



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Salvino Júnior Zampieri Alves

Aplicação das técnicas de calibração multi-fluxo e multi-isotópica para determinação de metais em amostras de vinho por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

Florianópolis
2022

Salvino Júnior Zampieri Alves

Aplicação das técnicas de calibração multi-fluxo e multi-isotópica para determinação de metais em amostras de vinho por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Eduardo S. Chaves.

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Alves, Salvino Júnior Zampieri

Aplicação das técnicas de calibração multi-fluxo e multi isotópica para determinação de metais em amostras de vinho por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado / Salvino Júnior Zampieri Alves ; orientador, Eduardo Sidinei Chaves, 2022.

81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, , Programa de Pós-Graduação em , Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. . 2. Técnicas de Calibração. 3. Calibração Multi sinais. 4. Química. 5. ICP-MS. I. Chaves, Eduardo Sidinei. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em . III. Título.

Salvino Júnior Zampieri Alves

**Aplicação das técnicas de calibração multi-fluxo e multi-isotópica para
determinação de metais em amostras de vinho por espectrometria de massa com plasma
indutivamente acoplado**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a Cristiane Luisa Jost, Dr^a.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Rennan Geovanny Oliveira Araujo, Dr.

Universidade Federal da Bahia

Prof. Gustavo Amadeu Micke, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de mestre em Química Analítica.

Prof. Giovanni Finoto Caramori, Dr.

Prof. Eduardo S. Chaves, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais e a minha
companheira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha família e também a minha companheira, Ecléa Vanessa, pelo apoio, compreensão e carinho em todos os momentos e por aguentarem muitas vezes meu cansaço, por entenderem as horas de ausência e por comemorarem as conquistas ao longo do caminho.

Também à Universidade Federal de Santa Catarina pela educação pública, gratuita e de qualidade exemplar, sem a qual não seria possível tanto pelos conhecimentos adquiridos ao longo dos anos de formação, quanto pelo suporte disponibilizado.

Ao orientador, Prof^o Eduardo, pelo acompanhamento, dedicação, paciência, sugestões e força durante o trabalho, por acreditar e me dar confiança.

Aos colegas do LEMA sempre dispostos na ajuda e atenciosos ao longo da jornada da dissertação e também, por toda a estrutura que o laboratório oferece para o aprendizado.

Por fim, agradeço de coração todos que de alguma forma contribuíram para o projeto, seja do simples lembrete pelo whatsapp até dicas de escrita e funcionamento do equipamento, o meu eterno obrigado.

“Se a educação sozinha não transforma a sociedade, sem ela tampouco a sociedade muda.”

(FREIRE, 1992)

RESUMO

As técnicas de calibração multi-sinais, em específico a multi-isotópica (MICal) e a multi-fluxo (MFC), são alternativas às técnicas tradicionais de calibração rotineiramente utilizadas em laboratórios de análise. As técnicas MICal e MFC são novas abordagens para calibração e são compatíveis com a espectrometria de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Em ambas as técnicas, é necessário apenas o preparo de duas soluções de calibração contendo os analitos a serem monitorados. A MICal é baseada no monitoramento dos sinais analíticos dos isótopos dos analitos nas soluções S_1 (Amostra+Padrão) e S_2 (Amostra+Branco), a curva de calibração obtida plotando a resposta instrumental (contagens) da solução 1 no eixo x e da solução 2 no eixo y. Então, a concentração do analito na amostra é calculada com base no *slope* da curva de calibração e a concentração padrão da solução multi-elementar adicionada na S_1 . Para a MFC, o parâmetro variável é a vazão do gás nebulizador, fazendo com que as soluções 1 (Amostra) e 2 (Padrão) sejam expostas a diferentes condições no plasma. Nessas condições, a curva de calibração é plotada com a resposta instrumental obtida para solução da amostra no eixo y e para a solução do padrão multi-elementar no eixo x. Nesse caso, são monitorados a variação na resposta instrumental nas diferentes condições de vazão do gás nebulizador, sendo a concentração dos analitos é calculada na amostra a partir da multiplicação da concentração do padrão e do *slope* da curva de calibração. Neste estudo, a MICal foi aplicada para determinação de Mo, Pb, Cd e Ni em amostras de vinho tinto por ICP-MS. Os resultados obtidos para MICal demonstraram que a condição ótima para o *slope* da função de calibração variou em uma faixa entre 0,68 e 0,78 e permitiu que o grau de exatidão estivesse em uma faixa de 105 a 115% e 107 a 116%, respectivamente, para as soluções de concentração padrão multi-elementar $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e $20 \mu\text{g L}^{-1}$ representado pelas melhores recuperações para Mo, Pb, Cd e Ni nas amostras. Para MFC e MICal no presente estudo determinou Mo, Ni, Zn e Fe e os resultados obtidos foram comparados com das técnicas convencionais de calibração (calibração externa e padronização interna). A utilização das técnicas alternativas MICal e a MFC possibilitam a obtenção de resultados comparáveis às técnicas de calibração convencionais. No caso da MICal, a concentração do padrão utilizado para calibração pode influenciar na concentração dos analitos na amostra. As técnicas de calibração possibilitam a obtenção de limites de detecção na ordem de $0,06 \mu\text{g L}^{-1}$ e valores precisão (RSD < 10%) adequados para determinação dos analitos em amostras de vinho.

Palavras-chave: Calibração multi-sinais . ICP-MS . Técnicas de calibração.

ABSTRACT

Multi-signal calibration techniques, specifically multi-isotope (MICal) and multi-flow (MFC), are alternatives to traditional calibration techniques routinely used in analysis laboratories. The MICal and MFC techniques are new approaches to calibration and are compatible with inductively coupled plasma spectrometry (ICP-MS). In both techniques, it is only necessary to prepare two calibration solutions containing the analytes to be monitored. The MICal is based on monitoring the analytical signals of the isotopes of the analytes in the S1 (Sample+Standard) and S2 (Sample+Blank) solutions, the calibration curve obtained by plotting the instrumental response (counts) of solution 1 on the x axis and solution 2 on the y axis. Then, the concentration of the analyte in the sample is calculated based on the slope of the calibration curve and the standard concentration of the multi-element solution added to S1. For MFC, the variable parameter is the nebulizer gas flow, causing solutions 1 (Sample) and 2 (Standard) to be exposed to different conditions in the plasma. Under these conditions, the calibration curve is plotted with the instrumental response obtained for the sample solution on the y-axis and for the multi-element standard solution on the x-axis. In this case, the variation in the instrumental response under different flow conditions of the nebulizer gas is monitored, and the concentration of the analytes is calculated in the sample by multiplying the concentration of the standard and the slope of the calibration curve. In this study, MICal was applied for determination of Mo, Pb, Cd and Ni in red wine samples by ICP-MS. The results obtained for MICal showed that the optimal condition for the slope of the calibration function varied in a range between 0.68 and 0.78 and allowed the degree of accuracy to be in a range of 105 to 115% and 107 to 116%, respectively, for the solutions of standard multi-element concentration 12.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ represented by the best recoveries for Mo, Pb, Cd and Ni in the samples. For MFC and MICal, the present study determined Mo, Ni, Zn and Fe and the results obtained were compared with conventional calibration techniques (external calibration and internal standardization). The use of alternative MICal and MFC techniques allow the achievement of results comparable to conventional calibration techniques. In the case of MICal, the concentration of the standard used for calibration can influence the concentration of analytes in the sample. The calibration techniques make it possible to obtain detection limits in the order of 0.06 $\mu\text{g L}^{-1}$ and precision values (RSD < 10%) suitable for the determination of analytes in wine samples.

Keywords: Multi-signal calibration. ICP-MS. Calibration techniques.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do estágio de preparo das soluções padrão e representação gráfica da relação entre o sinal analítico e as concentrações conhecidas para a técnica de calibração externa.....	20
Figura 2 – Representação gráfica da curva de calibração expressa pela função de calibração linear entre a intensidade do sinal obtido e a concentração definida para uma determinada solução padrão.....	21
Figura 3 – Procedimento do preparo das soluções pela técnica de calibração por adição de padrão.....	24
Figura 4 – Plotagem típica do gráfico referente a técnica de calibração por adição de padrão. A extrapolação é denotada pela linha contínua entre o ponto 1 e o ponto da amostra (A).....	25
Figura 5 – Esquematisação das etapas de preparo da amostra, soluções padrão e padrão interno.....	27
Figura 6 – Plotagem do gráfico referente a técnica de calibração com padrão interno. A determinação da concentração do analito é mediante a regressão inversa para o sinal (Y_a/Y_i) ao interpolar na curva de calibração representado pela linha contínua.....	28
Figura 7 – Fluxograma mostrando as novas estratégias de calibração. Os caminhos a serem percorridos são divididos com base no tipo de interferência.....	30
Figura 8 – Representação esquemática da plotagem do gráfico para calibração multi-isotópica.....	34
Figura 9 – Gráfico típico para calibração multifluxo.....	37
Figura 10 – Otimização do potencial de radiofrequência. a) para amostra de vinho e b) para uma solução padrão multi-elementar ($20 \mu\text{g L}^{-1}$).....	50
Figura 11 – Otimização da vazão do gás nebulizador. a) para amostra de vinho e b) para uma solução padrão multi-elementar ($20 \mu\text{g L}^{-1}$).....	51
Figura 12 – Otimização da rotação da bomba peristáltica para solução padrão (<i>Daily performance</i>) $10 \mu\text{g L}^{-1}$ contendo os analitos Mg, Pb, In e Rh.....	53
Figura 13 – Otimização da vazão do gás nebulizador para solução padrão (<i>Daily performance</i>) $10 \mu\text{g L}^{-1}$ contendo os analitos Mg, Pb, In, Rh, Ba e Ce.....	54
Figura 14 - Otimização da vazão do gás nebulizador para solução padrão (<i>Daily performance</i>) $10 \mu\text{g L}^{-1}$ contendo os analitos Mg, Pb, In, Rh, Ba e Ce. a) razão entre as contagens para CeO/Ce e em b) a razão entre as contagens para Ba^{2+}/Ba	55

Figura 15 – Curvas de calibração multi-isotópica de a) Mo; b) Pb; c) Cd e d) Ni para amostra de vinho por ICP-MS.....	59
Figura 16 – Estudo da condição ótima para o preparo da solução padrão multi-elementar para Mo, Ni, Zn e Fe em meio a) alcoólico e b) aquoso.	65
Figura 17 – Curvas de calibração multi-fluxo para Mo e Ni em concentração $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de solução padrão multi-elementar e $60 \mu\text{g L}^{-1}$ para Zn e Fe.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aplicações de espectrometria atômica envolvendo métodos de calibração multi-isotópica e multi-fluxo.....	42
Tabela 2 – Otimização dos parâmetros de ICP-MS aplicados para a calibração multi-fluxo e multi-isotópica.	44
Tabela 3 – Isótopos selecionados para determinação de metais em amostras de vinho usando de calibração multi-fluxo (MFC) e multi-isotópica (MICal) por ICP-MS.....	45
Tabela 4 – Estudo da concentração do padrão (média \pm desvio padrão, $n = 3$) para calibração multi-isotópica na composição 50% ($v v^{-1}$) amostra e 50%($v v^{-1}$) padrão para o preparo da solução de calibração.....	57
Tabela 5 – Desvio padrão relativo para as técnicas de calibração multi-isotópica, externa e padrão interno em amostra de vinho por ICP-MS.....	61
Tabela 6 – Concentrações em $\mu g L^{-1}$ para Mo, Pb, Cd e Ni em amostra de vinho (adicionada de $40 \mu g L^{-1}$ dos analitos) empregando calibração externa, padronização interna e calibração multi-isotópica, respectivamente.	63
Tabela 7 – Desvio padrão relativo para as técnicas de calibração multi-fluxo, externa e padrão interno em amostra de vinho por ICP-MS.....	69
Tabela 8 – Determinação das concentrações de Mo, Ni, Zn e Fe em amostra de vinho nas condições de 10 e $60 \mu g L^{-1}$ de solução padrão multi-elementar para calibração multi-fluxo.	70
Tabela 9 – Concentrações em $\mu g L^{-1}$ para Mo, Ni, Zn e Fe em amostra de vinho empregando calibração externa, padronização interna e calibração multi-isotópica, respectivamente.	71

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNICOS

MICal: *Multi-isotope calibration* (Calibração Multi-isotópica)

ICP-MS: *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado)

MFC: *Multi-Flow calibration* (Calibração Multi-fluxo)

EC: *External Calibration* (Calibração Externa)

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry* (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

IS: *Internal Standardization* (Padronização Interna)

MMC: *Matrix-matched Calibration* (Calibração com correspondência de Matriz)

SA: *Standard Additions* (Adições de Padrão)

RMs: *Reference Materials* (Materiais de Referência)

LOD: *Limit of detection* (Limite de Detecção)

LOQ: *Limit of quantification* (Limite de Quantificação)

RSD: *Relative Standard Deviation* (Desvio Padrão Relativo)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	Revisão Bibliográfica.....	17
2.1	Calibração	17
2.1.1	Técnicas de calibração tradicionais	19
2.1.1.1	<i>Calibração Externa</i>	<i>19</i>
2.1.1.2	<i>Calibração por correspondência de matriz.....</i>	<i>22</i>
2.1.1.3	<i>Calibração por adição de padrão</i>	<i>23</i>
2.1.1.4	<i>Calibração por padrão interno</i>	<i>26</i>
2.2	Novas estratégias de calibração	29
2.2.1	Técnica de calibração: padrão de interferência.....	30
2.2.2	Técnicas de calibração: multi-sinais	31
2.2.2.1	<i>Técnica de calibração multi-isotópica</i>	<i>33</i>
2.2.2.2	<i>Técnica de calibração multi-fluxo</i>	<i>36</i>
2.2.2.3	<i>Técnica de calibração análise de diluição padrão.....</i>	<i>39</i>
2.2.2.4	<i>Principais aplicações de calibração multi-sinais em técnica espectrométrica... 40</i>	
3	Objetivos.....	43
3.1	Objetivo geral	43
3.2	Objetivos específicos	43
4	metodologia	44
4.1	Instrumentação.....	44
4.2	Materiais e reagentes	45
4.3	Amostras.....	46
4.4	Procedimento experimental	46
4.4.1	Procedimento de preparo da solução padrão multi-elementar para a calibração multi-sinais	46
4.4.1.1	<i>Preparo da solução padrão multi-elementar para MICal</i>	<i>46</i>
4.4.1.2	<i>Preparo da solução padrão multi-elementar para MFC</i>	<i>47</i>

4.4.2	Otimização instrumental para calibração multi-sinais.....	47
4.4.2.1	<i>Otimização dos parâmetros do ICP-MS para calibração MICal</i>	47
4.4.2.2	<i>Otimização dos parâmetros do ICP-MS para calibração MFC</i>	47
4.4.2.3	<i>Calibração Externa e padronização interna</i>	48
5	Resultados e discussões	49
5.1	Otimização instrumental para calibração multi-sinais.....	49
5.1.1	Calibração multi-isotópica.....	49
5.1.1.1	<i>Potência de radiofrequência.....</i>	49
5.1.1.2	<i>Vazão do gás nebulizador.....</i>	50
5.1.2	Calibração Multi-fluxo.....	52
5.1.2.1	<i>Rotação da bomba peristáltica.....</i>	52
5.1.2.2	<i>Vazão do gás nebulizador.....</i>	53
5.2	Técnica de calibração multi-isotópica	56
5.2.1	Estudo da concentração padrão multi-elementar.....	56
5.2.2	Parâmetros de mérito	59
5.2.3	Determinação de metais em vinhos usando MICal	63
5.3	Técnica de calibração multi-fluxo	64
5.3.1	Definição da condição ótima para a solução padrão multi-elementar.....	64
5.3.2	Parâmetro de mérito.....	68
5.3.3	Determinação de metais em vinhos pela calibração multi-fluxo.....	70
6	Conclusões	72
7	Perspectivas	73
8	Referências	74

1 INTRODUÇÃO

Em química analítica a investigação de espécies químicas específicas em uma amostra desconhecida, requer do analista um julgamento lúcido em relação a escolha/proposição de um determinado método analítico, a técnica de análise compatível com o seu problema de pesquisa. O próximo passo em uma análise química, geralmente, é a quantificação da espécie química de interesse. Embora alguns métodos absolutos não necessitem de calibração, por exemplo, os métodos gravimétricos, para a maioria dos métodos a calibração é necessária e seleção da técnica adequada de calibração é fundamental para garantir a qualidade dos resultados (Hulanicki, 1995).

Na maioria das técnicas de calibração, a determinação da concentração do analito na amostra requer o preparo de soluções padrão do analito com concentrações conhecidas e a aquisição do sinal analítico correspondente a cada uma das soluções padrão. Uma dependência linear entre os parâmetros é estabelecida e uma curva de calibração pode ser plotada com base em uma função de calibração, a concentração do analito na amostra pode ser obtida pela transformação da intensidade do sinal medido por meio de uma função matemática (Kościelniak, 2001). Devido ao ambiente físico-químico distinto da amostra e das soluções padrão dos analitos, limitações podem ocorrer devido a efeitos causados pela matriz da amostra e possíveis flutuações no sinal analítico relacionado com o transporte da amostra, geração de aerossol, temperatura do instrumento e outras mudanças físicas (Virgilio et al., 2017). Essas limitações, geralmente, podem ser contornadas e/ou minimizadas por meio de procedimentos diferenciados do preparo das soluções padrão, resultando em técnicas de calibração distintas, como por exemplo, a calibração por simulação de matriz, a calibração por adição de padrão e o uso de padrão interno (Carter et al., 2018).

No presente trabalho, a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado foi selecionada devido a sua capacidade de análise multi-elementar em concentrações de ultra-traços e isotópicas, frequência analítica, maior sensibilidade, baixos limites de detecção e ampla faixa linear (Thomas, 2013; Agatemor e Beauchemin, 2011). Entretanto, a técnica apresenta desafios relacionados com potenciais interferências espectrais e não espectrais, os quais instigam novas abordagens instrumentais, diferenciados preparos de amostra ou técnicas de calibração que contribuam para minimizar os efeitos das interferências e assim, atender uma demanda industrial, de saúde, ambiental ou até mesmo uma melhor compreensão de processos químicos (Carter et al., 2018). Neste contexto, as novas estratégias de calibração relatadas na

literatura como, multi-fluxo (MFC) e multi-isotópica (MICal) em que mudanças nos parâmetros instrumentais de análise e um preparo simplificado de amostra possibilitam maior precisão, menor consumo de reagentes, redução do tempo de análise e fácil detecção de potenciais interferências (Carter et al., 2018) motivam aplicação dessas técnicas alternativas de calibração para análise elementar por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CALIBRAÇÃO

É sabido que em uma análise química, a escolha ou desenvolvimento de um método analítico que visa à determinação da concentração de um analito em uma amostra desconhecida, perpassa, geralmente, por uma etapa denominada por calibração. A acentuada atenção no procedimento deve-se pelo fato de que os instrumentos das diferentes técnicas de análise fornecem medições em termos de intensidade de sinal analítico e não a grandeza do estudo logo transformar os dados obtidos e registrados em um espectro de massa, por exemplo, em concentração do analito é definir em linhas gerais o conceito de calibração.

Para a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), a calibração é definida como “o conjunto de operações que estabelecem, sob condições especificadas, a relação entre os valores indicados pelo instrumento analítico e os correspondentes valores conhecidos de um analito”. A definição genérica não especifica, por exemplo, o conjunto de operações necessárias que o químico precisa dominar ao longo do processo de calibração.

Para **Kościelniak e Wieczorek (2016)** ao discutirem metodologias e estratégias de calibração univariada, descreveram de forma prática os princípios do processo de calibração analítica, os quais são norteados por 4 etapas: (1) o preparado da amostra e dos padrões, (2) o estágio de medição (conforme técnica de análise selecionada), (3) o estágio de modelagem matemática, ou seja, a função calibração e por fim (4) a aplicação da transição dos dados obtidos da instrumentação em grandezas analíticas mensuráveis, geralmente em termos de concentração. Em um contexto amplo os autores reescrevem, interpretam e sugerem que o termo “conjunto de operações” presente na definição da IUPAC, seja compreendido como procedimento de calibração, isto é, o processo de calibração perpassa os estágios ao longo de seu procedimento.

