

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

***“CALIBRAÇÃO MULTIVIAS EM LASER-INDUCED BREAKDOWN
SPECTROSCOPY (LIBS) PARA DETERMINAÇÃO DE Ca, K E Mg EM
AMOSTRAS DE SUPLEMENTO MINERAL PARA HUMANOS”***

Alisson Silva de Araújo*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho

*bolsista CAPES

São Carlos – SP

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Alisson Silva de Araújo, realizada em 25/03/2021.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho (UFSCar)

Prof. Dr. Adriano de Araújo Gomes (UFRGS)

Profa. Dra. Mariane Gonçalves Santos (UNIFAL)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

Ao meu pai, José Adailton, por todo amor e apoio. A minha mãe Elisangela, que mesmo do céu vem me ajudando, de certa forma, a enfrentar todas as adversidades. Aos meus irmãos, Ailton, Atalita e Ailson, como forma de gratidão. A minha esposa, Gabriela Pardino, como forma de amor.

Com carinho, dedico.

“Sempre é preciso saber quando uma etapa chega ao final. Se insistirmos em permanecer nela mais do que o tempo necessário, perdemos a alegria e o sentido das outras etapas que precisamos viver. Encerrando ciclos, fechando portas, terminando capítulos. Não importa o nome que damos, o que importa é deixar no passado os momentos que já se acabaram. As coisas passam, e o melhor que fazemos é deixar que elas possam ir embora.”

Gloria Hurtado

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre está me guiando em todas as minhas decisões;

Ao meu pai Adailton, por sempre me apoiar e por todo amor e carinho;

A minha mãe Elisangela, que pelo tempo que esteve em vida me criou com muito amor e dedicação;

Aos meus irmãos Ailton, Ailson e Atalita por serem minha base e por todo apoio;

A minha esposa Gabriela Pardinho, pelos incentivos, amor e apoio nos momentos de tristeza e alegria;

Ao professor Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho pela orientação, conselhos acadêmicos e por toda assistência durante o mestrado;

Aos professores da graduação Francisco Adriano, Simone Silva, Sebastião Silva, Marilene Nunes, Adriano Gomes e Adriane Damasceno, que sempre me incentivaram a continuar na carreira acadêmica, e pelos conselhos que levarei sempre comigo.

À colega Flaviana Pamplona por todos os conselhos e ajuda durante a transição de cidade.

A todos os colegas que adquiri durante esses dois anos no GAIA, especialmente Marco Aurélio, Vinícius Câmara e Raimundo Gamela, pela ótima recepção no grupo de pesquisa e pela descontração no dia-a-dia.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

LISTA DE ACRÔNIMOS

EEM - Excitation-Emission Matrices

FTIR - Fourier Transform Infrared

HPLC-DAD - High-performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection

ICP OES - Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry

IS - Internal Standardization

LIBS – Laser Induced Breakdown Spectroscopy

LoD - Limit of Detection

LoQ - Limit of Quantification

MCR-ALS - Multivariate Curve Resolution- Alternating Least Squares

MEC – Multi Energy Calibration

MLR - Multiple Linear Regression

MMC – Matrix Matching Calibration

OP GSA - One-Point Gravimetric Standard Addition

OP MLC - One-Point and Multiline Calibration

PARAFAC - Parallel Factor Analysis

PCR - Principal Component Regression

PLS - Partial Least Squares

RMSEP - Root Mean Square Error of Prediction

RMSEV - Root Mean Square Error of Validation

SA - Standard Addition

SRC - Slope Ratio Calibration

SSC - Single-Sample Calibration

STA - Simultaneous Thermal Analysis

TP CT - Two-Point Calibration Transfer

U-PLS/RBL - Unfolded Partial Least-Squares with Residual Bilinearization

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1.1 Representação gráfica do arranjo instrumental de um equipamento LIBS.	6
Figura 2.2.1 Classificação e organização dos dados em calibração. Fonte: Adaptado de OLIVIERI; ESCANDAR (2014) ⁴⁰	12
Figura 2.2.2 Representação gráfica da decomposição de um tensor de dados pelo PARAFAC. Fonte: Adaptado da referência ⁵¹	15
Figura 2.2.3 Esquema geral do algoritmo U-PLS/RBL. Fonte: Adaptado da referência ⁵⁴	17
Figura 3.1.1 Planejamento experimental do tipo composto central empregado para preparar as amostras do conjunto de calibração (círculos em vermelho) e validação (círculos em azul).	20
Figura 3.3.1 Esquema do procedimento para obtenção de dados multivias em LIBS.	23
Figura 4.2.1 Dados brutos antes e após o alinhamento.	28
Figura 4.2.2 Perfis espectrais selecionados para (a) Ca, (b) K e (c) Mg.	30
Figura 4.2.3 Descrição pictórica da organização de dados multivias para modelagem por MCR-ALS, PARAFAC e U-PLS / RBL.	31
Figura 4.4.1 Comparação dos perfis do analito puro e potenciais interferentes recuperados pelo algoritmo U-PLS / RBL na amostra de suplemento mineral de Mg (MS 01) nos modos (a) tempo de atraso e (b) linhas de emissão, bem como na amostra mineral de suplemento de K.	43
Figura 4.6.1 Acurácia (%) para (a) Ca, (b) K e (c) Mg para Amostras de suplemento mineral enriquecidas (SME) e suplemento mineral humano (SM).	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1.1. Aplicações das estratégias não tradicionais em LIBS.	10
Tabela 3.1.1. Escalas codificada e real dos níveis de concentração avaliados.	19
Tabela 3.2.1 Composição química básica das amostras de suplemento mineral (SM).	21
Tabela 3.3.1 Condições instrumentais usadas nas determinações por ICP OES.	22
Tabela 4.1.1 Valores teóricos e determinado por ICP OES de Ca, K e Mg nos sais e bases.	25
Tabela 4.1.2 Valores teóricos e de referências de Ca, K e Mg nas amostras dos conjuntos de calibração (Cal) e validação (Val).	26
Tabela 4.1.3 Concentração de Ca, K e Mg nas amostras de suplemento mineral (SM).	26
Tabela 4.1.4 Valores teóricos e de referências de Ca, K e Mg nas amostras de suplemento mineral enriquecidas (SME).	27
Tabela 4.3.1 Valores de referência e preditos pelo algoritmo MCR-ALS para as amostras de validação.	33
Tabela 4.3.2 Valores de referência e preditos pelo algoritmo PARAFAC para as amostras de validação	34
Tabela 4.3.3 Valores de referência e preditos pelo algoritmo U-PLS/RBL para as amostras de validação.	35
Tabela 4.4.1 Valores de referência e preditos pelo algoritmo MCR-ALS para as amostras de suplemento mineral (SM).	36
Tabela 4.4.2 Valores de referência e preditos pelo algoritmo MCR-ALS para as amostras de suplemento mineral enriquecidas (SME).	37
Tabela 4.4.3 Resumo das métricas de desempenho obtidas pelo algoritmo MCR- ALS.	38
Tabela 4.4.4 Valores de referência e preditos pelo algoritmo PARAFAC para as amostras de suplemento mineral (SM).	38
Tabela 4.4.5 Valores de referência e preditos pelo algoritmo PARAFAC para as amostras de suplemento mineral enriquecidas (SME).	39
Tabela 4.4.6 Resumo das métricas de desempenho obtidas pelo algoritmo PARAFAC.	40
Tabela 4.4.7 Valores de referência e preditos pelo algoritmo U-PLS/RBL para as amostras de suplemento mineral (SM).	40
Tabela 4.4.8 Valores de referência e preditos pelo algoritmo U-PLS/RBL para as amostras de suplemento mineral enriquecidas (SME).	41
Tabela 4.4.9 Resumo das métricas de desempenho obtidas pelo algoritmo U- PLS/RBL.	42
Tabela 4.5.1 Resumo das métricas de desempenho obtidos pelos algoritmos MCR- ALS, PARAFAC e U-PLS/RBL antes e após a inclusão de mais amostras no conjunto de calibração.	45

RESUMO

PROPOSIÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE CALIBRAÇÃO MULTIVIAS EM DADOS LASER-INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY (LIBS) PARA DETERMINAÇÃO DE Ca, K E Mg EM AMOSTRAS DE SUPLEMENTO MINERAL HUMANO. Este trabalho pretende apresentar uma nova abordagem para modelagem de dados LIBS resolvidos no tempo empregando algoritmos multivias, visando alcançar a vantagem de segunda ordem. Os algoritmos avaliados neste estudo foram: resolução de curvas multivariadas (*Multivariate Curve Resolution- Alternating Least Squares*, MCR-ALS), análise de fatores paralelos (*Parallel Factor Analysis*, PARAFAC) e regressão por mínimos quadrados parciais desdobrados com bilinearização residual (*Unfolded Partial Least-Squares with Residual Bilinearization*, U-PLS/RBL). Os analitos monitorados neste trabalho foram Ca, K e Mg em amostras de suplemento mineral. Este estudo foi dividido em quatro (4) partes. Na Parte 1 a validação dos algoritmos foi realizada utilizando amostras de misturas dos próprios sais e bases dos analitos estudados. Nas partes 2 e 3, amostras de suplemento mineral foram utilizadas para avaliar a capacidade preditiva dos modelos, com 6 amostras no conjunto de calibração (Parte 2) e 17 amostras no conjunto de calibração (Parte 3). Por fim, modelos univariados convencionais foram construídos e os resultados obtidos comparados com o desempenho dos algoritmos multivias (Parte 4). Os resultados obtidos na primeira parte demonstraram um bom desempenho para os algoritmos avaliados, com destaque para o U-PLS/RBL. Os valores obtidos de RMSEV por MCR-ALS foi de 3,4 % pp⁻¹, 0,4 % pp⁻¹ e 0,9 % pp⁻¹ para o Ca, K e Mg, respectivamente. Para o PARAFAC os valores obtidos para Ca, K e Mg foram 11 % pp⁻¹, 0,3 % pp⁻¹ e 1,1 % pp⁻¹, respectivamente. Já os valores obtidos por U-PLS/RBL foram 2,5 % pp⁻¹ para o Ca, 0,2 % pp⁻¹ para o K e 1,2 % pp⁻¹ para o Mg. Quanto aos resultados obtidos na Parte 2, observou-se uma queda no desempenho dos algoritmos MCR-ALS e PARAFAC quando as amostras de suplementos foram utilizadas como amostras de teste, com altos valores de LoD e LoQ por ambos os modelos para os três analitos monitorados. Já o U-PLS/RBL apresentou um ótimo desempenho, com baixos valores de LoD e LoQ para Ca (0,4% pp⁻¹ e 1,2 % pp⁻¹, respectivamente) e K (LoD: 0,1% pp⁻¹ e LoQ: 0,2 % pp⁻¹), enquanto que para o Mg algumas amostras ficaram abaixo ou próximas do LoD (1,0 pp⁻¹) e LoQ (3,0 pp⁻¹). Com a inclusão de mais amostras no conjunto de calibração (Parte 3) o desempenho dos algoritmos MCR-ALS e PARAFAC melhoraram para alguns analitos, contudo os valores de LoD e LoQ ainda continuaram altos para os três analitos monitorados. Em relação ao U-PLS/RBL não houve melhoras significativas para Ca e K, enquanto que para o Mg uma certa melhora nos valores de LoD e LoQ foram observados, 0,2 pp⁻¹ e 0,7 pp⁻¹, respectivamente. A calibração univariada convencional (Parte 4) não conseguiu obter bons resultados, o que era esperado, uma vez que se faz necessário linhas seletivas para obter bons resultados. Portanto, estes resultados confirmam que com o modelo U-PLS/RBL foi possível prever os analitos de interesse em amostras desconhecidas, sendo possível alcançar a vantagem de segunda ordem.

