinal de cada isótopo avaliado. Além das informações qualitativas, o processo de imageamento também permite a geração de imagem quantitativa, relacionando a resposta analítica obtida por meio da análise instrumental com a concentração do analito. Neste sentido, há a possibilidade de transformação da informação qualitativa do *pixel* em informação quantitativa ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , por exemplo) [6].

Uma das grandes dificuldades em análises quantitativas por LA-ICP-MS é a obtenção de um método de calibração adequado para cada amostra, devido ao efeito matriz e de fracionamento de massa causados pela interação laser-amostra e o transporte ao ICP-MS, bem

como a falta CRM para o preparo de amostras de calibração e as etapas de validação analítica [15,18]. Pozebon *et al.* (2017) apresentaram novas estratégias de calibração para análise por LA-ICP-MS que podem ser estudadas e aplicadas no processo de imagem, como calibração externa via compatibilização de matriz (do inglês *matrix-matching*), na qual a matriz utilizada para preparar os pontos de calibração deve apresentar propriedades físicas e uma interação laser-amostra igual ou semelhante à da amostra a ser avaliada, assim diminuindo o efeito matriz, como CRMs ou a própria amostra limpa [38]. Estratégias de calibração externa (curva analítica), uso de padrão interno e aplicação de soluções de quantificação juntamente ao processo de ablação são descritas [21,22,30].

Pessôa *et al.* (2016) desenvolveram um guia prático para ajudar a obter imagens por LA-ICP-MS, no qual foram descritas todas as etapas, desde a preparação da amostra até à calibração dos parâmetros instrumentais, e como construir a imagem quantitativa final, usando o *software* MatLab [19].

Os métodos de quantificação relacionam a concentração do analito com a resposta analítica obtida por meio da análise instrumental. É comum observar a aplicação de calibração externa como curvas analíticas do tipo  $y = ax + b$ , em que  $y$  é a concentração e  $x$ , a resposta analítica, a fim de obter a concentração elementar. Pessôa *et al.* (2017) aplicaram o imageamento quantitativo, utilizando o conceito de compatibilização de matriz para obter a curva analítica, a fim de avaliar elementos essenciais e tóxicos em sementes de girassóis em solo contaminado com Cd, no qual puderam verificar a translocação de Cd para as sementes, bem como a variação na concentração espacial (variando de 10 a 20  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) deste elemento [22]. Para determinar elementos essenciais e não essenciais em tecidos vegetais de tabaco, Becker *et al.* (2008), por meio da compatibilização de matriz feita em laboratório, verificam a heterogeneidade química das flores, raízes e brotos, a partir da distribuição e concentração espacial elementar via imageamento quantitativo [29].

Como para realizar a calibração por meio de curvas analíticas em LA-ICP-MS é necessário um maior espaço na câmara de ablação, bem como o consumo de tempo é um fator complicador, para a aplicação de imageamento quantitativo, método que, por si, consome horas da análise e necessita de espaço para inserir as amostras de interesse, há a necessidade de aplicação de métodos alternativos que aperfeiçoem tais aspectos.

Na literatura é possível observar métodos que utilizam um, dois ou mais pontos analíticos para quantificação elementar pela técnica Espectroscopia de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Laser (do inglês *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy* – LIBS), como apresentado na recente revisão de Costa et. al (2020) [21], técnica que também utiliza laser, porém, a detecção é feita por meio da energia emitida pelos elementos excitados diretamente na superfície da amostra pelo contato com o laser.

Neste sentido, o método de calibração externa conhecido como **um-ponto** (do inglês *one-point* ou *single-point*), apresentado por Jochum *et al.* (2007), consiste na utilização de apenas um ponto analítico com concentração conhecida dos elementos, sendo este constituído por CRM ou preparado por compatibilização de matriz. Este ponto é utilizado para calcular a concentração final dos analitos na matriz de interesse por meio de equações matemáticas. Este método apresenta vantagens para a aplicação em imageamento quantitativo em relação à curva analítica, como minimização dos efeitos matriz, menor tempo de análise e espaço requerido [23]. De fato, este método foi apresentado e validado para quantificar diferentes elementos, como Pb e Ba, em amostras geológicas.

Jochum *et al.* (2012) também aplicaram o método de calibração *one-point* para avaliar estalagmites e conchas, no qual determinaram concentrações de 30 à 50 elementos, como Ca, Pb, Mg, Zn, Sr e Ba, com incertezas variando entre 5 – 10%. Neste estudo, os autores relatam a necessidade de materiais compatíveis com a matriz de interesse, além dos CRMs, pois alguns elementos com pontos de ebulição baixos, como Pb, necessitam de pontos de calibração por compatibilização de matriz, a fim de diminuir as incertezas da análise [71].

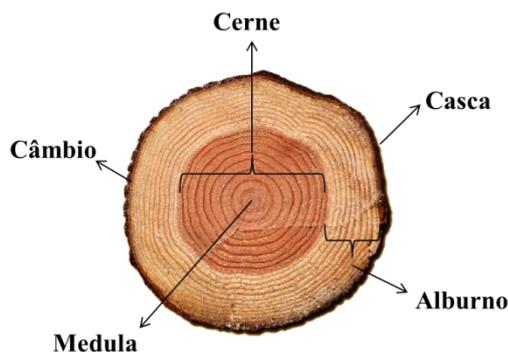
Hare *et al.* (2011) também aplicaram o método *one-point*, utilizando CRM como ponto analítico para quantificação de Zn, Sr, Pb e Cd em dentes, via imageamento quantitativo por LA-ICP-MS. Como resultados, os pesquisadores detectaram concentrações de Sr e Zn na faixa de 80 – 300  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente, e de 30 – 300  $\text{ng g}^{-1}$  para Cd e Pb em diferentes regiões da amostra [72]. Moradi *et al.* (2010) aplicaram o método de calibração via *one-point*, utilizando CRM *Olive Leaves*, para quantificar Ni e Fe na raiz de *B. coddii*, bem como para mapear o complexo Ni-DMG (dimetilglioxima) na superfície da raiz. Como resultado, altas concentrações de Ni foram observadas no interior da raiz (*ca.* 500  $\text{mg kg}^{-1}$  no córtex e 300  $\text{mg kg}^{-1}$  no centro da raiz), e Fe com concentrações menores que 100  $\text{mg kg}^{-1}$ , sendo os valores confirmados via decomposição e análise por ICP OES [73].

Já no trabalho realizado por Santos *et al.* (2009), este método foi aplicado como primeiro passo para a quantificação de Cu, Zn, Cd, Hg e Pb em amostras de tecido de caracol marinho, para posterior imageamento em LA-ICP-MS, via curva analítica. O método *one-point*, de acordo com os autores, é considerado como semi-quantitativo, pois é limitado em exatidão e precisão, devendo ser utilizado como pré-análise quantitativa. Porém, não foram encontradas diferenças significativas (nível de confiança de 95%) entre os valores encontrados via *one-point* e aqueles obtidos por ICP-MS [74]. Para Hare *et al.* (2012) o termo semi-quantitativo deveria ser evitado, pois os métodos de calibração seriam classificados como quantitativo, no qual há presença das figuras de mérito (exatidão, limites de detecção e quantificação, por exemplo), ou como qualitativo [17].

De acordo com a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), para métodos que utilizam um ponto de calibração, nos quais não há a construção de uma curva analítica, e, portanto, não há como obter o coeficiente angular, os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) podem ser obtidos baseados no desvio padrão do branco da análise [75–77]. Portanto, é possível caracterizar o método via *one-point* como método quantitativo, porém, sendo necessária a aplicação do método de compatibilização de matriz para que seja possível a obtenção da concentração total, e, também, imagens quantitativas, minimizando, assim, os efeitos adversos da análise por LA-ICP-MS.

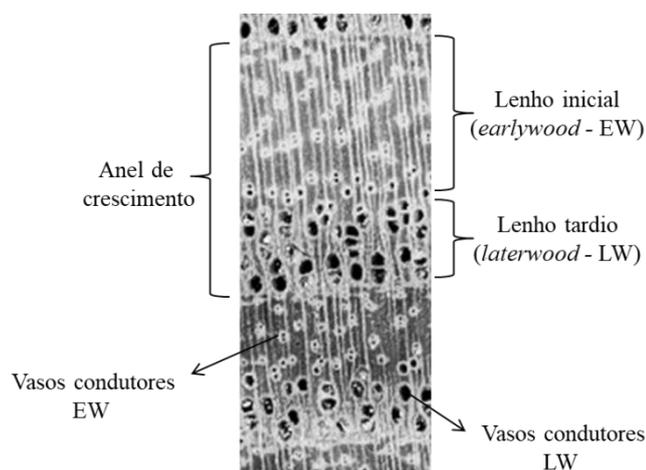
## 2.2. ANÉIS DE CRESCIMENTO DE ÁRVORES

Cada espécie de árvore possui especificidades em relação à sua estrutura e composição, porém, apresentam similaridades em relação à presença de folhas, caules, raiz e tronco. O tronco de uma árvore é formado por diferentes estruturas (Figura 2.1): a medula, sendo a parte central do tronco; o cerne, composto por células inativas provindas do alburno; o alburno, madeira recentemente formada, apresentando células ativas e coloração clara; o câmbio, grupo de fibras imperceptíveis localizadas entre a casca e o alburno, responsável pelo crescimento da árvore em diâmetro, ou seja, pela formação dos anéis constituintes do alburno; e, por fim, a casca, sendo a parte externa que garante a proteção do tronco [78,79].



**Figura 2. 1:** Configuração do tronco de árvore. Fonte: autoria própria.

Os anéis de crescimento são considerados camadas de crescimento produzidas pela madeira por certo período de tempo. O tempo de formação para um anel de crescimento é de um ano, mas esta periodicidade pode variar com a espécie e a idade da árvore, bem como com as condições ambientais em que está inserida, sendo possível a presença de mais de um anel em uma mesma época de crescimento ou a sua ausência em razão da impossibilidade de distinção entre os lenhos formadores de um anel de crescimento. Diferentes aspectos estruturais podem indicar os limites dos anéis de crescimento e variam de acordo com a espécie de árvore, como a presença de parênquima marginal e diferentes diâmetros dos vasos condutores entre o lenho inicial (parcela do anel clara) e lenho tardio (parcela do anel escura), como observado na Figura 2.2, sendo tais lenhos formadores de um anel de crescimento [80].



**Figura 2. 2:** Aspectos estruturais de anel de crescimento de árvore. Fonte: adaptado de Wheeler (2001) [81].

Como a formação de anéis de crescimento ocorre com periodicidade anual, tais matrizes podem realizar o registro biológico das alterações ocorridas no meio abiótico por meio da absorção de diferentes elementos presentes no solo ou ar atmosférico, assim sendo consideradas *proxies* ambientais, pois permitem o estudo de alterações climáticas e ambientais ocorridas em

certo período de tempo por meio da amostragem adequada das espécies que melhor representam tais variações, pois cada espécie responderá com diferentes comportamentos bióticos em relação ao estímulo externo, assim diminuindo os falsos sinais (como falsos anéis de crescimento) em avaliações ambientais [24].

Uma das causas de mudanças climáticas é a ocorrência de vulcanismo, pois erupções vulcânicas liberam aerossóis e gases químicos para a atmosfera, bem como diferentes elementos como S, Hg e Pb, que afetam a irradiação solar e causam a diminuição do pH das chuvas ocorridas naquela região [82–84].

Com a diminuição do pH das chuvas, a disponibilidade de nutrientes e íons no solo pode sofrer alterações em razão da lixiviação e mudanças de pH do solo. Assim, elementos como Al e Ba podem sofrer ionizações em solução e se translocar para o interior das árvores por meio dos vasos condutores. Com a absorção de diferentes elementos que, sem a ocorrência de erupção vulcânica, não seriam absorvidos, pode ser observada variações anômalas em conjuntos de anéis sequenciais, e, assim, caminhar para a caracterização de tais eventos com o auxílio dos anéis de crescimento [82,83].

Em estudo recente realizado por Alfaro-Sánchez *et al.* (2020) via decomposição e análise por ICP OES, os autores avaliaram sinais de erupções vulcânicas em anel de crescimento de *Pinus hartwegii*, localizadas à 3 km do vulcão Popocatepetl (México), o qual apresenta atividade vulcânica ativa desde 1994. Neste estudo, os pesquisadores verificaram altas concentrações de diversos metais no ano de 2001, dentre eles Ni e Pb, após uma grande erupção nos anos 2000, bem como elementos como Al, K e S após dois anos do evento em anéis de crescimento estreitos [84].

Pearson *et al.* (2005), por meio de análise por LA-ICP-MS, detectaram aumento de Al e Zn entre os anos 1814 e 1815 em amostras de *Pinus sylvestris* (Sarikamis, Turquia) e relacionaram esta variação com a possibilidade de mobilização de cátions bivalentes devido a acidificação do solo daquela região [83].

Padilla e Andersom (2002), via decomposição e análise por ICP-MS, associaram a variação elementar de Ba, Cu e Zn em anéis de crescimento da amostra-fóssil *Pinus ponderosa*, de 350 anos de datação, com a diminuição do pH do solo causado por erupção vulcânica, pois a variação incomum ocorreu conjuntamente com a ocorrência das erupções dos vulcões Laki (1783), Tambora (1815) e Krakatau (1883) [85].

Já na pesquisa realizada por Locosseli *et al.* (2018), por meio da análise pela técnica LA-ICP-MS os autores relatam diminuição de Pb por meio dos anéis de crescimento, a qual foi relacionada com a diminuição de Pb nos combustíveis automobilísticos na cidade de São Paulo (SP, Brasil), bem como a variabilidade na composição elementar de acordo com a estrutura celular, como o acúmulo de diferentes elementos (Ni, Zn e Pb, por exemplo) nos vasos condutores, e Na associado ao parênquima axial [86]. Amais *et al.* (2021) recentemente apresentaram o imageamento elementar qualitativo por LA-ICP-MS em quatro diferentes espécies de árvores, demonstrando a potencialidade da técnica e a relação entre os elementos e o tipo de estrutura celular analisada [42].

Para amostras com grandes dimensões, como o tronco de árvores, as informações obtidas por meio de linhas de ablação tendem a ser mais utilizadas para avaliação ambiental em razão da praticidade e rapidez na análise, como aplicado por Bukata & Kyser (2008) na avaliação da concentração de Ba, Sr e Pb ( $< 10 \mu\text{g g}^{-1}$ ) ao longo de anéis de crescimento [87], bem como por Märten *et al.* (2015) ao estudarem os níveis de U em amostras de árvore em locais de atividade de mineração [88].

### 3. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

Inicialmente, todas as vidrarias e materiais de preparo de amostra utilizados foram previamente descontaminados em solução de  $\text{HNO}_3$  (10% v/v) por 24 h, lavados em água deionizada ( $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ , Millipore, Bedford, USA) e secos em capela de fluxo laminar a temperatura ambiente.