O principal objetivo da calibração é transformar o sinal analítico em concentração do analito de forma precisa e exata, deste modo o conceito citado no estágio 3 pelos autores anteriormente se destaca. Segundo a IUPAC, o termo *função de calibração* é definido como:

A relação funcional (não estatística) para o processo de medição química, relacionando o valor esperado do sinal (bruto) observado ou variável de resposta E (y) para a quantidade de analito x. A exibição gráfica correspondente para um único analito é chamada de curva de calibração. Quando estendida a variáveis ou analitos adicionais que ocorrem na análise multicomponente, a 'curva' se torna uma superfície de calibração ou hipersuperfície". (IUPAC).

A compreensão do conceito, indica que ao longo do procedimento de calibração a clareza entre a relação existente na determinação da concentração da espécie química em estudo com a medição química instrumental perpassa por uma função matemática que descreve uma curva de calibração. Neste sentido, as técnicas de calibração propõem modelagens matemática intrínsecas e contemplam preparos de amostras e padrões diferenciados (**Donati e Amais, 2019**).

Kościelniak e Wieczorek (2016) abordam, além do termo procedimento de calibração, sobre a utilização de método de calibração na literatura analítica. Para os autores, método de calibração, trata-se sobre executar o procedimento de calibração com base em objetivos específicos para o estudo analítico investigado, tendo em vista a superação das limitações impostas pela amostra, padrões analíticos ou questões instrumentais. Entretanto o termo, técnica de calibração, conceitua de forma geral o processo de calibração independente de uma amostra, padrões analíticos ou instrumentos específicos. Associado ao termo, técnica de calibração, é possível encontrar a palavra estratégia, com a mesma finalidade conceitual (**Carter et al., 2018; Barros et al., 2019; Donati e Amais., 2019; Machado et al., 2021 e Virgilio et al., 2020**).

Carter et al. (2018) ao revisar as técnicas de calibração para espectrometria atômica considera a calibração externa (EC, *External Standard Calibration*), correspondência da matriz (MMC, *Matrix-Matched Calibration*), padronização interna (IS, *Internal Standardization*) e adição de padrão (AS, *Standard Additions Calibration*) como métodos tradicionais de calibração.

Em uma análise química, as características da amostra, do analito e do instrumento, o sinal analítico poderá oscilar, consideravelmente, gerando dúvidas na determinação elementar. A flutuação causada é denominada de interferência e erros sistemáticos podem ser adicionados nos dados gerados afastando-se a média dos valores obtidos do valor verdadeiro. Entretanto as

técnicas de calibração podem ser usadas com a finalidade de controlar os efeitos de interferência, sem modificar o instrumento de análise e melhorar a exatidão e precisão na análise elementar (**Cuadros-Rodríguez et al., 2001; Kościelniak e Wieczorek, 2016; Carter et al., 2018**). Ao longo desse trabalho novas técnicas de calibração aplicado para ICP-MS são discutidas e sua aplicação enquanto método de calibração são apresentados em termos de não tradicionais.

2.1.1 Técnicas de calibração tradicionais

Em química analítica, as técnicas de calibração externa (EC), calibração com padrão interno (IS), calibração por adição de padrão (SA) e correspondência de matriz (MMC) são amplamente utilizadas e difundidas na literatura (**Donati e Amais., 2019 e Carter et al., 2018**). Por este motivo, o termo “tradicionais” empregado no trabalho de **Carter et al., 2018** será utilizado para mencionar as técnicas de calibração citadas.

Uma característica comum para as calibrações ditas, tradicionais, está na consideração das variáveis que descrevem os eixos dos gráficos quando plotados. Em termos gerais, no eixo da variável dependente é representado pelo sinal analítico e na variável independente a concentração. Cada técnica de calibração descreve um procedimento específico de preparo da solução padrão e amostra. Além de determinar a concentração do analito na amostra, a calibração tem por função minimizar/controlar eventuais supressões ou elevações na intensidade do sinal analítico obtido seja relacionado com o instrumento utilizado, efeito de matriz e/ou interferências espectrais (**Donati e Amais, 2019**).

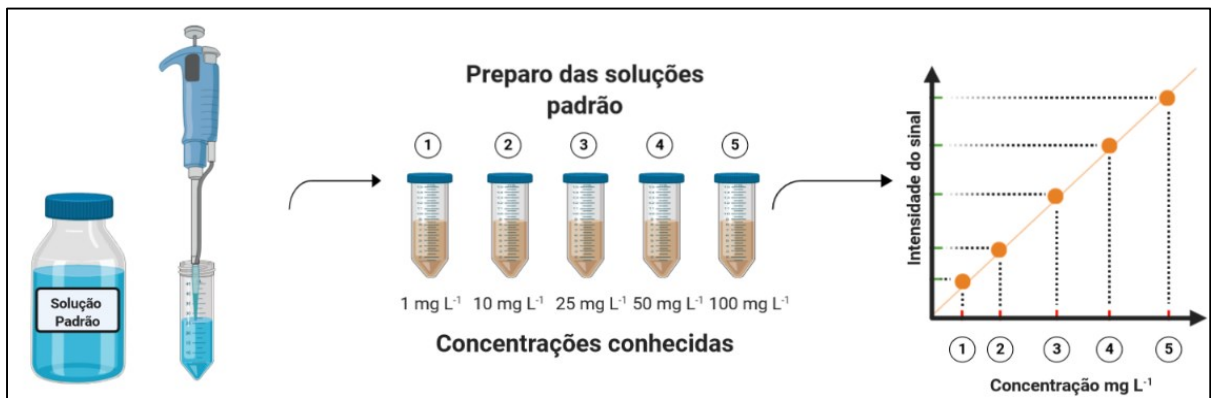
A seguir as técnicas de calibração são descritas com base no seu preparo, função de calibração, vantagens, limitações e representação gráfica característica.

2.1.1.1 Calibração Externa

É a técnica de calibração amplamente utilizada em laboratório para análises de rotina. Em seu procedimento, a etapa (1) envolve o preparo de soluções padrão contendo o analito com base em materiais de referência (RMs, *Reference materials*) conhecido por padrões de medição química em concentrações conhecidas (**Cuadros-Rodríguez et al., 2001**). Para cada solução padrão a concentração definida é associada com um sinal analítico (contagens, absorvância, área do pico, altura do pico) obtido conforme, exemplo, representado na Figura 1. Desse modo

uma função matemática descreve uma relação dependente e linear entre a resposta instrumental (variável dependente) e a concentração da solução padrão (variável independente), chamada de função de calibração (estágio 3, Figura 2).

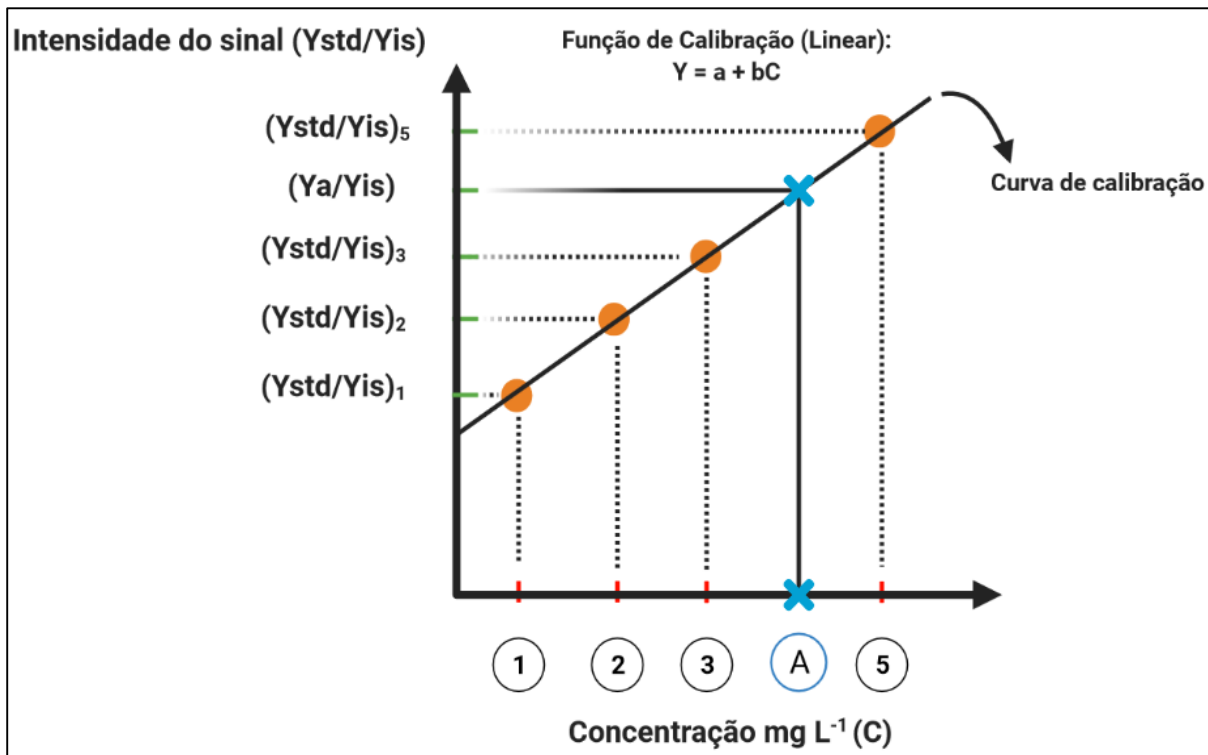
Figura 1 – Representação esquemática do estágio de preparo das soluções padrão e representação gráfica da relação entre o sinal analítico e as concentrações conhecidas para a técnica de calibração externa.



Fonte: o autor 2022

O termo externo é empregado para designar que o procedimento de calibração é externo em relação a amostra (Skoog et al., 2005), isto é, separado da mesma, fato este pressupõe que o ambiente químico das soluções padrão e da amostra não interferem de maneira significativa na obtenção do sinal analítico (Virgilio et al., 2017).

Figura 2 – Representação gráfica da curva de calibração expressa pela função de calibração linear entre a intensidade do sinal obtido e a concentração definida para uma determinada solução padrão.



Fonte: o autor 2022

A determinação da concentração do analito na amostra (obtida por meio de regressão inversa) é realizada com base na medição do sinal e interpolação na curva de calibração expressa pela sua função matemática utilizando a regressão dos mínimos quadrados (**Miller e Miller, 1984**). A quantificação da concentração da espécie química presente na amostra é possível pela aplicação da função de calibração $f(x) = a + bC$, onde $f(x)$, a , b e C correspondem, respectivamente, a resposta do sinal analítico, interceptação no eixo y , coeficiente angular (*slope*) e concentração do analito (**Cuadros-Rodríguez et al., 2001; Kościelniak e Wieczorek, 2016**).

O fato da amostra não estar presente no procedimento de calibração, a técnica é incapaz de compensar os efeitos de matriz, flutuações instrumentais ou variações na sensibilidade da curva de calibração (**Nelms, 2005**). **Bader (1980)**, destaca que a limitação está no fato de propriedades como pH, força iônica, temperatura, viscosidade, tensão superficial, pressão de vapor ou tipos e concomitantes presentes na amostra divergirem das soluções padrão. A limitação para a técnica de calibração, pode ser contornada quando um preparo da amostra

eficiente é associado com esta técnica de calibração, garantindo que a amostra seja convertida em solução com o mínimo/inexistência de matriz e compatível com o sistema de introdução da técnica de análise empregada (**Carter et al., 2018**).

Em casos que o preparo de amostra seja laborioso ou não possibilite a adequada redução das potenciais interferências da matriz, a sugestão é investigar outras técnicas de calibração que possibilitem minimizar/corrigir os efeitos causados pelas propriedades físico-químicas da amostra. Entre as técnicas alternativas de calibração estão a calibração por correspondência de matriz, utilização de padrão interno e adição de padrão.

2.1.1.2 Calibração por correspondência de matriz

Quando o efeito de matriz interfere na medição do sinal analítico, em que erros sistemáticos acentuados podem estar presentes na determinação da concentração do (s) analito (s) ao longo da análise elementar/multielementar, é possível fazer uso de RM's com matriz semelhante à da amostra, conforme recomenda a Organização Internacional de Padronização em (**ISO Guide 33:2015**). A escolha do RM parte de um conhecimento prévio dos concomitantes presentes na matriz da amostra como também os analitos, sendo que uma correspondência seja estabelecida, de tal modo que possíveis efeitos de matriz sejam compensados (**Carter et al., 2018**).

Após conclusão do primeiro estágio no procedimento de calibração, as etapas subsequentes são similares aos utilizados em EC, como exemplo, **Tormen et al. (2012)** em seu trabalho com amostras biológicas, preparou as amostras e as soluções padrão em meio aquoso com ácido fórmico a 5% v v⁻¹ para calibração na determinação simultânea de elementos por ETV-ICP-MS para que os efeitos sobre a nebulização, transporte do aerossol e ionização estimados pelo elevado conteúdo de carbono fossem compensados.

A medida que a matriz da amostra se torna complexa, em que suas propriedades físico-químicas são alteradas, a possibilidade de encontrar RM's em que sua matriz seja correspondente torna-se difícil e podendo demandar materiais de referência de custo elevado.

Quando aproximações são consideradas pelo analista entre os RMs e a amostra, é preciso atenção na resposta instrumental. Pode-se obter determinações em que o conjunto de dados obtidos, estejam estimados com erros sistemáticos, os quais não foram minimizados ou controlados pela calibração (**Cuadros-Rodríguez et al., 2001**). Diferenças na viscosidade, por exemplo, podem influenciar no sistema de transporte durante a introdução da amostra para a

técnica de análise selecionada (por exemplo, em sistemas de introdução de amostras por nebulização) como também, diferenças nos mecanismos de atomização, excitação e ionização dos analitos causando interferências, por exemplo, nas análises por ICP-MS e F AAS (**Carter et al., 2018**).

2.1.1.3 Calibração por adição de padrão

Em casos em que a matriz da amostra é desconhecida, materiais de referência matriciais são inexistentes e há suspeita de efeito da matriz, a calibração por adição de padrão pode ser uma estratégia apropriada (**Currie, 1998**). Nestas condições, o ambiente químico das soluções padrão é combinado com o da amostra.

Do ponto de vista de contribuição histórica, **Burns e Walker (2019)** descrevem e concluem que a primeira utilização da técnica em instrumentos de análise química, foi datado em 1937 por Hans Hohn em seu livro intitulado “*Chemische Analysen mit dem Polarographen*” para determinação de Cu, Pb, Zn e Fe em amostra essencialmente de alumínio. **Kelly et al. (2011)** expõe que o termo em inglês “*standard addition*” foi utilizado por Lingane e Kerlinger no ano de 1941 em Química Analítica para a determinação de Ni e Co por polarografia (**Lingane e Kerlinger, 1941**).

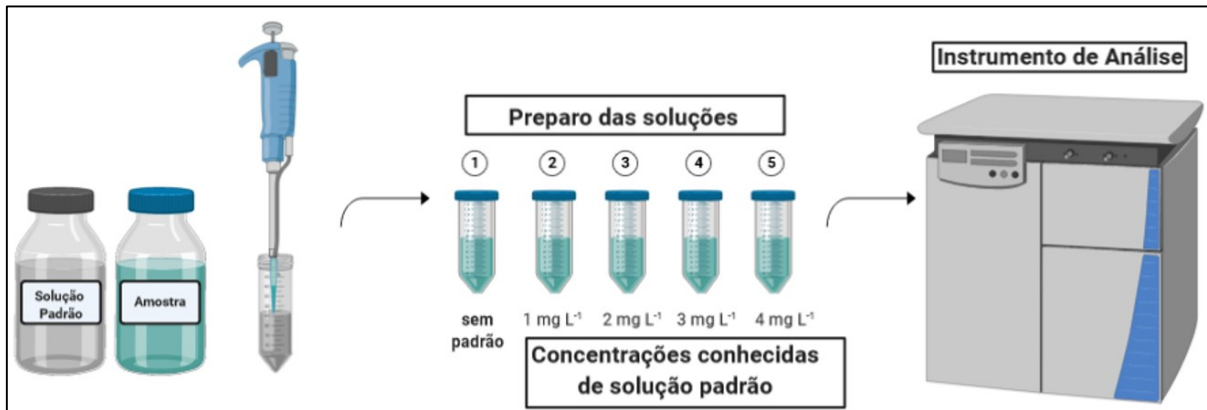
A técnica de calibração por adição de padrão abrange diversas etapas, pode-se destacar o trabalho de **Bader (1980)**, em que 5 etapas para calibração são descritas e que para cada uma delas é apresentado uma equação matemática intrínseca para calcular a concentração desconhecida do analito na amostra.

Entretendo é possível notar um consenso entre os autores (**Currie, 1998; Cuadros-Rodríguez et al., 2001; Nelms, 2005; Thomas, 2013; Carter et al., 2018; Donati e Amais, 2019**) ao descreverem a técnica de calibração, sendo a abordagem um procedimento pautado no preparo de soluções em que há uma combinação entre a amostra e a solução padrão com o propósito de que a solução da amostra seja utilizado para minimizar os efeitos da matriz tendo em vista uma relação linear entre a resposta instrumental e a concentração do analito.

O estágio inicial para o procedimento de calibração por adição do analito (Figura 3), considera constantes as concentrações dos analitos e dos concomitantes da amostra, ou seja, o volume amostral é idêntico para todas as replicatas. Em seguida, volume de solução padrão é

adicionada para cada réplica, exceto para uma que será considerada “branco”, de modo que se estabeleça concentrações crescentes e equimolares do analito à amostra (Currie, 1998).

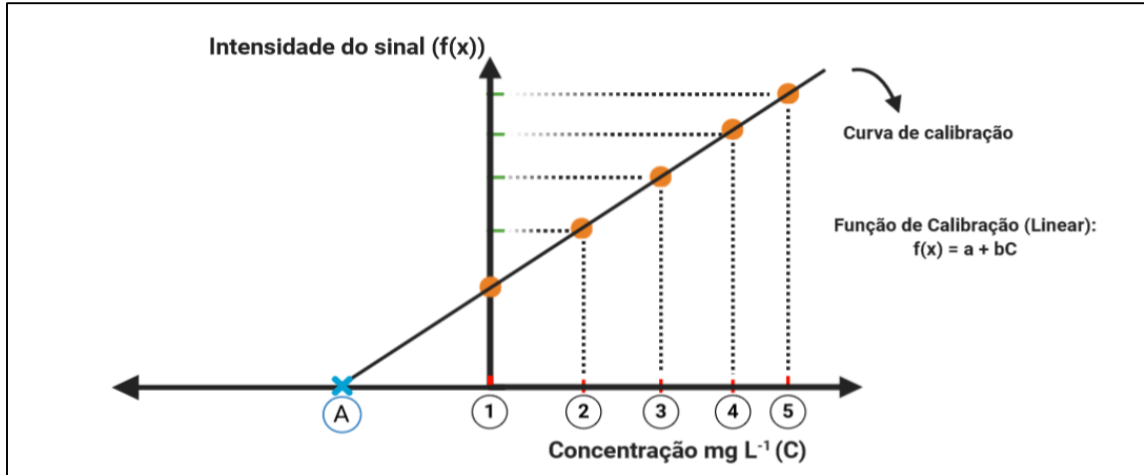
Figura 3 – Procedimento do preparo das soluções pela técnica de calibração por adição de padrão.



Fonte: o autor 2022

Como a concentração do analito presente na solução padrão adicionada à amostra é conhecida (ou os volumes de solução padrão adicionados), a plotagem do gráfico a considera como variável independente (eixo x) e o sinal analítico obtido para cada uma das replicatas o eixo y (variável dependente). Com o auxílio da regressão dos mínimos quadrados, uma função matemática (função de calibração, estágio 3) expressa uma curva de calibração descrita em forma de gráfico. Para determinar a concentração do analito na amostra, considera-se o ponto do gráfico em que a curva de calibração intercepta o eixo x para $y=0$, conforme a representação a esquemática da Figura 4. Deste modo, a extrapolação para a curva de calibração é aplicada e o cálculo da concentração do analito (estágio 4) é determinado (Currie, 1998; Kościelniak e Wieczorek, 2016; Carter et al., 2018).

Figura 4 – Plotagem típica do gráfico referente a técnica de calibração por adição de padrão. A extrapolação é denotada pela linha contínua entre o ponto 1 e o ponto da amostra (A).