ABSTRACT

PROPOSITION OF MULTIWAY CALIBRATION STRATEGIES IN LASER-INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY (LIBS) DATA FOR DETERMINATION OF Ca, K AND Mg IN SAMPLES OF HUMAN SUPPLEMENTS. This work intends to present a new approach for modeling LIBS data resolved in time using multiway algorithms, aiming to achieve the advantage of second order. The algorithms evaluated in this study were: Multivariate Curve Resolution- Alternating Least Squares (MCR-ALS), Parallel Factor Analysis (PARAFAC) and Unfolded Partial Least-Squares with Residual Bilinearization (U-PLS / RBL). The analytes monitored in this work were Ca, K and Mg in samples of mineral supplement. This study was divided into four (4) parts. In Part 1 the validation of the algorithms was performed using samples of mixtures of the salts and bases of the studied analytes. In parts 2 and 3, mineral supplement samples were used to assess the predictive capacity of the models, with 6 samples in the calibration set (Part 2) and 17 samples in the calibration set (Part 3). Finally, conventional univariate models were built and the results obtained compared with the performance of the multivariate algorithms (Part 4). The results obtained in the first part demonstrated a good performance for the evaluated algorithms, with emphasis on the U-PLS / RBL. The values obtained for RMSEV by MCR-ALS were 3.4% pp⁻¹, 0.4% pp⁻¹ and 0.9% pp⁻¹ for Ca, K and Mg, respectively. For PARAFAC the values obtained for Ca, K and Mg were 11% pp⁻¹, 0.3% pp⁻¹ and 1.1% pp⁻¹, respectively. The values obtained by U-PLS / RBL were 2.5% pp⁻¹ for Ca, 0.2% pp⁻¹ for K and 1.2% pp⁻¹ for Mg. As for the results obtained in Part 2, a decrease in the performance of the MCR-ALS and PARAFAC algorithms was observed when the supplement samples were used as test samples, with high values of LoD and LoQ by both models for the three monitored analytes. The U-PLS / RBL showed an excellent performance, with low values of LoD and LoQ for Ca (0.4% pp⁻¹ and 1.2% pp⁻¹, respectively) and K (LoD: 0.1% pp⁻¹ and LoQ: 0.2% pp⁻¹), while for Mg some samples were below or close to loD (1.0 pp⁻¹) and LoQ (3.0 pp⁻¹). With the inclusion of more samples in the calibration set (Part 3) the performance of the MCR-ALS and PARAFAC algorithms improved for some analytes, however the LoD and LoQ values still remained high for the three monitored analytes. Regarding the U-PLS / RBL, there were no significant improvements for Ca and K, while for Mg a certain improvement in the values of LoD and LoQ was observed, 0.2 pp⁻¹ and 0.7 pp⁻¹, respectively. Conventional univariate calibration (Part 4) did not achieve good results, which was expected, since selective lines are necessary to obtain good results. Therefore, these results confirm that the U-PLS / RBL model was able to predict the analytes of interest in unknown samples, being possible to achieve the second order advantage.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	2
1.1	CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA.....	2
1.2	OBJETIVO GERAL.....	4
1.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1	LASER-INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY (LIBS).....	6
2.1.1	Conceitos fundamentais.....	6
2.1.2	Estratégias de calibração em LIBS.....	8
2.2	ESTRATÉGIAS DE CALIBRAÇÃO MULTIVIAS.....	12
2.2.1	Classificação dos dados e calibrações.....	12
2.2.2	Resolução de Curvas Multivariadas (MCR-ALS).....	13
2.2.3	Análises de Fatores Paralelos (PARAFAC).....	15
2.2.4	Regressão por mínimos quadrados parciais desdobrados com bilinearização residual (U-PLS/RBL).....	16
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1	AMOSTRAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO.....	19
3.2	AMOSTRAS DO CONJUNTO DE TESTE.....	21
3.3	ANÁLISE INSTRUMENTAL.....	21
3.4	TRATAMENTO DOS DADOS.....	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1	AMOSTRAS.....	25
4.1.1	Amostras do conjunto de calibração e validação.....	25
4.1.2	Amostras do conjunto de teste.....	26
4.2	ANÁLISE DOS DADOS.....	27
4.3	PARTE 1: VALIDAÇÃO DA MODELAGEM DOS DADOS LIBS RESOLVIDOS NO TEMPO POR ALGORITMOS MULTIVIAS.....	32
4.4	PARTE 2: AVALIAÇÃO DOS ALGORITMOS MULTIVIAS EM AMOSTRAS DE SUPLEMENTO MINERAL HUMANDO.....	36
4.5	PARTE 3: AVALIAÇÃO DOS ALGORITMOS MULTIVIAS COM A INCLUSÃO DE MAIS AMOSTRAS NO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO.....	44
4.6	PARTE 4: CALIBRAÇÃO UNIVARIADA.....	46
5	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	50
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

A espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (*Laser-Induced breakdown spectroscopy, LIBS*) vem se consolidando em diversos campos da ciência como uma técnica analítica atraente para obter informações sobre a composição química elementar em diversos tipos de amostras, seja ela sólida, líquida ou gasosa¹⁻⁵. O seu amplo uso pode ser justificado pela capacidade de realizar uma análise rápida, com pouco ou nenhum preparo de amostra, elevada frequência analítica, multielementar e micro destrutiva⁶.

O funcionamento básico da técnica LIBS consiste em induzir a formação de um plasma incidindo pulsos de laser de baixa frequência sobre uma pequena região da amostra. Uma parte da radiação do plasma formado é então coletada por cabo de fibra óptica, analisada por um detector e então visualizada na forma de gráficos (espectros de emissão) em um computador. Estes espectros podem então ser utilizados para uma inspeção qualitativa ou quantitativa da composição química de uma amostra^{7,8}.

Diversos trabalhos empregaram a LIBS com sucesso para fins qualitativos⁹⁻¹¹. No entanto, quando se trata da análise quantitativa alguns inconvenientes devem ser superados, como exemplo os efeitos de matriz, devido à forte interação entre o laser e a amostra, bem como as interferências espectrais, que podem influenciar negativamente na calibração em LIBS. Diante disso, estratégias univariadas convencionais e não convencionais, assim como estratégias multivariadas foram empregadas em dados LIBS, objetivando resolver ou minimizar os problemas supracitados¹². Contudo, no caso da calibração univariada é necessária uma seletividade total para atingir bons resultados, enquanto que na calibração multivariada toda variabilidade dos dados deve ser modelada para que uma boa capacidade preditiva seja alcançada.

Uma alternativa seria o uso de dados multivias, no qual cada amostra é representada por uma matriz ou um tensor de informação. O grande interesse nos dados multivias deve-se pela sua capacidade, quando modelados por algoritmos apropriados, de identificar e quantificar o analito mesmo na presença de interferentes que não estavam presentes na etapa de calibração. Essa propriedade é definida na

literatura como vantagem de segunda ordem¹³. Dentre os principais algoritmos utilizados para modelagem desses tipos de dados podemos citar: resolução de curvas multivariadas (*Multivariate Curve Resolution- Alternating Least Squares*, MCR-ALS)¹⁴, análise de fatores paralelos (*Parallel Factor Analysis*, PARAFAC)¹⁵ e regressão por mínimos quadrados parciais desdobrados com bilinearização residual (*Unfolded Partial Least-Squares with Residual Bilinearization*, U-PLS/RBL)¹⁶.

Apesar do amplo uso dos algoritmos multivias em diversos tipos de dados, ainda são poucos os trabalhos reportados na literatura em que estes algoritmos foram utilizados para modelagem de dados LIBS. Por exemplo, EL HADDAD et al.¹⁷, realizaram a identificação mineral multifásica e quantificação por LIBS e MCR-ALS. Já Castro et al.¹⁸, utilizaram o PARAFAC em dados LIBS apenas para remoção de interferentes antes da caracterização de elementos básicos e nobres em amostras de placa de circuito impresso. Quanto ao algoritmo U-PLS/RBL nenhum trabalho foi apresentado na literatura em que este algoritmo foi utilizado na modelagem de dados LIBS. Vale ressaltar, que em nenhum dos trabalhos mencionados, os algoritmos multivias foram empregados objetivando alcançar a vantagem de “segunda ordem”.

1.2 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como principal objetivo apresentar uma nova estratégia de calibração empregando algoritmos de ordem superior para o processamento de dados LIBS multidimensionais visando alcançar a vantagem de segunda ordem.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Desenvolvimento de uma nova abordagem para modelagem de dados LIBS resolvidos no tempo.
- ✓ Avaliação da abordagem proposta na determinação de Ca, K e Mg em amostras de suplemento mineral para humanos
- ✓ Comparação entre calibração multivariada e calibração univariada convencional.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LASER-INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY (LIBS)

2.1.1 Conceitos fundamentais

Com o avanço da microeletrônica a LIBS se desenvolveu rapidamente nos últimos anos como uma técnica analítica de grande potencial para análise elementar. Em comparação com outras técnicas espectroanalíticas, a LIBS se destaca pela capacidade de realizar uma análise rápida com mínimo preparo de amostra, microdestrutiva e *in situ*, uma vez que estes equipamentos apresentam a vantagem de serem compactados e portáteis^{7,8}.

Esta técnica analítica emprega uma fonte de laser e lentes focalizadoras para vaporizar uma pequena região da amostra, um plasma então é gerado e a radiação é coletada por cabos de fibra óptica e direcionada para um espectrômetro, o qual é utilizado para difratar a luz das espécies. Em seguida, um detector registra os sinais de emissão e essas informações podem ser visualizadas em um computador^{7,8}. A Figura 2.1.1 mostra uma representação gráfica dos componentes básicos de um equipamento LIBS.

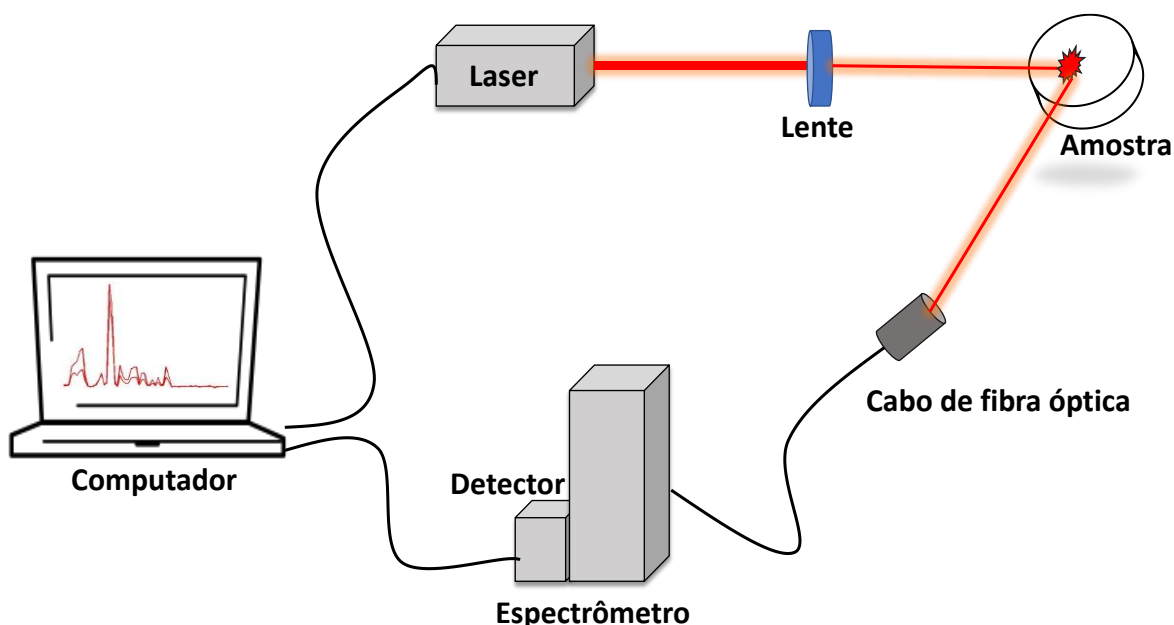


Figura 2.1.1 Representação gráfica do arranjo instrumental de um equipamento LIBS.

A fonte de energia geralmente utilizada nas aplicações em LIBS para realizar a formação do plasma são lasers de estado sólido do tipo Nd:YAG (*neodymium-doped yttrium aluminium garnet*), um dispositivo que opera em 1064 nm e que pode ter duração em nano, pico ou femto segundos. A depender das aplicações, a escolha da duração do pulso do laser é fundamental, pois são observadas diferenças durante a interação do laser com a amostra, bem como na formação do plasma. Em lasers com durações em nano e pico segundos, por exemplo, a precisão é consideravelmente mais baixa devido a formação de material “derretido” ao redor do ponto ablado, fazendo com que o plasma seja formado por parte deste material. Por outro lado, em lasers com duração em femto segundos uma melhor precisão é alcançada, uma vez que o curto intervalo de tempo possibilita uma transição do sólido direto para o plasma e, assim, proporcionando uma menor recombinação entre os analitos¹⁹.