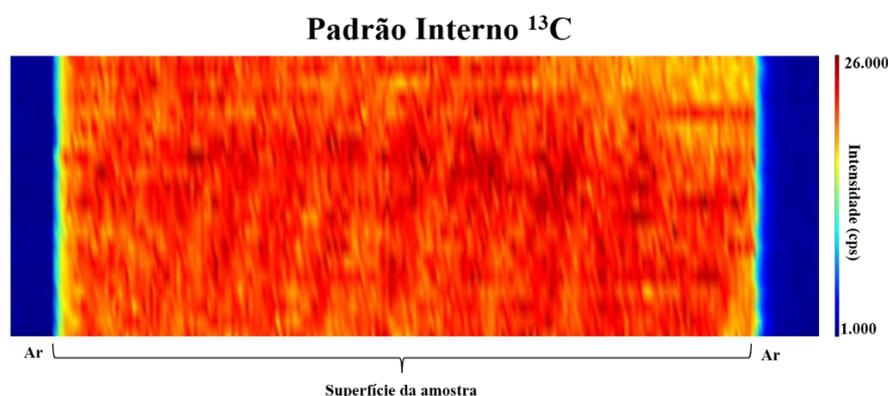
O sistema de ablação a laser da New Wave UP-213, com fonte de laser Nd:YAG (213 nm), acoplado com analisador de massas quadrupolo com fonte de plasma indutivamente acoplado (PerkinElmer ELAN DRC-e) foram utilizados para as análises via LA-ICP-MS, os quais estão localizados em uma sala limpa, com número de partículas, temperatura e umidade controlados. Antes da realização dos experimentos, as condições experimentais do ICP-MS são avaliadas por meio de uma solução multielementar (Mg, In, U, Ce e Ba) para o monitoramento da formação de óxidos e espécies com dupla carga, os quais devem apresentar valores abaixo de 3%. Para garantir a confiabilidade dos resultados, um período de 45 min. de estabilização do plasma formado por argônio, também foi realizado, no qual há o monitoramento da estabilidade dos isótopos  $^{12}\text{C}^+$  e  $^{13}\text{C}^+$ .

Todos os dados brutos obtidos foram tratados por meio do programa Microsoft Excel® e Origin 8.1, e as imagens quantitativas, pelo *software* MatLab [10].

### 3.1. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DA TÉCNICA LA-ICP-MS

Para a otimização dos parâmetros instrumentais de LA-ICP-MS para anéis de crescimento, foi utilizado 0,2 g de celulose microcristalina (Vetec), na qual foram adicionados 400 µL de solução 5 µg g<sup>-1</sup> de padrões para ICP-MS, contendo Pb, Cd e Ba (Tec Lab, Hexis Científica Ltda, 1000 µg g<sup>-1</sup>) em HNO<sub>3</sub> (1% v/v), para que a concentração final, no *pellet*, fosse 10 µg g<sup>-1</sup> de cada analito. A mistura foi seca em estufa à 37°C até massa constante, homogeneizada por meio de almofariz por 10 min. e prensada a 7 ton cm<sup>-2</sup>, durante 1 min., com auxílio de prensa hidráulica digital (PIKE CrushIR) [12].

Foram otimizados os parâmetros de LA conhecidos como intensidade do laser, frequência e *spot*, bem como os parâmetros potência da radiofrequência na formação do plasma, vazão do gás carregador e do gás auxiliar do ICP-MS, na análise dos isótopos <sup>206</sup>Pb, <sup>208</sup>Pb, <sup>112</sup>Cd, <sup>114</sup>Cd, <sup>137</sup>Ba e <sup>138</sup>Ba por meio do método de análise univariada, no qual há a variação de apenas um dos parâmetros, enquanto os demais apresentam um valor fixo [12]. O isótopo <sup>13</sup>C foi utilizado como IS, devido a homogeneidade na superfície de anéis de crescimento, como observado na Fig. 2.3. Todas as análises foram realizadas por meio de linhas de ablação [48], com condições fixas de velocidade de ablação de 60 µm s<sup>-1</sup> e tempo de integração de 60 ms também foram utilizadas [26]. Vale ressaltar que a escolha dos elementos de interesse foram baseadas na origem vulcânica das amostras de anéis de crescimentos analisadas nesta Tese.



**Figura 2. 3:** Imagem qualitativa de <sup>13</sup>C na superfície da madeira da espécie *Araucaria araucana*. Imagem obtida através do software LA-iMageS e análise pela técnica LA-ICP-MS.

## 3.2. ESTRATÉGIAS DE QUANTIFICAÇÃO E IMAGEAMENTO QUANTITATIVO PELA TÉCNICA LA-ICP-MS

### 3.2.1. Etapa de preparo da madeira para compatibilização de matriz

Para o preparo da madeira limpa, uma amostra da espécie *P. taeda*, doada pelo Prof. Mário Tomazello-Filho (ESALQ-USP, Piracicaba, SP), foi triturada usando um moinho de bolas (Gerhard Koch) e peneirada para obter tamanho de partículas inferiores a 75  $\mu\text{m}$ . Assim, 5 g de amostra foram limpas e filtradas a vácuo com 60 mL de solução 0,2 mol L<sup>-1</sup> de HNO<sub>3</sub> e agitação magnética por 6 vezes, para remover impurezas e metais da composição da madeira. Após esta etapa, a amostra foi limpa com água deionizada e seca a 37°C até um peso constante. A eficiência da etapa de limpeza ácida foi verificada através da decomposição ácida da amostra e análise pela técnica ICP-MS, a qual constatou a concentração dos elementos abaixo do LQ.

Para o preparo dos *pellets* de concentração conhecida dos analitos, a partir da amostra limpa, foram pesados 0,2 g de amostra em tubo falcon de 15 mL, no qual foram adicionados 1,2 mL de uma solução 1% de HNO<sub>3</sub> contendo concentrações conhecidas de cada analito, agitadas em vórtex por 2 min., congeladas com nitrogênio líquido e secas em liofilizador por 72 h. Após a secagem, as amostras foram homogeneizadas por 4 min. com auxílio de vórtex e prensadas por 1 min. a 7 ton cm<sup>-2</sup> empregando prensa hidráulica digital. Este método de preparo foi comparado ao método mencionado no item 4.2.1. O processo de ablação, pela técnica LA-ICP-MS, foi realizado a partir de 3 linhas de 6 mm de comprimento e 1,6 mm de distância entre os centros de cada linha, para avaliação de cada preparo de amostra.

### 3.2.2. Estratégia de calibração externa via curva analítica e compatibilização de matriz

A curva analítica baseada na compatibilização de matriz foi obtida por meio de 5 pontos com diferentes concentrações (0, 0,2, 1,0, 5,0, e 25  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) de Pb, Cd e Ba, de acordo com o processo descrito na secção 3.2.1. As concentrações elementares das amostras de CRM, para avaliação das etapas de exatidão e precisão analítica, foram determinadas por meio de uma equação linear  $y \text{ (cps)} = ax \text{ (}\mu\text{g g}^{-1}\text{)} + b$  (“a”, coeficiente angular e “b”, coeficiente linear). O isótopo <sup>13</sup>C foi utilizado como IS. Os limites de detecção LD e de quantificação (LQ) foram determinados como  $(3 \times S_{\text{branco}})/b$  e  $(10 \times S_{\text{branco}})/b$ , respectivamente, onde  $S_{\text{branco}}$  é o desvio padrão das medições analíticas do *pellet* sem os analitos e  $b$  é a inclinação da curva analítica. Os valores de RSD foram obtidos pela razão entre o desvio padrão da intensidade do sinal elementar (ou concentração elementar) e a média dos valores obtidos de intensidade.

### 3.2.3. Estratégia de calibração externa via “um-ponto” e compatibilização de matriz

Neste caso, foram preparados *pellets* de 1,0, 5,0 e 25  $\mu\text{g g}^{-1}$  para os analitos Pb, Cd e Ba, em amostra limpa da espécie *P. taeda*, por meio do método descrito na seção 4.2.2.1. A quantificação por meio do método *one-point* requer saber a concentração do IS e calcular o fator de sensibilidade relativa (RSF), obtido à partir da Eq. 1:

$$RSF = \frac{C_{ap,el}}{C_{true\ std}} \quad \text{Equação 1}$$

sendo  $C_{true\ std}$  a concentração do analito no pellet final e  $C_{ap,el}$ , a concentração aparente do analito, ambas obtida pelo pellet de *P. taeda* preparado em laboratório. A concentração aparente foi calculada por meio da Eq. 2:

$$C_{ap,el} = C_{IS} \times \frac{I_{el}}{I_{IS}} \times \left[ \frac{\left(\frac{A_{IS}}{A_{el}}\right)}{\left(\frac{M_{el}}{M_{IS}}\right)} \right] \quad \text{Equação 2}$$

sendo  $C_{IS}$  a concentração ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) do padrão interno,  $I_{el}$ ,  $A_{el}$  e  $M_{el}$  a intensidade de sinal, a abundância e a massa atômica relativa do analito, respectivamente, e  $I_{IS}$ ,  $A_{IS}$  e  $M_{IS}$ , os mesmos parâmetros, porém, para o padrão interno.

Para saber a concentração real do analito na amostra de interesse também é necessário calcular a concentração aparente (Eq. 2). Esta concentração aparente, atrelada ao ajuste realizado pelo RSF, como apresentado na Eq. 3, permite que a concentração real  $C_{el}$  seja obtida.

$$C_{el} (\text{g g}^{-1}) = \frac{C_{ap,el}}{RSF} \quad \text{Equação 3}$$

As figuras de mérito calculadas, para o método de calibração via *one-point*, foram os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), de acordo com as Equações 4 e 5 abaixo. Para transformar a unidade do LD e LQ em  $\mu\text{g g}^{-1}$  também foi realizada a quantificação dos valores obtidos (cps) através do método *one-point*; o desvio padrão relativo (RSD) e a recuperação analítica como já mencionadas anteriormente [76,77].

$$LD = 3,3 \times \sigma \quad \text{Equação 4}$$

$$LQ = 10 \times \sigma \quad \text{Equação 5}$$

$\sigma$ : desvio padrão do sinal analítico/IS no branco da análise (*pellet* sem adição de analito)

### 3.2.4. Imageamento quantitativo

Para a aplicação dos métodos de calibração externa avaliados na obtenção de imagens quantitativas em amostra de madeira, foi utilizado um pellet de CRM 1575a – *Trace Elements in Pinus Needles (Pinus taeda)* para a avaliação da exatidão do imageamento quantitativo. Neste caso, além da análise da curva analítica e os pontos para o método *one-point*, foram realizadas 30 linhas de ablação, com 0,24 mm de distância entre os centros de cada linha e 7 mm de comprimento, ao longo da superfície do CRM em questão.

Três amostras de madeira da espécie *Araucária araucana* foram utilizadas no processo de imageamento quantitativo em anéis de crescimento, as quais possuem, aproximadamente, 30 x 5 x 1 mm (comprimento x largura x espessura). Tais amostras foram cedidas pelo grupo *Argentina Institute for Snow, Glacier and Environmental Research (IANIGLA)*, Mendoza, Argentina, coordenado pelo Prof. Ricardo Villalba (associado ao projeto PIRE-CREATE). De acordo com os pesquisadores responsáveis pela coleta, as amostras foram coletadas na província de Neuquén (Norte da Patagônia, Argentina), nas regiões de Primeros Pinos (1670 metros acima do mar, 39° 08' 44,8" S – 70° 35' 33,2" W) e Picún Leufú (1680 metros acima do mar, 38° 52' 10" S – 70° 34' 27" W), ambas regiões vulcânicas [89]. Após a coleta, os fragmentos de cada amostra foram fixados lateralmente em suportes de madeira e, com auxílio de uma dupla-serra circular, foi possível a obtenção da espessura de 1 mm e 2,5 cm de comprimento, sem a necessidade de polimento com lixa em uma das faces para evitar contaminação cruzada da superfície lisa. Inicialmente foi realizada uma análise exploratória ao longo dos anéis de crescimento, do cerne em direção ao alburno da amostra, por meio de 3 linhas de ablação com 31, 16 e 23 mm de comprimento para as amostras 1-E, 11-S e 12-N, respectivamente, para avaliar a região de aplicação do processo de imageamento quantitativo. Após a escolha do local, para cada amostra foram realizadas 20 linhas de ablação, 10 mm de comprimento e 0,165 mm de distância entre o centro de cada linha.

### 3.2.5. Comparação entre imageamento quantitativo e quantificação total

A região da superfície de cada amostra analisada via processo de imageamento foi cortada com bisturi de aço inoxidável e triturada com auxílio de moinho analítico de facas (IKA A1 *basic*). Cada região forneceu, aproximadamente, 50 mg de amostra, as quais levadas à decomposição ácida com 7 mL de 37,5% (v/v) de ácido nítrico (Merck, Darmstadt, Alemanha), 25% (v/v) de peróxido de hidrogênio (Merck, Darmstadt, Alemanha), e água deionizada (18

M $\Omega$  cm<sup>-1</sup>; Millipore, Bedford, USA) por meio de decomposição assistida por micro-ondas (Berghof, Speedwave® DIRC, Alemanha) com tubo de Teflon® fechado. As amostras foram submetidas ao seguinte programa de aquecimento: 5 min. a 400W; 15 min. a 500W; 4 min. a 320W; 3 min. a 0W [90]. Após a decomposição ácida, as soluções previamente diluídas e analisadas através da técnica ICP-MS (iCAP TQ, Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) previamente verificado em relação a formação de óxidos e carga dupla. As condições experimentais do ICP-MS foram: 0,98 L min<sup>-1</sup> de fluxo de gás nebulizador (Ar), 0,80 L min<sup>-1</sup> de fluxo de gás auxiliar (Ar), 4,42 mL min<sup>-1</sup> de fluxo de gás de colisão (He), 0,25 mL min<sup>-1</sup> de gás de reação (O<sub>2</sub>) e 1550W de potência de radiofrequência.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DA TÉCNICA LA-ICP-MS

Como mencionado anteriormente, para a otimização dos parâmetros instrumentais de LA-ICP-MS para análise de anéis de crescimento, foi utilizado o método univariado, e os detalhes dos resultados obtidos podem ser observados em Amais *et al.* (2021) [42]. Assim como para as amostras de espeleotemas, também foi observado que o aumento da intensidade de ablação, frequência e tamanho do *spot* da ablação a laser proporcionam o aumento do sinal analítico, indo ao encontro dos valores utilizados por Locosseli *et al.* (2018) ao empregar a LA-ICP-MS para analisar amostras de *T. tipu* da cidade de São Paulo [86].

Portanto, as condições experimentais utilizadas para as análises dos métodos de quantificação e imageamento quantitativo de anéis de crescimento, após a otimização instrumental, podem ser observadas na Tabela 2.1. É válido ressaltar que foram avaliados os parâmetros razão sinal analítico/sinal de fundo (do inglês *signal to background signal ratio* - SBR) e concentração equivalente ao sinal de fundo (do inglês *background signal equivalent concentration* - BEC), de modo a obter valores mais elevados de SBR e mais baixos de BEC, a fim de se obter condições que possibilitem menor sinal de fundo e que não influencie negativamente na análise, como apresentado no artigo anteriormente publicado em colaboração por Amais *et al.* (2021) [42].

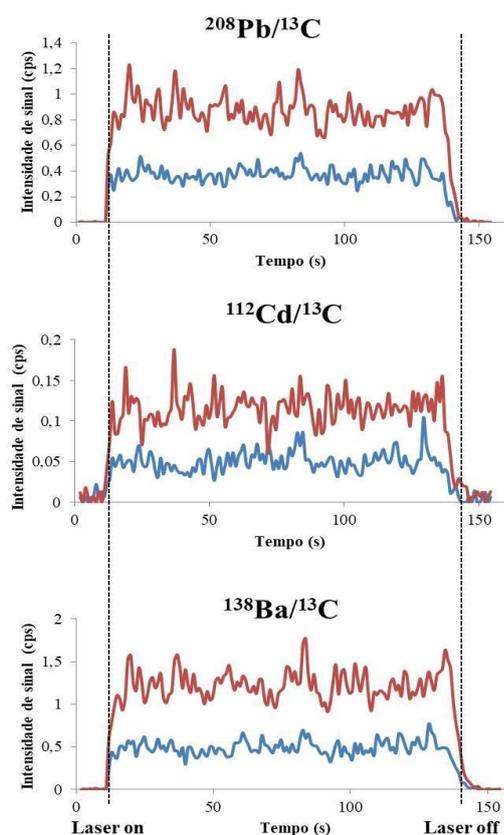
**Tabela 2. 1:** Parâmetros instrumentais otimizados para análise via LA-ICP-MS em amostra de madeira.