Fonte: o autor 2022

A determinação da concentração do analito, pode ser realizada considerando a resposta instrumental ($f(x)$) registrada para cada solução padrão dependente de uma constante de proporcionalidade k ; dos volumes da amostra (V_x), solução estoque (V_s), volume final (V_t) e das concentrações do analito (C_x) e solução padrão (C_s). A relação existente é representada na equação 1 a seguir (Bader, 1980):

$$f(x) = \frac{kC_xV_x}{V_t} + \frac{kC_sV_s}{V_t} \quad (\text{Eq. 1})$$

O termo kC_xV_x/V_t , é referente a solução “branco” em que não teve adição de solução estoque, isto é, intercepta o gráfico quando $x = 0$ considerado o coeficiente linear (a) da função de calibração. Para kC_s/V_t o slope (b) da curva de calibração e V_s é a variável independente. Para determinar a concentração do analito na amostra, é preciso extrapolar para o ponto em que $f(x) = 0$. Reorganizado a equação anterior, o termo C_x é isolado rearranjando as equações 2, 3 e 4 e representado pela equação 5:

$$f(x) = bC + a \quad (\text{Eq. 2})$$

$$0 = bC + a \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\frac{|a|}{|b|} = \frac{\left| \frac{kC_x V_x}{V_t} \right|}{\left| \frac{kC_s}{V_t} \right|} = \frac{V_x C_x}{C_s} \quad (\text{Eq. 4})$$

$$C_x = \frac{aC_s}{bV_x} \quad (\text{Eq. 5})$$

Do ponto de vista matemático, a concentração do analito na amostra pode ser determinada considerando a equação 5.

Caso o efeito de matriz seja pronunciado e a técnica de adições de padrão escolhida, o método de análise como um todo terá uma frequência analítica reduzida em virtude do procedimento de calibração, pois, para cada amostra será necessário construir uma curva de calibração tornando a análise demorada (**Virgilio et al., 2017**). Interferências espectrais não são corrigidas por esta técnica de calibração, podendo afetar o sinal analítico do analito de forma constante ao longo de todas as concentrações, assim o slope não será afetado, porém haverá um deslocamento da curva de calibração ao longo do eixo y (**Donati e Amais, 2019**).

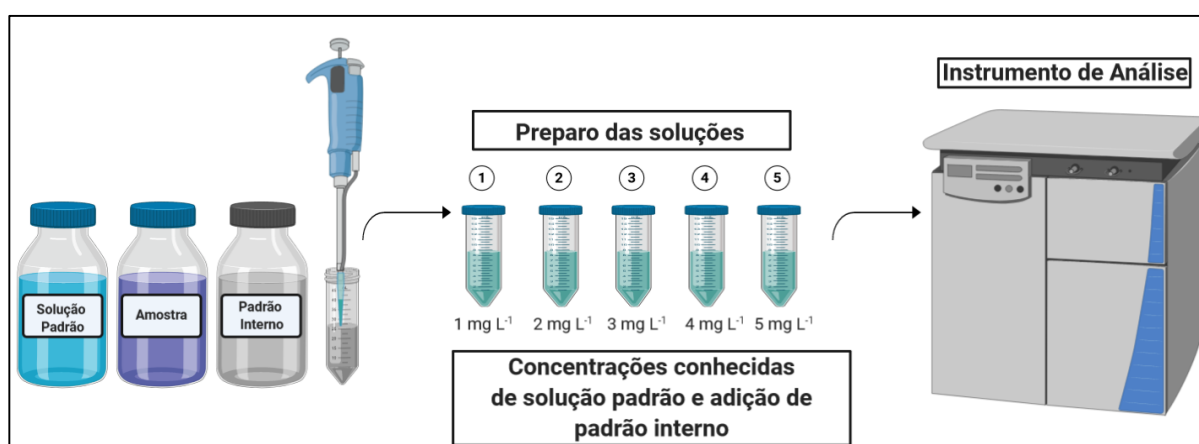
2.1.1.4 Calibração por padrão interno

Ao escolher uma técnica de calibração, espera-se que no seu procedimento seja possível minimizar efeitos de matriz, como discutido nas técnicas anteriores, mas também controlar possíveis instabilidades instrumentais, conforme a técnica de análise selecionada. **Donati e Amais (2019)** descrevem que em medições por espectrometria atômica, flutuações na taxa de aspiração de introdução de amostras, geração de aerossóis, vaporização, temperatura do plasma entre outras condições de operação instrumental, podem influenciar na precisão e exatidão resultados.

Para contornar situações em que parâmetros instrumentais estão afetando a precisão e a exatidão em análise elementar, é possível selecionar uma espécie química, chamada de padrão interno, que esteja ausente da amostra ou em concentração conhecida e que apresente um comportamento físico-químico semelhante do analito. O trabalho proposto por **Vanhaecke et al. (1992)** sobre a seleção de padrões interno em ICP-MS destacaram a importância de uma correspondência próxima entre as massas atômicas. Espera-se que o padrão interno seja afetado do mesmo modo que o analito ao longo do processo de medição instrumental. A espécie química selecionada passa a ser referência, isto é, um padrão interno (**Carter et al., 2018**).

No primeiro estágio do procedimento de calibração, o padrão interno de concentração conhecida é adicionado na amostra, em soluções padrão e em brancos (Figura 5). No estágio 2, a técnica de análise selecionada precisa fornecer um sinal analítico do padrão interno distinguível do sinal medido para o analito. Idealmente, a razão entre os sinais analíticos analito / padrão interno seja o mais próximo da unidade (**Barnett, 1968; Barnett et al., 1970; Fernandes et al., 2003; Kościelniak e Wieczorek, 2016**).

Figura 5 – Esquemática das etapas de preparo da amostra, soluções padrão e padrão interno.



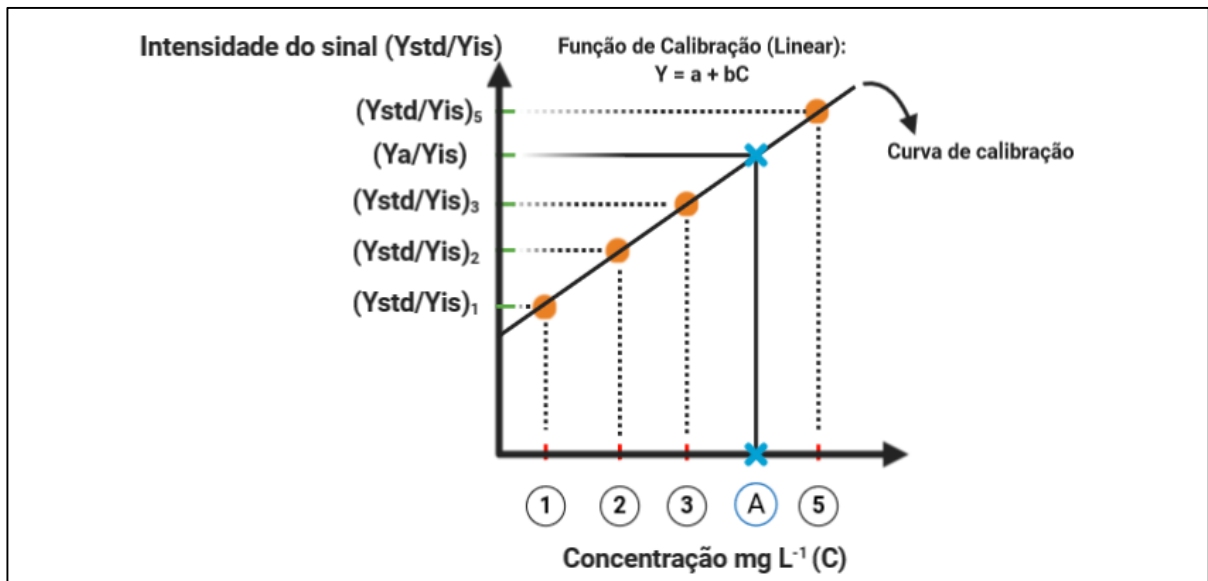
Fonte: o autor (2022)

Neste sentido, espera-se que a técnica de calibração por padrão interno minimize possíveis interferências causadas pelo efeito de matriz, pois os concomitantes e as propriedades físico-químicas da amostra alterariam o sinal do analito e do padrão interno de forma proporcional. Entretanto, é possível utilizar a padronização interna para este fim, a citar o trabalho de **Babos et al. (2016)** ao determinar molibdênio e níquel em materiais vegetais por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua em forno de grafite utilizando cobalto como padrão interno, corroboram para o debate sobre a atuação do padrão interno e seu mecanismo de ação (**Carter et al., 2018**).

A construção da curva de calibração considera no eixo x do gráfico, variável independente, a concentração crescente do analito nas soluções padrão preparadas na presença do padrão interno. A razão dos sinais analíticos do analito na solução padrão e o padrão interno, é expressa no eixo y (variável dependente), para cada uma das soluções padrão. A função de calibração responsável por expressar a curva de calibração, faz uso da regressão dos mínimos quadrados.

Após o sinal obtido da razão entre os sinais analíticos do analito na amostra e do padrão interno, a concentração do analito é determinada por interpolação da curva de calibração, mediante a regressão inversa conforme a Figura 6.

Figura 6 – Plotagem do gráfico referente a técnica de calibração com padrão interno. A determinação da concentração do analito é mediante a regressão inversa para o sinal (Y_A/Y_{IS}) ao interpolar na curva de calibração representado pela linha contínua.



Fonte: o autor (2022)

Considere o sinal obtido para o analito (y_A) e para o padrão interno (y_{IS}), sensibilidade da curva de calibração (b), as variáveis que envolvem os parâmetros instrumentais (t) e concentração (C). Em métodos que utilizam espectrometria atômica é possível descrever as equações 6 e 7 (Vandecasteele e Block, 1993):

$$y_A = b_A t_A C_A \quad (\text{Eq. 6})$$

$$y_{IS} = b_{IS} t_{IS} C_{IS} \quad (\text{Eq. 7})$$

Considerando o comportamento ideal do padrão interno, os termos t_A e t_{IS} são iguais. A razão entre a equação 6 para o analito e a equação 7 para o padrão interno, o termo b_A/b_{IS} passa a ser um fator (R) dependente da sensibilidade e C_{IS} por ser conhecido e constante é incorporado no termo R e passa a ser representado por R' . Logo, a equação 8 resultante é:

$$\frac{y_a}{y_{IS}} = R' C_A \quad (\text{Eq. 8})$$

Um dos desafios vinculados a utilização de padrão interno em análises por ICP-MS, é justamente a seleção do PI. Em trabalhos como de **Thompson e Houk (1987)** determinam que os fatores dominantes para a escolha é a massa e o potencial de ionização, enquanto **Vanhaecke et al. (1992)** sugerem apenas aproximações na massa. Outra propriedade que restringe e torna a seleção do PI complexa é o fato de este não deve estar presente da amostra ou com concentração conhecida, exigindo uma avaliação específica para cada analito (**Vandecasteele e Block, 1993**). Entende-se que a tomada de decisão não é trivial e exige do analista um conhecimento prévio da composição da amostra a ser analisada.

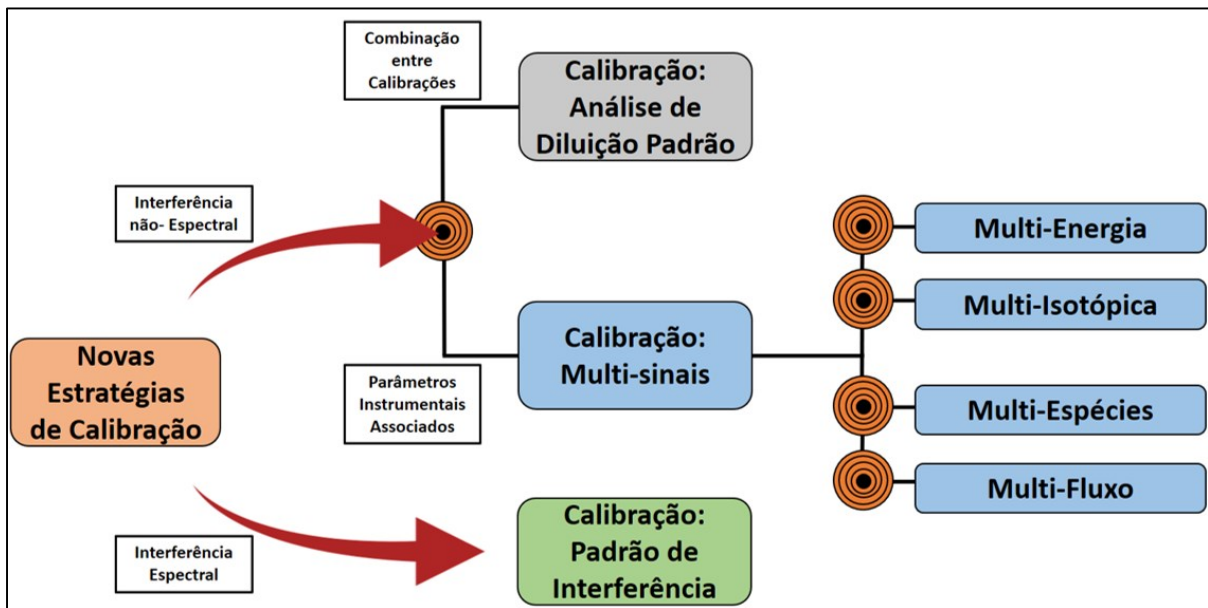
2.2 NOVAS ESTRATÉGIAS DE CALIBRAÇÃO

Os trabalhos reportados na literatura têm adotado os termos não-tradicionais ou estratégias recentes para se referir as novas estratégias de calibração. Dentre as citadas nos trabalhos de revisão (**Donati e Amais, 2019; Carter et al., 2018**) destacam-se o padrão de interferência (do inglês, *interference standard* – IFS), análise de diluição padrão (do inglês, *Standard dilution analysis* – SDA), multi-energia (do inglês, *multi-energy calibration* – MEC), multi-isotópica (do inglês, *multi-isotope calibration* – MICal), multi-espécies (do inglês, *multispecies calibration* – MSC) e multi-fluxo (do inglês, *multi-flow calibration* – MFC).

A medida que novas estratégias de calibração são propostas para as mais diversas técnicas analíticas, há um consenso que a calibração ideal deve ser capaz de minimizar significativamente os efeitos de matriz, flutuações de sinal relacionado com instabilidades instrumentais e interferências espectrais e não espectrais. De modo que quantidades discretas sejam utilizadas para reagente e amostra, e assim a relação entre sinal analítico e a determinação da concentração do analito seja exata e precisa (**Kościelniak e Wiczorek, 2016; Donati e Amais, 2019**).

Tendo a referência de uma calibração ideal, é possível sugerir uma classificação para as novas estratégias (IFS, SDA, MEC, MSC, MICal e MFC) em três grupos de acordo com dois critérios fundamentais (Figura 7), são eles: interferências espectrais e não espectrais.

Figura 7 – Fluxograma mostrando as novas estratégias de calibração. Os caminhos a serem percorridos são divididos com base no tipo de interferência.



Fonte: o autor (2022)

Conforme representado no fluxograma, o percurso da calibração multi-sinais e análise de diluição padrão consideram a interferência não-espectral e dependendo da técnica de análise escolhida e da amostra, outros percursos podem ser percorridos. Para o critério de interferência espectral a calibração de padrão de interferência apresenta-se como uma nova estratégia de calibração.

2.2.1 Técnica de calibração: padrão de interferência

O primeiro grupo destaca-se a técnica de calibração IFS, em que minimização de interferência (denominado de interferência espectral) causadas pela sobreposição do sinal analítico entre o analito e uma espécie química interferente de mesma razão massa/carga, são relatadas com base no conceito de padrão de interferência (Donati; Amais e Nóbrega, 2011). Esta abordagem avalia a potencialidade de espécies químicas formadas naturalmente no plasma por meio de processos físicos e químicos em descrever comportamento semelhante de íons poliatômicos isobáricos do analito que se deseja determinar por ICP-MS.

A técnica é baseada em espécies químicas naturalmente encontradas no plasma, como por exemplo $^{36}\text{Ar}^+$, $^{36}\text{ArH}^+$ e $^{38}\text{Ar}^+$ que podem apresentar flutuações de sinais semelhantes das espécies químicas que causam interferência na razão massa carga no analito a ser determinado.

Amais; Donati e Nóbrega, 2012 ao determinar enxofre por espectrometria de plasma indutivamente acoplado, selecionaram os padrões de interferência $^{36}\text{Ar}^+$, $^{36}\text{ArH}^+$ e $^{38}\text{Ar}^+$ para minimizar interferências espectrais por íons poliatômicos como $^{16}\text{O}_2^+$, $(^{16}\text{OH})_2^+$, $^{14}\text{N}^{16}\text{OH}_2^+$ e $^{14}\text{N}^{18}\text{O}^+$ em microemulsões de biodiesel. Material de referência certificado (Lubricating Oil, SRM 1848) e testes de adição e recuperação em amostras de biodiesel foram empregadas e recuperações entre 77 a 105% foram obtidas e consideradas eficazes.

A técnica de calibração parte do princípio de que o sinal analítico total (I_I) obtido é a composição do sinal da interferência (I_I) somado com o do analito (I_A). Deste modo, a razão entre o sinal total obtido e o sinal do interferente padrão de interferência formado no plasma minimizam o efeito do sinal interferente (**Amais, Nóbrega e Donati, 2014**). Assim, a menor variação em I_I (V_I) no tempo em que os padrões de calibração e amostra são medidos, a recuperação (R (%)) pode ser afetada, conforme representado na equação 9 (**Donati et al., 2011**).

$$R(\%) = \left(\frac{I_I}{I_A} \cdot V_I + 1 \right) 100 \quad (\text{Eq. 9})$$

A técnica não foi proposta para eliminar as interferências isobáricas e sim, superar as limitações causadas pelas interferências espectrais, melhorar a precisão nas análises por ICP-QMS e possibilitar uma estratégia alternativa que não requer modificações instrumentais, correções matemáticas e de custos reduzidos.

2.2.2 Técnicas de calibração: multi-sinais

Conforme discutido anteriormente, as técnicas de calibração tradicionais têm como base a relação entre o sinal analítico obtido do instrumento e a concentração do analito (**Virgilio et al., 2017**). Para as técnicas de calibração recentemente descritas na literatura (**Donati e Amais, 2019**), como a multi-energia (MEC), multi-isotópica (MICal), multi-espécies (MSC) e multi-fluxo (MFC), a determinação da concentração do analito parte da interpretação da constante de proporcionalidade existente entre o sinal analítico e a concentração da solução padrão (classificado na Figura 7 como o segundo grupo).

A resposta instrumental é dependente de diversos parâmetros, os quais são mantidos constantes e proporcionais para que a relação com a concentração do analito seja estabelecida, conforme equação 10:

$$E_{out} = K C \quad (\text{Eq. 10})$$

O termo E_{out} refere-se ao potencial de saída medido, C a concentração do analito e K uma constante de proporcionalidade. Ao considerar os parâmetros que estão associados a K , as técnicas de calibração multi-sinais são descritas. Reescrevendo a equação 11, temos que (Williams et al., 2019):

$$E_{out} = \left(\frac{CF\varepsilon_a}{Qe_f} \right) \frac{g_j}{g_0} e^{-\frac{E_{j0}}{k_B T}} V E_{j0} A_{j0} Y_m T_{op} R(\lambda) G \quad (\text{Eq. 11})$$

Onde C , F , ε_a , Q , e_f , g_j , g_0 , E_{j0} , k_B , T , V , A_{j0} , Y_m , T_{op} , $R(\lambda)$ e G representam respectivamente, concentração do analito, taxa de fluxo de solução, eficiência de atomização, taxa de fluxo de gás nebulização, fator de expansão do gás, pesos estatísticos do estado excitado e do estado fundamental, energia de transição, constante de Boltzmann, temperatura do plasma, volume observado do monocromador, taxa de emissão espontânea, eficiência de coleta do monocromador, transmitância ótica, responsividade do detector e ganho da eletrônica.

Para cada nova técnica de calibração, a concentração da solução padrão é mantida constante e um outro parâmetro responsável por descrever a constante de proporcionalidade é variável. A calibração multi-energia, considera o parâmetro E_{j0} (energia de transição que corresponde os diferentes comprimentos de onda de emissão ou absorção) como variável, entretanto a calibração multi-isotópica e multi-espécies, considera os sinais dos diferentes isótopos ou espécies múltiplas do mesmo analito. A calibração multi-fluxo tem a taxa da vazão do gás nebulizador (Q) ou a taxa de fluxo da solução (F) variando, dependendo do recurso instrumental disponibilizado.

Partindo de um procedimento de calibração em que a concentração da solução padrão é mantida constante, é possível estudar as diferentes estratégias de calibração multi-sinais (conforme Figura 7) dependendo de parâmetro instrumental, da variável que descreve a constante de proporcionalidade e da técnica de análise.