Já o plasma é a base da aplicação da LIBS e pode ser caracterizado por ser um estado da matéria em que átomos, íons, elétrons e radiação coexistem e interagem entre si trocando energia. A formação de plasma se dá por uma série de processos físicos. Na primeira etapa, ocorre absorção de energia pela amostra a partir de um campo de radiação pulsada, da ordem de nanosegundos ou, até mesmo, femtosegundos, dependendo da fonte de energia empregada. Em seguida, ocorre a ablação da massa amostral, levando à formação de um vapor (pluma do plasma) acima da superfície da amostra. As partículas presentes nesse vapor (misturas de átomos, íons e espécies provenientes tanto da amostra quanto da atmosfera ambiente) absorvem e dispersam a radiação, induzindo a formação do plasma²⁰.

A radiação emitida pelo plasma contém idealmente toda informação química elementar presente em uma amostra. Para que essa informação seja interpretável quimicamente, um sistema de detecção é empregado para coletar e registrar esses sinais em um computador. Dentre o arranjo instrumental mais empregado em LIBS destaca-se o acoplamento de um detector *charge-coupled device* (CCD) ou *intensified CCD* (ICCD) a um espectrômetro *echelle*. Essa configuração instrumental possibilita uma alta resolução e maior cobertura espectral, (entre 165 a 1000 nm) garantindo, dessa forma, um sistema robusto diante da análise de matrizes complexas^{19,20}.

2.1.2 Estratégias de calibração em LIBS

As interferências espectrais e os efeitos de matriz, devido à forte interação entre laser e amostra, fazem da análise quantitativa em LIBS um grande desafio. Diante deste cenário, diversas estratégias de calibração vêm sendo reportadas na literatura com intuito de contornar tais problemas. Em um trabalho de revisão apresentado por Costa et al.¹², foram classificados as principais estratégias de calibração em LIBS em três grandes grupos: (I) calibração tradicional, (II) calibração não tradicional e (III) calibração multivariada.

Dentre as estratégias do grupo (I), calibração tradicional, as mais utilizadas para minimizar os efeitos de matriz na análise quantitativa são: compatibilização de matriz (*matrix-matching calibration*, MMC), padronização interna (*Internal standardization*, IS) e adição de padrão (*standard addition*, SA)¹². A abordagem MMC vem sendo utilizada na análise quantitativa em LIBS para minimizar os efeitos de matriz em amostras complexas, essa estratégia visa combinar padrões de calibração, geralmente um material de referência certificado (*certified reference materials*, CRMs), com a matriz da amostra. Todavia, o MMC apresenta algumas limitações, como a dificuldade de preparar padrões de calibração, bem como obter CRMs disponíveis comercialmente¹².

Já IS consiste na escolha de um padrão interno que apresente o mesmo comportamento que o analito durante todos os processos temporais do plasma. A razão entre o sinal do analito e do padrão interno é então utilizada para obter a curva de calibração. No entanto, a escolha adequada do padrão pode ser uma tarefa difícil. Além disso, pode não ser eficiente em casos severos de efeito de matriz¹².

A adição de padrão, por sua vez, baseia-se na adição de um padrão do analito puro nas amostras desconhecidas. Normalmente são feitas várias adições em quantidades crescentes do padrão do analito na amostra a ser analisada para que o comportamento entre os padrões e a amostra seja semelhante. No entanto, essa estratégia exige que a adição de padrão seja realizada para cada amostra, demandando um grande esforço experimental¹².

Em um trabalho desenvolvido por Babos et al.,²¹ os autores avaliaram o uso do MMC para determinação de elemento estratégico (Al) e tóxico (Pb) em amostras de lixo eletrônico (placas de circuito impresso), obtendo resultados satisfatórios quando o MMC foi empregado, com recuperações variando entre 80-

120%, demonstrando que tal estratégia pode ser empregada com sucesso na análise quantitativa em LIBS.

ZHANG et al.,²² demonstraram que a padronização interna é eficaz para análise de amostras complexas em LIBS. Os autores realizaram a detecção de P em amostras de fertilizantes empregando a padronização interna como método para reduzir os efeitos de matriz. Neste estudo o Si foi utilizado como padrão interno e foi obtido um coeficiente de correlação de 0,932.

Zivkovic et al.,²³ utilizaram o método de adição de padrão para determinação de Ba e Mn em amostras de chá de hortelã-pimenta. Os autores obtiveram coeficiente de correlação superiores a 0,95 e recuperações de 99,7% para o Ba e 102,3% para o Mn, confirmando que essa abordagem pode ser empregada com confiança satisfatória para o controle de qualidade de alimentos.

Em relação as abordagens do grupo (II), calibração não tradicional, são estratégias que foram propostas a partir de 2018 na literatura e buscam, de modo geral, construir um modelo de calibração explorando as propriedades físico-químicas do plasma, usando linhas de emissão do analito com sensibilidades diferentes, além de buscar diminuir o esforço experimental empregando poucos padrões. As principais estratégias que compõe este grupo são: *multi-energy calibration* (MEC), *one-point gravimetric standard addition* (OP GSA), *one-point and multiline calibration* (OP MLC), *slope ratio calibration* (SRC), *two-point calibration transfer* (TP CT) e *single-sample calibration* (SSC). As abordagens matemáticas de cada estratégia mencionada podem ser consultadas em literatura especializada¹².

Estas estratégias foram empregadas com sucesso em diversos tipos de amostras de diferentes complexidades, demonstrando que são eficientes para resolver ou minimizar os problemas que tanto afetam a análise quantitativa em LIBS. Alguns dos principais trabalhos disponíveis na literatura em que as estratégias supracitadas foram utilizadas podem ser visualizadas a partir da Tabela 2.1.1.

Tabela 2.1.1. Aplicações das estratégias não tradicionais em LIBS.

Matriz	Descrição	Estratégia de calibração	Resultados alcançados	Referência
Suplementos alimentares	Determinação de Ca, Mg e K	MEC	Recuperação de 81 a 103% para o Ca, 74 a 106% para o Mg e apenas duas amostras tiveram recuperações aceitáveis para o K	24
Suplementos minerais para bovinos	Determinação direta de Ca e P	OP-GSA e MEC	Recuperações para o Ca da ordem de 86–109% MEC e 72–117% OP-GSA, para o P de 80–108% MEC e 82–111% OP GSA	25
Ligas de aço	Determinação de Mn, Cr, Ni e Ti	OP-MLC	Erros relativos médios de 9% para o Mn, 22% para Cr, 21% para o Ni e 36% para o Ti	26
Folhas de plantas	Determinação de macro e micronutrientes	SRC	Coefficientes lineares superiores a 0,99 para todos os analitos monitorados	27
Polipropileno reciclado a partir de baterias de carros	Determinação de Pb	TP CT	Recuperação entre 100 a 127% e RSD entre 6-21%	28
Amostras de aço, latão e liga a base de níquel	Determinação de Fe, Zn, Ni, Cr, Nb e Mo	SSC	Valores de R^2 de 0,97 e RMSECV de 0,76 wt%	29

Assim como qualquer estratégia de calibração, as não tradicionais também apresentam algumas dificuldades que limitam suas aplicações. No caso do MEC a escolha de um diluente adequado nem sempre é uma tarefa fácil, uma vez que se faz necessário um reagente de alta pureza para não ocorrer contaminações durante as análises. Em relação a abordagem OP GSA há uma necessidade de uma homogeneização eficiente da amostra com o branco/padrão. Enquanto ao OP-MLC e SSC a dificuldade decorre em encontrar um padrão de calibração apropriado. Já nos casos das estratégias SRC e TP CT faz-se necessário que a concentração dos analitos seja semelhante às dos padrões¹².

O grupo (III), que abrange as estratégias de calibração multivariada, relaciona a concentração dos constituintes de interesse com múltiplas respostas medidas, ou seja, enquanto que na calibração univariada para cada amostra apenas um sinal será obtido, na calibração multivariada cada amostra será representada por um vetor de informação. Dentre as estratégias de calibração multivariada mais empregadas em dados LIBS podemos citar: *partial least squares* (PLS)³⁰, *principal component regression* (PCR)³¹ e *multiple linear regression* (MLR)³². Estas estratégias já estão bastante estabelecidas na literatura e apresentam como principal vantagem a capacidade de prever o constituinte de interesse mesmo na presença de interferentes, desde que estes estejam presentes na etapa de calibração. Como desvantagens destaca-se a necessidade de um grande conjunto de amostras de calibração para os modelos PLS e PCR, enquanto que o MCR requer que número de amostras seja menor que o número de variáveis, além de não obter uma boa capacidade preditiva quando variáveis altamente correlacionadas são empregadas^{12,33}. Apesar disso, as estratégias de calibração multivariada já estão bastante estabelecidas na literatura e também foram utilizadas com sucesso em diversos tipos de amostras³⁴⁻³⁹.

De modo geral, as estratégias dos grupos (I), (II) e (III) foram eficientes para contornar os problemas que tanto afetam a análise quantitativa em LIBS. No entanto, quando se trata das estratégias de calibração tradicionais e não tradicionais um esforço é necessário para selecionar linhas seletivas e livres de interferências, enquanto que as estratégias de calibração multivariada só alcançam bons resultados quando toda variabilidade dos dados é modelada. Assim, para contornar essas limitações, uma alternativa seria o uso de estratégias de calibração multivariadas. Nas

seções subsequentes, serão abordados os conceitos e as principais vantagens de usar tais estratégias.

2.2 ESTRATÉGIAS DE CALIBRAÇÃO MULTIVIAS

2.2.1 Classificação dos dados e calibrações

O procedimento matemático que relaciona o sinal instrumental fornecido por um instrumento analítico com uma propriedade de interesse, geralmente a concentração de uma determinada espécie, é denominada de calibração. Diante disso, o bloco das respostas instrumentais a ser relacionada com a propriedade de interesse pode ser classificado como sendo de zero, primeira, segunda, terceira ou até mesmo de quarta ordem. A calibração univariada, na qual cada amostra é representada por um valor discreto, é denominada como calibração de ordem zero. Já na calibração multivariada cada amostra pode ser representada por um vetor (primeira ordem), matriz (segunda ordem) ou por um tensor de informação (terceira ordem). Os dados a partir de segunda ordem são classificados na literatura como dados multivias⁴⁰. A Figura 2.2.1 ilustra como são classificados e organizados os dados em cada caso.



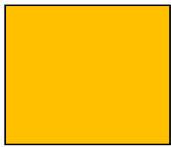


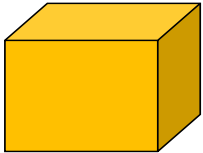



	Ordem 0	Ordem 1	Ordem 2
Amostra	 Escalar	 Vetor	 Matriz
Conjunto de Amostra	 Vetor	 Matriz	 3 vias
Calibração	 Univariada	 Multivariada	
			 Multiway

Figura 2.2.1 Classificação e organização dos dados em calibração. Fonte: Adaptado de OLIVIERI; ESCANDAR (2014)⁴⁰.

As vantagens analíticas inerentes aos dados de primeira e segunda ordem estão relacionadas à capacidade de identificar e quantificar o analito na presença de interferentes, algo que não pode ser realizado quando a calibração univariada ou de ordem zero é empregada. No caso da calibração de primeira ordem é possível detectar o analito mesmo na presença de interferentes, no entanto, faz-se necessário que o modelo esteja treinado para realizar a previsão do analito quando tais interferentes estejam presentes. Já na calibração de segunda ordem o analito pode ser detectado mesmo na presença de interferentes não calibrados. Na literatura essas vantagens analíticas são denominadas de vantagem de primeira e segunda ordem, respectivamente⁴⁰.

Em cada tipo de dados são necessárias estratégias de calibração adequadas para a modelagem. Vimos nas seções anteriores alguns dos procedimentos matemáticos mais empregados em calibração univariada e calibração de primeira ordem. Para modelagem de dados multivias os principais algoritmos utilizados são: resolução de curvas multivariadas com mínimos quadrados alternados (*multivariate curve resolution alternating least square*, MCR-ALS)⁴¹, análise de fatores paralelos (*parallel factor analysis*, PARAFAC)⁴² e mínimos quadrados parciais desdobrados com uma etapa de bilinearização residual (*Unfolded partial least-squares with residual bilinearization*, U-PLS/RBL)⁴³. Nas seções subsequentes veremos mais detalhes sobre cada um desses algoritmos.