<b>ICP-MS (PerkinElmer ELAN DRC-e)</b>	
Potência RF (W)	1300
Vazão gás de nebulização (L min <sup>-1</sup> )	1,2
Vazão gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	1,6
<b>Parâmetros de aquisição de dados</b>	
Modo de leitura	<i>Peak hopping</i>
Detector	<i>Dual</i>
<i>Sweeps</i>	3
<i>Dwell time</i> (ms)	20
Tempo de integração (ms)	60
<b>LA (New Wave UP-213)</b>	
Nd:YAG (nm)	213
Intensidade de ablação (%)	70
Frequência (Hz)	20
Spot (µm)	110
Velocidade de scan (µm s <sup>-1</sup> )	60
Pulso (mJ)	1,21
Densidade energética (J cm <sup>-2</sup> )	16,69

## **4.2. ESTRATÉGIAS DE QUANTIFICAÇÃO E IMAGEAMENTO QUANTITATIVO PELA TÉCNICA LA-ICP-MS**

### **4.2.1. Etapa de preparo da madeira para compatibilização de matriz**

O processo de preparo de *pellet* de madeira para possibilitar a compatibilização de matriz foi realizado por meio do processo de liofilização, no qual consiste na sublimação da água e auxilia na preservação dos compostos químicos inerentes da amostra ou, no caso, àqueles adicionados à amostra, sob vácuo parcial [91]. Este processo foi comparado com o método convencional (linha azul), por adição do analito direto na amostra e seca em estufa, como pode ser observado na Figura 2.4, demonstrando que, com o processo de liofilização (linha vermelha) é possível obter maiores intensidades de sinal, ou seja, houve maior assimilação do analito na amostra. Este método também apresentou os menores valores de RSD (1,14 - 2,87%) quando comparado ao método convencional (5,30 – 8,05%).



**Figura 2. 4:** Comparação entre o processo convencional (linha azul) e a liofilização (linha vermelha) no preparo dos pellets.

#### 4.2.2. Estratégia de calibração externa via curva analítica e compatibilização de matriz

A curva analítica foi obtida por meio de 5 pontos com concentrações conhecidas de cada analito. Como observado na Tabela 2.2, foi obtida uma linearidade adequada ( $r > 0,999$ ), bem como baixos LDs e LQs, para todos os isótopos avaliados, os quais são resultados importantes quando considera que tais elementos não são inerentes a amostras de madeira [42].

**Tabela 2. 2:** Resultados obtidos para a curva analítica por compatibilização de matriz.

Isótopo	$y = ax + b$	LD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	r
$^{206}\text{Pb}/^{13}\text{C}$	$y = 0,0222x + 0,00005$	0,053	0,176	0,9999
$^{208}\text{Pb}/^{13}\text{C}$	$y = 0,04786x - 0,0004$	0,068	0,227	0,9999
$^{112}\text{Cd}/^{13}\text{C}$	$y = 0,0091x + 0,00021$	0,064	0,215	0,9999
$^{114}\text{Cd}/^{13}\text{C}$	$y = 0,01141x - 0,0003$	0,045	0,151	0,9999
$^{137}\text{Ba}/^{13}\text{C}$	$y = 0,0086x - 0,0002$	0,084	0,28	0,9999
$^{138}\text{Ba}/^{13}\text{C}$	$y = 0,0557x - 0,0008$	0,056	0,186	0,9997

Os resultados de recuperação analítica (Tabela 2.3) apresentaram valores adequados (> 70%), assim como os resultados obtidos para os RSDs (10-15%), demonstrando que o método possui exatidão e precisão [92]. No entanto, mesmo com baixos valores de LQ, as concentrações de Pb e  $^{112}\text{Cd}$  em CRM *Pinus Needles*, estão abaixo do LQ. Neste caso, para procurar assegurar a exatidão e precisão do método de quantificação, também foram realizados testes com diferentes CRMs, tais como *Peach leaves* e *Plankton*, os quais apresentaram concentrações obtidas acima do LQ da curva analítica. Todos os resultados podem ser vistos na Tabela 2.3, confirmando que o método de quantificação tem recuperações > 74,8 % e RSD < 15,9 % para os analitos de interesse. O isótopo  $^{112}\text{Cd}$  no CRM de *Plankton* apresentou 28,7 % como valor RSD, porém, esta matriz é a menos semelhante à madeira, o que poderia ocasionar em efeito da matriz na análise via LA-ICP-MS.

**Tabela 2. 3:** Resultados de concentração, recuperação e RSD obtidos para diferentes CRMs por meio de curva analítica e LA-ICP-MS.

<b>CRM <i>Pinus Needles</i></b>				
<b>Isótopo/IS</b>	<b>Certificado (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>	<b>Experimental (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>RSD (%)</b>
$^{206}\text{Pb}/^{13}\text{C}$	0,167	$0,13 \pm 0,02$	< LOQ	15,9
$^{208}\text{Pb}/^{13}\text{C}$	0,167	$0,122 \pm 0,006$	< LOQ	5,3
$^{112}\text{Cd}/^{13}\text{C}$	0,233	$0,19 \pm 0,01$	< LOQ	7,5
$^{114}\text{Cd}/^{13}\text{C}$	0,233	$0,20 \pm 0,01$	88,8	6,6
$^{137}\text{Ba}/^{13}\text{C}$	6	$4,6 \pm 0,2$	76,8	4,7
$^{138}\text{Ba}/^{13}\text{C}$	6	$4,5 \pm 0,3$	74,8	6,4
<b>CRM <i>Peach Leaves</i></b>				
<b>Isótopo/IS</b>	<b>Certificado (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>	<b>Experimental (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>RSD (%)</b>
$^{206}\text{Pb}/^{13}\text{C}$	0,869	$0,74 \pm 0,02$	85,2	3,5
$^{208}\text{Pb}/^{13}\text{C}$	0,869	$0,69 \pm 0,04$	80,3	5,8
$^{112}\text{Cd}/^{13}\text{C}$	n	n	n	n
$^{114}\text{Cd}/^{13}\text{C}$	n	n	n	n
$^{137}\text{Ba}/^{13}\text{C}$	123,7	$111 \pm 2$	90,2	2
$^{138}\text{Ba}/^{13}\text{C}$	123,7	$112 \pm 2$	90,8	2
<b>CRM <i>Plankton</i></b>				
<b>Isótopo/IS</b>	<b>Certificado (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>	<b>Experimental (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>RSD (%)</b>
$^{206}\text{Pb}/^{13}\text{C}$	3,97	$3,1 \pm 0,2$	77,5	7,2
$^{208}\text{Pb}/^{13}\text{C}$	3,97	$3,2 \pm 0,2$	80	7,6
$^{112}\text{Cd}/^{13}\text{C}$	0,383	$0,3 \pm 0,1$	78,2	28,7
$^{114}\text{Cd}/^{13}\text{C}$	0,383	$0,35 \pm 0,04$	92	11,3
$^{137}\text{Ba}/^{13}\text{C}$	n	n	n	n
$^{138}\text{Ba}/^{13}\text{C}$	n	n	n	n

n = sem valor certificado

Embora a curva analítica por compatibilização de matriz possa ser considerada um método de quantificação eficiente por LA-ICP-MS, o tempo de análise excessivo (cerca de 90 min.), tendo em conta o processo de ablação total e o foco manual requerido do laser, é uma limitação para análise via imageamento.

#### 4.2.3. Estratégia de calibração externa via *one-point* e compatibilização de matriz

Na literatura é comum observar o uso de CRM como o ponto analítico para cálculo do RSF [71,74], porém, também é comum a falta deste tipo de material para os diferentes tipos de matriz, sendo uma das limitações em análises quantitativas via LA-ICP-MS. Neste caso, o presente estudo buscou aplicar o método de compatibilização de matriz (espécie *P. taeda*) para o preparo de três pontos analíticos de concentração conhecida (1, 5 e 25  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) para a realização dos cálculos de RSF, de acordo com a Equação 1 (item 3.2.3), o qual deve corrigir efeito matriz, bem como efeitos de fracionamento de massa [23]. Os resultados de RSF são apresentados na Tab. 2.4.

**Tabela 2. 4:** Valores obtidos do RSF em *pellet* de *P. Taeda* para quantificação via *one-point*.

Isótopo	RSF		
	1 $\mu\text{g g}^{-1}$	5 $\mu\text{g g}^{-1}$	25 $\mu\text{g g}^{-1}$
<sup>206</sup> Pb	30,4 ± 2,6	28,2 ± 7,1	29,5 ± 1,5
<sup>208</sup> Pb	29,5 ± 2,7	27,9 ± 7,0	29,2 ± 1,5
<sup>112</sup> Cd	22,0 ± 2,4	21,9 ± 5,7	22,2 ± 1,2
<sup>114</sup> Cd	22,8 ± 1,4	17,9 ± 11,1	23,4 ± 1,1
<sup>137</sup> Ba	36,4 ± 3,2	35,3 ± 9,2	36,8 ± 2,4
<sup>138</sup> Ba	35,1 ± 1,3	34,4 ± 10,1	37,5 ± 2,7

Para a quantificação por meio da calibração via *one-point* também é necessário saber a concentração do padrão interno na amostra para o cálculo de concentração aparente (Equação 2, item 3.2.3). Neste caso, a concentração do padrão interno carbono (<sup>13</sup>C) é considerada 50% (m/m) – 5.10<sup>5</sup>  $\mu\text{g g}^{-1}$  – em amostras e produtos derivados da madeira [93]. Também foi considerado este valor para as demais amostras de CRM.

Sabendo-se os valores de RSF e utilizando a Equação 2 (seção 4.2.2.3) para o cálculo da concentração aparente, foi possível encontrar os valores de concentração final (Equação 3, seção 2.2) para cada isótopo nos CRMs *Pinus Needles*, *Peach Leaves* e *Plankton*. Os resultados da concentração final, bem como das recuperações analíticas e RSDs para cada ponto analítico avaliado, podem ser observados na Tab. 2.5.

**Tabela 2. 5:** Resultados obtidos utilizando o método de quantificação via *one-point* e LA-ICP-MS.

<b>1 µg g<sup>-1</sup></b>									
<b>CRM <i>Pinus Needles</i></b>				<b>CRM <i>Peach Leaves</i></b>			<b>CRM <i>Plankton</i></b>		
<b>Isótopo</b>	<b>Exp. (µg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Rec. (%)</b>	<b>RSD (%)</b>	<b>Exp. (µg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Rec. (%)</b>	<b>RSD (%)</b>	<b>Exp. (µg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Rec. (%)</b>	<b>RSD (%)</b>
<sup>206</sup> Pb	0,12 ± 0,02	< LOQ	15,6	0,72 ± 0,02	82,8	3,5	2,98 ± 0,21	75,1	7,2
<sup>208</sup> Pb	0,113 ± 0,006	< LOQ	5,7	0,68 ± 0,04	78,4	5,9	3,1 ± 0,2	78,8	7,6
<sup>112</sup> Cd	0,22 ± 0,01	< LOQ	6,7	n	n	n	0,33 ± 0,08	85	26,7
<sup>114</sup> Cd	0,18 ± 0,01	79,2	7,6	n	n	n	0,33 ± 0,04	87	12,2
<sup>137</sup> Ba	4,5 ± 0,3	75,2	7,5	112 ± 2	91,2	2	n	n	n
<sup>138</sup> Ba	4,8 ± 0,3	79,5	6,4	119 ± 2	96,7	2	n	n	n
<b>5 µg g<sup>-1</sup></b>									
<b>CRM <i>Pinus Needles</i></b>				<b>CRM <i>Peach Leaves</i></b>			<b>CRM <i>Plankton</i></b>		
<b>Isótopo</b>	<b>Exp. (µg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Rec. (%)</b>	<b>RSD (%)</b>	<b>Exp. (µg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Rec. (%)</b>	<b>RSD (%)</b>	<b>Exp. (µg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Rec. (%)</b>	<b>RSD (%)</b>
<sup>206</sup> Pb	0,13 ± 0,02	< LOQ	15,6	0,77 ± 0,03	<b>89,2</b>	3,5	3,2 ± 0,2	<b>81</b>	7,2
<sup>208</sup> Pb	0,12 ± 0,01	< LOQ	5,7	0,73 ± 0,04	<b>82,7</b>	6,1	3,3 ± 0,2	<b>83,2</b>	7,6
<sup>112</sup> Cd	0,22 ± 0,01	< LOQ	6,7	n	n	n	0,32 ± 0,09	<b>85,2</b>	26,7
<sup>114</sup> Cd	0,23 ± 0,02	<b>100,8</b>	7,6	n	n	n	0,42 ± 0,05	<b>110,8</b>	12,2
<sup>137</sup> Ba	4,8 ± 0,2	<b>79,7</b>	4,7	116 ± 2	<b>94,1</b>	2	n	n	n
<sup>138</sup> Ba	4,9 ± 0,2	<b>82,7</b>	5,3	122 ± 2	<b>98,7</b>	2	n	n	n
<b>25 µg g<sup>-1</sup></b>									
<b>CRM <i>Pinus Needles</i></b>				<b>CRM <i>Peach Leaves</i></b>			<b>CRM <i>Plankton</i></b>		
<b>Isótopo</b>	<b>Exp. (µg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Rec. (%)</b>	<b>RSD (%)</b>	<b>Exp. (µg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Rec. (%)</b>	<b>RSD (%)</b>	<b>Exp. (µg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Rec. (%)</b>	<b>RSD (%)</b>
<sup>206</sup> Pb	0,12 ± 0,01	< LOQ	10,3	0,75 ± 0,04	85,8	5,1	2,99 ± 0,06	75,4	2,2
<sup>208</sup> Pb	0,115 ± 0,001	< LOQ	1,2	0,68 ± 0,03	78,6	4,6	3,16 ± 0,21	79,7	6,6
<sup>112</sup> Cd	0,22 ± 0,02	< LOQ	9,7	n	n	n	0,32 ± 0,07	83,1	22,8
<sup>114</sup> Cd	0,182 ± 0,009	78	5	n	n	n	0,33 ± 0,03	85	10,4
<sup>137</sup> Ba	4,7 ± 0,3	78,7	5,8	114 ± 3	92,2	2,9	n	n	n
<sup>138</sup> Ba	4,713 ± 0,005	78,5	8,8	114 ± 4	92,6	3,9	n	n	n

n = sem valor certificado

Assim como os valores obtidos pela curva analítica, os resultados de concentração final são condizentes com o valor certificado, no qual apenas a recuperação de  $^{208}\text{Pb}$ , no ponto de  $1 \mu\text{g g}^{-1}$ , está abaixo da faixa considerada adequada, sendo que os demais isótopos para os três pontos avaliados apresentam recuperação analítica acima de 70%. O ponto de  $5 \mu\text{g g}^{-1}$  foi aquele que apresentou os melhores valores de recuperação (Tab. 6, valores em negrito), assim sendo o ponto com exatidão analítica adequada. Os valores de RSDs estão na faixa esperada em análise via LA-ICP-MS (10-15%), assim garantindo a precisão do método de calibração via *one-point* [92]. O isótopo  $^{112}\text{Cd}$  mostrou resultados imprecisos para todas amostras de CRMs (RSD > 26,7%), considerando os três pontos analíticos avaliados, semelhantes aos resultados da curva analítica.

Os LDs e LQs no método *one-point* são calculados por meio do desvio padrão da razão entre a intensidade dos isótopos e padrão interno (equações 4 e 5, seção 4.2.2.3) no branco da análise, sendo este o ponto sem adição de analito, e transformados em valores de concentração através do método *one-point* avaliado [76,77]. Os resultados podem ser observados na Tabela 2.6, o qual apresentam baixos valores de LOD e LOQ para todos os isótopos avaliados.