Para cada nova técnica de calibração, a concentração da solução padrão é mantida constante e um outro parâmetro responsável por descrever a constante de proporcionalidade é variável. A calibração multi-energia, considera o parâmetro E_{j0} (energia de transição que corresponde os diferentes comprimentos de onda de emissão ou absorção) como variável, entretanto a calibração multi-isotópica e multi-espécies, considera os sinais dos diferentes isótopos ou espécies múltiplas do mesmo analito. A calibração multi-fluxo tem a taxa da vazão do gás nebulizador (Q) ou a taxa de fluxo da solução (F) variando, dependendo do recurso instrumental disponibilizado.

Partindo de um procedimento de calibração em que a concentração da solução padrão é mantida constante, é possível estudar as diferentes estratégias de calibração multi-sinais (conforme Figura 7) dependendo de parâmetro instrumental, da variável que descreve a constante de proporcionalidade e da técnica de análise.

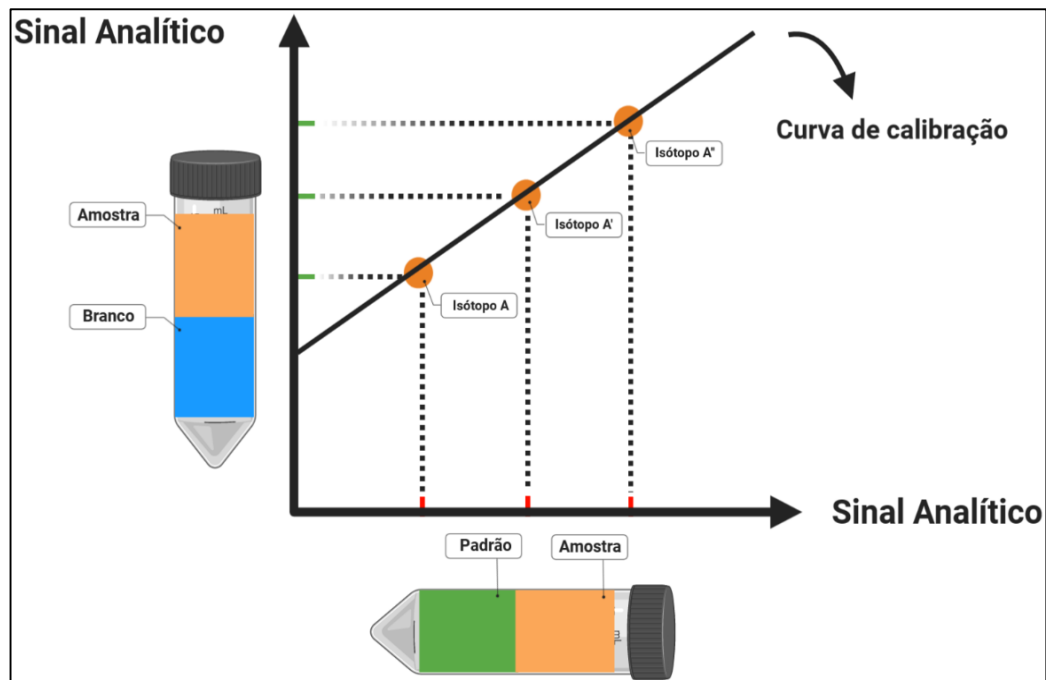
2.2.2.1 Técnica de calibração multi-isotópica

Um das vantagens desta técnica de calibração, está na simplificação do preparo da amostra e a necessidade de menores quantidades de solução padrão e amostra quando comparado com as técnicas tradicionais (**Carter et al., 2018**).

O procedimento de calibração é definido em termos de porcentagem volume/volume, sendo necessário duas soluções de calibração. Uma delas é composta por 50% amostra e 50% padrão e a outra por 50% amostra e 50% branco. O volume de amostra em ambas as soluções é o mesmo, assim efeitos de matriz são minimizados devido a correspondência estabelecida (**Virgilio et al., 2018**). Cuidado adicional no preparo da solução amostra e padrão, pois erros sistemáticos podem influenciar os resultados e não serem detectados facilmente (**Carter et al., 2018**).

A calibração multi-isotópica é dita multi-sinais devido ao monitoramento dos sinais analíticos instrumentais diferentes isótopos de um dado analito medido nas soluções de calibração preparadas. A resposta instrumental obtida para a solução de calibração amostra e padrão é plotada no eixo x do gráfico e para a solução amostra e branco no eixo y, a resposta para cada isótopo, corresponde um ponto de calibração conforme apresentado na Figura 8.

Figura 8 – Representação esquemática da plotagem do gráfico para calibração multi-isotópica.



Fonte: o autor (2022)

Medindo as respostas instrumentais para cada solução de calibração preparada e monitorando cada isótopo, a equação 10 pode ser reescrita para:

$$I_{(is\acute{o}topo)amostra+padr\tilde{a}o} = K(C_{(amostra)} + C_{(padr\tilde{a}o)}) \quad (\text{Eq. 11})$$

$$I_{(is\acute{o}topo)amostra} = K(C_{amostra}) \quad (\text{Eq. 12})$$

Se substituir E_{out} por intensidade do sinal analítico ($I_{(is\acute{o}topo)}$) para representar a resposta instrumental para um determinado isótopo, as relações entre o sinal analítico e a concentração são descritas conforme as equações 11 e 12.

Considerando a alta estabilidade proporcionada pelos instrumentos modernos e a minimização dos efeitos de matriz estabelecido pela correspondência de matriz no preparo das soluções de calibração (Donati e Amais, 2019), a constante de proporcionalidade K nas equações 11 e 12 tem o mesmo valor, possibilitando uma relação entre o sinal analítico e a concentração do analito representa por:

$$K = \frac{I_{(is\acute{o}topo)amostra+padr\~{a}o}}{(C_{(amostra)} + C_{(padr\~{a}o)})} \quad (\text{Eq. 13})$$

$$K = \frac{I_{(is\acute{o}topo)amostra}}{(C_{amostra})} \quad (\text{Eq. 14})$$

$$\frac{I_{(is\acute{o}topo)amostra+padr\~{a}o}}{(C_{(amostra)} + C_{(padr\~{a}o)})} = \frac{I_{(is\acute{o}topo)amostra}}{(C_{amostra})} \quad (\text{Eq. 15})$$

$$I_{(is\acute{o}topo)amostra} = I_{(is\acute{o}topo)amostra+padr\~{a}o} \cdot \left[\frac{C_{(amostra)}}{C_{(amostra)} + C_{(padr\~{a}o)}} \right] \quad (\text{Eq. 16})$$

De acordo com a equação 16 uma função de calibração é estabelecida, sendo a variável dependente o sinal analítico para o isótopo presente na solução de calibração amostra e branco ($I_{(is\acute{o}topo)amostra}$) e a independente registrada no eixo x, o sinal proporcionado pelo isótopo presente na solução de calibração padrão e amostra é simbolizado por $I_{(is\acute{o}topo)amostra+padr\~{a}o}$. Para determinar a concentração do analito na amostra, o slope da função de calibração $\left[\frac{C_{(amostra)}}{C_{(amostra)} + C_{(padr\~{a}o)}} \right]$ pode ser rearranjado para:

$$\text{Slope} = \left[\frac{C_{(amostra)}}{(C_{(amostra)} + C_{(padr\~{a}o)})} \right] \quad (\text{Eq. 17})$$

$$C_{amostra} = \left[\frac{\text{Slope} \cdot C_{(padr\~{a}o)}}{1 - \text{Slope}} \right] \quad (\text{Eq. 18})$$

A proporção 1:1 estabelecida entre amostra/branco e amostra/padrão é adotada para simplificar os cálculos, porém outras proporções podem ser utilizadas desde que a quantidade de amostra seja a mesma para cada solução a ser preparada e um fator de correção seja aplicado:

$$(C_{amostra}) = \left[\frac{Slope \cdot C_{(padrão)}}{1 - Slope} \right] \cdot \frac{V_{padrão}}{V_{amostra}} \quad (\text{Eq. 19})$$

Devido a técnica de análise ser a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, o princípio da técnica de calibração está evidenciado nos sinais monitorados para os isótopos do analito nas soluções de calibração, entretanto é possível extrapolar o princípio da técnica de calibração multi-sinais e o artifício matemático da calibração para multi-energia e multi-espécie, sendo o parâmetro variável as múltiplas energia de transição aplicado na espectrometria de emissão e absorção atômica e o íon molecular do analito investigado, respectivamente.

Um dos limitantes da técnica de calibração multi-isotópica é o fato de algumas espécies químicas serem monoisotópicas, restringindo o a quantidade de analitos a que podem ser determinados. Entretanto, a ausência de padrão interno e conseqüentemente o estudo extensivo e aprofundado para a sua escolha, torna a MICal uma alternativa de técnica de calibração simplificada.

2.2.2.2 Técnica de calibração multi-fluxo

O nome atribuído para a técnica de calibração, multi-fluxo, está relacionado com alterações na taxa de fluxo de solução ou na vazão do gás nebulizador, representado na constante de proporcionalidade por F e Q respectivamente (Eq. 11).

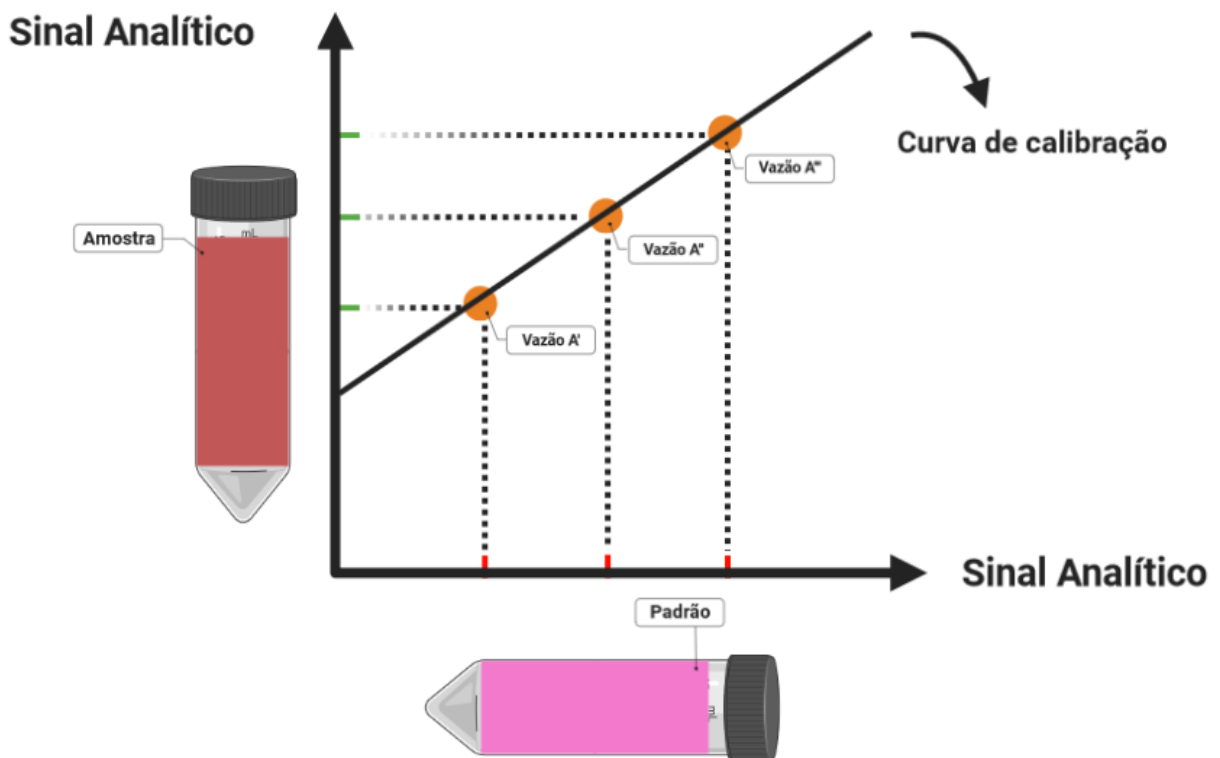
Para a técnica de análise ICP-MS, alterações do termo Q podem ser feitos com base no software que acompanha o instrumento, isto é, mudanças na vazão do gás nebulizador proporcionam condições diferentes no plasma e sinais analíticos (contagens) distintos.

As técnicas de calibração tradicionais por relacionar o sinal analítico obtido do instrumento com a concentração, o preparo de soluções com diferentes concentrações do padrão passa a ser um requisito da técnica, entretanto quando o parâmetro a ser alterado é o termo Q, é possível preparar apenas uma única solução de calibração padrão com concentração conhecida.

Devido a possibilidade de alterar a vazão do gás nebulizador, por meio do software disponibilizado para o instrumento o qual a técnica de ICP-MS é aplicada, os sinais analíticos de uma concentração conhecida de solução estoque padrão e da amostra, são obtidos para cada vazão (ponto de calibração), separadamente, ao longo de um intervalo definido.

Devido a possibilidade de alterar a vazão do gás nebulizador, por meio do software disponibilizado para o instrumento o qual a técnica de ICP-MS é aplicada, os sinais analíticos de uma concentração conhecida de solução estoque padrão e da amostra, são obtidos para cada vazão (ponto de calibração), separadamente, ao longo de um intervalo definido.

Figura 9 – Gráfico típico para calibração multifluxo.



Fonte – o autor (2022)

O gráfico é plotado como variável independente (eixo x), o sinal medido para a solução padrão preparada e o eixo y, como variável dependente, o sinal medido para a amostra, conforme a Figura 9. Para esta calibração multi-sinal, o procedimento de preparo das soluções se diferencia, pois não há correspondência de matriz.

Para determinar a concentração do analito na amostra, a função de calibração é obtida considerando que:

$$I_{(rotação)padrão} = KC_{(padrão)} \quad (\text{Eq. 20})$$

$$I_{(rotação)amostra} = KC_{(amostra)} \quad (\text{Eq. 21})$$

As condições de estabilidade dos instrumentos modernos em técnicas de análise são constantes, K apresenta o mesmo valor para a solução padrão e a amostra, o que permite estabelecer a seguinte relação:

$$K = \frac{I_{(rotação)padrão}}{C_{(padrão)}} \quad (\text{Eq. 22})$$

$$K = \frac{I_{(rotação)amostra}}{(C_{amostra})} \quad (\text{Eq. 23})$$

$$\frac{I_{(rotação)padrão}}{C_{(padrão)}} = \frac{I_{(rotação)amostra}}{C_{(amostra)}} \quad (\text{Eq. 24})$$

$$I_{(rotação)amostra} = I_{(rotação)padrão} \cdot \left[\frac{C_{(amostra)}}{C_{(padrão)}} \right] \quad (\text{Eq. 25})$$

A equação 25 descreve a função de calibração para a calibração multi-fluxo. O slope é denotado por $\left[\frac{C_{(amostra)}}{C_{(padrão)}} \right]$ e a concentração da amostra é determinada e rearranjada para:

$$Slope = \left[\frac{C_{(amostra)}}{C_{(padrão)}} \right] \quad (\text{Eq. 26})$$

$$C_{(amostra)} = C_{(padrão)} \cdot Slope \quad (\text{Eq. 27})$$

Devido ao preparo de apenas uma única solução padrão, a MFC quando comparada com a calibração externa, desempenha uma economia de recursos para seu procedimento e simplifica o trabalho exercido pelo analista. Ao mesmo tempo, a limitação de empregar apenas uma única solução de calibração pode estar nos erros sistemáticos associados à preparação (Williams et al., 2019).

2.2.2.3 Técnica de calibração análise de diluição padrão

Dentre as novas estratégias de calibração, a análise de diluição padrão é a única que combina calibrações tradicionais para minimizar interferências não-espectrais (**Virgilio et al., 2016**).

O procedimento de preparo das soluções de calibração é semelhante da calibração multi-isotópica, sendo que uma delas é composta por 50% amostra e 50% padrão e um elemento utilizado como padrão interno (S_1 , solução 1) e a outra composta por 50% amostra e 50% branco (S_2 , solução 2). O padrão interno será utilizado para minimizar possíveis flutuações do sinal analítico relacionados com parâmetros instrumentais, conforme descrito na calibração de padrão interno e o volume correspondente de amostra em ambas as soluções, possibilita a correção de efeitos de matriz simplificando a calibração de adição de padrão (**Jones et al., 2015**).

A técnica baseia-se na diluição da solução 1 à medida que a solução 2 é adicionada no mesmo recipiente de S_1 . Inicialmente, os sinais dos analitos e do padrão interno são monitorados em um intervalo de tempo, até descrever um comportamento estável e constante antes da adição da solução 2. Com adição da S_2 , os sinais analíticos são de menor intensidade devido a diluição gradual ao longo do tempo, descrevendo um comportamento decrescente no gráfico, região esta denominada de SDA (**Donati e Amais, 2019**).

Com base na razão entre o sinal do analito e do padrão interno, a resposta é plotada no gráfico como variável dependente e no eixo da variável independente a razão de $1/\text{Concentração do padrão interno}$. A plotagem do gráfico descreve uma curva de calibração crescente para cada analito, sendo a concentração do padrão interno calculada a cada ponto ao longo da diluição padrão. A concentração do analito na amostra é calculado pela equação 28 (**Jones et al., 2015**):

$$C_{amostra} = \left[\frac{Slope \cdot C_{(padr\tilde{a}o)}}{C_{(interno)} \cdot Slope} \right] \cdot \frac{V_{padr\tilde{a}o}}{V_{amostra}} \quad (\text{Eq. 28})$$

Jones et al., 2015 determinaram Al, Cd, Cr, Cu, Co, Fe, Ni e Pb em diversas amostras por ICP OES utilizando a calibração de análise de diluição padrão sendo os resultados comparados com os valores obtidos de calibrações tradicionais como a calibração externa, interna e adição de padrão. O erro percentual da concentração esperada do analito presente na

amostra foi de 19,3%, 20,3%, 10,7% e 4,7% para EC, IS, SA e SDA, respectivamente. O desvio padrão relativo, avaliado como precisão, obteve valores médios de 19,8%, 9,3%, 13,3% e 5,8% para EC, IS, SA e SDA respectivamente.

2.2.2.4 Principais aplicações de calibração multi-sinais em técnica espectrométrica

A medida que as técnicas de calibração multi-sinais avançam na sua aplicação seja para amostras em diferentes níveis de complexidade, compatibilidade com diferentes técnicas de análise e preparo de amostra simplificado, trabalhos são reportados na literatura como apresentado na Tabela 1.

Virgilio et al., 2017 descrevem e valida a técnica de calibração multi-sinais denominada de multi-energia e aplica para técnicas como espectrometria de emissão óptica de plasma induzido por micro-ondas (MIP OES), espectrometria de emissão óptica de plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de absorção chama atômica de alta resolução com fonte contínua por chama (HR-CS FAAS). Os autores aplicaram a técnica de calibração para diferentes amostras, como por exemplo, chá verde, refrigerante, vinho tinto molho de soja e os resultados quando comparados com a calibração externa, interna e adições de padrão, concluíram ser um rápido e eficiente a calibração multi-energia.

A abrangência das técnicas multi-sinais, também foram investigas em espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) por **Virgilio et al., 2018** em seu trabalho com a técnica de calibração multi-isotópica. Neste estudo, envolveu a prova de conceito para a técnica de calibração a qual foi utilizada para determinar Ba, Cd, Se, Sn e Zn em materiais de referência certificados em matrizes distintas. Para os autores a conclusão foi que pode ser uma boa alternativa quando comparada com as técnicas de calibração tradicionais. Para a técnica de análise, ICP-MS/MS, a calibração muti-espécies foi proposta no trabalho dos autores **Williams e Donati, 2018** em que várias espécies químicas de um elemento químico isotópico são utilizadas para a calibração, os quais são utilizados para determinar a concentração As, Co e Mn em amostras de arroz e fígado. Concluíram que a calibração pode ser uma técnica eficiente para minimizar os efeitos de matriz.

Williams et al., 2019 descrevem a calibração multi-fluxo como sendo uma combinação de simplicidade da calibração externa com a precisão aprimorada de empregar diferentes condições para coleta do sinal analítico para descrever a curva de calibração. Em seu trabalho os autores determinaram Cr, Cu, Fe e Mn em amostras de água e alimentos por meio

da espectrometria de emissão óptica de plasma induzido por micro-ondas (MIP OES). Os efeitos de matriz, segundo os autores foram minimizados devido à normalização do plasma devido a técnica de calibração utilizar diferentes vazões do fluxo de gás nebulizador e concluíram que quando comparado com a técnica de calibração externa é uma alternativa eficaz, entretanto ressaltam a necessidade de estudos adicionais em diferentes condições de amostra e analitos.