2.2.2 Resolução de Curvas Multivariadas (MCR-ALS)

O algoritmo MCR-ALS tem como principal objetivo recuperar perfis espectrais individuais em misturas de sinais, bem como a concentração relativa das espécies recuperadas. Para isso a matriz das respostas instrumentais (**D**) é decomposta iterativamente por meio do algoritmo *Alternating Least Squares* (ALS) em duas matrizes, uma contendo os perfis espectrais puros (**S**) e outra o perfil de concentração (**C**) de todas as espécies presentes em uma amostra. As informações não modeladas estão presentes na matriz de resíduos (**E**)^{41,44}:

$$\mathbf{D} = \mathbf{CS}^T + \mathbf{E} \quad (1)$$

Antes da etapa de otimização pelo algoritmo ALS, porém, faz-se necessário estimar os perfis das matrizes **C** e **S** por meio de alguns métodos, tais como Análise de Fatores Evolucionários (EFA, do inglês *Evolving Factor Analysis*) ou métodos baseados na aproximação da variável pura, visto que essas informações nem sempre são conhecidas. Essa estimativa inicial, no entanto, nem sempre recupera perfis quimicamente interpretáveis, sendo necessário o uso de restrições para melhorar a qualidade do modelo final. Dentre as restrições mais utilizadas podemos citar: não negatividade, unimodalidade, melhor proximidade e trilinearidade. A escolha de restrições é opcional e seu uso dependerá do conhecimento do analista sobre os dados^{41,44}.

Realizada então as estimativas iniciais das matrizes **C** e **S** o processo de otimização é realizado iterativamente da seguinte forma: uma matriz **D*** é calculada a partir das estimativas iniciais e comparada com a matriz **D** original até que a diferença entre os resultados da matriz reconstruída (**D***) e a original sejam muito pequenas. A porcentagem de falta de ajuste (LOF) e a porcentagem de variância explicada (R^2) podem ser utilizados para verificar a qualidade do modelo final^{41,44}.

O algoritmo MCR-ALS é bastante utilizado tanto em dados de primeira, quanto de segunda ordem, para auxiliar na interpretação e no tratamento dos mesmos. Dessa forma, diversos trabalhos vêm sendo reportados na literatura empregando este algoritmo em dados gerados por diferentes instrumentos⁴⁵⁻⁴⁸. Apesar do uso difundido deste algoritmo em diversos equipamentos, são poucos os trabalhos encontrados na literatura em que esta técnica quimiométrica é empregada em sinais espectrais LIBS. Por exemplo, EL HADDAD et al.,¹⁷ realizaram a identificação mineral multifásico e quantificação por LIBS e MCR-ALS. Enquanto que METZINGER et al.,⁴⁹ aplicaram o MCR-ALS em dados LIBS para discriminação de tipos de papel e impressões feitas por impressoras digitais. Já em um estudo realizado por EL RAKWE et al.,⁵⁰ o MCR-ALS foi empregado em dados LIBS resolvidos no tempo para investigar os fenômenos físicos que ocorrem no plasma. No entanto, em nenhum desses estudos o MCR-ALS foi utilizado na quantificação objetivando a vantagem de segunda ordem.

2.2.3 Análises de Fatores Paralelos (PARAFAC)

O PARAFAC é definido matematicamente como um método de decomposição de dados de três vias \mathbf{X} ($I \times J \times K$), no qual o objetivo principal é encontrar duas matrizes de pesos (\mathbf{B} e \mathbf{C}) e uma matriz de scores (\mathbf{A}) para todos os componentes responsivos (f) presentes em uma amostra.

$$\mathbf{x}_{ijk} = \sum_{f=1}^F \mathbf{a}_{if} \mathbf{b}_{jf} \mathbf{c}_{kf} + \mathbf{e}_{ijk} \quad (2)$$

Em que \mathbf{x}_{ijk} corresponde aos valores medidos do arranjo tridimensional \mathbf{X} ($I \times J \times K$) nos modos de detecção I , J e K , enquanto que \mathbf{b}_{jf} , \mathbf{c}_{kf} e \mathbf{a}_{if} são os elementos das matrizes de pesos (\mathbf{B} e \mathbf{C}) e scores (\mathbf{A}), respectivamente. As informações não modeladas estão presentes em \mathbf{e}_{ijk} .⁵¹ Uma representação gráfica da decomposição de um tensor de dados pode ser visualizada na Figura 2.2.2.

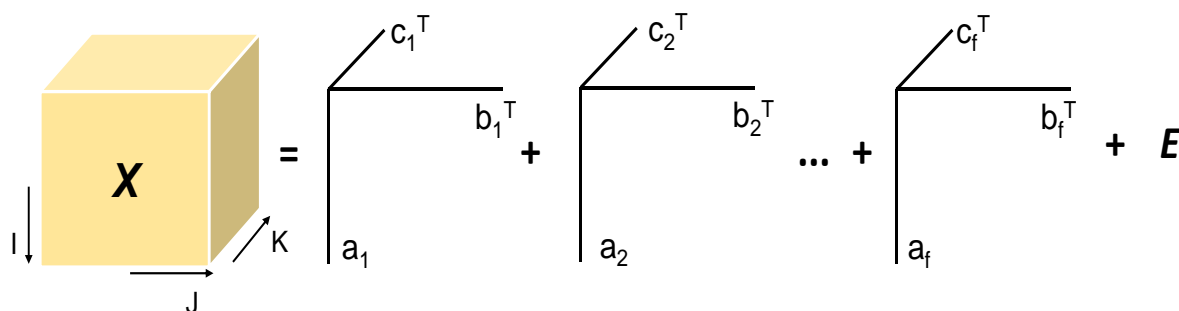


Figura 2.2.2 Representação gráfica da decomposição de um tensor de dados pelo PARAFAC.

Fonte: Adaptado da referência ⁵¹.

A decomposição de dados tridimensionais pelo PARAFAC apresenta uma única solução no qual é possível minimizar a soma quadrática dos resíduos, tal propriedade é conhecida como unicidade. No entanto, nem sempre essa solução obtida por PARAFAC é quimicamente interpretável, sendo necessário, portanto, o uso de restrições matemáticas para direcionar o algoritmo à solução correta⁵¹.

As aplicações do algoritmo PARAFAC se estendem a dados gerados por diversos instrumentos, como cromatografia líquida de alto desempenho com detecção por arranjo de diodos (*High-performance liquid chromatography with diode array detection*, HPLC-DAD)⁴², fluorescência de matriz de excitação e emissão (*excitation-emission matrices*, EEM)⁵², análise térmica simultânea (*Simultaneous Thermal*

Analysis, STA) associada a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared*, FTIR)⁵³, dentre outros. Em dados LIBS, no entanto, apenas um trabalho foi reportado na literatura. Neste trabalho, desenvolvido por Castro et al.,¹⁸ o PARAFAC foi utilizado em dados LIBS apenas para remoção de interferentes antes da caracterização de elementos básicos (Al e Cu) e nobres (Au e Ag) em amostras de placa de circuito impresso.

2.2.4 Regressão por mínimos quadrados parciais desdobrados com bilinearização residual (U-PLS/RBL)

O algoritmo U-PLS é uma variação do algoritmo PLS e foi desenvolvida especificamente para o processamento de dados de ordem superior. Essa estratégia transforma a estrutura original dos dados em um vetor. Em seguida as matrizes desdobradas são processadas pelo PLS convencional, onde há uma decomposição da matriz de dados do conjunto de calibração (\mathbf{X}_{cal}) no produto de duas matrizes, um referente a matriz de pesos (\mathbf{P}) e outra a matriz de scores (\mathbf{T}), o erro residual está presente na matriz \mathbf{E}_{cal} :

$$\mathbf{X}_{cal} = \mathbf{P}\mathbf{T}^T + \mathbf{E}_{cal} \quad (3)$$

Se nas amostras do conjunto de teste não conter nenhum componente desconhecido a concentração do analito pode ser determinada nesta amostra com base na equação 4:

$$\mathbf{y} = \mathbf{v}^T \mathbf{t} \quad (4)$$

Onde \mathbf{v} é o vetor das estimativas dos coeficientes de regressão e \mathbf{t} são os scores da amostra de teste. No caso de um possível interferente na amostra de teste (\mathbf{X}_{test}) a Equação 4 não pode ser utilizada para uma previsão confiável de \mathbf{y} . Neste caso, faz-se necessário o uso do algoritmo RBL para modelar os resíduos causados pelos componentes desconhecidos e assim alcançar a vantagem de segunda ordem. De uma forma geral o que o algoritmo RBL faz é comparar e modelar os resíduos das amostras dos conjuntos de calibração e teste e remover possíveis interferentes^{43,54}. A Figura 2.2.3 ilustra de uma forma esquemática o procedimento geral realizado pelo algoritmo U-PLS/RBL.

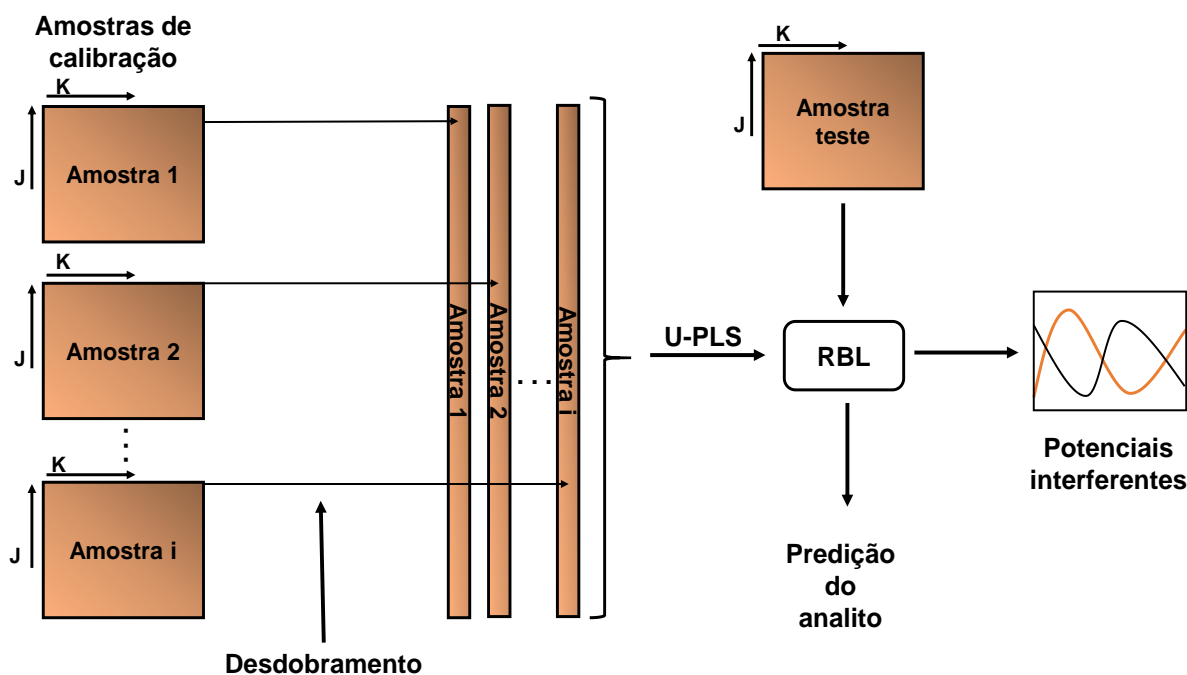


Figura 2.2.3 Esquema geral do algoritmo U-PLS/RBL. Fonte: Adaptado da referência⁵⁴

Assim como o MCR-ALS e PARAFAC o algoritmo U-PLS/RBL já está bastante estabelecido na literatura e foi empregado para modelagem de dados provenientes de diversos instrumentos^{43,55-57}. No entanto, até o final da redação deste trabalho, o algoritmo U-PLS/RBL ainda não tinha sido empregado para modelagem de dados LIBS.

CAPÍTULO 3

Materiais e métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO

O desempenho dos algoritmos MCR-ALS, PARAFAC e U-PLS/RBL foi avaliado a partir das misturas dos sais e bases precursoras dos analitos monitorados (Ca, K e Mg). Dessa forma, as amostras do conjunto de calibração e validação foram preparadas com base em um planejamento do tipo composto central. Diante disso foram realizadas misturas adequadas de CaCO_3 , KCl e Mg(OH)_2 com celulose microcristalina, sendo cada analito analisado em cinco níveis de concentração (veja Tabela 3.1.1).

Tabela 3.1.1. Escalas codificada e real dos níveis de concentração avaliados.