**Tabela 2. 6:** LD e LQ para o método *one-point*.

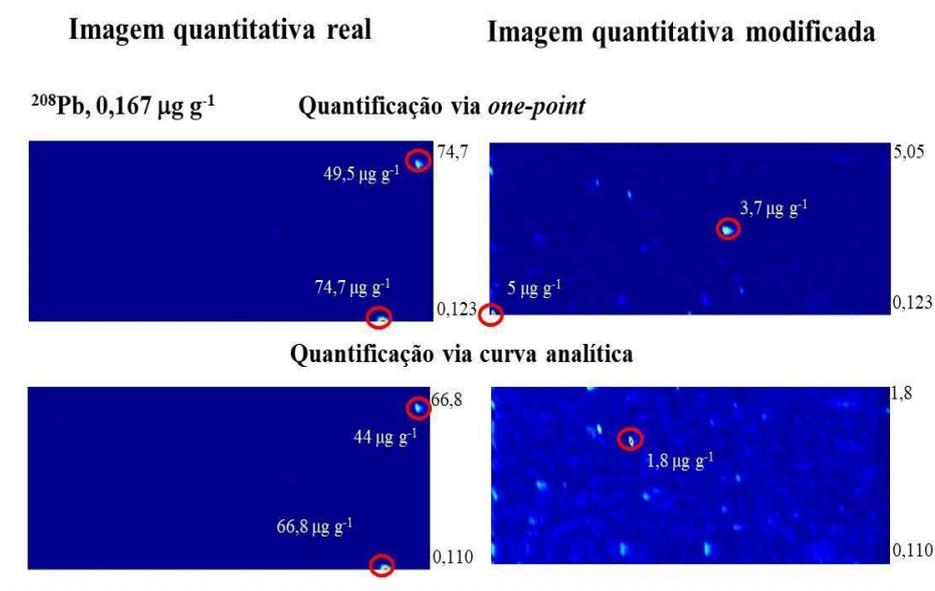
<b>Isótopo</b>	<b>LD (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>	<b>LQ (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>
$^{206}\text{Pb}$	0,048	0,145
$^{208}\text{Pb}$	0,074	0,226
$^{112}\text{Cd}$	0,072	0,22
$^{114}\text{Cd}$	0,064	0,193
$^{137}\text{Ba}$	0,078	0,235
$^{138}\text{Ba}$	0,058	0,176

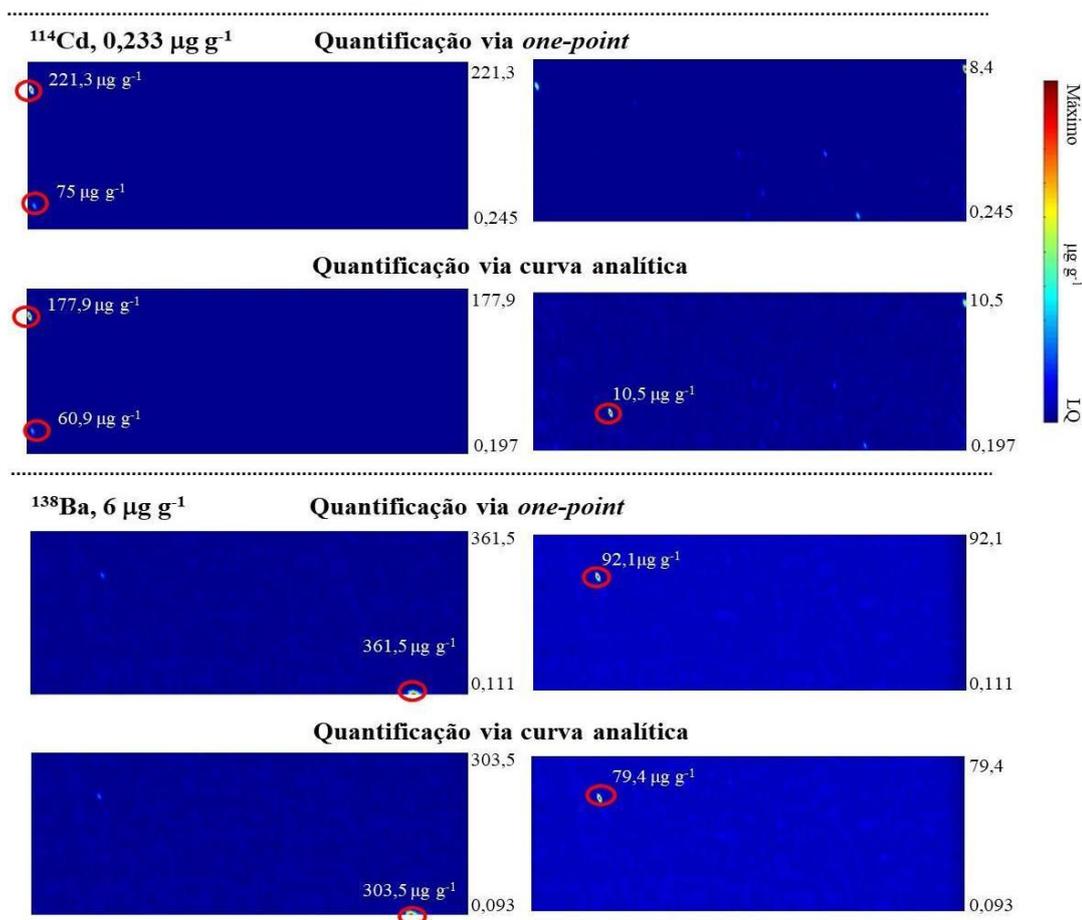
Na literatura, alguns trabalhos consideram este tipo de abordagem como semi-quantitativo, pois seria limitado em exatidão e precisão [74]. Porém, com os resultados obtidos neste estudo, é possível considerar este método de quantificação por LA-ICP-MS em amostras de madeira. Além disso, este método requer menor tempo de análise, uma vez que utiliza apenas um ponto de calibração, sendo a análise realizada em menos de 15 min (dependendo dos parâmetros de LA-ICP-MS).

#### 4.2.4. Imageamento quantitativo

No subitem anterior foram apresentados os resultados obtidos para a quantificação total em diferentes CRMs por meio dos métodos de calibração externa: curva analítica e *one-point*. Após a validação analítica, foi feita a aplicação dos métodos para o imageamento quantitativo, empregando as duas estratégias, para análise do CRM *Pinus Needles*, pois esta é a matriz mais similar às amostras de interesse.

Na Figura 2.5 (imagem quantitativa real), é possível observar que os valores de concentração encontrados (valor máximo da escala), para ambos os métodos, são próximos para todos os isótopos, logo, ambos os métodos são adequados para o processo de imageamento quantitativo. Também se observa que a superfície do CRM apresenta *hotspots* (regiões destacadas vermelho), como se houvesse uma concentração maior naquela região em escala micrométrica, e, assim, ocasionando em valores maiores de concentração de imagem quando comparados aos valores de referência. Ao retirar esta região (imagem quantitativa modificada), é verificado, com mais facilidade, a região da amostra, como nas imagens de  $^{138}\text{Ba}$  e  $^{208}\text{Pb}$ , porém, a escala quantitativa máxima encontrada ainda não é equivalente ao valor de referência de concentração.





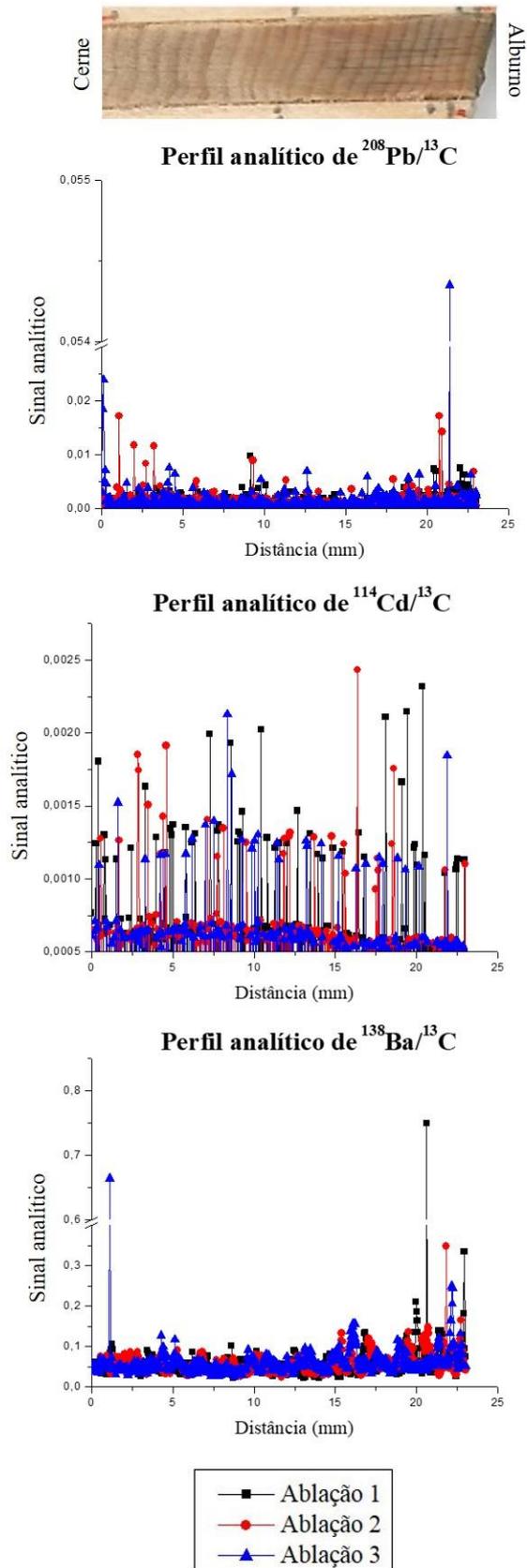
**Figura 2. 5:** Imagens quantitativas da superfície do CRM *Pinus Needles* por meio das estratégias de quantificação avaliadas.

Este resultado da heterogeneidade quantitativa em escala micrométrica pode se relacionar ao recomendado para fins de comparação com os valores certificados (250 mg deste CRM), quando se considera uma análise da solução após um método de decomposição, mas não para análise diretamente do sólido [94]. Pensando por este aspecto, foi avaliada a média dos valores de concentração da área analisada, tanto para as imagens reais, como para àquelas modificadas. Na Tab. 2.7 (valores em negrito acima do LQ da análise) é possível verificar que, após a retirada dos *hotspots*, os valores de recuperação analítica se aproximam de 100%, principalmente para os isótopos de Pb. Para os isótopos de Cd, ainda pode haver locais de concentração elementar que influenciam nos resultados na análise. Já para os isótopos de Ba, os resultados de recuperação obtidos são similares, pois a maior concentração deste elemento ocasiona menor heterogeneidade na superfície da amostra.

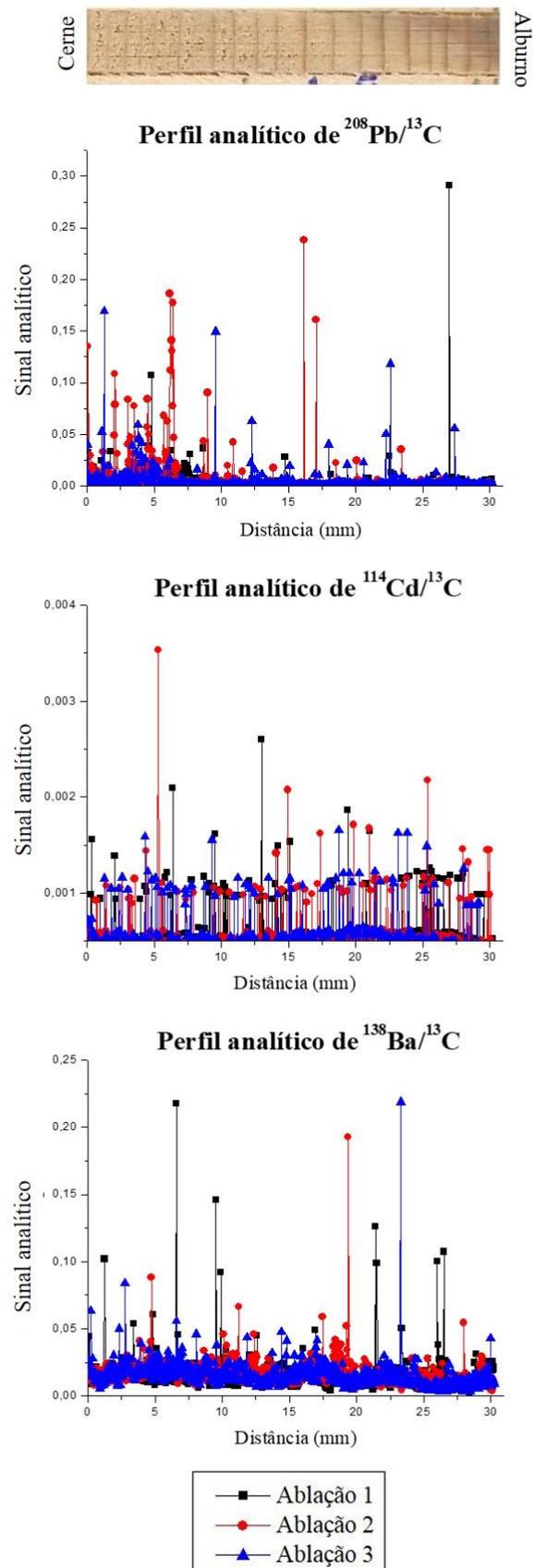
**Tabela 2. 7:** Resultado de recuperação analítica considerando o valor médio da área das imagens quantitativas do CRM Pinus Needles.