Diante dos relatos acima nota-se que a utilização das técnicas de calibração multi-sinais surge como uma alternativa viável para as técnicas de análise, em específico para a ICP-MS, entretanto os conceitos envolvidos para as técnicas de calibração, em especial para a calibração multi-fluxo e multi-isotópica, requerem otimização das condições instrumentais para possibilitar novas aplicações destas técnicas de calibração em diferentes, sendo este um incentivo de pesquisa.

Tabela 1 – Aplicações de espectrometria atômica envolvendo métodos de calibração multi-isotópica e multi-fluxo

Estratégia de Calibração	Analito	Amostra	Técnica de Análise	Referência
MICal	Cr, Co, Fe, Ni, Pb, Sn, Sr e Zn	Vinho	ICP-MS	Wheal e Wilkes, 2021
MICal	Ba, Cd, Se, Sn e Zn	CRMs NIST 1515 ^a , NIST 1547 ^b , NIST 1570a ^c e NIST 1573a ^d , NIST 1567a ^e e NIST 1568b ^f e NIST 1643e ^g	ICP-MS	Virgilio et al., 2018
MICal	Cd, Cr, Mo, Ni, Pb, Se e Sr	CRMs NIST 1577c ^h e NIST 8414 ⁱ	ICP-MS	de Higuera et al., 2020
MFC	Cr, Cu, Fe e Mn	SDWM ^j , CRM-RS-A ^k e NIST 1573a ^l	MIP OES	Williams et al., 2019

Fonte: o autor (2022)

^aMaçã

^bPêssego

^cEspinafre

^dFolhas de tomate

^eTrigo

^fFarinhas de arroz

^gTraço de elemento em água

^hFígado Bovino

ⁱMúsculo Bovino

^jMetais em água potável secundária

^kSedimento de rio A

^lFolhas de tomate

3 OBJETIVOS

3.1 OBJTIVO GERAL

Avaliar a aplicação das novas técnicas de calibração, multi-fluxo e multi-isotópica, em comparação com a calibração externa e com padrão interno para determinação de metais em amostras de vinho utilizando a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Otimizar os parâmetros instrumentais tais como potencial da radiofrequência e vazão do gás nebulizador para as técnicas de calibração multi-isotópica e multi-fluxo, calibração externa e com padrão interno.
2. Estabelecer a faixa da vazão do gás nebulizador para a técnica de calibração multi-fluxo.
3. Estudar a concentração a ser utilizada do padrão multi-elementar para a técnica de calibração multi-isotópica e multi-fluxo.
4. Comparar as concentrações dos analitos nas amostras de vinho obtidas utilizando calibrações multi-isotópica e multi-fluxo com as determinadas com uso das técnicas convencionais de calibração (externa e com padrão interno).

4 METODOLOGIA

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

A avaliação da aplicação das novas técnicas de calibração multi-sinais foi realizada utilizando um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) Elan 6000 (Perkin Elmer-Sciex, Thornhill, Canadá) e argônio (99,996%, White Martins, São Paulo, Brasil) foi utilizado como gás do plasma. Os parâmetros instrumentais utilizados para as determinações por ICP-MS para a técnica de calibração multi-fluxo e multi-isotópica foram otimizados e os isótopos monitorados foram selecionados de acordo com as características de cada técnica de calibração, níveis de concentração dos analitos nas amostras, abundâncias relativas, potenciais interferências e também pelo fato de estabelecer uma comparação entre as calibrações convencionais e as novas técnicas, excluindo as comparações entre as calibrações multi-sinais. Os parâmetros instrumentais do ICP-MS e os isótopos selecionados são apresentados, respectivamente, nas Tabela 1 e Tabela 2.

Tabela 2 – Otimização dos parâmetros de ICP-MS aplicados para a calibração multi-fluxo e multi-isotópica.

Parâmetro	Condição operacional
Potencial da Radiofrequência	1100 W
Vazão do gás do plasma	15 L . min ⁻¹
Vazão do gás nebulizador	0,8 – 1,2 L min ⁻¹
Cones amostrador e skimmer	Pt
Medição do sinal	Peak Hopping
Leituras/Replicatas	1
Replicatas	3
<i>Dwell Time</i>	50 ms
Modo de operação do detector	Dual
Nebulizador	Pneumático de fluxo cruzado
Câmara de nebulização	Duplo passo

Fonte: o autor (2022)

Tabela 3 – Isótopos selecionados para determinação de metais em amostras de vinho usando de calibração multi-fluxo (MFC) e multi-isotópica (MICal) por ICP-MS.

Técnica de Calibração	Isótopos Selecionados
MICal	Mo ⁹⁵ , Mo ⁹⁶ , Mo ⁹⁷ , Mo ⁹⁸ e Mo ¹⁰⁰
	Pb ²⁰⁴ , Pb ²⁰⁶ , Pb ²⁰⁷ e Pb ²⁰⁸
MFC	Cd ¹¹¹ , Cd ¹¹² , Cd ¹¹³ , Cd ¹¹⁴ e Cd ¹¹⁶
	Ni ⁵⁸ , Ni ⁶⁰ , Ni ⁶¹ e Ni ⁶²
	Mo ⁹⁸ , Ni ⁶⁰ , Zn ⁶⁶ e Fe ⁵⁷

Fonte – o autor (2022)

4.2 MATERIAIS E REAGENTES

Todos os reagentes utilizados foram grau analítico de pureza. Água deionizada em sistema Milli-Q Millipore ((Bedford, MA, EUA) a uma resistividade de 18,2 MΩ cm, ácido nítrico (Carlo Erba, Milão, Itália) destilado abaixo do seu ponto de ebulição em um destilador de quartzo da Kürner Analysentechnik (Rosenheim, Alemanha). As soluções foram preparadas por diluição apropriada da solução estoque multi-elementar contendo 1000 mg L⁻¹ de Ag, Al, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mo, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Tl e Zn dissolvida em HNO₃ 1% (v v⁻¹) (Ref. 1113550100, Merck, cidade, país). As curvas de calibração na faixa de 5 – 200 µg L⁻¹ foram construídas para a calibração externa e calibração com padrão interno, e ¹⁰³Rh (ródio) a 5 µg L⁻¹ foi usado como padrão interno.

Para a calibração multi-isotópica, a solução padrão+amostra foi preparada usando 50% v v⁻¹ das amostras de vinho e 50% v v⁻¹ de solução multi-elementar, e a solução branco+amostra foi preparada usando 50% v v⁻¹ das amostras de vinho e 50% v v⁻¹ de HNO₃ diluído (1% v v⁻¹). As concentrações da solução estoque para calibração multi-fluxo foram preparadas por diluição apropriada em meio aquoso e em meio alcoólico (C₂H₅OH absoluto P.A. ACS 99,5% SYNTH, Diadema, Brasil) e as faixas da vazão do gás nebulizador (0,6 – 1,3 L min⁻¹, incremento de 0,1) e da rotação da bomba peristáltica (2,5 – 30 rpm, incremento de 2,5) foram avaliadas considerando os analitos da solução padrão (Daily performance) 10 µg L⁻¹ contendo os analitos Mg, Pb, In, Rh, Ba e Ce.

4.3 AMOSTRAS

Para as análises, três amostras de vinhos tintos produzidos e engarrafados no Brasil, foram adquiridos em lojas especializadas da cidade de Florianópolis, no estado de Santa Catarina. Os tipos de vinho foram selecionados aleatoriamente com teor alcoólico na faixa de 15% v v⁻¹. As amostras possuem coloração púrpura/violeta que podem variar com o tempo entre vermelho/rubi, granada/tijolo e acastanhado. As amostras foram adquiridas em temperatura ambiente e engarrafadas em material de vidro com tampa de rolha e lacradas. Separou-se uma alíquota de 50 mL de cada amostra as quais foram armazenadas na geladeira a 7 ± 2 °C.

4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.4.1 Procedimento de preparo da solução padrão multi-elementar para a calibração multi-sinais

4.4.1.1 Preparo da solução padrão multi-elementar para MICal

Para a definição das soluções para a calibração multi-isotópica, primeiro iniciou com o preparo da solução composta, em volume, por 50% de padrão e 50% de amostra. A concentração do padrão multi-elementar foi avaliada, em triplicata, para as soluções concentrações de 2,5, 6,25, 12,5, 20, 30 e 40 µg L⁻¹ para Mo, Pb, Cd e Ni (e seus respectivos isótopos, de acordo com a Tabela 2).

As amostras de vinho utilizadas foram adicionadas de 40 µg L⁻¹ dos analitos e diluídas 25 vezes para compor a solução final de amostra+branco e amostra+padrão. De acordo com a composição, em volume, de 50% para amostra e 50% para o branco (1% v v⁻¹ de HNO₃) a solução final apresentou uma diluição de 50 vezes para a amostra.

Cabe ressaltar que o objetivo do trabalho é realizar o teste de conceito para a calibração multi-isotópica por ICP-MS, por este motivo nenhuma consideração específica sobre a origem geográfica das amostras foi feita para comparar com as técnicas de calibração externa e interna.

4.4.1.2 Preparo da solução padrão multi-elementar para MFC

O estudo e definição das concentrações em relação as soluções padrão multi-elementar para a calibração multi-fluxo, iniciou com uma diluição de 50 vezes para as amostras de vinho e utilizando padrões em faixa de concentrações entre 10, 15, 30 e 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Mo, Ni, Zn e Fe em triplicata na ausência e presença de álcool 0,3% v v⁻¹ (valor correspondente a uma diluição de 50 vezes o teor alcoólico da amostra) foram preparadas.

4.4.2 Otimização instrumental para calibração multi-sinais

4.4.2.1 Otimização dos parâmetros do ICP-MS para calibração MICal

Os parâmetros otimizados para a calibração multi-isotópica por ICP-MS foram: a vazão do gás nebulizador e o potencial da radiofrequência que variaram, respectivamente, de 0,8 a 1,2 L min⁻¹ e 900 a 1400 W nos meios aquosos e amostra de vinho diluída. Para cada parâmetro a análise compreendeu-se conforme as concentrações obtidas para cada analito, e as características intrínsecas da calibração multi-isotópica.

4.4.2.2 Otimização dos parâmetros do ICP-MS para calibração MFC

Inicialmente a vazão do gás nebulizador e a rotação da bomba peristáltica foram otimizados por meio de uma solução padrão de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ contendo Pb, In, Ba, Ce, Mg e Rh conhecida por solução *Daily*, conforme o fabricante do equipamento (Perkin-Elmer) sugere para as otimizações instrumentais. Para a vazão do gás nebulizador a otimização compreendeu uma faixa de 0,6 – 1,3 L min⁻¹ com incrementos de 0,1 L min⁻¹, sendo os valores alterados no software que acompanha o equipamento. Nesta etapa a rotação da bomba peristáltica foi mantida constante em 24 rotações por minuto e radiofrequência de 1100 W. Para cada condição da vazão do gás nebulizador, as contagens para os analitos Pb, Mg, In e Rh, a razão Ba²⁺/Ba⁺ para íons de dupla carga e a formação de óxido CeO/Ce foram monitorados.

A otimização da rotação da bomba peristáltica foi realizada através da interpretação da relação existe entre as contagens por segundo para os analitos Mg, Pb, In e Rh de uma solução padrão de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (solução *Daily*) em função da faixa de rotação 2,5 – 30 rotações por minuto (incrementos de 2,5).

4.4.2.3 Calibração Externa e padronização interna

Os dados obtidos da calibração multi-isotópica e multi-fluxo, foram comparados com os das calibrações externa e com padrão interno. As curvas de calibração foram construídas na entre 5; 10; 50; 100; 150 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os experimentos e ^{103}Rh (ródio) a 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi usado como padrão interno. As amostras de vinho, foram analisadas em triplicata, utilizando diluição de 50 vezes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 OTIMIZAÇÃO INSTRUMENTAL PARA CALIBRAÇÃO MULTI-SINAIS

5.1.1 Calibração multi-isotópica

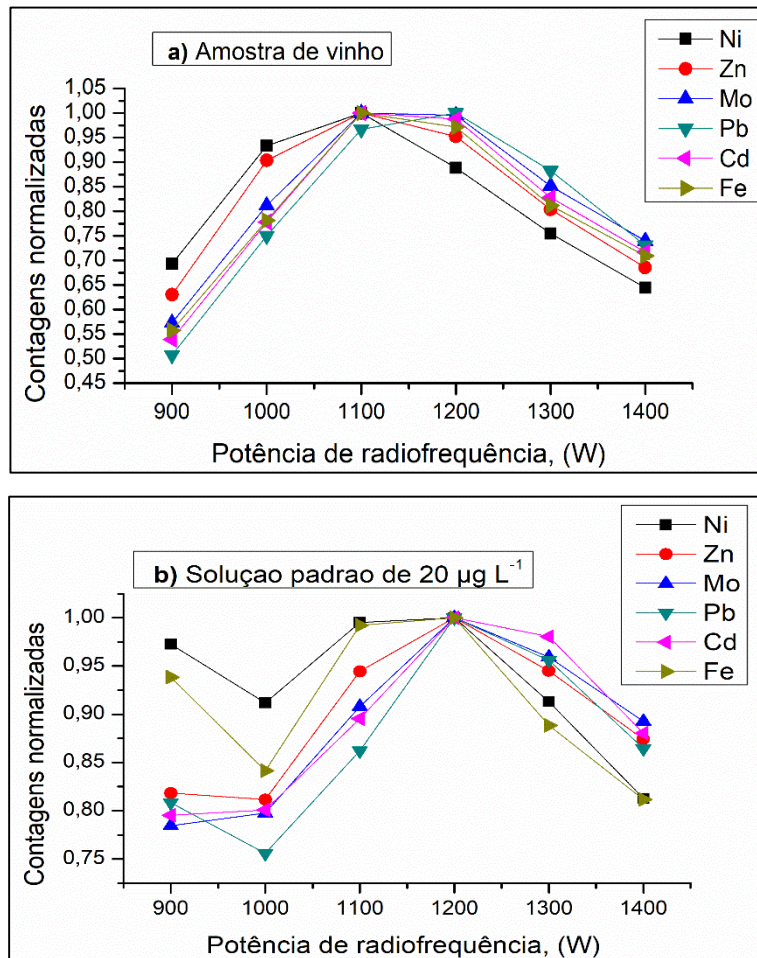
5.1.1.1 Potência de radiofrequência

Após o processo de nebulização da amostra, o aerossol líquido/gás é conduzido para o plasma onde ocorre os processos de dessolvatação, volatilização, dissociação e ionização, produzindo íons atômicos dos analitos. Estes, serão amostrados por diferença de pressão através do cone amostrador e *skimmer* e direcionados para o analisador de massas onde são separados em função da sua razão massa/carga (**Thomas, 2013**).

A energia necessária para que o aerossol líquido/gás seja convertido em uma população de íons atômicos, está associada ao plasma indutivamente acoplado. É uma relação direta com o potencial de radiofrequência aplicado. Em condições de potenciais baixos, a energia associada ao plasma favorece a formação de óxidos e íons poliatômicos, podendo interferir na razão massa/carga do isótopo do analito (**Thomas, 2013**). No outro extremo, em condições de elevada potência de radiofrequência a alta energia a população de íons de dupla carga é favorecida, os quais pode interferir na análise (**Nelms, 2005**).

Com base nas características instrumentais e o funcionamento do ICP-MS, para se obter uma resposta analítica significativa, foi otimizado a potência da radiofrequência (900 a 1400 W, incrementos de 100 W) para a solução padrão multi-elementar e a amostra de vinho, respectivamente, conforme apresentado na Figura 11. As contagens por segundo obtidas para cada analito foram normalizadas em relação a maior contagem de cada analito para facilitar a representação dos resultados e pelas diferenças na sensibilidade distinta de cada analito no ICP-MS.

Figura 10 – Otimização do potencial de radiofrequência. a) para amostra de vinho e b) para uma solução padrão multi-elementar ($20 \mu\text{g L}^{-1}$).



Fonte: o autor (2022)

De acordo com os dados apresentados na Figura 11 a condição de compromisso para potência de radiofrequência está entre 1200 W para a solução padrão multi-elementar e 1100 W para a amostra de vinho diluída 50 vezes.

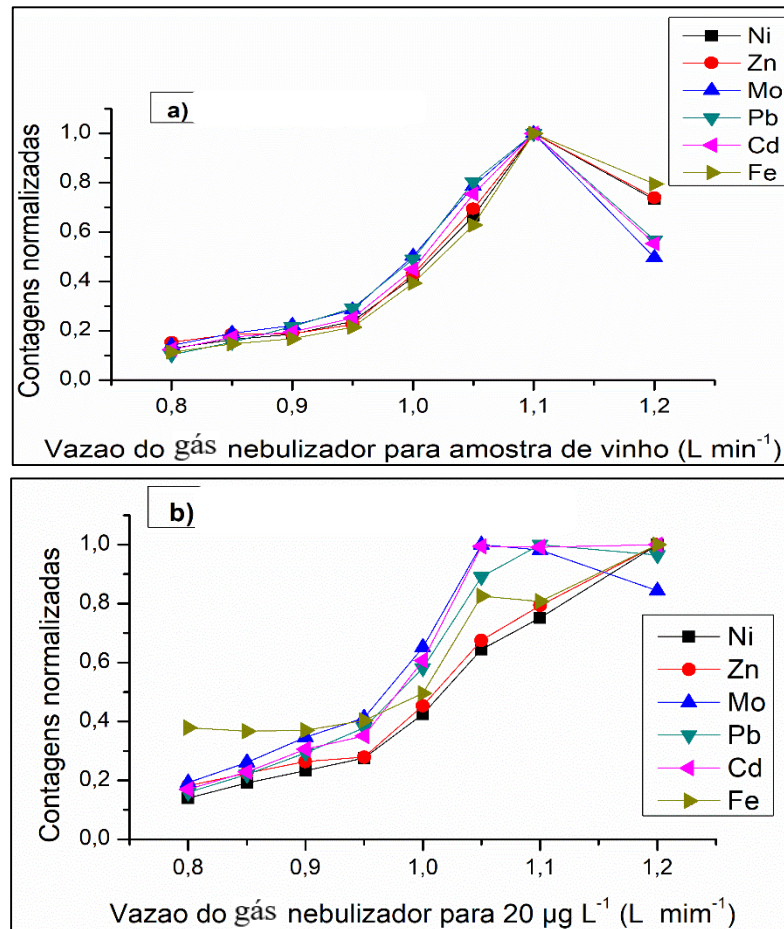
Devido ao preparo das soluções de calibração para a técnica multi-isotópica adotar uma correspondência de matriz para minimizar os seus efeitos, foi escolhido a condição ótima de 1100 W para as calibrações multi-sinais.

5.1.1.2 Vazão do gás nebulizador

Os resultados representados na Figura 11, apresentam o efeito da variação da vazão de gás nebulizador sobre a contagens normalizadas de diferentes isótopos monitorados na amostra

de vinho e para o padrão multi-elementar, respectivamente. As contagens por segundo obtidas para cada analito foram normalizadas em relação a maior contagem para cada um dos analitos.

Figura 11 – Otimização da vazão do gás nebulizador. a) para amostra de vinho e b) para uma solução padrão multi-elementar ($20 \mu\text{g L}^{-1}$).



Fonte: o autor (2022)

De acordo com os dados apresentados na Figura 11 a condição ótima da vazão do gás nebulizador está entre $1,1 \text{ L min}^{-1}$ para a amostra de vinho diluída 50 vezes e $1,2 \text{ L min}^{-1}$ para a solução padrão multi-elementar. Ressalta-se que o tempo de permanência dos analitos no plasma para vazões do gás nebulizador abaixo de $1,1 \text{ L min}^{-1}$ é maior e favorece a formação dos íons dupla carga (Ba^{2+}/Ba) e vazões maiores que $1,2 \text{ L min}^{-1}$, diminui o tempo de exposição do aerossol da amostra no plasma e favorece um aumento considerável na formação de óxidos (CeO/Ce) (Nelms, 2005). Neste caso, a condição de compromisso foi a vazão do gás

nebulizador de $1,1 \text{ L min}^{-1}$ para MICal, uma vez que o preparo das soluções de calibração para a técnica multi-isotópica foi realizado por meio da correspondência de matriz.