Ca		K		Mg	
Cod.	Real (%)	Cod.	Real (%)	Cod.	Real (%)
-1,68	12,61	-1,68	0,47	-1,68	0,68
-1	13,07	-1	0,94	-1	1,98
0	16,45	0	1,00	0	4,17
1	19,80	1	1,13	1	6,40
1,68	22,75	1,68	1,15	1,68	7,52

Um total de 17 amostras foram preparadas, sendo 6 amostras para compor o conjunto de calibração e 11 amostras para o conjunto de validação. A partir da Figura 3.1.1 é possível observar o desenho experimental empregado no planejamento das amostras do conjunto de calibração e validação.

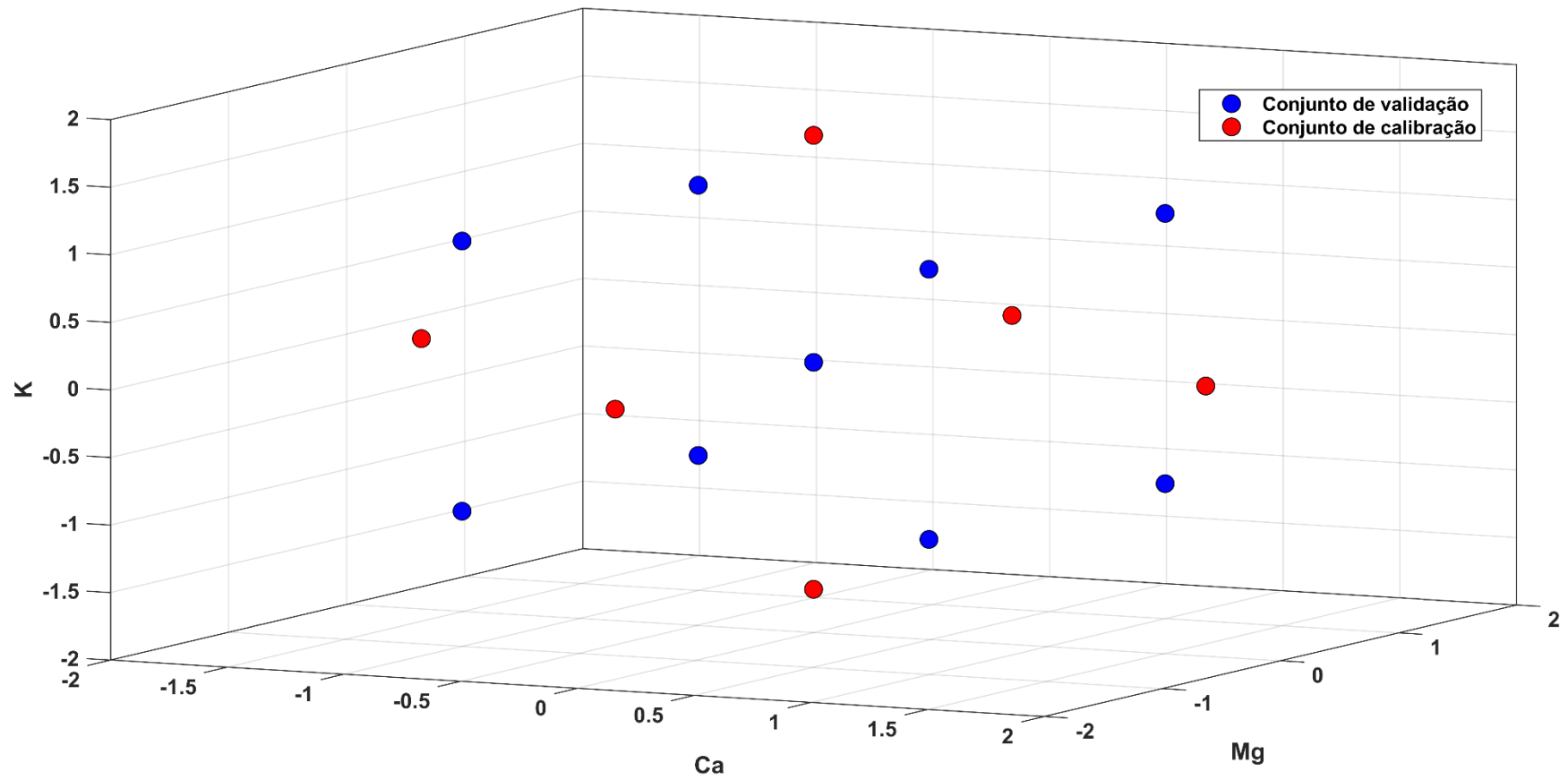


Figura 3.1.1 Planejamento experimental do tipo composto central empregado para preparar as amostras do conjunto de calibração (círculos em vermelho) e validação (círculos em azul).

3.2 AMOSTRAS DO CONJUNTO DE TESTE

Amostras de suplemento mineral para humanos foram utilizadas para avaliar a capacidade preditiva dos modelos em amostras desconhecidas. Dessa forma, foram adquiridas 4 amostras de suplemento mineral (SM) no comércio local da cidade de São Carlos-SP, sendo duas amostras de suplemento mineral de Mg, uma de K e outra de Ca. A Tabela 3.2.1 apresenta a composição básica das amostras avaliadas neste estudo.

Tabela 3.2.1 Composição química básica das amostras de suplemento mineral (SM).

Amostra	Composição*
SM_01	Amido, Cloreto de magnésio hexahidrato, Dióxido de silício (Antiumectante) e Fosfato Tricálcio (Antiumectante).
SM_02	Diamagnésio malato, celulose microcristalina, amido, Dióxido de silício (Antiumectante) e Fosfato Tricálcio (Antiumectante).
SM_03	Carbonato de cálcio, Maltodextrina, Colecalciferol, Antiumectante INS 460 (i), Celulose Microcristalina, Estabilizante INS 468 Croscarmelose Sódica., Estereato de magnésio.
SM_04	Cloreto de potássio, álcool cetosteárico, gelatina, dióxido de titânio, talco, goma arábica, sacarose, óxido de ferro vermelho, óxido de ferro amarelo e cera de carnaúba.

*informações obtidas do rótulo

Além disso, cada amostra foi enriquecida três vezes com misturas apropriadas dos sais/bases precursores e diluídas com celulose microcristalina. Para isso, algumas amostras de suplementos foram maceradas utilizando um cadinho e pistilo de porcelana, pois apresentam forma física em comprimido, enquanto que as amostras em pó foram simplesmente misturas com os sais/bases. Desta forma, o conjunto de teste consistiu em 16 amostras, sendo 12 amostras de suplemento mineral enriquecido (SME) e 4 amostras de suplemento mineral (SM).

3.3 ANÁLISE INSTRUMENTAL

Os valores de referências das amostras dos conjuntos de calibração, validação e teste foram obtidos por espectroscopia de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (*inductively coupled plasma optical emission spectrometry*, ICP OES), modelo iCAP 7400 (Thermo Fisher Scientific, EUA). Dessa forma, 200 mg de amostra foram digeridas com 5 mL de ácido nítrico concentrado e 5 mL de água em um bloco digestor a uma temperatura de 95°C por aproximadamente 4 horas. Em seguida, os digeridos foram transferidos para tubos do tipo falcon de 50 mL e

avolumados com água deionizada, pois faz-se necessário que a acidez residual seja menor que 10% v/v e o limite máximo de sólidos dissolvidos de 2% m/v antes da leitura por ICP OES. As condições experimentais empregadas nas determinações por ICP OES estão descritas na Tabela 3.3.1.

Tabela 3.3.1 Condições instrumentais usadas nas determinações por ICP OES.

Parâmetros instrumentais	Condições operacionais
Potência de radiofrequência aplicada (kW)	1,15
Vazão de introdução de amostra (mL min ⁻¹)	1,0
Tempo de estabilização da bomba (s)	5,0
Vazão do gás de argônio auxiliar (L min ⁻¹)	0,5
Vazão do gás de plasma (L min ⁻¹)	12
Vazão do nebulizador (L min ⁻¹)	0,7
Número de réplicas (n)	3
Modo de visualização	Axial e Radial
Linhas selecionadas por analito	Ca I (422,673), K I (766,490 e 769,896), Mg II (280,270)

Antes da análise por LIBS aproximadamente 400 mg de cada amostra foram prensadas sob pressão de 10 ton in⁻² para obtenção de pastilhas. Posteriormente, as pastilhas foram analisadas por um sistema LIBS 200 (Applied Spectra, Fremont, CA), equipado com um laser Nd: YAG de 1064 nm, um cabo de fibra adequado para coletar a radiação e um espectrômetro de dispositivo de carga acoplada (CCD) de 6 canais com 12,288 pixels de variação de 186 a 1042 nm. Os parâmetros instrumentais usados foram: spot size 100 µm, energia do pulso do laser de 80 mJ, taxa de repetição de 5 Hz.

Para gerar dados multivias em LIBS, o *delay time* foi empregado como modo adicional. Dessa forma, as linhas de emissão de cada analito em cada amostra foram monitoradas entre 0,5 a 2,0 µs, com incremento de 0,3 µs. Para cada *delay time* foram registrados aproximadamente 50 espectros e calculada a média. A Figura 3.3.1 apresenta um esquema do procedimento adotado para aquisição de uma matriz de informação por amostra.

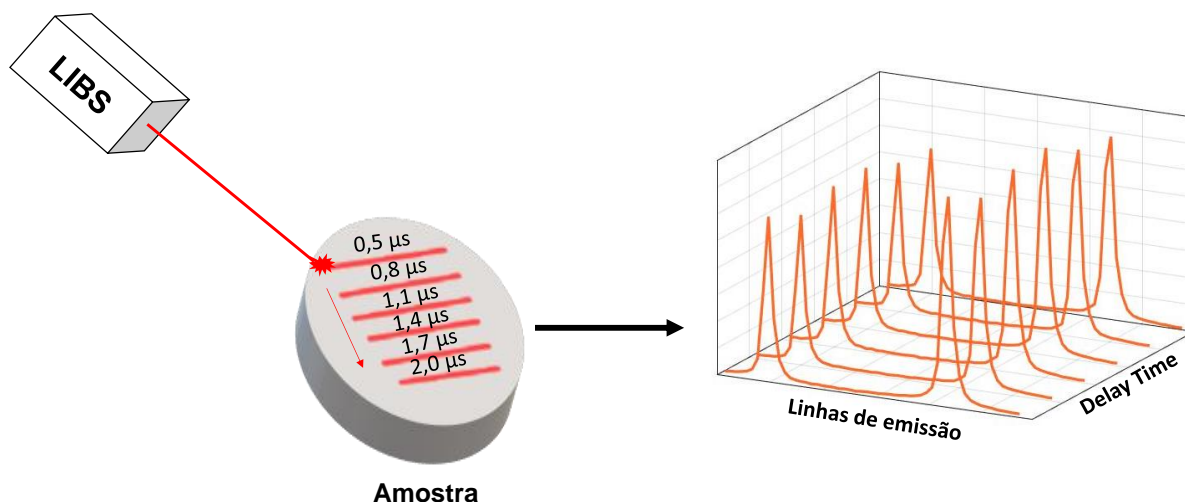


Figura 3.3.1 Esquema do procedimento para obtenção de dados multivias em LIBS.

3.4 TRATAMENTO DOS DADOS

Todos os cálculos foram realizados usando os programas Microsoft Excel e MATLAB R2019b. A interface gráfica *mvc2* (<http://www.iquirconicet.gov.ar/descargas/mvc2.rar>) foi usada para obter os modelos MCR-ALS, PARAFAC e U-PLS/RBL, enquanto que o software *PLS_Toolbox 8.7.1* foi utilizado para alinhamento dos picos antes da obtenção dos modelos multivias.

Para calcular os modelos univariados, duas rotinas foram utilizadas em ambiente Matlab, são elas: (1) *libs_treat*: Utilizada para detectar espectros anômalos e calcular 12 diferentes modos de normalização; (2) *Libs_par2* para o cálculo da razão sinal/background (SBR), área e altura para uma linha de emissão específica do analito monitorado.

CAPÍTULO 4

Resultados e discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AMOSTRAS

4.1.1 Amostras do conjunto de calibração e validação

A pureza dos sais e bases empregados no preparo das amostras dos conjuntos de calibração e validação foi primeiramente avaliada por ICP OES. Dessa forma, os sais/bases foram digeridos com HNO₃ concentrado e água em um bloco disgetor antes da análise por ICP OES e os resultados podem ser visualizados na Tabela 4.1.1.