<b>Recuperação analítica (%) do valor médio da área</b>						
<b>Curva analítica</b>						
	<sup>206</sup> Pb	<sup>208</sup> Pb	<sup>112</sup> Cd	<sup>114</sup> Cd	<sup>137</sup> Ba	<sup>138</sup> Ba
CRM real	173,7	<b>171,8</b>	147,1	<b>150,1</b>	<b>80,5</b>	<b>83,4</b>
CRM modificado	123,7	<b>122,9</b>	135,9	<b>148,4</b>	<b>75,9</b>	<b>79,4</b>
<b>One-point</b>						
	<sup>206</sup> Pb	<sup>208</sup> Pb	<sup>112</sup> Cd	<sup>114</sup> Cd	<sup>137</sup> Ba	<sup>138</sup> Ba
CRM real	151,5	<b>143,5</b>	84,5	<b>72,8</b>	<b>96,1</b>	<b>95,6</b>
CRM modificado	103,5	<b>90,3</b>	82,6	<b>69,6</b>	<b>90,6</b>	<b>90,9</b>

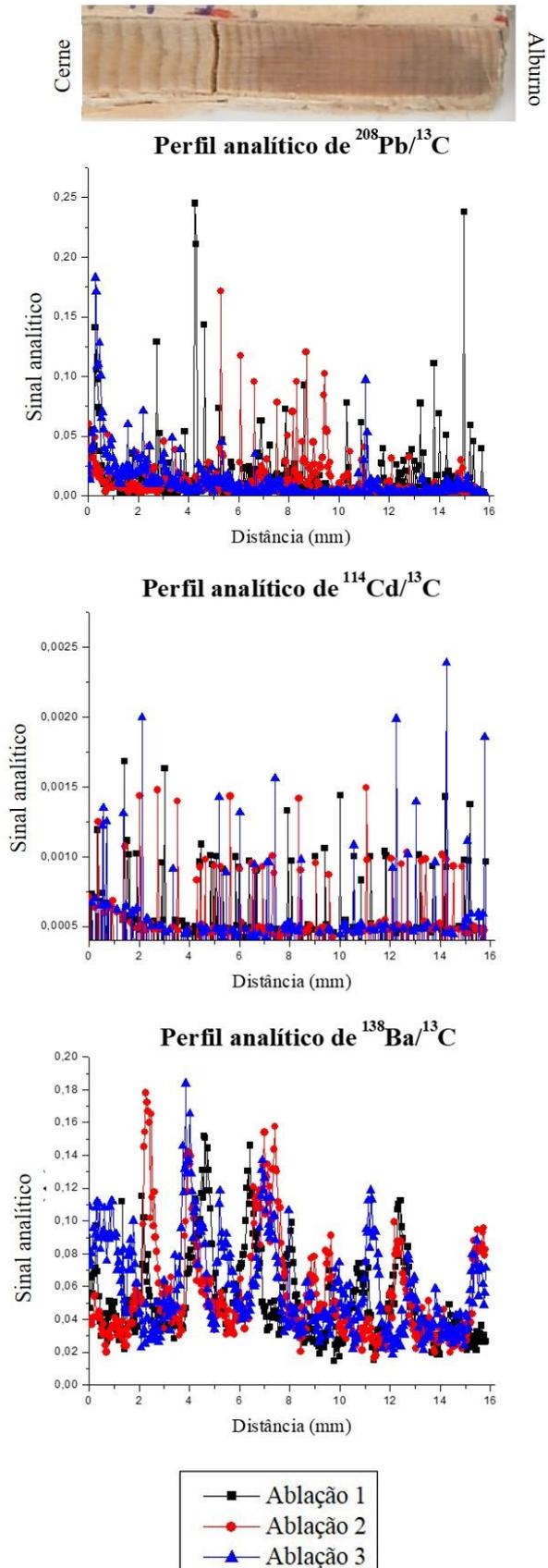
Após o imageamento quantitativo do CRM, esta metodologia foi aplicada em três amostras de madeira da espécie *Araucária araucana*: 12-N, 1-E e 11-S. Porém, anteriormente ao processo de imageamento quantitativo, foi realizada a análise exploratória ao longo dos anéis de crescimento, do cerne em direção ao alburno, afim de avaliar a região de interesse analítico. Além deste fato, a aplicação de linhas de ablação também permite realizar o estudo da variação elementar por meio dos anéis de crescimento e a correlação com eventos extremos de vulcanismo, enchentes e poluição ambiental [86]. Os resultados da análise exploratória para as amostras 12-N, 1-E e 11-S podem ser verificados nas figuras 2.6, 2.7 e 2.8, respectivamente.



**Figura 2. 6:** Distribuição elementar ao longo dos anéis de crescimento da amostra 12-N pela técnica LA-ICP-MS.



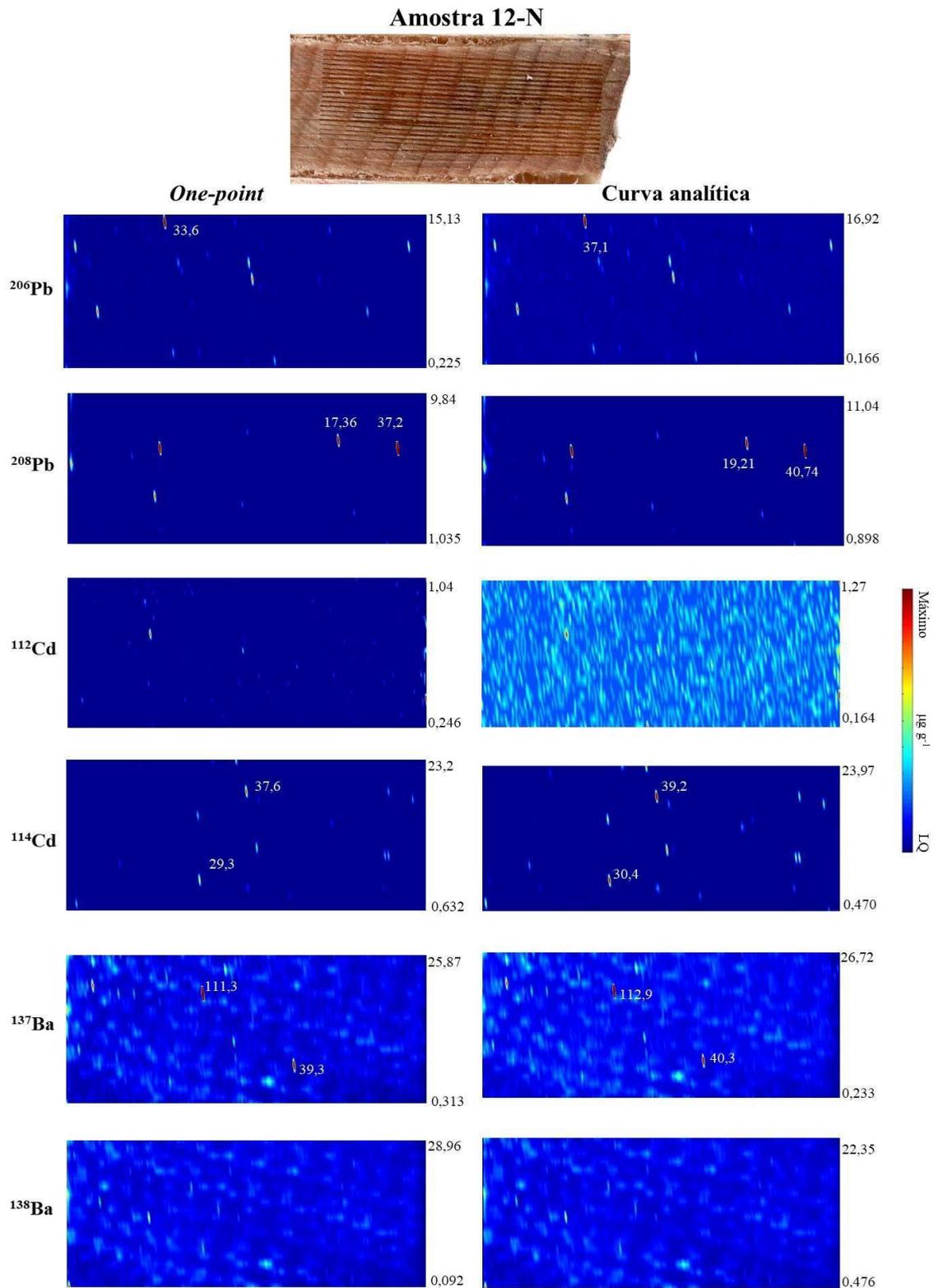
**Figura 2. 7:** Distribuição elementar ao longo dos anéis de crescimento da amostra 1-E pela técnica LA-ICP-MS.



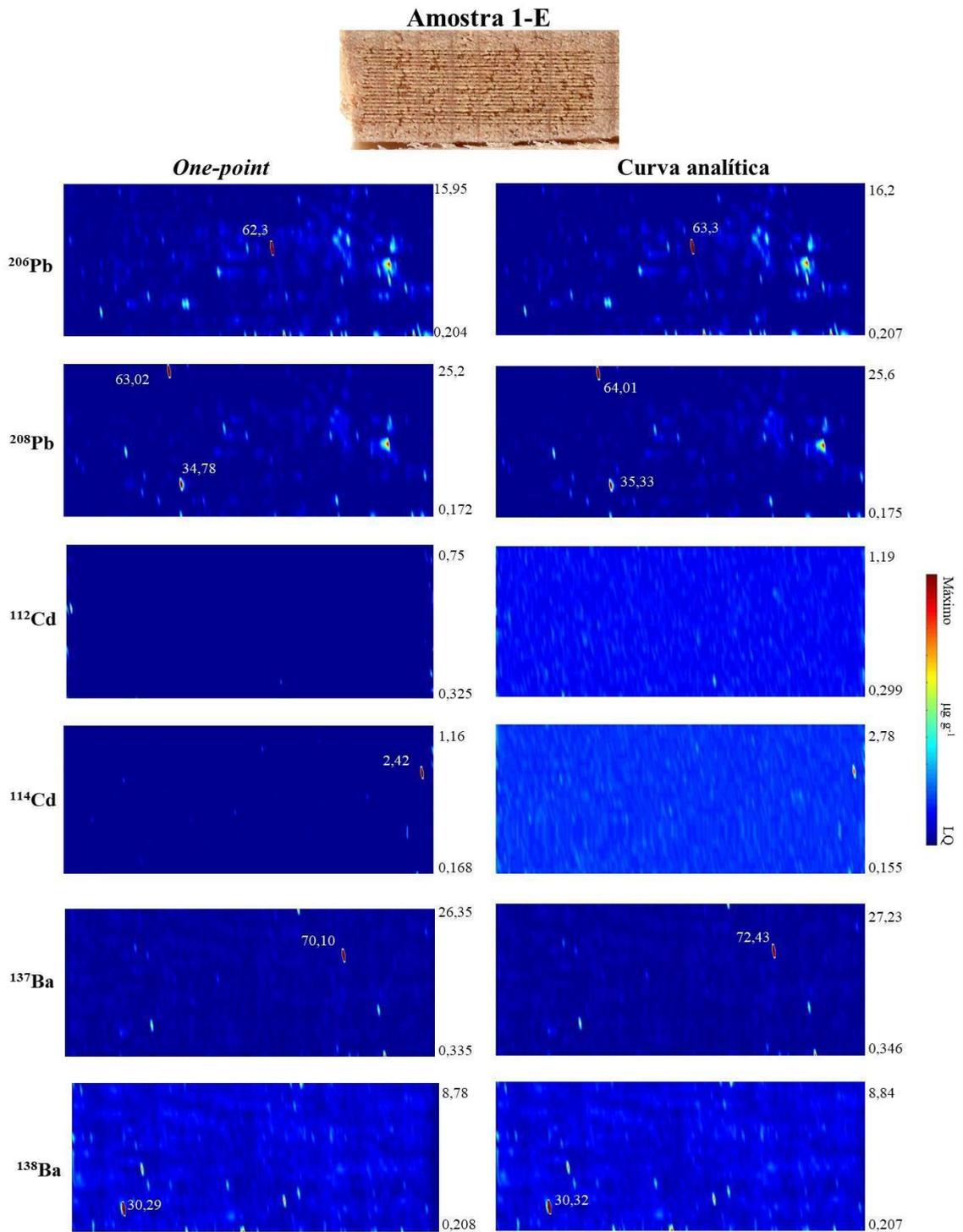
**Figura 2. 8:** Distribuição elementar ao longo dos anéis de crescimento da amostra 11-S pela técnica LA-ICP-MS.

Com os resultados exploratórios qualitativos fica evidente a diferença elementar entre as amostras, bem como a heterogeneidade entre os anéis de crescimento. Neste sentido a região de 13 à 23 mm da superfície da amostra 12-N e 0 a 10 mm das amostras 1-E e 11-S foram escolhidas para aplicação do método de imageamento quantitativo devido à alta intensidade de sinal encontrada para os isótopos avaliados. A diferença de disponibilidade elementar no solo ou ar atmosférico, como os possíveis meios de translocação elementar (via folhas e cascas das árvores, por meio do contato imediato pelos elementos do ar atmosférico, ou pelos vasos condutores das raízes, quando há certos tempos de exposição), podem ser os contribuintes externos que geram variações na presença dos analitos [84]. Estes resultados da heterogeneidade da distribuição elementar também evidenciam a necessidade das análises prévias das amostras, a fim da escolha de amostra e local de interesse para posterior aplicação do processo de imageamento, já que este processo demanda tempo e gasto excessivo em uma análise química.

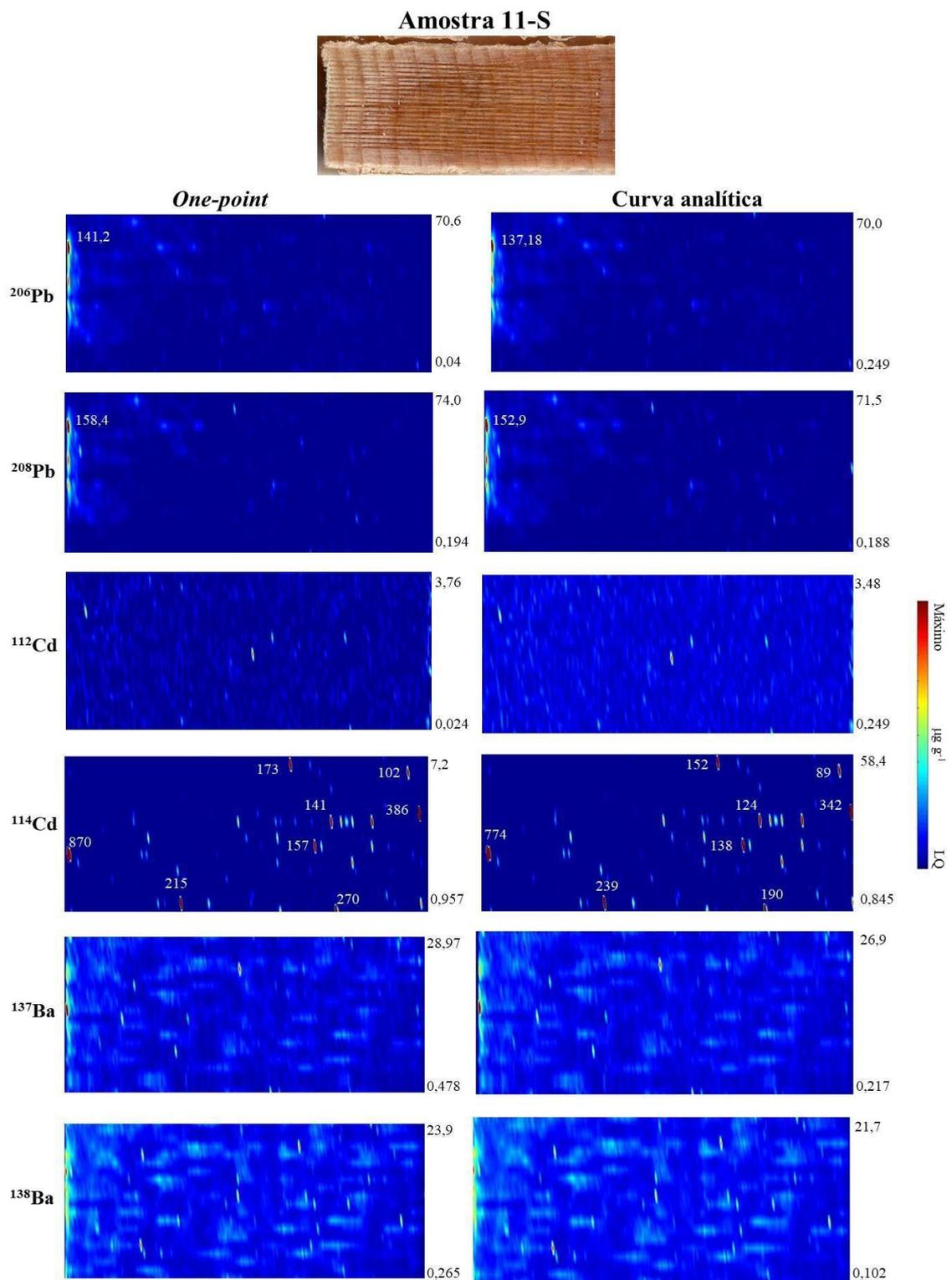
Após a análise exploratória e escolha do local na superfície de cada amostra, foi realizado o processo de imageamento quantitativo por meio da técnica LA-ICP-MS. Todos os resultados, dos métodos de quantificação avaliados, são apresentados nas Figuras 2.9, 2.10 e 2.11, nas quais *hotspots* de concentração podem ser observados por meio dos valores em branco apresentados.