5.1.2 Calibração Multi-fluxo

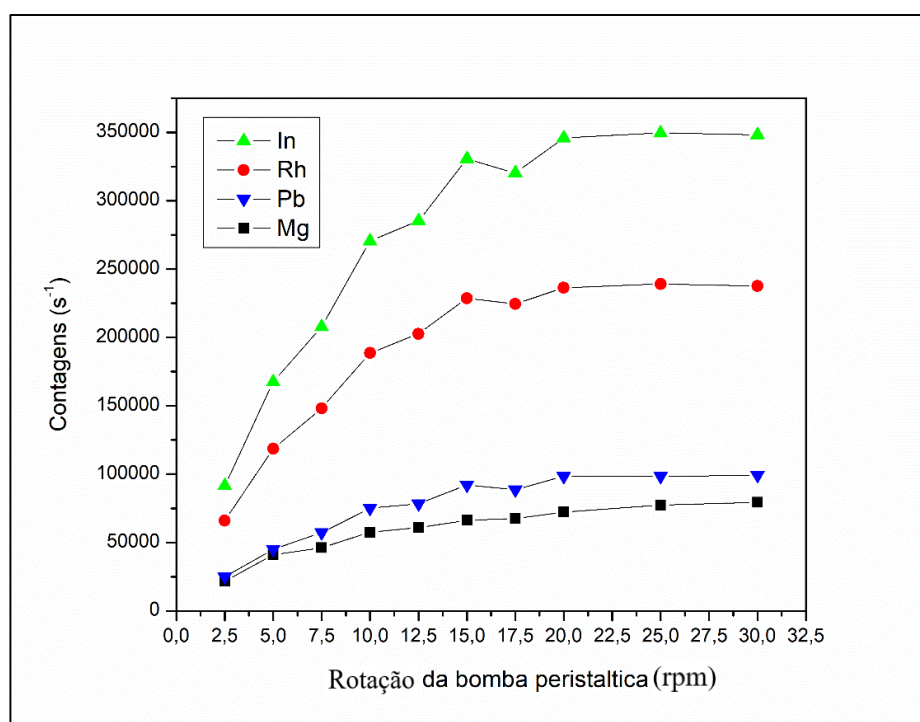
Nesta técnica de calibração, a quantidade de analito que chega ao plasma pode variar, basicamente, em função de dois parâmetros instrumentais, a rotação da bomba peristáltica e vazão do gás nebulizador. A alteração desses parâmetros pode aumentar ou reduzir a quantidade de analito que efetivamente chega ao plasma, dessa forma ambos podem ser utilizados para a calibração multi-fluxo. Assim, a variação da rotação da bomba peristáltica e a variação na vazão do gás nebulizador foram avaliados para esta técnica de calibração.

5.1.2.1 Rotação da bomba peristáltica

A otimização da rotação da bomba peristáltica foi realizada, conforme manual do equipamento, por meio da interpretação da relação existe entre as contagens por segundo (s^{-1}) para os analitos Mg, Pb, In e Rh em função da faixa de rotação (2,5 – 30 rpm) para uma solução padrão de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ contendo Mg, Pb, In, Rh, Ba e Ce. Neste caso, a vazão do gás nebulizador foi mantida constante ($1,1 \text{ L min}^{-1}$).

Foi observado que em rotações na faixa entre 5 – 20 com incrementos de 2,5 rpm, descrevem um comportamento crescente para as contagens por segundo, devido ao aumento do volume de aerossol da solução que chega ao plasma. Entretanto, para rotações acima de 20 rpm, o volume de aerossol tende para uma estabilidade, isso ocorre devido a limitação imposta pela capacidade máxima do nebulizador, conforme demonstrado na Figura 12.

Figura 12 – Otimização da rotação da bomba peristáltica para solução padrão (*Daily performance*) $10 \mu\text{g L}^{-1}$ contendo os analitos Mg, Pb, In e Rh.



Fonte: o autor (2022)

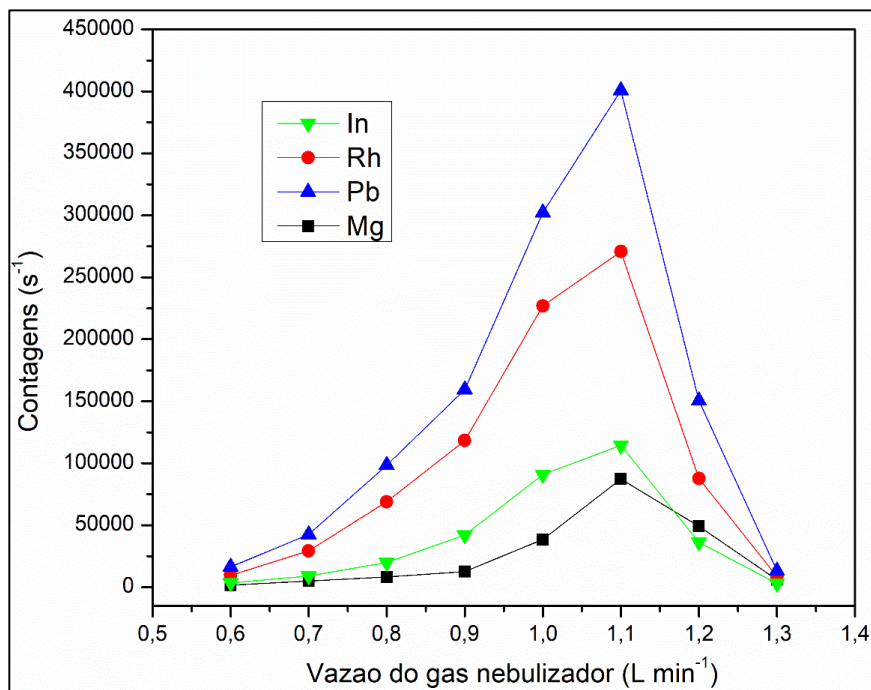
A velocidade de rotação da bomba peristáltica para a calibração multi-fluxo, poderia ser estipulado a faixa entre 5 – 20 rpm, pois para rotações inferiores a 5 rpm o tempo de análise seria maior, reduzindo a frequência analítica e elevando o seu custo da análise. Para rotações superiores a 20 rpm, a capacidade de nebulização do sistema utilizado atinge o seu limite.

5.1.2.2 Vazão do gás nebulizador

A vazão do gás nebulizador é outro parâmetro instrumental que também pode ser utilizado para a técnica de calibração multi-fluxo. Neste sentido, mantendo a rotação da bomba peristáltica constante (24 rpm) foi avaliado o efeito da vazão sobre as contagens dos analitos Mg, Pb, In e Rh como também, a razão das contagens para íons de dupla carga (Ba^{2+}/Ba) e formação de óxidos (CeO/Ce) em função do intervalo ($0,6 - 1,3 \text{ L min}^{-1}$) para uma solução padrão de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ contendo Mg, Pb, In, Rh, Ba e Ce.

Observa-se, de acordo com a Figura 13, um aumento das contagens para vazões entre o intervalo de 0,6 – 1,1 L min⁻¹, nestas condições o tempo de residência dos analitos no plasma favorece o processo de ionização. Para vazões acima de 1,1 L min⁻¹ as contagens para os analitos Mg, Pb, In e Rh apresentam redução considerável na intensidade dos sinais, justificado pelo menor tempo de residência no plasma, afetando o processo de ionização e favorecendo o aumento de espécies poliatômicas (Nelms, 2005).

Figura 13 – Otimização da vazão do gás nebulizador para solução padrão (*Daily performance*) 10 µg L⁻¹ contendo os analitos Mg, Pb, In, Rh, Ba e Ce.

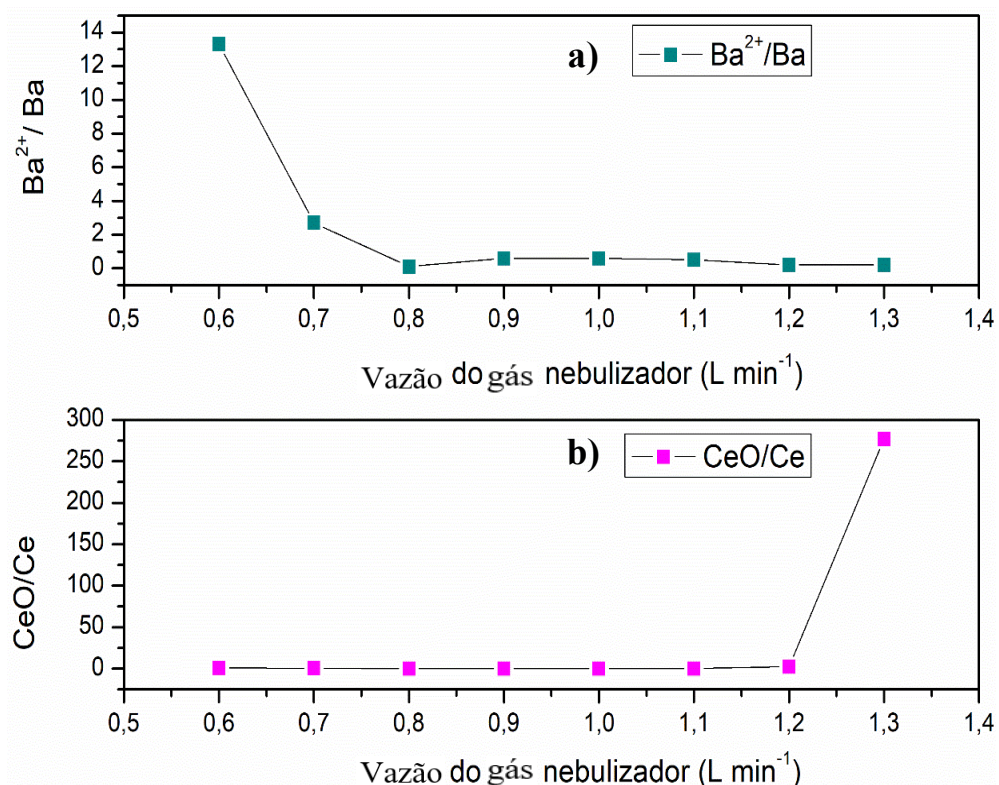


Fonte: o autor (2022)

Observa-se um aumento considerável (>3%) na formação de óxidos (CeO/Ce) para vazões maiores que 1,2 L min⁻¹ (incremento de 0,1 L min⁻¹) e aumento de íons dupla carga (Ba²⁺/Ba) (>3%) para vazões menores que 0,7 L min⁻¹ conforme a Figura 14. O tempo de permanência dos analitos no plasma para vazões do gás nebulizador abaixo de 0,7 L min⁻¹ é maior, favorecendo a formação de íons de dupla carga fato este justificado pelo aumento da razão Ba²⁺/Ba monitorados e menores contagens por segundo para os analitos Mg, In, Pb e Rh. Enquanto em vazões acima de 1,2 L min⁻¹ o tempo de residência dos analitos no plasma é menor e a formação de espécies químicas poliatômicas com oxigênio, óxidos, é favorecido e evidenciado pelo aumento da razão CeO/Ce.

Após avaliar os dois parâmetros (rotação da bomba peristáltica e vazão do gás nebulizador) que podem ser utilizados para a calibração multi-fluxo, optou-se por escolher a vazão do gás nebulizador como parâmetro variável para a técnica de calibração multi-fluxo, pois a quantidade de amostra necessária e de resíduo formado são menores em comparação com possíveis alterações na rotação da bomba peristáltica (Williams et al., 2019; Machado et al., 2021) e a faixa da condição ótima foi monitorada de forma específica com base na formação íons dupla carga e óxidos. A faixa da vazão do gás nebulizador utilizado foi de 0,8 até 1,2 L min⁻¹ sendo a região em que os íons de dupla carga e as espécies poliatômicas estão dentro dos limites adequados (<3%) para permitir a determinação por ICP-MS.

Figura 14 - Otimização da vazão do gás nebulizador para solução padrão (Daily performance) 10 µg L⁻¹ contendo os analitos Mg, Pb, In, Rh, Ba e Ce. a) razão entre as contagens para CeO/Ce e em b) a razão entre as contagens para Ba²⁺/Ba.



Fonte: o autor (2022)

5.2 TÉCNICA DE CALIBRAÇÃO MULTI-ISOTÓPICA

5.2.1 Efeito da concentração padrão multi-elementar

A determinação da concentração dos analitos na amostra, com base na técnica de calibração multi-isotópica, considerou a função de calibração, conforme equação 16. Foi avaliado a concentração de solução padrão a ser adicionada na solução amostra+padrão para a calibração multi-isotópica, pois a medida que a concentração da solução padrão adicionada aumenta, o *slope* descreve uma relação inversa e a determinação da concentração do analito na amostra depende deste valor (**Higuera et al., 2020**) conforme observado na equação 17.

Para a amostra de vinho no estudo da calibração multi-isotópica, foi necessária adição de $40 \mu\text{g L}^{-1}$ de solução padrão multi-elementar para elevar as concentrações dos analitos Mo, Pb, Cd e Ni para níveis ultra-traço. Na Tabela 4 a adição de solução padrão multi-elementar, o valor adicionado de solução padrão multi-elementar no vinho, a concentração determinada e o *slope* das curvas de calibração usando MICal por ICP-MS são apresentados.

Destaca-se com base na Tabela 4 apresentada que as concentrações da solução padrão entre $12,5$ e $20 \mu\text{g L}^{-1}$ a determinação para Mo, Pb, Cd e Ni se aproxima do valor adicionado na amostra e o *slope* da curva de calibração varia na faixa de $0,68$ até $0,78$ indicando que as condições ótimas estão em uma razão próxima de ± 1 para a concentração presente na amostra.

Para **Higuera et., al 2020** em seu trabalho sobre a calibração multi-isotópica por ICP-MS para Cr, Cd, Mo, Ni, Pb, Se e Sr em materiais de referência padrão de fígado (NIST SRM 1577c) e músculo bovino (NIST SRM 8414). Segundo os autores, o estudo da concentração padrão a ser adicionada na solução amostra+padrão foi com base na concentração dos analitos na solução padrão que se aproximavam das concentrações presentes na amostra certificada, observando *slopes* próximos de $0,5$, resultados significativamente melhores foram obtidos.

Tabela 4 – Estudo da concentração do padrão (média \pm desvio padrão, $n = 3$) para calibração multi-isotópica na composição 50% (v v⁻¹) amostra e 50%(v v⁻¹) padrão para o preparo da solução de calibração.

Vinho					
Analito	Adição de Padrão ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Valor adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	<i>Slope</i>	Recuperação (%)
Mo	2,5	40	34,93 \pm 1,76	0,9330	87
	6,25		48,71 \pm 1,48	0,8862	121
	12,5		41,90 \pm 0,63	0,7702	104
	20		44,25 \pm 3,42	0,6878	110
	30		47,75 \pm 2,98	0,6136	119
	40		45,50 \pm 2,36	0,5318	113
Pb	2,5	40	234,77 \pm 208,44	0,9797	586
	6,25		65,36 \pm 9,09	0,9113	163
	12,5		45,94 \pm 2,59	0,7860	114
	20		43,64 \pm 3,12	0,6850	109
	30		49,65 \pm 3,00	0,6228	124
	40		44,71 \pm 2,16	0,5275	111
Cd	2,5	40	69,17 \pm 3,59	0,9650	172
	6,25		58,74 \pm 1,08	0,9038	146
	12,5		43,80 \pm 0,54	0,7787	109
	20		42,90 \pm 2,76	0,6814	107
	30		47,97 \pm 2,55	0,6148	119
	40		44,74 \pm 1,89	0,5275	111
Ni	2,5	40	20,24 \pm 1,82	0,9211	50
	6,25		50,49 \pm 4,53	0,8891	126
	12,5		43,9 \pm 2,00	0,7782	109
	20		46,33 \pm 3,86	0,6974	115
	30		49,77 \pm 3,36	0,6233	125
	40		48,33 \pm 2,72	0,5467	120

Fonte: o autor (2022)

Os resultados obtidos para o *slope* da curva de calibração na Tabela 4 podem ser interpretados de acordo com a equação 17. A medida que a concentração da solução padrão tende para valores próximos de $40 \mu\text{g L}^{-1}$, o *slope* da função de calibração é alterado e a determinação da concentração de Mo, Pb, Cd e Ni na amostra de vinho se afasta do valor adicionado na mesma. Aplicou-se o teste Q em um nível de confiança de 95%, o qual identificou resultados anômalos para Pb nas concentrações preparadas de 2,5 (n = 6) e $6,25 \mu\text{g L}^{-1}$ (n = 5), e para Ni na concentração de $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (n = 6).

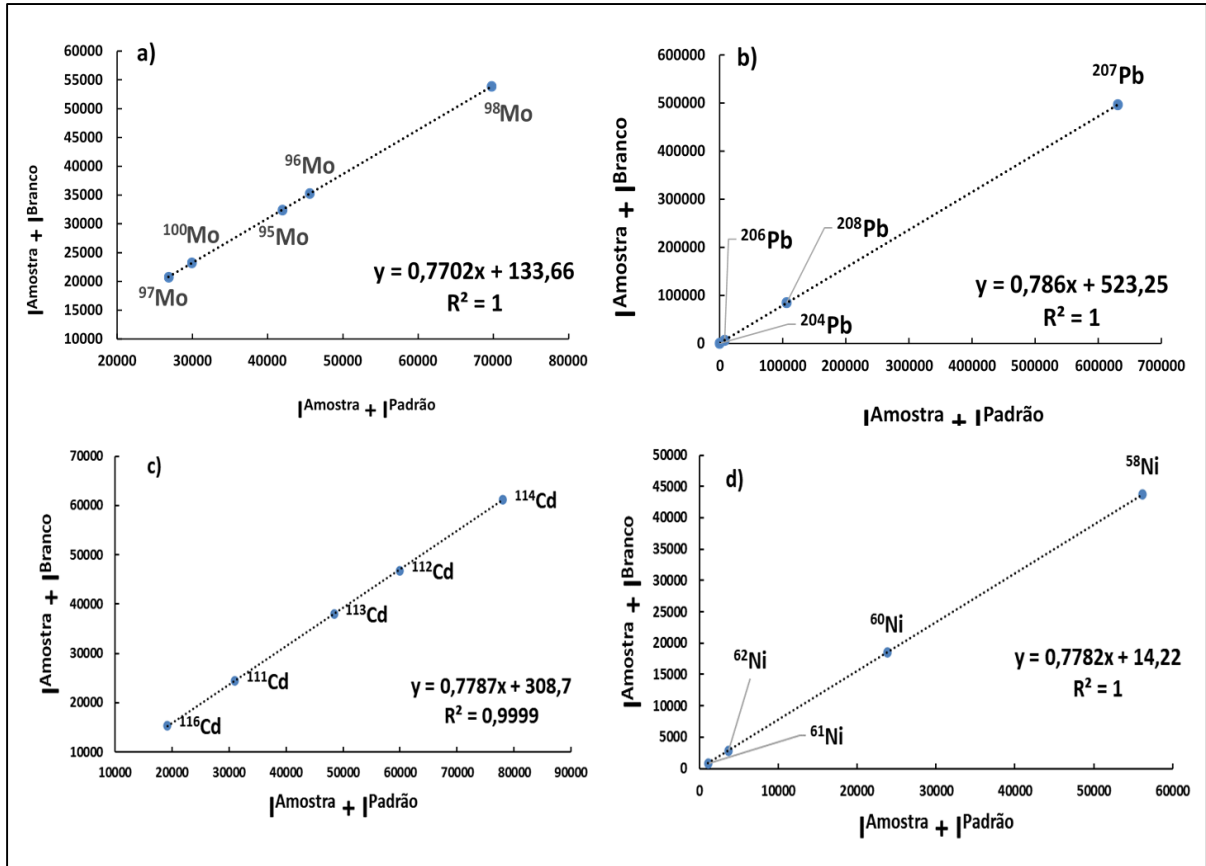
Para analisar se existe uma diferença significativa entre as concentrações preparadas, o teste t foi aplicado para Mo (n = 6), Pb (n = 4), Cd (n = 6) e Ni (n=5) em um nível de confiança de 95%. Para os analitos Pb, Cd e Ni o t-calculado (4,57, 2,60 e 6,47, respectivamente) foi maior que o t-crítico (3,18, 2,57 e 2,78, respectivamente), ou seja, existe uma diferença significativa em um nível de confiança de 95% e para Mo o t-calculado (1,88) < t-crítico (2,57).

Virgilio et al., 2018 em seu trabalho sobre a calibração multi-isotópica por ICP-MS destaca que a faixa de trabalho para o uso da calibração com amostras desconhecidas pode ser definida considerando o intervalo do *slope* entre 0,1 e 0,9, pois a equação 18 descreve uma limitação em seu denominador.