Tabela 4.1.1 Valores teóricos e determinado por ICP OES de Ca, K e Mg nos sais e bases.

Sal/base	Ca (% p p ⁻¹)		K (% p p ⁻¹)		Mg (% p p ⁻¹)	
	Teórico	Determinado	Teórico	Determinado	Teórico	Determinado
CaCO ₃	40	27 ± 4	-	-	-	-
Mg(OH) ₂	-	-	-	-	42	27 ± 3
KCl	-	-	52	38 ± 1	-	-

Posteriormente, os valores reais das concentrações dos analitos nos sais e bases foram utilizados nos cálculos para obter os valores de referências de Ca, K e Mg nas amostras dos conjuntos de calibração e validação. É importante salientar, que apenas algumas amostras foram analisadas por ICP OES. Dessas amostras, todas do conjunto de calibração e apenas quatro amostras do conjunto de validação (Val_03, Val_06, Val_10, Val_10) foram analisadas. A Tabela 4.1.2 apresenta os valores teórico e de referência dos analitos monitorados nas amostras dos conjuntos de calibração e validação. De acordo com essa tabela, é possível observar que não há diferenças significativas entre os valores teóricos e de referência dos analitos monitorados nas amostras analisadas por ICP OES.

Tabela 4.1.2 Valores teóricos e de referência de Ca, K e Mg nas amostras dos conjuntos de calibração (Cal) e validação (Val).

Amostra	Ca (% p p ⁻¹)		K (% p p ⁻¹)		Mg (% p p ⁻¹)	
	Teórico	Referência	Teórico	Referência	Teórico	Referência
Cal_01*	11	13 ± 1	1,0	1,0 ± 0,1	4,2	4,7 ± 0,3
Cal_02*	22	23 ± 3	1,0	0,9 ± 0,1	4,2	4,4 ± 0,3
Cal_03*	16	16 ± 4	0,9	0,7 ± 0,1	0,7	0,7 ± 0,2
Cal_04*	17	16 ± 0,1	0,9	0,9 ± 0,1	7,8	7,5 ± 0,1
Cal_05*	17	14 ± 1	0,6	0,5 ± 0,04	4,2	3,6 ± 0,3
Cal_06*	16	14 ± 1	1,2	1,1 ± 0,1	4,2	3,7 ± 0,2
Val_01	13	13	0,9	0,9	2,0	2,0
Val_02	20	20	1,0	1,0	2,0	2,0
Val_03*	13	13 ± 0,3	0,9	0,9 ± 0,1	6,3	6,3 ± 0,2
Val_04	19	19	0,7	0,7	6,3	6,3
Val_05	13	13	1,1	1,1	2,0	2,0
Val_06*	20	19 ± 1,4	1,1	1,0 ± 0,1	2,0	1,9 ± 0,1
Val_07	13	13	1,1	1,1	6,4	6,4
Val_08	20	20	1,1	1,1	6,4	6,4
Val_09	16	16	1,0	1,0	4,2	4,2
Val_10*	16	14 ± 0,4	1,0	0,8 ± 0,1	4,2	3,6 ± 0,1
Val_11*	17	16 ± 0,5	0,9	1,0 ± 0,1	4,2	4,4 ± 0,1

* Amostras analisadas por ICP OES.

4.1.2 Amostras do conjunto de teste

A Tabela 4.1.3 apresenta a concentração teórica e determinada por ICP OES de Ca, K e Mg nas amostras de suplementos. Para a amostra de suplemento mineral de K (SM_04) foi necessário realizar uma diluição adicional com celulose microcristalina para que a concentração de K ficasse dentro da curva de calibração.

Tabela 4.1.3 Concentração de Ca, K e Mg nas amostras de suplemento mineral (SM).

Amostra	Ca (%)		K (%)*		Mg (%)	
	Rótulo	Determinado	Rótulo	Determinado	Rótulo	Determinado
SM_01	-	-	-	-	8	6 ± 0,1
SM_02	-	-	-	-	11	7 ± 0,1
SM_03	26	16 ± 1	-	-	-	-
SM_04	-	-	27	31 ± 1	-	-

* Fator de diluição = 24

Para obtenção dos valores de referência nas amostras de suplementos enriquecidas (SME), foram considerados em todos os cálculos os valores determinados por ICP OES nos sais/bases (Tabela 4.1.1) e nas amostras de suplemento mineral (Tabela 4.1.3). Algumas amostras de suplemento enriquecidas foram submetidas à análise por ICP OES (SME_02, SME_05, SME_08, SME_11) e os valores determinados ficaram bem próximos dos valores teóricos (veja Tabela 4.1.4).

Tabela 4.1.4 Valores teóricos e de referências de Ca, K e Mg nas amostras de suplemento mineral enriquecidas (SME).

Amostra	Ca (% p p ⁻¹)		K (% p p ⁻¹)		Mg (% p p ⁻¹)	
	Teórico	Referência	Teórico	Referência	Teórico	Referência
SME_01	13	13	0,7	0,7	3,2	3,2
SME_02*	15	15 ± 1	0,6	0,6 ± 0,1	4,7	4,7 ± 0,3
SME_03	11	11	0,8	0,8	4,7	4,7
SME_04	13	13	0,7	0,8	6,5	6,5
SME_05*	11	11 ± 0,1	0,6	0,7 ± 0,1	2,7	2,0 ± 0,1
SME_06	11	11	0,6	0,6	7,4	7,4
SME_07	18	18	0,7	0,7	1,3	1,3
SME_08*	14	13 ± 1	0,7	0,7 ± 0,1	4,3	4,1 ± 0,2
SME_09	16	16	0,6	0,6	2,8	2,8
SME_10	13	13	0,9	0,9	1,3	1,3
SME_11*	13	13 ± 1	1,1	1,1 ± 0,2	4,1	4,3 ± 0,3
SME_12	15	15	1,0	1,0	2,8	2,8

* Amostras analisadas por ICP OES.

4.2 ANÁLISE DOS DADOS

Após aquisição dos espectros LIBS ao longo do tempo, os dados foram organizados de tal forma que cada amostra fosse representada por uma matriz **X** (J x K) de informação, em que J representa o *delay time* e K os comprimentos de onda. Ao analisar os dados brutos é possível observar um pequeno deslocamento dos picos (veja Figura 4.2.1). Este deslocamento é ocasionado pelo fato do instrumento empregado neste trabalho ser equipado com um espectrômetro CCD de 12,288 pixels, variando de 186 a 1042 nm, e a resolução muda de um canal para o outro. Diante disso, antes dos procedimentos quimiométricos, os picos foram alinhados empregando a rotina peak alignment implementado no software PLS_Toolbox 8.7.1.

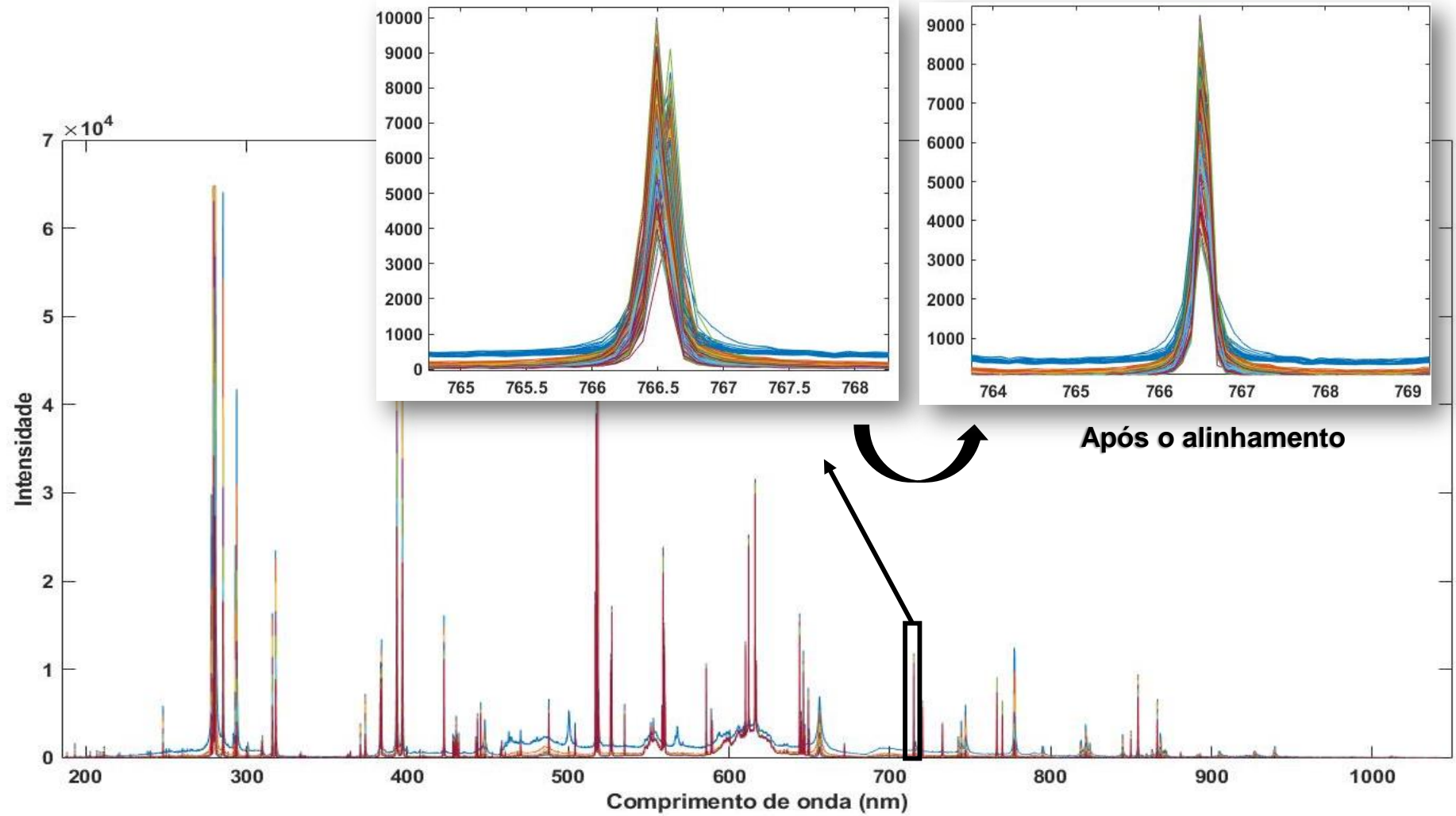


Figura 4.2.1 Dados brutos antes e após o alinhamento.

Posteriormente, foram selecionados os perfis espectrais das linhas de emissão de Ca (II 315,887, II 317,933, II 393,366 e II 396,847 nm), K (I 766,49 nm, I 769,896 nm) e Mg (I 285,213, I 516,732 e I 517,268 nm). Dessa forma, cada matriz de dados passou a ter dimensões de 6 x 129 para o Ca, 6 x 56 para o K e 6 x 64 para o Mg. A Figura 4.2.2 apresenta os perfis espectrais selecionados para Ca, K e Mg. Com base nesta imagem é possível observar como as linhas de emissão de cada elemento se comportam ao longo do tempo, verifica-se que as linhas de emissão para cada analito apresentam um decaimento característico durante a evolução temporal do plasma. Esse comportamento pode ser considerado como um fator positivo na diferenciação temporal entre o analito e interferentes por meio dos algoritmos multivias, uma vez que as espécies presentes no plasma podem apresentar comportamentos distintos.