**Figura 2. 9:** Imageamento quantitativo da amostra 12-N (*Araucária araucana*) por meio dos métodos de quantificação *one-point* e curva analítica e LA-ICP-MS (Imagens obtidas pelo software MatLab).



**Figura 2. 10:** Imageamento quantitativo da amostra 1-E (*Araucária araucana*) por meio dos métodos de quantificação *one-point* e curva analítica e LA-ICP-MS (Imagens obtidas pelo software MatLab).



**Figura 2. 11:** Imageamento quantitativo da amostra 11-S (*Araucária araucana*) por meio dos métodos de quantificação *one-point* e curva analítica e LA-ICP-MS (Imagens obtidas pelo software MatLab).

É possível notar que os resultados obtidos para os métodos quantitativos são similares quando se compara os maiores valores de concentração, como 158,4 e 152,9 µg g<sup>-1</sup> para <sup>208</sup>Pb,

e 23,9 e 21,7 para  $^{138}\text{Ba}$  na amostra 11-S por meio do método *one-point* e curva analítica, respectivamente, bem como entre os isótopos de um mesmo elemento.

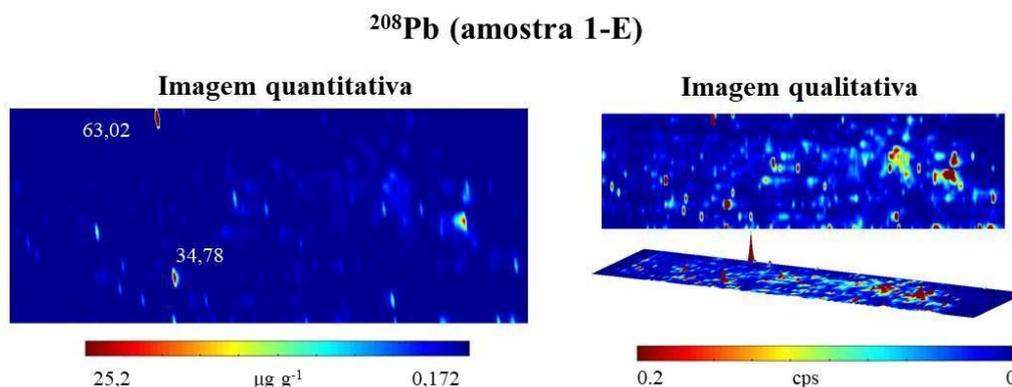
Porém, nas amostras 1-E e 12-N há diferenças no local dos *hotspots*, bem como na concentração quando se compara os valores obtidos entre os isótopos de um mesmo elemento. Este fator pode estar relacionado com a origem das amostras, pois são oriundas de um local com atividade vulcânica ativa. Assim, os processos físico-químicos que ocorrem no ambiente podem variar devido a liberação de aerossóis e gases químicos que afetam a irradiação solar e diminuem o pH das chuvas ocorridas na região, fatores que impactam diretamente na composição química e isotópica dos elementos presentes no solo e água, e, por consequência, das plantas [82–84].

Resultado similar foi observado por Varga *et al.* (2020), os quais observaram que duas amostras diferentes de  $\text{UO}_2$ , com abundância isotópica semelhante de  $^{235}\text{U}$ , podem mostrar heterogeneidade isotópica de  $^{235}\text{U}$  ( $^{235}\text{U}/^{238}\text{U}$ ) em nível micrométrico por meio de imagem qualitativa via multicoletor-LA-ICP-MS, resultado que foi comparado com as rotas diferentes de obtenção da amostra [95].

De acordo com Wiederhold (2015), a diferença na razão isotópica de elementos metálicos merece atenção na procura de novos traçadores de alterações ambientais, devido ao fracionamento isotópico que pode ocorrer em razão das alterações na precipitação, evaporação e outras reações químicas que podem ocorrer no ambiente [96]. Como a diferença isotópica aparenta ocorrer apenas na amostra de *Araucária araucana*, não sendo observado na matriz do *pellet* de quantificação, os resultados da concentração podem variar de acordo com o isótopo avaliado, como obtido para  $^{206}\text{Pb}$  e  $^{208}\text{Pb}$  na amostra 1-E.

Vale ressaltar que, por meio do imageamento quantitativo, não foi observado os anéis de crescimento, pois os analitos Pb e Cd não são inerentes a madeira, e apenas Ba pode ser observado ao longo da superfície. Este fato foi relatado por Amais *et al.* (2021) em imagens qualitativas, sendo o Ba àquele que pode ser relacionado com a divisão dos anéis de crescimento, em quatro espécies de madeira [42]. Em imagens qualitativas é possível mudanças dos valores máximos da escala de cor, ação não realizada em uma escala quantitativa, assim melhorando a visualização da distribuição elementar e dos anéis de crescimento. Neste sentido, a comparação entre a imagem quantitativa e qualitativa da distribuição de  $^{208}\text{Pb}$  na amostra 1-

E é apresentada na Figura 2.12, na qual regiões, de alta intensidade de sinal, podem ser vistas na imagem qualitativa, porém, menos visíveis em uma imagem quantitativa.



**Figura 2. 12:** Comparação entre a imagem quantitativa e qualitativa de  $^{208}\text{Pb}$  em uma amostra de Araucária araucana.

Quando comparada com a datação dos anéis de crescimento, esta variação pode estar relacionada com eventos ambientais, já que estas foram coletadas em regiões vulcânicas, como feito por Locosseli *et al.* (2018) ao observar a diminuição de Pb em anéis de crescimento de *Amburana cearenses* coletadas na cidade de São Paulo que, ao comparar com a datação, correlacionaram com a o período de diminuição de Pb na gasolina [86]. Pearson *et al.* (2005), também detectaram aumento de Al e Zn em amostras de *Pinus sylvestris* datadas e relacionaram esta variação com a possibilidade de mobilização de cátions bivalentes devido à acidificação do solo daquela região ocorrida pela ação vulcânica [83].

#### **4.2.5. Comparação entre imageamento quantitativo e quantificação total elementar em anéis de crescimento**

Na literatura científica é comum a comparação do valor de concentração obtido pelo método proposto com àquele obtido pelo método de referência, como a técnica ICP-MS para a avaliação da exatidão dos resultados obtidos pela técnica LA-ICP-MS [6,35]. Neste sentido, foi realizada a decomposição ácida assistida por micro-ondas apenas da região dos anéis de crescimento nos quais foi realizado o processo de imageamento quantitativo. Em razão da decomposição da amostra fornecer resultados da média da concentração da área, e não dos pontos heterogêneos individualmente, tais valores foram comparados com a média da concentração da área do imageamento quantitativo. Os resultados da quantificação total obtidos pela técnica ICP-MS, bem como pela técnica LA-ICP-MS (pelos métodos de quantificação

curva analítica e *one-point*), podem ser verificados na Tabela 2.8. É válido ressaltar que, como os resultados estão relacionados apenas com uma amostra de cada região, por não haver amostras-espelho, não há dados de desvio padrão entre réplicas.

**Tabela 2. 8:** Comparação entre a média da concentração total dos isótopos obtida por meio do imageamento quantitativo pelas técnicas LA-ICP-MS e ICP-MS da área analisada dos anéis de crescimento.

<b>Média da concentração (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>) da área analisada</b>			
<b>Amostra 12-N</b>			
<b>Isótopo</b>	<b>ICP-MS</b>	<b>Curva analítica (LA-ICP-MS)</b>	<b>One-point (LA-ICP-MS)</b>
$^{206}\text{Pb}$	<LQ	0,56	<LQ
$^{208}\text{Pb}$	<LQ	<LQ	<LQ
$^{112}\text{Cd}$	<LQ	0,43	<LQ
$^{114}\text{Cd}$	<LQ	<LQ	<LQ
$^{137}\text{Ba}$	1,91	3,55	2,85
$^{138}\text{Ba}$	2,16	3,48	<LQ
<b>Amostra 1-E</b>			
<b>Isótopo</b>	<b>ICP-MS</b>	<b>Curva analítica (LA-ICP-MS)</b>	<b>One-point (LA-ICP-MS)</b>
$^{206}\text{Pb}$	<LQ	0,53	0,513
$^{208}\text{Pb}$	<LQ	0,55	0,523
$^{112}\text{Cd}$	<LQ	0,54	<LQ
$^{114}\text{Cd}$	<LQ	0,59	<LQ
$^{137}\text{Ba}$	0,61	0,98	0,94
$^{138}\text{Ba}$	0,77	0,98	0,92
<b>Amostra 11-S</b>			
<b>Isótopo</b>	<b>ICP-MS</b>	<b>Curva analítica (LA-ICP-MS)</b>	<b>One-point (LA-ICP-MS)</b>
$^{206}\text{Pb}$	0,03	1,45	1,40
$^{208}\text{Pb}$	0,03	1,47	1,41
$^{112}\text{Cd}$	<LQ	<LQ	0,11
$^{114}\text{Cd}$	<LQ	<LQ	<LQ
$^{137}\text{Ba}$	2,07	3,15	3,19
$^{138}\text{Ba}$	2,44	3,19	3,25

Verifica-se que os isótopos de Pb apresentaram valores abaixo do LQ para as amostras 12-N e 1-E, bem como os isótopos de Cd para as três amostras avaliadas pela técnica ICP-MS. Este fato pode estar relacionado com a massa (aprox. 50 mg) de cada região decomposta não ser suficiente para proporcionar sensibilidade a análise e possibilitar a quantificação dos isótopos, pois, após a decomposição, diluições são necessárias para se adequar ao sistema de ICP-MS. Também verificou-se a similaridade ao comparar os resultados de concentração média

obtidos entre os métodos curva analítica e *one-point* pela técnica LA-ICP-MS para os isótopos de Ba nas três amostras, para os isótopos de Pb nas amostras 1-E e 11-S, e concentrações abaixo do LQ para os isótopos de Cd, demonstrando que os métodos são compatíveis entre si, como já observado no item 4.2.3. desta Tese.

Ao comparar os resultados encontrados na quantificação total de Pb pela técnica ICP-MS e pela técnica LA-ICP-MS na amostra 11-S (acima do LQ) observa-se maior concentração obtida pela análise via ablação a laser, pois, de acordo com o imageamento quantitativo apresentado na Fig. 2.10 (item 4.2.4), há uma alta concentração de Pb apenas no início dos anéis de crescimento (lateral esquerda da imagem), e, ao decompor a amostra, esta região micrométrica aparenta ser dissipada e/ou perdida durante o preparo de amostra, ocasionando em menores concentrações obtidas pela técnica ICP-MS após a decomposição e, assim, não sendo similar à concentração obtida anteriormente.

Quando se compara os valores obtidos para os isótopos de Ba verifica-se que há concordância entre os resultados obtidos de, aproximadamente, 130%. Este fato pode estar relacionado com a maior homogeneidade deste elemento ao longo da superfície dos anéis de crescimento em relação aos demais elementos, como observado nas imagens quantitativas apresentadas no item 4.2.4. Este fato também vai ao encontro dos resultados obtidos no imageamento quantitativo do CRM. Assim, conclui-se que, quanto maior a homogeneidade de um elemento, maior similaridade será observada entre os resultados de imageamento quantitativo e quantificação total.

Resultados similares já foram observados na literatura da não comparação entre as técnicas LA-ICP-MS e ICP-MS. Moreau e Arruda (2022), ao comparar as concentrações de Zn e Cu em CRM de folha de tomate (1573a), obtiveram uma recuperação entre 135 e 150% utilizando papel de filtro qualitativo como suporte sólido para os pontos de calibração na construção da curva analítica [90]. Devido a heterogeneidade dos anéis de crescimento, Loni *et al.* (2019) também não encontraram concordância entre a concentração de Hg em amostras de anéis de árvores da espécie *Quercus petraea*, comparando resultados entre as técnicas LA-ICP-MS e ICP-MS, em que se observou maiores resultados na análise de LA-ICP-MS [97]. Neste sentido, pode-se concluir que a heterogeneidade entre os anéis de crescimento influencia negativamente na comparação entre os resultados quantitativos do LA-ICP-MS e do ICP-MS, pois este tipo de matriz apresenta heterogeneidade em regiões micrométricas.

Assim, cresce a preocupação em como validar os dados de imageamento quantitativo pela técnica LA-ICP-MS quando se trata de amostras heterogêneas. A partir da revisão da literatura [6], percebe-se o crescimento de análises multimodais, ou seja, análises em que há a união entre duas ou mais técnicas que forneçam resultados similares, como duas técnicas de imageamento, a fim de validação ou complementação de dados. [35]. Como exemplo, Ackerman *et al.* (2018) utilizaram as técnicas LA-ICP-MS e nanoSIMS para avaliar e validar a distribuição subcelular de Cu em uma análise de *zebrafish* para avaliação da doença de Menkes [98], bem como Lützen *et al.* (2020) aplicaram as técnicas LA-ICP OES e  $\mu$ XRF para avaliação de cloro e iodo em alucinógenos moleculares, também avaliados por MALDI-MS e imageamento [99].

Galiová *et al.* (2008) demonstraram uma boa concordância entre LA-ICP-MS e LIBS ao avaliar a distribuição espacial de Cu e Ag em girassóis. Ambas as técnicas mostraram uma elevada intensidade de sinal da Ag na mesma região da amostra (as áreas das nervuras centrais) e apenas um ligeiro aumento do sinal do Cu na veia central da amostra [100]. Portanto, parece ser que o método multimodal se mostra viável para futuras validações de imageamento quantitativo para amostras heterogêneas como os anéis de crescimento.

## 5. CONCLUSÕES PARCIAIS

O Capítulo II desta Tese teve como objetivo a avaliação dos métodos de quantificação elementar para a obtenção de imagens quantitativas de Pb, Cd e Ba ao longo da superfície de anéis de crescimento.

Primeiramente, ao avaliar o processo de preparo do *pellet* para obter padrões analíticos, pode ser observado que a liofilização auxilia na obtenção de maiores valores de intensidade de sinal e menor variação analítica; assim sendo, este método foi aplicado para a obtenção dos *pellets* utilizados na quantificação elementar total e via imagem por meio da calibração externa e *one-point* em amostras de madeira.

De acordo com os resultados obtidos na quantificação total de Pb, Cd e Ba em amostras de CRMs, foi possível concluir que ambas as estratégias de calibração propostas são eficientes e passíveis de aplicação em imageamento quantitativo. Ao realizar a comparação entre os métodos, percebe-se que aquele via *one-point* apresentou os valores mais adequados de

recuperação analítica, menores valores de RSD para os isótopos em estudo, sendo, portanto, considerado exato e preciso para a aplicação quantitativa em amostras de anéis de crescimento.

Ao aplicar o método de imageamento quantitativo, tanto na superfície do CRM *Pinus Needles*, bem como em três amostras de *Araucária araucana*, foi possível observar que os resultados obtidos para ambos os métodos quantitativos são similares quando se compara os maiores valores de concentração encontrados ao longo da superfície. Porém, em duas amostras de *Araucária araucana* houve diferenças nos locais de alta concentração quando os valores obtidos entre os isótopos de um mesmo elemento são avaliados, podendo estar relacionada com as diferenças na composição isotópica dos elementos devido a mudanças ambientais que podem ocorrer em locais com ação vulcânica, influenciando diretamente na intensidade de sinal obtida para o isótopo.

No comparativo e validação dos resultados de imagem quantitativa das amostras de *A. araucana* pela técnica ICP-MS, foi possível verificar que os elementos que possuem alta heterogeneidade ao longo da superfície podem apresentar resultados diferentes para cada técnica devido a necessidade (ou não) de preparo de amostra. Assim, a validação de imageamento quantitativo pode ser realizada por meio de análises multimodais com técnicas que irão fornecer resultados de imagem, assim como a técnica LA-ICP-MS.