De acordo com os trabalhos reportados na literatura (**Higuera et., al 2020**), os testes estatísticos aplicados e as recuperações apresentadas na Tabela 4, as concentrações ótimas de $12,5$ e $20 \mu\text{g L}^{-1}$ da solução padrão multi-elementar para o preparo da solução amostra+padrão para calibração multi-isotópica, foram selecionados para comparar com a calibração externa e padronização interna.

Os resultados observados na Tabela 4 para a concentração padrão adicionada de $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$ da solução padrão multi-elementar para o preparo da solução amostra+padrão, são apresentados na Figura 15, com base nas curvas de calibração para Mo, Pb, Cd e Ni, respectivamente, para ilustrar o comportamento do gráfico típico da calibração multi-isotópica.

Figura 15 – Curvas de calibração multi-isotópica de a) Mo; b) Pb; c) Cd e d) Ni para amostra de vinho analisadas por ICP-MS.



Fonte: o autor (2022)

Os gráficos típicos apresentados para a calibração multi-isotópica na Figura 15 são exemplos que descrevem a curva de calibração e observa-se linearidade compatível e comparável com as técnicas de calibração externa e com padrão interno. Cada ponto de calibração, representa um isótopo monitorado na solução amostra+padrão e solução amostra+branco.

5.2.2 Parâmetros de mérito

As determinações foram realizadas utilizando as técnicas de calibração externa, com padrão interno e multi-isotópica. A comparação da precisão, o desvio padrão relativo obtidos com as diferentes técnicas de calibração avaliadas está apresentada na Tabela 5. Os limites de

detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) definidos respectivamente como 3 s/b e 10 s/b, em que s é o desvio padrão correspondente a 10 medidas do branco, e b o valor da inclinação da curva de calibração para as técnicas de calibração externa e interna de acordo com as recomendações da IUPAC não foram determinados devido a problemas instrumentais. Para a calibração multi-isotópica os parâmetros LOD e LOQ são calculados conforme reportado no trabalho de **Virgilio et al., 2020**:

$$LOD = 3 \left[\frac{S_{slope} \cdot C_{(padr\tilde{a}o)}}{(1 - Slope)^2} \right] \quad (\text{Eq. 29})$$

$$LOQ = 10 \left[\frac{S_{slope} \cdot C_{(padr\tilde{a}o)}}{(1 - Slope)^2} \right] \quad (\text{Eq. 30})$$

As equações 29 e 30 consideram uma abordagem de propagação de erro, onde S_{slope} é o desvio padrão do *slope* da curva de calibração, $C_{(padr\tilde{a}o)}$ concentração padrão da solução multi-elementar presente na solução amostra+branco e *slope* da curva de calibração.

Os problemas instrumentais enfrentados durante a execução da parte final deste projeto, infelizmente, não permitiram a aquisição dos dados experimentais necessários para o cálculo do LOD e LOQ. Entretanto, os trabalhos reportados na literatura (**Virgilio et al., 2020**) apontam que, quando comparado com as técnicas de calibração tradicionais, os valores de LOD e LOQ são maiores para a calibração multi-isotópica, visto que para o cálculo dos parâmetros o *slope* da curva de calibração considera uma faixa de trabalho ótima a qual pode contribuir para valores maiores.

Para verificar a precisão das técnicas de calibração, o desvio padrão relativo (RSD) foi calculado considerando o desvio padrão (s) dividido pela média (\bar{x}) multiplicado por 100.

Tabela 5 – Desvio padrão relativo para as técnicas de calibração multi-isotópica, externa e padrão interno em amostra de vinho por ICP-MS.

Analito	Técnica de Calibração	RSD (%)
Mo	MICal (12,5 µg L ⁻¹)	1,51
	MICal (20 µg L ⁻¹)	7,72
	EC	2,89
	IS	3,55
Pb	MICal (12,5 µg L ⁻¹)	5,65
	MICal (20 µg L ⁻¹)	7,16
	EC	1,90
	IS	4,08
Cd	MICal (12,5 µg L ⁻¹)	1,24
	MICal (20 µg L ⁻¹)	6,43
	EC	2,18
	IS	3,55
Ni	MICal (12,5 µg L ⁻¹)	4,55
	MICal (20 µg L ⁻¹)	8,32
	EC	1,98
	IS	3,87

Fonte: o autor (2022)

É possível observar, com base na Tabela 5, que a diferença percentual entre os valores obtidos para cada analito, dentre as calibrações, variou da seguinte forma: para o Mo de 1,51% a 7,72 %, para o Pb de 1,90 a 7,16%, para o Cd de 1,24 a 6,43% e de 1,98 a 8,32% para o Ni. Observa-se que para Mo e Cd as precisões foram melhores para a calibração multi-isotópica na concentração de 12,5 µg L⁻¹ quando comparadas com as técnicas de calibração externa e interna, entretanto para Ni e Pb a calibração externa apresentou RSD menores em comparação com as demais técnicas de calibração. Neste caso, erros aleatórios podem estar adicionados para as determinações visto que a técnica de calibração multi-isotópica considera uma correspondência de matriz no preparo das soluções padrão e por este motivo, potenciais interferências não espectrais poderiam ser minimizadas e níveis de precisão melhores poderiam ser alcançados, o que não foi possível observar nos dados obtidos.

Os dados estatísticos, por meio do teste F, indicam que existe diferenças significativas entre as variâncias dos desvios do padrão relativo para as técnicas de calibração. O teste foi aplicado em um nível de confiança de 95% e o valor calculado de F foi de 14,12 sendo o valor crítico F para 3 e 12 graus de liberdade igual a 3,49. Conclui-se que existe diferença significativa entre as variâncias devido F calculado ser maior que o F crítico.

O teste t para duas amostras independentes aplicado para o par de calibração multi-isotópica 12,5 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ apresentou como t-crítico bicaudal e nível de confiança de 95% igual a 2,77 e t-calculado = -3,56, de modo que existe diferença significativa entre as médias dos RSD determinados pelas técnicas de calibração multi-isotópica. O teste quando aplicado entre a calibração multi-isotópica para as duas concentrações e as técnicas de calibração externa e padronização interna, indicou que não existe diferenças significativas apenas entre os pares multi-isotópica 12,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ / calibração externa (t-calculado = -0,89 // t-crítico = 3,18) e multi-isotópica 12,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ / padronização interna (t-calculado = 0,47 // t-crítico = 3,18).

5.2.3 Determinação de metais em vinhos usando MICal

Para avaliar os conceitos teóricos para a técnica MICal, as técnicas de calibração externa e padrão interno foram selecionadas e comparadas conforme a Tabela 6 para amostra de vinho diluída.

Tabela 6 – Concentrações em $\mu\text{g L}^{-1}$ para Mo, Pb, Cd e Ni em amostra de vinho (adicionada de $40 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos) empregando calibração externa, padronização interna e calibração multi-isotópica, respectivamente.

Analito ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Vinho			
	EC	IS	MICal ($12,5 \mu\text{g L}^{-1}$)	MICal ($20 \mu\text{g L}^{-1}$)
Mo	$40,38 \pm 1,17$	$37,32 \pm 1,32$	$41,90 \pm 0,63$	$44,25 \pm 3,42$
Pb	$39,51 \pm 0,75$	$36,44 \pm 1,49$	$45,94 \pm 2,59$	$43,64 \pm 3,12$
Cd	$43,14 \pm 0,94$	$39,88 \pm 1,42$	$43,80 \pm 0,54$	$42,90 \pm 2,76$
Ni	$42,36 \pm 0,84$	$39,10 \pm 1,51$	$43,94 \pm 2,00$	$46,33 \pm 3,86$

*Calibração externa (EC) e com padrão interno (IS).

Fonte: o autor (2022)

Como forma de comparar os resultados obtidos das concentrações de Mo, Pb, Cd e Ni para as soluções amostra+padrão na concentração de $12,5$ e $20 \mu\text{g L}^{-1}$ com as técnicas de calibração convencionais, o teste t para amostras independentes foi utilizado e o teste F para verificar a igualdade de variâncias.

Aplicou-se análise de variância em um nível de confiança de 95% e o valor obtido de F foi de 12,36, sendo o valor crítico F para 3 e 12 graus de liberdade igual a 3,49. Uma vez que F é maior que 3,49, conclui-se que existe diferença significativa entre as variâncias das técnicas de calibração. Para diferenciar quais técnicas de calibração diferem em um nível de confiança de 95%, aplicou-se a diferença menos significativa (DMS) e o valor obtido foi de 3,36. Em seguida calculou a diferença entre as médias das técnicas de calibração e obteve diferença significativa para o par de calibração multi-isotópica $20 \mu\text{g L}^{-1}$ e padronização interna (valor da diferença entre as médias foi de 6,10, sendo maior que DMS calculado). Para os pares multi-

isotópica $20 \mu\text{g L}^{-1}$ e calibração externa, multi-isotópica $20 \mu\text{g L}^{-1}$ e multi-isotópica $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$ as diferenças entre as médias não foram significativas, apresentando DMS calculados de 2,93 e 0,38, respectivamente.

Para o par de calibração multi-isotópica $20 \mu\text{g L}^{-1}$ e padronização interna, o teste t para duas amostras independentes, neste caso para variâncias diferentes, obteve-se como t-crítico bicaudal e nível de confiança de 95% igual a -2,44 e t-calculado = -5,64, ou seja, existe diferença significativa entre as médias das concentrações dos analitos determinados pelas técnicas de calibração sendo o desempenho da padronização interna superior da multi-isotópica. Para o par multi-isotópica $20 \mu\text{g L}^{-1}$ e calibração externa o t-crítico bicaudal e nível de confiança de 95% igual a 2,44 e t-calculado = 2,61, sendo a calibração externa de melhor desempenho.

Considerando a concentração dos analitos adicionadas na amostra ($40 \mu\text{g L}^{-1}$), para a calibração externa, a faixa de recuperação entre 99 a 108% foi obtida para concentração de Mo, Pb, Cd e Ni. O uso do padrão interno estabeleceu a faixa de recuperação entre 91 a 98% e para a calibração multi-isotópica entre 105 a 115% e 107 a 116% para as soluções de concentração padrão multi-elementar $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e $20 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

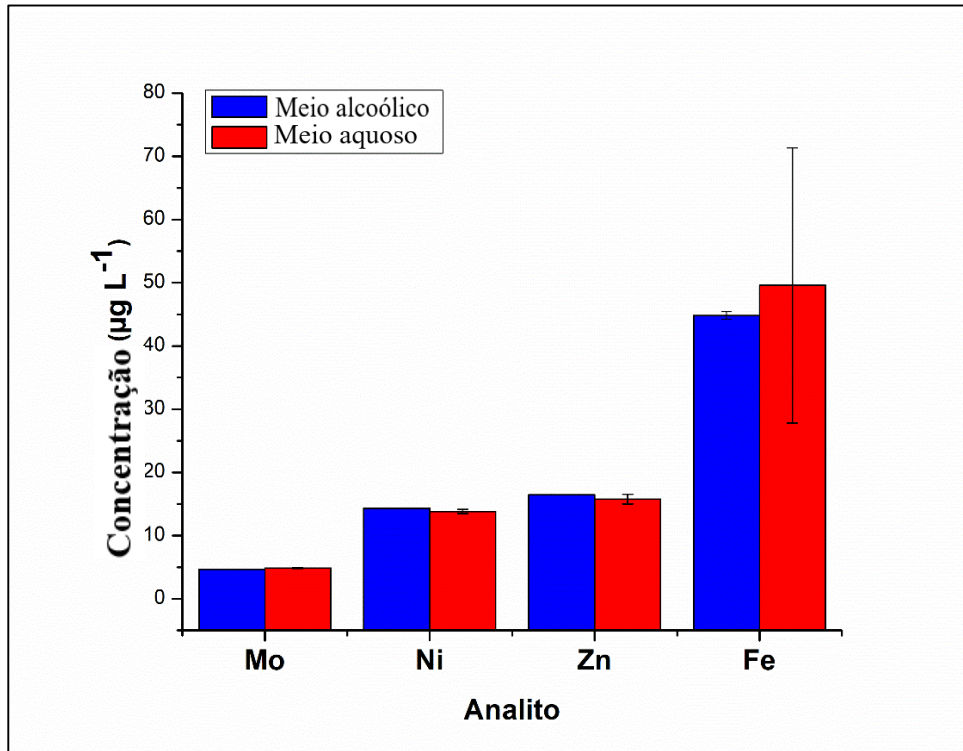
5.3 TÉCNICA DE CALIBRAÇÃO MULTI-FLUXO

5.3.1 Definição da condição ótima para a solução padrão multi-elementar

Devido ao teor alcoólico aproximado de $15\% \text{ v v}^{-1}$ presente nas amostras de vinho, as possíveis alterações nas propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, a influência na formação do aerossol, o preparo da solução padrão multi-elementar considerou a concentração e a presença/ausência de álcool na solução.

A quantidade de analito que chega ao plasma está relacionada com dois parâmetros instrumentais, são eles, rotação da bomba peristáltica e vazão do gás nebulizador. Neste sentido, o estudo da condição ótima da solução padrão multi-elementar, para uma faixa de concentração compreendida entre 10, 15, 30 e $60 \mu\text{g L}^{-1}$ para os elementos Mo, Ni, Zn e Fe foi preparada em triplicata na ausência e presença de álcool $0,3\% \text{ v v}^{-1}$ (valor correspondente a uma diluição de 50 vezes o teor alcoólico da amostra) variando a vazão do gás nebulizador na faixa entre 0,8 e $1,2 \text{ L min}^{-1}$. A Figura 16 apresenta a média das concentrações dos analitos na determinação da concentração de Mo, Ni, Zn e Fe usando a calibração multi-fluxo considerando a presença e ausência e etanol na solução do padrão.

Figura 16 – Estudo da condição ótima para o preparo da solução padrão multi-elementar para Mo, Ni, Zn e Fe em meio a) alcoólico e b) aquoso.



Fonte: o autor (2022)

Diante dos dados apresentados na Figura 16, como forma de estabelecer uma comparação e avaliar a existência de uma diferença significativa nas médias das concentrações dos analitos em meio aquoso e alcoólico, o teste t-pareado foi realizado com nível de confiança de 95% para $n = 4$ (para os quatros analitos). O valor crítico de t com intervalo de 95% e 3 graus de liberdade é de 2,35, e o valor do teste-t obtido foi de 0,60. Como o valor de t obtido é menor que o estabelecido pelo t crítico, não há evidências de diferenças significativas entre as médias das concentrações dos analitos em meio aquoso e alcoólico, sendo possível utilizar a solução de padrão multi-elementar em meio aquoso para a calibração multi-fluxo na determinação de Mo, Ni, Zn e Fe em amostras de vinho.

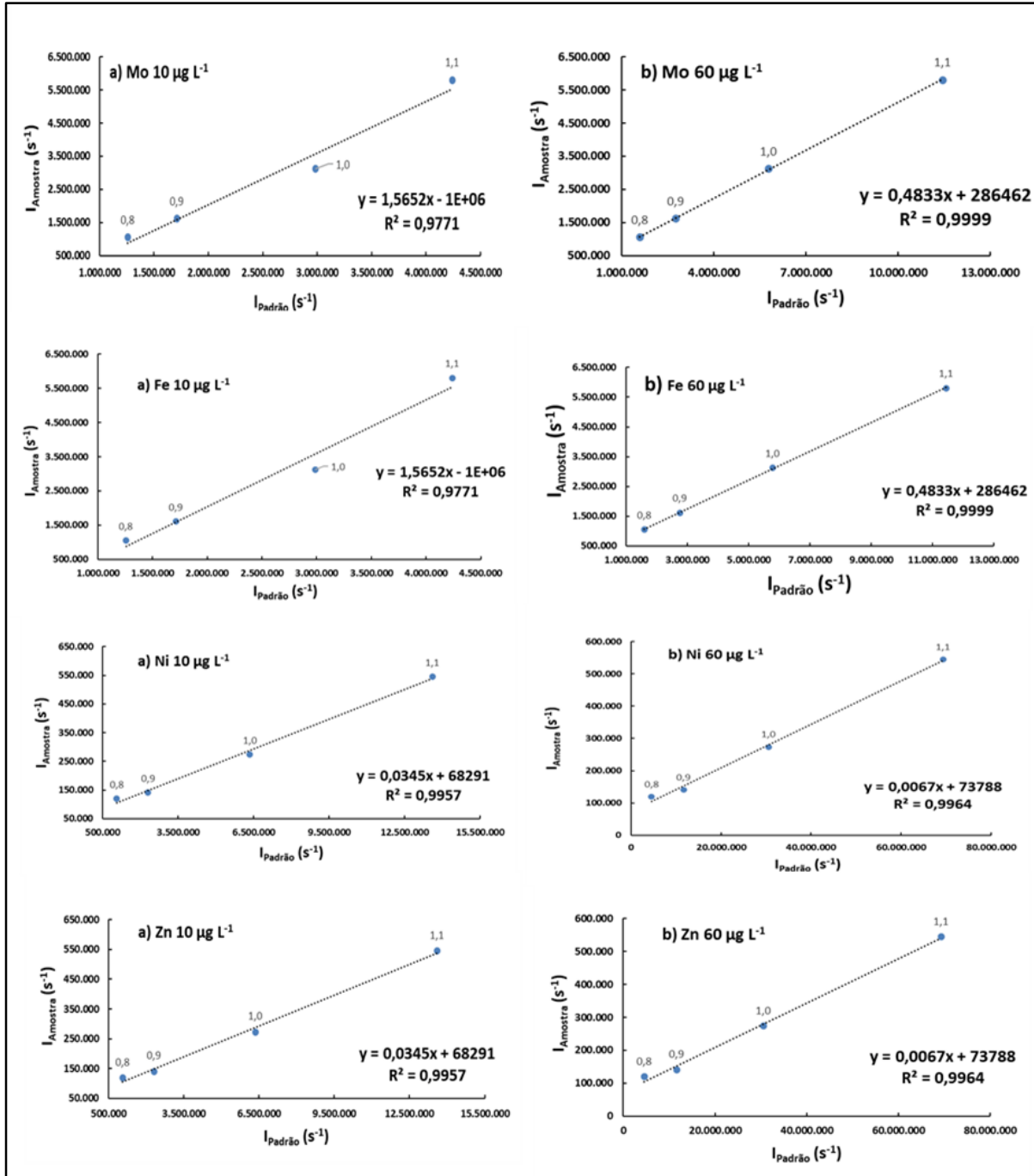
Os baixos valores de desvio padrão para a maioria dos analitos, sugerem que flutuações do sinal analítico causados por parâmetros instrumentais, como por exemplo, formação do aerossol, temperatura do plasma ou processamento dos dados pelo *software*, não influenciaram na precisão dos resultados para a maioria dos analitos, exceto para Fe em meio aquoso que

apresentou alto valor de desvio padrão podendo ser justificado por uma possível interferência espectral e a abundância do isótopo selecionado (May e Wiedemeyer, 1998).

A condição ótima para o preparo da solução padrão para a calibração multi-fluxo, conforme os dados apresentados da Figura 16 foi em meio aquoso, o que corrobora com o princípio da técnica de calibração em sua simplicidade no preparo em não requisitar reagentes auxiliares. Em termos de concentração, foram selecionadas soluções padrão de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para Mo e Ni devido a concentração ultra-traço nas amostras de vinho e $60 \mu\text{g L}^{-1}$ para Zn e Fe visto que os analitos estão em níveis traço na amostra. Na Figura 17 são apresentadas as curvas de calibração multi-fluxo para Mo e Ni em concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de solução padrão multi-elementar e $60 \mu\text{g L}^{-1}$ para Zn e Fe.

Os gráficos típicos apresentados para a calibração multi-fluxo na Figura 17 são exemplos que descrevem a curva de calibração e observa-se linearidade compatível e comparável com as técnicas de calibração externa e interna. Cada ponto de calibração, representa uma condição da vazão do gás nebulizador.

Figura 17 – Curvas de calibração multi-fluxo para Mo e Ni em concentração $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de solução padrão multi-elementar e $60 \mu\text{g L}^{-1}$ para Zn e Fe para análise de amostra de vinho por ICP-MS.