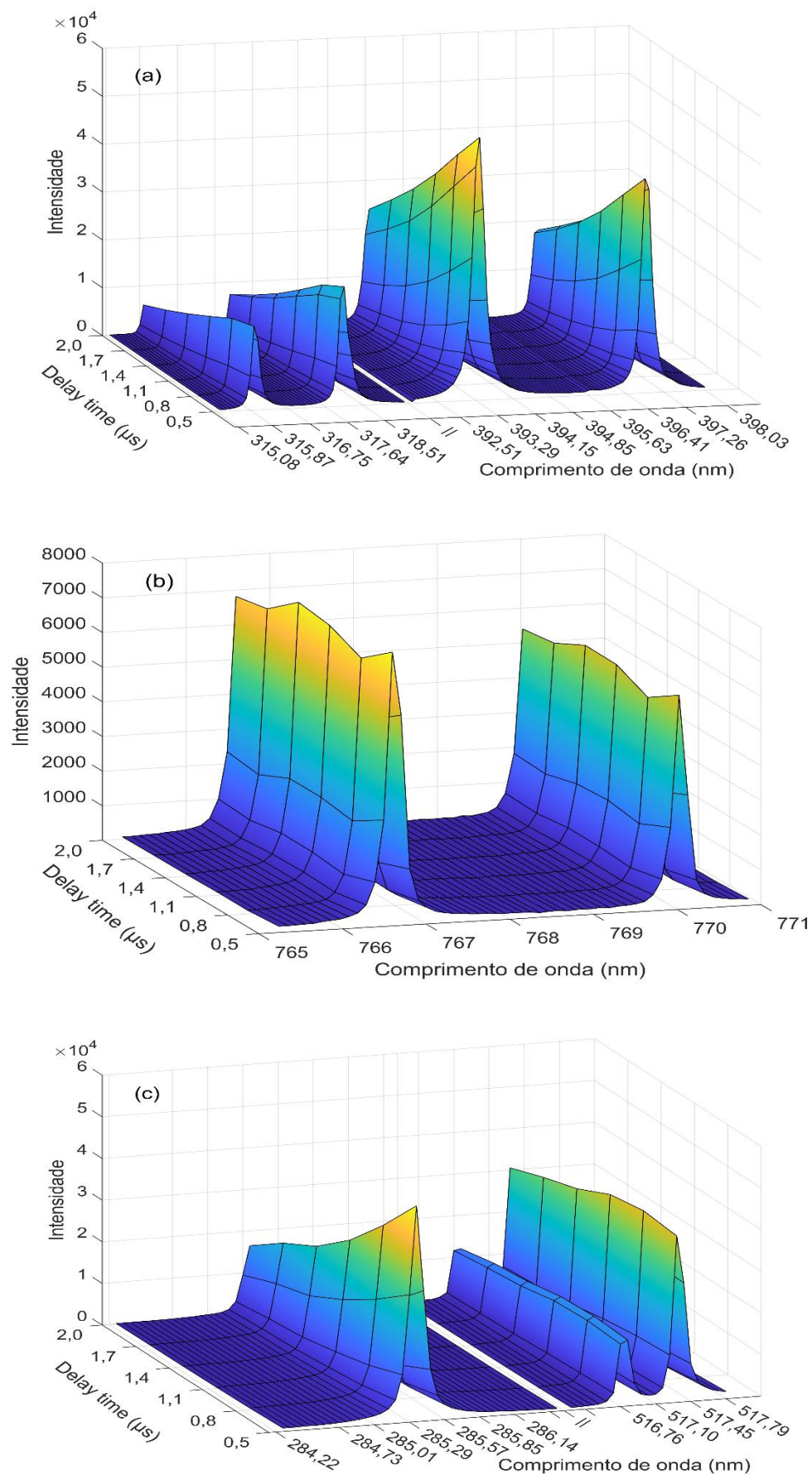


Figura 4.2.2 Perfis espectrais selecionados para (a) Ca, (b) K e (c) Mg.

Os dados multivias foram organizados adequadamente antes da modelagem pelos algoritmos MCR-ALS, PARAFAC e U-PLS/RBL. Para o MCR-ALS, as amostras foram ordenadas de tal forma em que fosse obtida uma matriz aumentada, o modo de aumento foi realizado no modo das linhas de emissão e foram aplicadas restrições de não negatividade em ambos os modos (*delay time* e linhas de emissão). Para o PARAFAC as amostras foram organizadas umas sobre as outras e também restrições de não negatividade foram aplicadas nos três modos (*delay time*, linhas de emissão e modo das amostras). Para o algoritmo U-PLS/RBL as matrizes foram desdobradas na forma de um vetor antes da modelagem. A Figura 4.2.3 apresenta de uma forma esquemática como as amostras foram organizadas em cada caso.

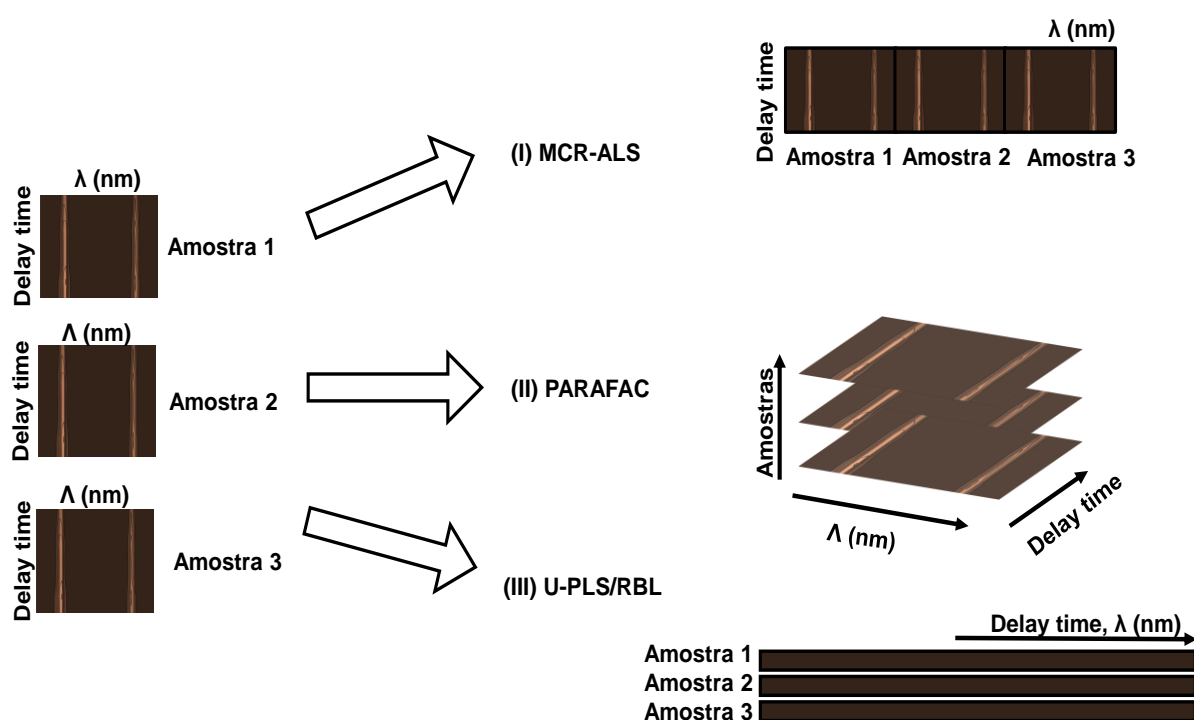


Figura 4.2.3 Descrição pictórica da organização de dados multivias para modelagem por MCR-ALS, PARAFAC e U-PLS / RBL.

4.3 PARTE 1: VALIDAÇÃO DA MODELAGEM DOS DADOS LIBS RESOLVIDOS NO TEMPO POR ALGORITMOS MULTIVIAS

O desempenho dos algoritmos multivias foi primeiramente avaliado a partir das próprias misturas dos sais e bases precursores dos analitos monitorados (Ca, K e Mg). Os resultados obtidos pelos algoritmos MCR-ALS, PARAFAC e U-PLS/RBL podem ser visualizados a partir das Tabelas 4.3.1, 4.3.2 e 4.3.3, respectivamente. Em geral, o algoritmo MCR-ALS obteve bons resultados para Ca, K e Mg, com acurácia dentro faixa considerada ideal para a maioria das amostras, entre 80 e 120% (veja Tabela 4.3.1). Essa faixa se encaixa nos níveis de concentração das amostras avaliadas e está de acordo com os métodos oficiais^{58,59}. A acurácia para o Ca variou entre 74-132%, para o K a faixa foi de 35 a 150% e para o Mg entre 47-125%. Além disso, foram obtidos valores aceitáveis de RMSEV (*Root Mean Square Error of Validation*, RMSEV) para todos os analitos monitorados. Vale ressaltar o número de fatores empregados pelo algoritmo MCR-ALS. Para o Ca, 2 fatores foram utilizados, sugerindo um possível interferente, enquanto que para o K e Mg apenas um fator foi necessário.

Ao analisar os resultados obtidos pelo PARAFAC (veja Tabela 4.3.2) observou-se uma queda no desempenho quando comparado com o MCR-ALS, com acurácia variando entre -59-203% para o Ca, 46-150% para o K e 52-136% para o Mg, bem como um aumento nos valores de RMSEV. Apesar disso, a maior parte das amostras obteve acurácia satisfatória para os três analitos. O número de fatores PARAFAC necessários foram 2 para cada analito.

Já o algoritmo U-PLS/RBL obteve melhores resultados em relação aos algoritmos MCR-ALS e PARAFAC. A acurácia para o Ca ficou entre 75-133%, para o K foi de 58% a 113% e para o Mg a faixa ficou entre 57-128%, com valores baixos de RMSEV para os três analitos. Além disso, não foi necessário a etapa RBL em nenhuma dos casos, isto é, nenhum potencial interferente foi detectado pelo algoritmo nesta etapa, ao contrário dos algoritmos MCR-ALS e PARAFAC, nos quais foram utilizados mais de um fator em alguns casos.

Estes resultados demonstram que o U-PLS/RBL foi mais coerente quando comparado com MCR-ALS e PARAFAC, pois além de obter melhores resultados nenhum possível interferente inesperado foi identificado nesta etapa, uma vez que a própria mistura dos sais/bases dos analitos monitorados foram utilizados tanto para calibrar quanto para validar.

Tabela 4.3.1 Valores de referência e preditos pelo algoritmo MCR-ALS para as amostras de validação.

Amostra	Concentração de Ca (% p p ⁻¹) (2)*			Concentração de K (% p p ⁻¹) (1)*			Concentração de Mg (% p p ⁻¹) (1)*		
	Referência	Predito	Acurácia	Referência	Predito	Acurácia	Referência	Predito	Acurácia
Val_01	13	14 ± 3	104	0,9	0,6 ± 0,2	65	2,0	1,1 ± 0,9	56
Val_02	20	15 ± 3	75	1,0	1,1 ± 0,2	109	2,0	0,9 ± 1,0	47
Val_03	13	17 ± 3	132	0,9	1,1 ± 0,2	125	6,3	7,8 ± 1,1	124
Val_04	19	14 ± 3	74	0,7	0,6 ± 0,2	85	6,3	5,6 ± 0,7	89
Val_05	13	15 ± 2	117	1,1	0,4 ± 0,3	39	2,0	1,1 ± 0,9	54
Val_06	19	23 ± 6	126	1,0	1,1 ± 0,2	113	1,9	1,9 ± 0,8	99
Val_07	13	11 ± 4	82	1,1	1,6 ± 0,5	150	6,4	7,6 ± 1,0	118
Val_08	20	17 ± 3	85	1,1	0,4 ± 0,3	35	6,4	6,9 ± 0,9	108
Val_09	16	20 ± 4	124	1,0	1,1 ± 0,2	120	4,2	4,5 ± 0,6	109
Val_10	14	15 ± 3	108	0,8	0,7 ± 0,2	88	3,6	4,3 ± 0,6	121
Val_11	16	16 ± 2	97	1,0	1,1 ± 0,2	106	4,4	5,4 ± 0,7	125
RMSEV		3			0,4			1,4	

*Número de fatores

Tabela 4.3.2 Valores de referência e preditos pelo algoritmo PARAFAC para as amostras de validação

Amostra	Concentração de Ca (% p p ⁻¹) (2)*			Concentração de K (% p p ⁻¹) (2)*			Concentração de Mg (% p p ⁻¹) (2)*		
	Referência	Predito	Acurácia	Referência	Predito	Acurácia	Referência	Predito	Acurácia
Val_01	13	17 ± 1	128	0,9	0,7 ± 0,1	80	2,0	1,3 ± 0,4	64
Val_02	20	33 ± 7	165	1,0	0,9 ± 0,1	91	2,0	2,2 ± 0,3	112
Val_03	13	-7 ± 10	-59	0,9	1,3 ± 0,2	150	6,3	3,3 ± 0,3	52
Val_04	19	16 ± 1	84	0,7	0,5 ± 0,1	65	6,3	5,3 ± 0,3	85
Val_05	13	14 ± 2	104	1,1	0,7 ± 0,1	59	2,0	1,7 ± 0,4	82
Val_06	19	38 ± 10	203	1,0	1,0 ± 0,1	101	1,9	2,6 ± 0,3	136
Val_07	13	1 ± 7	8	1,1	1,4 ± 0,2	136	6,4	6,8 ± 0,4	106
Val_08	20	23 ± 3	115	1,1	0,5 ± 0,1	46	6,4	5,0 ± 0,3	79
Val_09	16	19 ± 2	112	1,0	1,0 ± 0,1	107	4,2	4,5 ± 0,3	107
Val_10	14	26 ± 5	190	0,8	0,8 ± 0,1	93	3,6	4,3 ± 0,3	120
Val_11	16	18 ± 2	111	1,0	1,1 ± 0,1	106	4,4	4,9 ± 0,3	112
RMSEV		11			0,3			1,1	

*Número de fatores

Tabela 4.3.3 Valores de referência e preditos pelo algoritmo U-PLS/RBL para as amostras de validação.