Neste caso, pode-se concluir que os objetivos desta etapa do trabalho foram alcançados, e que os resultados obtidos dão margem para futuros estudos de imageamento quantitativo via LA-ICP-MS em anéis de crescimento.

## II. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Durante o desenvolvimento desta pesquisa foi possível evidenciar a aplicabilidade da técnica LA-ICP-MS para análise de imageamento qualitativo, bem como quantitativo, em dois tipos diferentes de amostras ambientais: espeleotemas e anéis de crescimento de árvore. Neste sentido, foi possível verificar quais os reais parâmetros da técnica LA-ICP-MS que irão impactar diretamente a obtenção de imagens elementares condizentes com a realidade de cada amostra avaliada, bem como maneiras de se transformar a informação qualitativa em quantitativa a nível micrométrico.

Ao longo desta tese também é possível observar esforços analíticos para a escolha das condições de trabalho que permitiram conseguir atingir os objetivos preestabelecidos, bem

como apresentar resultados confiáveis. Este fato se inicia na preocupação com a otimização das condições experimentais através de planejamentos experimentais e análise de efeito, no estudo dos parâmetros de ablação a laser que impactam na resolução das imagens que foram obtidas, no estudo de preparo de pontos de calibração para a avaliação de métodos de quantificação, bem como de todas as etapas de validação analítica.

Desta forma, no Capítulo I foi possível obter resultados de imagem qualitativa elementar para amostras de espeleotema com alta resolução espacial, as quais permitiram verificar que (i) quanto maior o diâmetro do *spot* e maior a intensidade do laser, maiores os sinais analíticos, resultando assim em melhorias na sensibilidade do método; (ii) quanto menor for a velocidade de ablação, maior será a resolução espacial da imagem obtida, porém maior será o tempo de análise; (iii) o padrão interno  $\text{Ca}^{44}$  não impacta na resolução de imagem e (iv) que há similaridade entre as regiões de concentração dos elementos Ba, Sr e Mg na superfície de espeleotemas, os quais podem estar relacionados com eventos de alterações paleoclimáticas.

Já no Capítulo II, estudar a transformação das informações espaciais qualitativas em quantitativas possibilitou a avaliação de dois métodos de quantificação pela técnica LA-ICP-MS, conhecidos como curva analítica e one-point. Neste caso, foi possível verificar (i) a influência do preparo de amostras para a construção de padrões sólidos; (ii) a similaridade entre os métodos de quantificação avaliados, seja na quantificação total de Pb, Cd e Ba em materiais certificados, como no processo de imageamento quantitativo em anéis de crescimento. Com este Capítulo, também foi possível verificar a influência da heterogeneidade da matriz na busca da validação dos resultados com técnicas convencionais, assim alertando para a busca de novas maneiras de se validar resultados de imagem quantitativa para além da quantificação total via ICP-MS.

Neste sentido, como perspectivas, é possível pensar no futuro de imageamento pela técnica LA-ICP-MS, principalmente através da quantificação, com a aplicação de métodos multimodais para a validação de imageamento quantitativo quando se trata de amostras heterogêneas a nível microscópicos, pois assim os dados serão comparáveis em termos de fornecerem o mesmo estilo de resultados, ou seja, através de imagens.

### III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] T. Van Acker, T. Buckle, S.J.M. Van Malderen, D.M. van Willigen, V. van Unen, F.W.B. van Leeuwen, F. Vanhaecke, High-resolution imaging and single-cell analysis via laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry for the determination of membranous receptor expression levels in breast cancer cell lines using receptor-specific hybrid tracers, *Anal Chim Acta.* 1074 (2019) 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.04.064>.
- [2] E.J. Lanni, S.S. Rubakhin, J. V. Sweedler, Mass spectrometry imaging and profiling of single cells, *J Proteomics.* 75 (2012) 5036–5051. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.017>.
- [3] E. Baltrenaite, D. Butkus, C.A. Booth, Comparison of three tree-ring sampling methods for trace metal analysis, *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management.* 18 (2010) 170–178. <https://doi.org/10.3846/jeelm.2010.20>.
- [4] D. Barańkiewicz, M. Kózka, A. Piechalak, B. Tomaszewska, P. Sobczak, Determination of cadmium and lead species and phytochelatins in pea (*Pisum sativum*) by HPLC – ICP-MS and HPLC – ESI-MSn, *Talanta.* 79 (2009) 493–498. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.04.026>.
- [5] D. Da Silva Francischini, A.P. Lopes, M.L. Segatto, A.M. Stahl, V.G. Zuin, Development and application of green and sustainable analytical methods for flavonoid extraction from *Passiflora* waste, *BMC Chem.* 14 (2020) 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13065-020-00710-5>.
- [6] D.S. Francischini, M.A.Z. Arruda, When a picture is worth a thousand words: molecular and elemental imaging applied to environmental analysis – A review, *Microchemical Journal.* 169 (2021) 106526. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106526>.
- [7] E.J. Mcallum, D.J. Hare, From niche methods to necessary tools: The growing importance of analytical atomic spectrometry in metal imaging in neuroscience, *Spectrochimica Acta Part B.* 156 (2019) 20–32. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2019.04.009>.

- [8] W. Michno, P.M. Wehrli, K. Blennow, H. Zetterberg, J. Hanrieder, Molecular imaging mass spectrometry for probing protein dynamics in neurodegenerative disease pathology, *J Neurochem.* 151 (2019) 488–506. <https://doi.org/10.1111/jnc.14559>.
- [9] C.R. Anderton, Mass spectrometry imaging: Methodology and applications, in: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, Third, Elsevier Ltd., 2016: pp. 719–727. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12135-3>.
- [10] R. Weiskirchen, S. Weiskirchen, P. Kim, R. Winkler, Software solutions for evaluation and visualization of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry imaging (LA-ICP-MSI) data: A short overview, *J Cheminform.* 11 (2019) 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13321-019-0338-7>.
- [11] Y. Garini, I.T. Young, G. Mcnamara, *Spectral Imaging: Principles and Applications*, *Cytometry Part A.* 69A (2006) 735–747. <https://doi.org/10.1002/cyto.a>.
- [12] D.J. Hare, E.J. New, M.D. Jonge, G. Mccoll, Imaging metals in biology: balancing sensitivity, selectivity and spatial resolution, *Chem Soc Rev.* 44 (2015) 5941. <https://doi.org/10.1039/c5cs00055f>.
- [13] W.X. Wang, S.N. Whitehead, Imaging mass spectrometry allows for neuroanatomic-specific detection of gangliosides in the healthy and diseased brain, *Analyst.* 145 (2020) 2473–2481. <https://doi.org/10.1039/c9an02270h>.
- [14] J. Hu, P. Yang, X. Hou, Atomic spectrometry and atomic mass spectrometry in bioanalytical chemistry, *Appl Spectrosc Rev.* 54 (2019) 180–203. <https://doi.org/10.1080/05704928.2018.1553047>.
- [15] J. Koch, D. Günther, *Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry.* (2017) 526–532. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00024-8>.
- [16] J. Koch, D. Günther, Review of the state-of- The-art of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Appl Spectrosc.* 65 (2011) 155–162. <https://doi.org/10.1366/11-06255>.

- [17] D. Hare, C. Austin, P. Doble, Quantification strategies for elemental imaging of biological samples using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Analyst*. 137 (2012) 1527–1537. <https://doi.org/10.1039/c2an15792f>.
- [18] N.S. Mokgalaka, J.L.G. Torresdey, Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Principles and Applications, *Appl Spectrosc Rev.* 41 (2006) 131–150. <https://doi.org/10.1080/05704920500510703>.
- [19] G.D.S. Pessôa, J.L. Capelo-Martínez, F. Fdez-Riverola, H. López-Fernández, D. Glez-Peña, M. Reboiro-Jato, M.A.Z. Arruda, Laser ablation and inductively coupled plasma mass spectrometry focusing on bioimaging from elemental distribution using MatLab software: A practical guide, *J Anal At Spectrom.* 31 (2016) 832–840. <https://doi.org/10.1039/c5ja00451a>.
- [20] H.L. Fernández, G.D.S. Pessôa, M.A.Z. Arruda, J.L.C. Martínez, F.F. Riverola, D.G. Peña, M.R. Jato, LA-iMageS: a software for elemental distribution bioimaging using LA-ICP-MS data, *J Cheminform.* 8 (2016) 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13321-016-0178-7>.
- [21] V.C. Costa, D. V Babos, J.P. Castro, D.F. Andrade, R.R. Gamela, R.C. Machado, M.A. Sperança, A.S. Araújo, J.A. Garcia, E.R. Pereira-Filho, Calibration Strategies Applied to Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: A Critical Review of Advances and Challenges, *J. Braz. Chem. Soc.* 31 (2020) 2439–2451. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20200175>.
- [22] G.D.S. Pessôa, C.A. Lopes, K.C. Madrid, M.A.Z. Arruda, A quantitative approach for Cd, Cu, Fe and Mn through laser ablation imaging for evaluating the translocation and accumulation of metals in sun flower seeds, *Talanta*. 167 (2017) 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.02.029>.
- [23] K.P. Jochum, B. Stoll, K. Herwig, M. Willbold, Validation of LA-ICP-MS trace element analysis of geological glasses using a new solid-state 193 nm Nd:YAG laser and matrix-matched calibration, *J Anal At Spectrom.* 22 (2007) 112–121. <https://doi.org/10.1039/b609547j>.
- [24] M.P. CHAGAS, Anéis de crescimento do lenho de árvores como monitores ambientais : avaliação temporal e espacial da poluição atmosférica na cidade de Paulínia, São Paulo,

- Tese (Doutorado), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. (2013).
- [25] K.P. Jochum, D. Scholz, B. Stoll, U. Weis, S.A. Wilson, Q. Yang, A. Schwab, N. Börner, D.E. Jacob, M.O. Andreae, Accurate trace element analysis of speleothems and biogenic calcium carbonates by LA-ICP-MS, *Chem Geol.* 318–319 (2012) 31–44. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2012.05.009>.
- [26] M. Allan, A. Delière, S. Verheyden, S. Nicolay, Y. Quinif, N. Fagel, Evidence for solar influence in a Holocene speleothem record (Père Noël cave, SE Belgium), *Quat Sci Rev.* 192 (2018) 249–261. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2018.05.039>.
- [27] D. da S. Francischini, R.S. Amais, N.M. Strikis, M.A.Z. Arruda, Qualitative Imaging of Elemental Spatial Distribution in Stalagmites through Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Analysis, *Brazilian Journal of Analytical Chemistry.* 10 (2022) 48–59. <https://doi.org/10.30744/brjac.2179-3425.AR-16-2022>.
- [28] K. Jurowski, B. Buszewski, W. Piekoszewski, Bioanalytics in Quantitative (Bio)imaging/Mapping of Metallic Elements in Biological Samples, *Crit Rev Anal Chem.* 45 (2015) 334–347. <https://doi.org/10.1080/10408347.2014.941455>.
- [29] J.S. Becker, R.C. Dietrich, A. Matusch, D. Pozebon, V.L. Dressler, Quantitative images of metals in plant tissues measured by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 63 (2008) 1248–1252. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2008.08.001>.
- [30] K. Chacón-Madrid, M.A.Z. Arruda, Internal standard evaluation for bioimaging soybean leaves through laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: a plant nanotechnology approach, *J. Anal. At. Spectrom.* 33 (2018) 1720–1728. <https://doi.org/10.1039/c8ja00254a>.
- [31] K. Löhr, H. Traub, A.J. Wanka, U. Panne, N. Jakubowski, Quantification of metals in single cells by LA-ICP-MS: Comparison of single spot analysis and imaging, *J Anal At Spectrom.* 33 (2018) 1579–1587. <https://doi.org/10.1039/c8ja00191j>.
- [32] A. Sussulini, J.S. Becker, J.S. Becker, Laser ablation ICP-MS: application in biomedical research, *Mass Spectrom Rev.* 36 (2017) 47–57. <https://doi.org/10.1002/mas.21481>.

- [33] J.S. Becker, D. Salber, New mass spectrometric tools in brain research, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 29 (2010) 966–979. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.06.009>.
- [34] B. Crone, L. Schlatt, R.A. Nadar, N.W.M. van Dijk, N. Margiotta, M. Sperling, S. Leeuwenburgh, U. Karst, Quantitative imaging of platinum-based antitumor complexes in bone tissue samples using LA-ICP-MS, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 54 (2019) 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.04.011>.
- [35] R.S. Amais, D.S. Francischini, P.S. Moreau, M.A.Z. Arruda, Laser Chemical Elemental Analysis: From Total to Images, in: *Laser Ablation*, IntechOpen, 2020: pp. 1–23. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94385>.
- [36] A. Gundlach-Graham, D. Günther, Toward faster and higher resolution LA-ICPMS imaging: On the co-evolution of la cell design and ICPMS instrumentation, *Anal Bioanal Chem*. 408 (2016) 2687–2695. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9251-8>.
- [37] B. Zhang, M. He, W. Hang, B. Huang, Minimizing matrix effect by femtosecond laser ablation and ionization in elemental determination, *Anal Chem*. 85 (2013) 4507–4511. <https://doi.org/10.1021/ac400072j>.
- [38] D. Pozebon, G.L. Scheffler, V.L. Dressler, Recent applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) for biological sample analysis: A follow-up review, *J Anal At Spectrom*. 32 (2017) 890–919. <https://doi.org/10.1039/c7ja00026j>.
- [39] M.T. Westerhausen, D.P. Bishop, A. Dowd, J. Wanagat, N. Cole, P.A. Doble, Super-Resolution Reconstruction for Two-and Three-Dimensional LA-ICP-MS Bioimaging, *Anal Chem*. 91 (2019) 14879–14886. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02380>.
- [40] M. Weber, J.A. Wassenburg, K. Peter, S.F.M. Breitenbach, J. Oster, D. Scholz, Sr-isotope analysis of speleothems by LA-MC-ICP-MS : High temporal resolution and fast data acquisition, *Chem Geol*. 468 (2017) 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2017.08.012>.
- [41] B. Neumann, S. Hösl, K. Schwab, F. Theuring, N. Jakubowski, Multiplex LA-ICP-MS bio-imaging of brain tissue of a parkinsonian mouse model stained with metal-coded affinity-tagged antibodies and coated with indium-spiked commercial inks as internal

- standards, *J Neurosci Methods*. 334 (2020).  
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108591>.
- [42] R.S. Amais, P.S. Moreau, D.S. Francischini, R. Magnusson, G.M. Locosselli, M. Godoy-Veiga, G. Ceccantini, D.R. Ortega Rodriguez, M. Tomazello-Filho, M.A.Z. Arruda, Trace elements distribution in tropical tree rings through high-resolution imaging using LA-ICP-MS analysis, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 68 (2021).  
<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2021.126872>.
- [43] E.R. Pereira-Filho, *Factorial design in chemistry: maximising the obtaining of results*, EdUFSCar, 2015.
- [44] C.G. Novaes, *Aplicação de técnicas quimiométricas na otimização de métodos usando a Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado e Espectrometria de Absorção Atômica com Chama visando a análise de amostras ambientais*, Tese (Doutorado), Instituto de Química, Universidade Federal Da Bahia, Salvador. (2011).
- [45] C. G. Novaes, S. L.C. Ferreira, J. H.S. Neto, F. A. de Santana, L. A. Portugal, H. C. Goicoechea, A Multiple Response Function for Optimization of Analytical Strategies Involving Multi-elemental Determination, *Curr Anal Chem*. 12 (2016) 94–101.  
<https://doi.org/10.2174/1573411011666150722220335>.
- [46] D.F. Andrade, M.A. Sperança, E.R. Pereira-Filho, Different sample preparation methods for the analysis of suspension fertilizers combining LIBS and liquid-to-solid matrix conversion: determination of essential and toxic elements, *Analytical Methos*. 9 (2017) 5156–5164. <https://doi.org/10.1039/C7AY01049D>.
- [47] F.M. Fortunato, T.A. Catelani, M.S. Pomares-Alfons, E.R. Pereira-Filho, Application of Multi-energy Calibration for Determination of Chromium and Nickel in Nickeliferous Ores by Laser-induced Breakdown Spectroscopy, *Analytical Sciences*. 35 (2019) 165–168. <https://doi.org/10.2116/analsci.18P286>.
- [48] R.E.S. Froes, W. Borges Neto, R.L.P. Naveira, N.C. Silva, C.C. Nascentes, J.B.B. da Silva, Exploratory analysis and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) applied in the determination of metals in soft drinks, *Microchemical Journal*. 92 (2009) 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2008.12.008>.