Fonte: o autor (2022)

5.3.2 Parâmetro de mérito

As determinações foram realizadas utilizando a técnica de calibração externa, com padrão interno e multi-fluxo. Para comparação da precisão, o desvio padrão relativo é apresentado na Tabela 7. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram definidos respectivamente como 3 s/b e 10 s/b, em que s é o desvio padrão correspondente a 10 leituras do branco, e b o valor da inclinação da curva de calibração para as técnicas de calibração externa e interna de acordo com as recomendações da IUPAC. Para a calibração multi-fluxo os parâmetros LOD e LOQ são calculados conforme reportado no trabalho de **Williams et al., 2019**:

$$LOD = 3 [S_{slope} \cdot C_{padr\tilde{a}o}] \quad (\text{Eq. 31})$$

$$LOQ = 10 [S_{slope} \cdot C_{padr\tilde{a}o}] \quad (\text{Eq. 32})$$

As equações 31 e 32 consideram S_{slope} como o erro padrão do *slope* da curva de calibração e $C_{(padr\tilde{a}o)}$ concentração padrão da solução multi-elementar preparada. Devido aos problemas instrumentais, LOD e LOQ não foram calculados, entretanto trabalhos reportados na literatura (**Williams et al., 2019**) apontam que valores maiores de LOD e LOQ são obtidos para a calibração multi-fluxo, quando comparado com as técnicas de calibração tradicionais. A possibilidade das técnicas multi-sinais apresentarem maiores limites de detecção e quantificação podem estar no fato da sua dependência com o *slope* da curva de calibração, isto é, como uma faixa de condição ótima pode ser utilizada para determinar a concentração dos analitos na amostra este fator pode interferir na detecção e quantificação.

Para verificar a precisão das técnicas de calibração, o desvio padrão relativo (RSD) (Tabela 7). Observa-se que a diferença percentual entre os valores obtidos para cada analito, dentre as calibrações, variou da seguinte forma: para o Mo de 0,14 % a 15,61 %, para o Ni de 1,09 a 24,15 %, para o Zn de 0,11 % a 5,69 % e de 0,10 a 3,06% para o Fe.

Tabela 7 – Desvio padrão relativo para as técnicas de calibração multi-fluxo, externa e padrão interno em amostra de vinho por ICP-MS.

Analito	Técnica de Calibração	RSD (n=3, %)
Mo	MFC (10 $\mu\text{g L}^{-1}$)	15,61
	MFC (60 $\mu\text{g L}^{-1}$)	7,87
	EC	0,14
	IS	0,38
Ni	MFC (10 $\mu\text{g L}^{-1}$)	23,72
	MFC (60 $\mu\text{g L}^{-1}$)	24,15
	EC	1,09
	IS	1,18
Zn	MFC (10 $\mu\text{g L}^{-1}$)	0,11
	MFC (60 $\mu\text{g L}^{-1}$)	5,69
	EC	0,27
	IS	0,33
Fe	MFC (10 $\mu\text{g L}^{-1}$)	3,06
	MFC (60 $\mu\text{g L}^{-1}$)	3,04
	EC	0,15
	IS	0,10

Fonte: o autor (2022)

Observa-se que para todos os analitos as precisões foram melhores para a calibração externa e com padrão interno quando comparadas com a técnica de calibração multi-fluxo. Para verificar se existe diferenças significativa entre as variâncias das técnicas de calibração, considerando o desvio padrão relativo, o teste F foi aplicado em um nível de confiança de 95% e o valor calculado de F foi de 2,49 sendo o valor crítico F para 3 e 12 graus de liberdade igual a 3,49. Conclui-se que não existe diferença significativa entre as variâncias devido F calculado ser menor que o F crítico.

A precisão menor determinada para a calibração multi-fluxo pode ser explicada por prováveis erros aleatórios (pelo mal funcionamento do equipamento) e erros sistemáticos somados no preparo das soluções padrão multi-elementar.

5.3.3 Determinação de metais em vinhos pela calibração multi-fluxo

Iniciou-se os testes de conceito da calibração multi-fluxo, determinando a concentração de Mo, Ni, Zn e Fe em amostras de vinho, considerando a solução padrão multi-elementar preparada nas concentrações de 10 e 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ em meio aquoso, conforme a condição ótima discutida anteriormente.

Tabela 8 – Determinação das concentrações de Mo, Ni, Zn e Fe em amostra de vinho nas condições de 10 e 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ de solução padrão multi-elementar para calibração multi-fluxo.

Analito	Solução padrão multi-elementar	Concentração
	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)
Mo	10	2,00 \pm 0,30
	60	2,20 \pm 0,20
Ni	10	17,25 \pm 4,09
	60	20,20 \pm 4,88
Zn	10	533,90 \pm 0,60
	60	635,40 \pm 36,20
Fe	10	782,62 \pm 23,96
	60	1.449,80 \pm 44,10

Fonte: o autor (2022)

Conforme discutido na literatura por **Grindlay et al., 2011** os elementos Mo e Ni estão presentes em concentrações $<100 \mu\text{g L}^{-1}$ e para Zn e Fe estão em concentrações entre 0,1 – 10 mg L^{-1} em amostras de vinho. De acordo com a Tabela 8 as determinações das concentrações para Mo, Ni, Zn e Fe estão em níveis que corroboram com a literatura.

Os dois testes estatísticos utilizados para analisar os resultados apresentados na Tabela 9 foram o teste t para amostras independentes e o teste F para verificar análise de variância.

Tabela 9 – Concentrações em $\mu\text{g L}^{-1}$ para Mo, Ni, Zn e Fe em amostra de vinho empregando calibração externa, padronização interna e calibração multi-isotópica, respectivamente, e determinação por ICP-MS

Vinho				
Analito	EC	IS	MFC (10 $\mu\text{g L}^{-1}$)	MFC (60 $\mu\text{g L}^{-1}$)
Mo	3,73 \pm 0,01	1,88 \pm 0,36	2,00 \pm 0,30	2,20 \pm 0,20
Ni	19,35 \pm 10,53	17,16 \pm 10,17	17,25 \pm 4,09	20,20 \pm 4,88
Zn	641,25 \pm 88,17	573,63 \pm 94,47	533,9 \pm 30,04	635,40 \pm 36,20
Fe	1.554,66 \pm 2,37	692,8 \pm 35,12	782,62 \pm 23,96	1.449,80 \pm 44,15

Fonte: o autor (2022)

Os resultados obtidos para as concentrações de Mo, Ni, Zn e Fe entre as técnicas de calibração, aplicou-se análise de variância em um nível de confiança de 95% e o valor obtido de F foi de 0,19, sendo o valor crítico F para 3 e 12 graus de liberdade igual a 3,49. Uma vez que F é menor que 3,49, conclui-se que não existe diferença significativa entre as técnicas de calibração para Mo, Ni, Zn e Fe.

Os resultados obtidos das concentrações de Mo, Ni, Zn e Fe para as soluções multi-elementar na concentração de 10 e 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ aplicou-se o teste t para amostras independentes utilizando $n = 4$ obtendo t-crítico bicaudal e nível de confiança de 95% igual a 2,44. Na comparação entre as duas soluções obteve-se $t = -0,49$, portanto não há diferença estatística entre as concentrações das soluções 10 e 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Mo, Ni, Zn e Fe utilizando a calibração multi-fluxo.

Posteriormente, comparou os dados obtidos da calibração MFC com as técnicas de calibração externa e padrão interno conforme Tabela 9 mediante aplicação do teste t para amostras independentes. O t-calculado para os pares calibração multi-fluxo 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ /calibração externa e calibração multi-fluxo 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ / padronização interna foram, respectivamente, 0,53 e -0,047 o que representa um valor inferior ao t-crítico igual a 2,44 sendo $n = 4$, t-crítico bicaudal e nível de confiança de 95%. O mesmo teste aplicado para a calibração

multi-fluxo na concentração de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ também apresentou t-calculado (0,055 e -0,53) em relação as calibrações convencionais, inferiores ao t-crítico (2,44).

6 CONCLUSÕES

A aplicação das novas técnicas de calibração, multi-fluxo e multi-isotópica para determinação de metais em amostras de vinho utilizando a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) foi realizada de forma satisfatória. Os resultados obtidos por meio destas novas técnicas de calibração foram comparados com as técnicas de calibração externa e com padrão interno. Na calibração multi-isotópica, a dependência com a concentração da solução padrão multi-elementar na preparação da solução apresentou-se como um fator a ser investigado, pois com base no teste Q, valores determinados para as concentrações Pb (em 2,5 e $6,25 \mu\text{g L}^{-1}$ de solução multi-elementar) e Ni (em $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de solução multi-elementar) foram considerados anômalos e o *slope* da função de calibração variou em uma faixa entre 0,68 e 0,78 e permitiu que o grau de exatidão estivesse em uma faixa de 105 a 115% e 107 a 116%, respectivamente, para as soluções de concentração padrão multi-elementar $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e $20 \mu\text{g L}^{-1}$ representado pelas melhores recuperações para Mo, Pb, Cd e Ni em amostras de vinho. Para a calibração externa, a faixa de recuperação entre 99 a 108% foi obtida para concentração de Mo, Pb, Cd e Ni. O uso do padrão interno estabeleceu a faixa de recuperação entre 91 a 98%. Erros aleatórios podem estar interferindo na exatidão devido a problemas instrumentais e afastando consideravelmente das calibrações convencionais.

Para a calibração multi-fluxo dentre os parâmetros otimizados, a vazão do gás nebulizador descreveu uma faixa de condição ótima possível de ser monitorada e controlada com base na formação de íons dupla carga e íons poliatômicos, sendo selecionada como parâmetro para a técnica de calibração. Observou-se que o estudo das concentrações da solução padrão multi-elementar para 10 e $60 \mu\text{g L}^{-1}$, estatisticamente não apresentam diferenças em suas variâncias e entre as médias das concentrações para Mo, Ni, Zn e Fe utilizando a calibração multi-fluxo.

7 PERSPECTIVAS

Ao longo do projeto de dissertação, múltiplas vivências “atípicas” foram contempladas e limitações se fizeram presente, as quais reservei este espaço para registrá-las.

O trabalho de dissertação iniciou no segundo semestre de 2019 e de acordo com os acontecimentos globais a respeito da pandemia de covid-19, em março de 2020, o mundo enfrentou medidas restritivas de circulação sendo uma delas, o acesso dos pós-graduandos ao laboratório de pesquisa das unidades de ensino superior. Este fato, importante do lado sanitário e limitante no que se refere a condução dos projetos de pesquisa de mestrado e doutorado, se estendeu em torno de 5 a 6 meses, período equivalente a $\frac{1}{4}$ do tempo de conclusão do nível de mestrado.

Somado as questões sanitárias, o equipamento que foi utilizado para a pesquisa apresentou problemas de funcionamento em tempos em tempos, sendo um total aproximado de 6 meses sem uso devido a sua manutenção.

O retorno para as atividades de laboratório, em meio a pandemia, foi escalonado e dividido por turnos, pois outros colegas da pós-graduação estavam conduzindo seus respectivos projetos de pesquisa, ou seja, o tempo e acesso aos equipamentos foram otimizados.

Dentre todas as adversidades, experiências simples foram resgatas ao longo deste período adverso, como por exemplo, otimização de espaço e tempo no laboratório de pesquisa, cuidados com equipamentos de proteção individual e aprofundamento do conhecimento científico com base em chamadas de vídeo, apresentações síncronas de workshop, semana acadêmica e aulas do programa de pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Diante dos fatos apresentados, considero que o tempo necessário para conduzir de forma aprofundada o projeto de pesquisa foi afetado e sua abrangência restrita, a exemplo do cálculo e determinação dos LODs e LOQs para as calibrações multi-sinais, a verificação da exatidão dos métodos usando MICal e MFC e aplicar os métodos para análise de diferentes amostras de vinho. Ao mesmo tempo em que novas formas de interação com o conhecimento científico poderiam ser vivenciada e contribuiriam de forma significativa para o projeto de pesquisa.

8 REFERÊNCIAS

5. Agatemor, C., & Beauchemin, D. (2011). Matrix effects in inductively coupled plasma mass spectrometry: A review. *Analytica Chimica Acta*, 706(1), 66–83. doi:10.1016/j.aca.2011.08.027.
6. Amais, R. S., Donati, G. L., & Nóbrega, J. A. (2012). Interference standard applied to sulfur determination in biodiesel microemulsions by ICP-QMS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(5), 797–803. doi:10.1590/s0103-50532012000500002
7. Amais, R. S., Nóbrega, J. A., & Donati, G. L. (2014). The interference standard method: evidence of principle, potentialities and limitations. *J. Anal. At. Spectrom.*, 29(7), 1258–1264.
8. Anastas, P., & Eghbali, N. (2010). Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.*, 39(1), 301–312. doi:10.1039/b918763b.
9. Babos, D. V., Bechlin, M. A., Barros, A. I., Ferreira, E. C., Gomes Neto, J. A., and Oliveira, S. R. (2016). Cobalt internal standard for Ni to assist the simultaneous determination of Mo and Ni in plant materials by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry employing direct solid sample analysis. *Talanta* 152, 457–462. doi: 10.1016/j.talanta.2016.02.046.
10. Bader, M. (1980). A Systematic approach to standard addition methods in instrumental analysis. *J. Chem. Educ.* 57, 703–706. doi: 10.1021/ed057p703.
11. Barnett, W. B. (1968). Theoretical principles of internal standardization in analytical emission spectroscopy. *Spectrochim. Acta* 23, 643–664. doi: 10.1016/0584-8547(68)80045-X.
12. Barnett, W. B., Fassel, V. A., and Kniseley, R. N. (1970). An experimental study of internal standardization in analytical emission spectroscopy.

Spectrochim. Acta Part B Atomic Spectrosc. 25, 139–161. doi: 10.1016/05848547(70)800179.

13. Barros Neto, Benício de; PIMENTEL, Maria Fernanda; ARAUJO, Mário César Ugulino. *Recomendações para calibração em química analítica: parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada)*. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 25, n. 5, p. 856-865, Sept. **2002** . Available from
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422002000500024&lng=en&nrm=iso>.access
14. Barros, A. I., Pinheiro, F. C., & Nobrega, J. A. (2019). Calibration strategies to correct for matrix effects in direct analysis of urine by ICP OES: internal standardization and multi-energy calibration. *Analytical Methods*. doi:10.1039/c9ay00907h
15. Beauchemin, D. (2017). Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Methods. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 236–245. doi:10.1016/b978-0-12-409547-2.11222-3.
16. Burns, D. T, Walker M. J. (2019). Origins of the method of standard additions and of the use of an internal standard in quantitative instrumental chemical analyses. *Anal Bioanal Chem*, 411:2749–53. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01754-w>.
17. Carter, J.A., et al., Traditional Calibration Methods in Atomic Spectrometry and New Calibration Strategies for Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Frontiers in Chemistry*, **2018**. **6**.
18. Chaves, Eduardo Sidinei. Determinação de elementos traço em diesel e biodiesel por espectrometria de emissão atômica em chama e por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com introdução da amostra por vaporização eletrotérmica. Florianópolis, **2008**. 1 v. Dissertação

(Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química. Disponível em: <<http://www.tede.ufsc.br/teses/PQMC0442-D.pdf>>

19. Cuadros-Rodríguez, L., Gámiz-Gracia, L., Almansa-López, E. M., & Bosque-Sendra, J. M. (2001). Calibration in chemical measurement processes. II. A methodological approach. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 20(11), 620–636. doi:10.1016/s0165-9936(01)00111-x
20. Currie, L. A. (1998). Guidelines for calibration in analytical chemistry guideline for calibration in analytical chemistry- part 1. *Pure Appl. Chem.* 70, 993–1014.
21. De Higuera, J. M., Silva, A. B. S. da, de Oliveira, A. F., & de Araujo Nogueira, A. R. (2020). Multi-elemental determination in meat samples using multi-isotope calibration strategy by ICP-MS. *Food Chemistry*, 303, 125395. doi:10.1016/j.foodchem.2019.125395.
22. Donati, G. L., Amais, R. S., & Nóbrega, J. A. (2011). Interference standard: a new approach to minimizing spectral interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 26(9), 1827. doi:10.1039/c1ja10136f
23. Donati, G. L., & Amais, R. S. (2019). Fundamentals and new approaches to calibration in atomic spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. doi:10.1039/c9ja00273a
24. Fernandes, K. G., De Moraes, M., Gomes Neto, J. A., Nóbrega, J. A., e Oliveira, P.V. (2003). Padronização interna em espectrometria de absorção atômica. *Quim.Nova* 26, 249–252. doi: 10.1590/S0100-40422003000200018

25. Grindlay, Guillermo et al. Atomic spectrometry methods for wine analysis: A critical evaluation and discussion of recent applications. **Analytica Chimica Acta**, v. 691, n. 1-2, p. 18-32, 2011.
26. HULANICKI, A. Absolute methods in analytical chemistry (Technical Report). **Pure and applied chemistry**, v. 67, n. 11, p. 1905-1911, 1995.
27. ISO Guide 32, Calibration in Analytical Chemistry and Use of Certified Reference Materials, ISO, Geneva, 1997.
28. ISO Guide 33 (2015) Reference materials—good practice in using reference materials, 3rd edn. International Organization for Standardization, Geneva.
29. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019-) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>.
30. Jones, W. B., Donati, G. L., Calloway, C. P., & Jones, B. T. (2015). Standard Dilution Analysis. *Analytical Chemistry*, 87(4), 2321–2327. doi:10.1021/ac504152x
31. Kelly R, Pratt KW, Guthrie WF, Martin KR. Origin and early history of Die Methode des Eichzusatzes or The Method of Standard Additions with primary emphasis on its origin, early design, dissemination, usage of terms. *Anal Bioanal Chem*. **2011**;400:1805–12.
32. Kościelniak, P., & Wieczorek, M. (2016). Univariate analytical calibration methods and procedures. A review. *Analytica Chimica Acta*, 944, 14–28. doi:10.1016/j.aca.2016.09.024.
33. Lingane, J. J., Kerlinger, H. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 1941, 13, 77.

34. Machado, R. C., Silva, A. B. S., Andrade, D. F., Pinheiro, F. C., Williams, C. B., Donati, G. L., ... & Pereira-Filho, E. R. (2021). Alternative Approaches Applied to Inductively Coupled Plasma Techniques: Multi-Flow and Two-Flow Calibration. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 32, 842-851.
35. Miller, JC e Miller, JN (1984). *Estatísticas para Química Analítica*. Chichester: Ellyp Horwood.
36. Nelms SM, editor. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Handbook*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.; 2005.
37. Oliveira, E. C. de, Muller, E. I., Abad, F., Dallarosa, J., & Adriano, C. (2010). Internal standard versus external standard calibration: an uncertainty case study of a liquid chromatography analysis. *Química Nova*, 33(4), 984–987. doi:10.1590/s0100-40422010000400041
38. Skoog, Douglas A. et al. *Fundamentos de química analítica*. São Paulo: Cengage Learning, c2015. xvii, 950, [100] p. ISBN 9788522116607.
39. Thomas, R. (2013). *Practical guide to ICP-MS: A tutorial for beginners* (3rd ed.). Boca Raton: CRC Press. J.J.
40. Thompson, R.S. Houk A study of internal standardization in inductively coupled plasma-mass spectrometry *Appl. Spectrosc.*, 41 (1987), pp. 801-806, [10.1366/0003702874448265](https://doi.org/10.1366/0003702874448265)
41. Tormen, Luciano. *Determinação de elementos traço em amostras biológicas tratadas com ácido fórmico por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado*. Florianópolis, 2012. xvi, 113 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

42. Vandecasteele, C. and Block, C. B. Modern methods for trace element determination, John Wiley & Sons, Chichester, 1993
43. Vanhaecke, F., Vanhoe, H., Dams, R., and Vandecasteele, C. (1992). The use of internal standards in ICP-MS. *Talanta* 39, 737–742. doi: 10.1016/0039-9140(92)80088-U
44. Virgilio, A., Schiavo, D., Nóbrega, J. A., & Donati, G. L. (2016). Evaluation of standard dilution analysis (SDA) of beverages and foodstuffs by ICP OES. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 31(6), 1216–1222. doi:10.1039/c6ja00040a
45. Virgilio, A., Nóbrega, J. A., & Donati, G. L. (2017). Multi-isotope calibration for inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(3), 1157–1162. doi:10.1007/s00216-017-0753-4.
46. Virgilio, A., J.A. Nobrega, and G.L. Donati, Multi-isotope calibration for inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2018**.
47. Virgílio, A., Silva, A. B. S., Nogueira, A. R. A., Nobrega, J. A., & Donati, G. L. (2020). Calculating limits of detection and defining working ranges for multi-signal calibration methods. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. doi:10.1039/d0ja00212g
48. Wheal, M. S., & Wilkes, E. N. (2021). Application of multi-isotope calibration to analysis of wine samples by ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 36(11), 2383-2390.
49. Williams, C. B., Jones, B. T., & Donati, G. L. (2019). Multi-flow calibration applied to microwave-induced plasma optical emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. doi:10.1039/c9ja00091g.