- [49] R.R.A. Peixoto, A. Oliveira, S. Cadore, Multielemental determinations in chocolate drink powder using multivariate optimization and ICP OES, *J Agric Food Chem.* 60 (2012) 8117–8122. <https://doi.org/10.1021/jf303022r>.
- [50] A.P. Ballantyne, P.A. Baker, J.Q. Chambers, R. Villalba, J. Argollo, Regional Differences in South American Monsoon Precipitation Inferred from the Growth and Isotopic Composition of Tropical Trees \*, *Earth Interact.* 15 (2011). <https://doi.org/10.1175/2010EI277.1>.
- [51] S.J. Burns, L.K. Welsh, N. Scropton, H. Cheng, R.L. Edwards, Millennial and orbital scale variability of the South American Monsoon during the penultimate glacial period, *Sci Rep.* 9 (2019) 4–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37854-3>.
- [52] A.M. GRIMM, The El Niño Impact on the Summer Monsoon in Brazil : Regional Processes versus Remote Influences, *American Meteorological Society.* 16 (2003).
- [53] H. Zhang, Y. Cai, L. Tan, S. Qin, Z. An, Stable isotope composition alteration produced by the aragonite-to-calcite transformation in speleothems and implications for paleoclimate reconstructions, *Sediment Geol.* 309 (2014) 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.sedgeo.2014.05.007>.
- [54] R.C. Casteel, J.L. Banner, Temperature-driven seasonal calcite growth and drip water trace element variations in a well-ventilated Texas cave: Implications for speleothem paleoclimate studies, *Chem Geol.* 392 (2015) 43–58. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2014.11.002>.
- [55] A.N. Meckler, H. Vonhof, A. Martínez-García, Temperature reconstructions using speleothems, *Elements.* 17 (2021) 101–106. <https://doi.org/10.2138/GSELEMENTS.17.2.101>.
- [56] I.J. Fairchild, E.A. Mcmillan, Speleothems as indicators of wet and dry periods, *International Journal of Speleology* . 36 (2007) 69–74. [www.ij.speleo.it](http://www.ij.speleo.it).
- [57] A.R. Paine, J.U.L. Baldini, F.B. Wadsworth, F.A. Lechleitner, R.A. Jamieson, L.M. Baldini, R.J. Brown, W. Müller, H. Hercman, M. Gąsiorowski, K. Stefaniak, P. Socha, A. Sobczyk, M. Kasprzak, The trace-element composition of a Polish stalagmite: Implications for the use of speleothems as a record of explosive volcanism, *Chem Geol.* 570 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2021.120157>.

- [58] I.J. Fairchild, A. Baker, *Speleothem Science: From Process to Past Environments*, John Wiley and Sons, 2012. <https://doi.org/10.1002/9781444361094.app1>.
- [59] W. Dreybrodt, Chemical kinetics, speleothem growth and climate, *Boreas*. 28 (2008) 347–356. <https://doi.org/10.1111/j.1502-3885.1999.tb00224.x>.
- [60] D.F.C. Riechelmann, S. Riechelmann, J.A. Wassenburg, J. Fohlmeister, B.R. Schöne, K.P. Jochum, D.K. Richter, D. Scholz, High-Resolution Proxy Records From Two Simultaneously Grown Stalagmites From Zoolithencave (Southeastern Germany) and their Potential for Palaeoclimate Reconstruction, *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*. 21 (2020) 0–2. <https://doi.org/10.1029/2019GC008755>.
- [61] R.N. Drysdale, G. Zanchetta, I. Baneschi, M. Guidi, I. Isola, I. Couchoud, L. Piccini, A. Greig, H. Wong, J.D. Woodhead, E. Regattieri, E. Corrick, B. Paul, C. Spötl, E. Denson, J. Gordon, S. Jaillet, F. Dux, J.C. Hellstrom, Partitioning of Mg, Sr, Ba and U into a subaqueous calcite speleothem, *Geochim Cosmochim Acta*. 264 (2019) 67–91. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2019.08.001>.
- [62] O. Chaldeckas, A. Vaks, I. Haviv, A. Gerdes, R. Albert, U-Pb speleothem geochronology reveals a major 6 Ma uplift phase along the western margin of Dead Sea Transform, *Geol Soc Am Bull*. 134 (2022) 1571–1584. <https://doi.org/10.1130/B36051.1>.
- [63] S. Vansteenberge, N. J. De Winter, M. Sinnesael, M. Sinnesael, S. Verheyden, P. Claeys, S. J. M. Van Malderen, F. Vanhaecke, Reconstructing seasonality through stable-isotope and trace-element analyses of the Proserpine stalagmite, Han-sur-Lesse cave, Belgium: Indications for climate-driven changes during the last 400 years, *Climate of the Past*. 16 (2020) 141–160. <https://doi.org/10.5194/cp-16-141-2020>.
- [64] S.I. Cantarero, J.T.I. Tanzil, N.F. Goodkin, Simultaneous analysis of Ba and Sr to Ca ratios in scleractinian corals by inductively coupled plasma optical emissions spectrometry, *Limnol Oceanogr Methods*. 15 (2017) 116–123. <https://doi.org/10.1002/lom3.10152>.
- [65] S.F. Durrant, Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: achievements, problems, prospects, *J. Anal. At. Spectrom*. 14 (1999) 1385–1403. <https://doi.org/10.1039/a901765h>.

- [66] A. Limbeck, P. Galler, M. Bonta, G. Bauer, W. Nischkauer, F. Vanhaecke, Recent advances in quantitative LA-ICP-MS analysis: Challenges and solutions in the life sciences and environmental chemistry, *Anal Bioanal Chem.* 407 (2015) 6593–6617. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8858-0>.
- [67] J.M. Vadillo, I. Vadillo, F. Carrasco, J.J. Laserna, Spatial distribution profiles of magnesium and strontium in speleothems using laser-induced breakdown spectrometry, *Fresenius J Anal Chem.* 361 (1998) 119–123. <https://doi.org/10.1007/s002160050846>.
- [68] T. Takahashi, B. Thornton, Quantitative methods for compensation of matrix effects and self-absorption in Laser Induced Breakdown Spectroscopy signals of solids, *Spectrochimica Acta Part B.* 138 (2017) 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2017.09.010>.
- [69] D. Li, L. Tan, F. Guo, Y. Cai, Y. Sun, G. Xue, X. Cheng, H. Yan, H. Cheng, R.L. Edwards, Y. Gao, J. Kelley, Application of Avaatech X-ray fluorescence core-scanning in Sr/Ca analysis of speleothems, *Sci China Earth Sci.* 62 (2019) 964–973. <https://doi.org/10.1007/s11430-018-9344-2>.
- [70] I.J. Fairchild, P.C. Treble, Trace elements in speleothems as recorders of environmental change, *Quat Sci Rev.* 28 (2009) 449–468. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2008.11.007>.
- [71] K.P. Jochum, D. Scholz, B. Stoll, U. Weis, S.A. Wilson, Q. Yang, A. Schwab, N. Börner, D.E. Jacob, M.O. Andreae, Accurate trace element analysis of speleothems and biogenic calcium carbonates by LA-ICP-MS, *Chem Geol.* 318–319 (2012) 31–44. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2012.05.009>.
- [72] D. Hare, C. Austin, P. Doble, M. Arora, Elemental bio-imaging of trace elements in teeth using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *J Dent.* 39 (2011) 397–403. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2011.03.004>.
- [73] A.B. Moradi, S. Swoboda, B. Robinson, T. Prohaska, A. Kaestner, S.E. Oswald, W.W. Wenzel, R. Schulin, Mapping of nickel in root cross-sections of the hyperaccumulator plant *Berkheya coddii* using laser ablation ICP-MS, *Environ Exp Bot.* 69 (2010) 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.02.001>.

- [74] M.C. Santos, M. Wagner, B. Wu, J. Scheider, J. Oehlmann, S. Cadore, J.S. Becker, Biomonitoring of metal contamination in a marine prosobranch snail (*Nassarius reticulatus*) by imaging laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS), *Talanta*. 80 (2009) 428–433. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.06.080>.
- [75] A. Virgilio, A.B.S. Silva, A.R.A. Nogueira, J.A. Nóbrega, G.L. Donati, Calculating limits of detection and defining working ranges for multi-signal calibration methods, *J Anal At Spectrom.* 35 (2020) 1614–1620. <https://doi.org/10.1039/d0ja00212g>.
- [76] IUPAC, *Compendium of Chemical Terminology - Gold Book*, 2012. <https://doi.org/https://doi.org/10.1351/goldbook>.
- [77] ICH, *Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology Q2 (R1)*, International Conference on Harmonization (ICH). 1994 (2005) 17. [https://doi.org/http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](https://doi.org/http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf).
- [78] S.G. Pallardy, *The Woody Plant Body*, in: *Physiology of Woody Plants*, Academic Press, 2008: pp. 9–38. <https://doi.org/10.1016/b978-012088765-1.50003-8>.
- [79] A. Andrade, *Guia básico para a instalação de pisos de madeira*, 2nd ed., ANPM, Piracicaba, 2015.
- [80] P.P. Mattos, *Identificação de anéis anuais de crescimento e estimativa de idade e incremento anual em diâmetro de espécies nativas do pantanal da Nhecolândia, MS*, 1999.
- [81] E. Wheeler, *Wood: Macroscopic Anatomy*, *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*. (2001) 9653–9657. <https://doi.org/10.1016/b0-08-043152-6/01749-6>.
- [82] Z. Siklósy, A. Demény, T.W. Vennemann, S. Pilet, J. Kramers, S. Leél-Óssy, M. Bondár, C.-C. Shen, E. Hegner, Bronze Age volcanic event recorded in stalaagmites by combined isotope and trace element studies, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 23 (2009) 801–808. <https://doi.org/10.1002/rcm>.

- [83] C. Pearson, S.W. Manning, M. Coleman, K. Jarvis, Can tree-ring chemistry reveal absolute dates for past volcanic eruptions?, *J Archaeol Sci.* 32 (2005) 1265–1274. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2005.03.007>.
- [84] R. Alfaro-Sánchez, J.J. Camarero, J.I. Querejeta, J. Sagra, D. Moya, D.A. Rodríguez-Trejo, Volcanic activity signals in tree-rings at the treeline of the Popocatepetl, Mexico, *Dendrochronologia* (Verona). 59 (2020) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.dendro.2020.125663>.
- [85] K.L. Padilla, K.A. Anderson, Trace element concentration in tree-rings biomonitoring centuries of environmental change, *Chemosphere.* 49 (2002) 575–585. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00402-2](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00402-2).
- [86] G.M. Locosselli, K. Chaccon-Madrid, M.A.Z.A. Arruda, E.P. Camargo, T.C.L. Moreira, J.M. Singer, P.A. André, C.D.S. André, M.S. Buckeridge, Tree rings reveal the reduction of Cd, Cu, Ni and Pb pollution in the central region of São Paulo, Brazil, *Environmental Pollution.* 242 (2018) 320–328. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.098>.
- [87] A.R. Bukata, T.K. Kyser, Tree-ring elemental concentrations in oak do not necessarily passively record changes in bioavailability, *Science of the Total Environment.* 390 (2008) 275–286. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.09.005>.
- [88] A. Märten, D. Berger, M. Köhler, D. Merten, The dendroanalysis of oak trees as a method of biomonitoring past and recent contamination in an area influenced by uranium mining, *Environmental Science and Pollution Research.* 22 (2015) 19417–19425. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4902-z>.
- [89] J.G. Arco Molina, M.A. Hadad, D. Patón Domínguez, F.A. Roig, Tree age and bark thickness as traits linked to frost ring probability on *Araucaria araucana* trees in northern Patagonia, *Dendrochronologia* (Verona). 37 (2016) 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.dendro.2016.01.003>.
- [90] P. dos S. Moreau, M.A.Z. Arruda, Direct analysis of tree rings using laser ablation-ICP-MS and quantitative evaluation of Zn and Cu using filter paper as a solid support for calibration, *J Anal At Spectrom.* 37 (2022) 795–804. <https://doi.org/10.1039/d1ja00414j>.
- [91] D.M. Silvestre, F. de Oliveira Leme, C.S. Nomura, A.N. do Nascimento, Direct analysis of barium, calcium, potassium, and manganese concentrations in tobacco by laser-

- induced breakdown spectroscopy, *Microchemical Journal*. 126 (2016) 545–550. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.01.015>.
- [92] A.G. González, M.Á. Herrador, A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles, *Trends in Analytical Chemistry*. 26 (2007) 227–238. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.009>.
- [93] R. Sathre, Life-Cycle Energy and Carbon Implications of Wood-Based Products and Construction., Mid Sweden University Doctoral Thesis 34, 2007.
- [94] NIST, Standard Reference Material - 1575a Trace Elements in Pine Needles (*Pinus taeda*), National Institute of Standards and Technology. (2022) 1–5.
- [95] Z. Varga, M. Wallenius, A. Nicholl, K. Mayer, Assessment of uranium inhomogeneity and isotope imaging for nuclear forensics, *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 171 (2020) 105920. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2020.105920>.
- [96] J.G. Wiederhold, Metal stable isotope signatures as tracers in environmental geochemistry, *Environ Sci Technol.* 49 (2015) 2606–2624. <https://doi.org/10.1021/es504683e>.
- [97] Y.H. Loni, K. David, S. Larrue, B. Grambow, C. Corona, S. Ribet, P. Chardon, G. Montavon, Uranium quantification of oak tree rings (*Quercus petraea*) from a former uranium mining site by High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass spectrometry in Laser Ablation and Solution modes, *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 161 (2019) 105709. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2019.105709>.
- [98] C.M. Ackerman, P.K. Weber, T. Xiao, B. Thai, T.J. Kuo, E. Zhang, J. Pett-Ridge, C.J. Chang, Multimodal LA-ICP-MS and nanoSIMS imaging enables copper mapping within photoreceptor megamitochondria in a zebrafish model of Menkes disease, *Metallomics*. 10 (2018) 474–485. <https://doi.org/10.1039/c7mt00349h>.
- [99] E. Lützen, M. Holtkamp, I. Stamme, R. Schmid, M. Sperling, M. Pütz, U. Karst, Multimodal imaging of hallucinogens 25C- and 25I-NBOMe on blotter papers, *Drug Test Anal.* 12 (2020) 465–471. <https://doi.org/10.1002/dta.2751>.
- [100] M. Galiová, J. Kaiser, K. Novotný, J. Novotný, T. Vaculovič, M. Liška, R. Malina, K. Stejskal, V. Adam, R. Kizek, Investigation of heavy-metal accumulation in selected plant

samples using laser induced breakdown spectroscopy and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Appl Phys A Mater Sci Process.* 93 (2008) 917–922. <https://doi.org/10.1007/s00339-008-4747-0>.