Amostra	Concentração de Ca (% p p ⁻¹) (1) ^a				Concentração de K (% p p ⁻¹) (1) ^a				Concentração de Mg (% p p ⁻¹) (2) ^a			
	Referência	Predito	Acurácia	RBL ^b	Referência	Predito	Acurácia	RBL ^b	Referência	Predito	Acurácia	RBL ^b
Val_01	13	16 ± 1	120	0	0,9	0,7 ± 0,1	78	0	2,0	2,0 ± 0,3	101	0
Val_02	20	20 ± 2	101	0	1,0	0,9 ± 0,1	96	0	2,0	2,5 ± 0,3	128	0
Val_03	13	9 ± 1	75	0	0,9	0,9 ± 0,1	110	0	6,3	4,3 ± 0,3	69	0
Val_04	19	16 ± 1	81	0	0,7	0,8 ± 0,1	103	0	6,3	4,9 ± 0,3	79	0
Val_05	13	15 ± 1	114	0	1,1	0,7 ± 0,1	58	0	2,0	2,0 ± 0,3	98	0
Val_06	19	21 ± 2	114	0	1,0	1,0 ± 0,1	96	0	1,9	2,4 ± 0,3	124	0
Val_07	13	12 ± 1	88	0	1,1	1,2 ± 0,1	113	0	6,4	6,6 ± 0,4	103	0
Val_08	20	17 ± 2	87	0	1,1	0,7 ± 0,1	58	0	6,4	3,7 ± 0,4	57	0
Val_09	16	16 ± 2	98	0	1,0	1,0 ± 0,1	103	0	4,2	5,0 ± 0,3	119	0
Val_10	14	18 ± 2	133	0	0,8	0,8 ± 0,1	97	0	3,6	4,2 ± 0,3	117	0
Val_11	16	16 ± 2	99	0	1,0	0,9 ± 0,1	91	0	4,4	5,1 ± 0,3	118	0
RMSEV		3				0,2				1,2		

a Número de componentes

b Número de fatores RBL utilizados

4.4 PARTE 2: AVALIAÇÃO DOS ALGORITMOS MULTIVARIAS EM AMOSTRAS DE SUPLEMENTO MINERAL HUMANO

Na segunda parte, a capacidade preditiva dos algoritmos multivariados foi avaliada em amostras desconhecidas. Dessa forma, o conjunto de teste foi constituído pelas amostras de suplemento mineral, assim como as amostras enriquecidas com os sais e bases precursores dos analitos monitorados.

Ao analisar os resultados obtidos para amostras não enriquecidas (amostras de Suplemento Mineral, SM), observou-se que o MCR-ALS obteve acurácia satisfatória para amostra de suplemento de Ca (SM_03) e para amostra de Mg (SM_02), 91% e 106%, respectivamente. Já para as outras amostras de suplemento a acurácia ficou fora da faixa considerada ideal (Tabela 4.4.1).

Tabela 4.4.1 Valores de referência e preditos pelo algoritmo MCR-ALS para as amostras de suplemento mineral (SM).

Amostra	Ca (% p p-1) (2)*			K (% p p-1) (2)*			Mg (% p p-1) (2)*		
	Referência	Predito	Acurácia	Referência	Predito	Acurácia	Referência	Predito	Acurácia
SM_01	-	-	-	-	-	-	5,6	8,2 ± 1	146
SM_02	-	-	-	-	-	-	6,6	7,0 ± 1	106
SM_03	16	14 ± 5	91	-	-	-	-	-	-
SM_04	-	-	-	1,3	0,7 ± 0,3	51	-	-	-

*Número de fatores

Ao analisar a Tabela 4.4.2 é possível observar que o algoritmo não conseguiu prever satisfatoriamente as concentrações de Ca, K e Mg nas amostras de suplemento mineral enriquecidas (SME). Para o Ca, a acurácia ficou entre -12-114%, com apenas três amostras com acurácia dentro da faixa considerada ideal (SME_07, SME_10 e SME_12). Já para o K a acurácia variou entre 18-151%, com acurácia satisfatória apenas para duas amostras (SME_04 e SME_07), enquanto que para o Mg a faixa foi de 39% a 178%, com a maioria das amostras com acurácia insatisfatória.

Tabela 4.4.2 Valores de referência e preditos pelo algoritmo MCR-ALS para as amostras de suplemento mineral enriquecidas (SME).

Amostra	Concentração de Ca (% p p ⁻¹) (2)*			Concentração de K (% p p ⁻¹) (2)*			Concentração de Mg (% p p ⁻¹) (2)*		
	Referência	Predito	Acurácia	Referência	Predito	Acurácia	Referência	Predito	Acurácia
SME_01	13	18 ± 3	136	0,7	0,9 ± 0,1	129	3,2	5,7 ± 0,6	178
SME_02	15	12 ± 4	80	0,6	0,8 ± 0,1	142	4,7	5,6 ± 0,6	119
SME_03	11	10 ± 5	93	0,8	0,3 ± 0,4	42	4,7	3,8 ± 0,6	82
SME_04	13	11 ± 4	82	0,8	0,7 ± 0,2	93	6,5	4,4 ± 0,6	68
SME_05	11	10 ± 5	90	0,7	0,4 ± 0,3	57	2,0	1,4 ± 0,9	72
SME_06	11	8 ± 6	73	0,6	0,4 ± 0,3	67	7,4	5,7 ± 0,6	77
SME_07	18	24 ± 6	128	0,7	0,6 ± 0,2	82	1,3	1,8 ± 1,0	136
SME_08	13	7 ± 6	56	0,7	0,5 ± 0,3	67	4,1	2,8 ± 0,6	68
SME_09	16	9 ± 5	56	0,6	0,5 ± 0,3	71	2,8	3,7 ± 0,6	133
SME_10	13	13 ± 3	96	0,9	1,3 ± 0,3	151	1,3	0,5 ± 1,1	39
SME_11	13	8 ± 6	68	1,1	0,2 ± 0,4	18	4,3	2,5 ± 0,7	58
SME_12	15	17 ± 3	114	1,0	0,4 ± 0,3	43	2,8	3,1 ± 0,7	113

* Número de fatores

O desempenho insatisfatório obtido pelo algoritmo MCR-ALS para a maioria das amostras se reflete nas métricas de desempenho (veja Tabela 4.4.3). Os limites de detecção (*Limit of Detection*, LoD) e quantificação (*Limit of Quantification*, LoQ) ficaram acima dos valores previstos pelo modelo, indicando a incapacidade do algoritmo em prever a concentração dos analitos monitorados em amostras desconhecidas com confiança aceitável.

Tabela 4.4.3 Resumo das métricas de desempenho obtidas pelo algoritmo MCR-ALS.

Analito	Métricas de desempenho*		
	RMSEP (% p p ⁻¹)	LoD (% p p ⁻¹)	LoQ (% p p ⁻¹)
Ca	4	22	65
K	0,4	1,8	5,5
Mg	1,4	4,1	12

*Os valores de LoD e LoQ foram calculados com base na referência⁶⁰

Quanto ao algoritmo PARAFAC, observou-se um comportamento similar ao MCR-ALS para as amostras de suplemento mineral, apenas as amostras de suplemento de Mg (SM_02) teve uma boa acurácia (veja Tabela 4.4.4). Por outro lado, a maioria das amostras de suplemento mineral enriquecidas ficaram fora da faixa considerada ideal para o Ca (-76-120%), K (-191-611%) e Mg (61-152%) (Tabela 4.4.5). De acordo com esses resultados é notável que houve uma queda no desempenho quando comparado com os valores previstos por MCR-ALS, principalmente para o Ca e K.

Tabela 4.4.4 Valores de referência e preditos pelo algoritmo PARAFAC para as amostras de suplemento mineral (SM).

Amostra	Ca (% p p-1) (1)*			K (% p p-1) (2)*			Mg (% p p-1) (1)*		
	Referência	Predito	Acurácia	Referência	Predito	Acurácia	Referência	Predito	Acurácia
SM_01	-	-	-	-	-	-	5,6	8,1 ± 1	145
SM_02	-	-	-	-	-	-	6,6	7,2 ± 0,5	109
SM_03	16	12 ± 2	76	-	-	-	-	-	-
SM_04	-	-	-	1,3	2,1 ± 0,4	164	-	-	-

* Número de componentes

Tabela 4.4.5 Valores de referência e preditos pelo algoritmo PARAFAC para as amostras de suplemento mineral enriquecidas (SME).

Amostra	Concentração de Ca (% p p ⁻¹) (1)*			Concentração de K (% p p ⁻¹) (2)*			Concentração de Mg (% p p ⁻¹) (1)*		
	Referência	Predito	Acurácia	Referência	Predito	Acurácia	Referência	Predito	Acurácia
SME_01	13	2 ± 6	16	0,7	2,9 ± 0,7	416	3,2	4,9 ± 0,3	152
SME_02	15	-8 ± 10	-50	0,6	3,5 ± 0,9	611	4,7	3,6 ± 0,3	76
SME_03	11	0,1 ± 7	1	0,8	1,2 ± 0,1	149	4,7	5,3 ± 0,3	113
SME_04	13	1 ± 7	5	0,8	2,1 ± 0,4	281	6,5	4,7 ± 0,3	73
SME_05	11	0,3 ± 7	3	0,7	1,0 ± 0,1	143	2,0	1,7 ± 0,4	85
SME_06	11	-8 ± 11	-76	0,6	2,2 ± 0,5	370	7,4	5,2 ± 0,3	70
SME_07	18	21 ± 3	114	0,7	2,6 ± 0,6	366	1,3	0,9 ± 0,5	68
SME_08	13	0 ± 7	0	0,7	1,6 ± 0,3	229	4,1	3,6 ± 0,3	86
SME_09	16	6 ± 5	36	0,6	2,1 ± 0,4	332	2,8	3,3 ± 0,3	119
SME_10	13	16 ± 1	120	0,9	-1,7 ± 0,9	-191	1,3	0,8 ± 0,5	61
SME_11	13	-1 ± 8	-9	1,1	-1,2 ± 0,7	-109	4,3	3,1 ± 0,3	73
SME_12	15	14 ± 2	95	1,0	-0,6 ± 0,5	-65	2,8	3,2 ± 0,3	116

*Número de componentes

Em relação as métricas de desempenho é evidente que o modelo não está adequado para determinar os analitos com confiança aceitável. Para os três analitos monitoriados foram obtidos valores altos de RMSEP (*Root Mean Square Error of Prediction*), LoD e LoQ, reforçando que mesmo que o modelo obtenha acurácia satisfatória para algumas amostras não é confiável considerar tal resultado (Tabela 4.4.6).

Tabela 4.4.6 Resumo das métricas de desempenho obtidas pelo algoritmo PARAFAC.

Analito	Métricas de desempenho*		
	RMSEP (% p p ⁻¹)	LoD (% p p ⁻¹)	LoQ (% p p ⁻¹)
Ca	11	24	71
K	1,6	1,0	3,0
Mg	1,2	2,0	6,0

*Os valores de LoD e LoQ foram calculados com base na referência ⁶⁰

Por outro lado, o algoritmo U-PLS/RBL obteve um ótimo desempenho para as amostras de suplemento mineral, conseguindo prever com acurácia satisfatória em todas as amostras estudadas (veja Tabela 4.4.7).

Tabela 4.4.7 Valores de referência e preditos pelo algoritmo U-PLS/RBL para as amostras de suplemento mineral (SM).

Amostra	Ca (% p p-1) (1) ^b			K (% p p-1) (1) ^b			Mg (% p p-1) (2) ^b		
	Referência	Predito	Acurácia	Referência	Predito	Acurácia	Referência	Predito	Acurácia
SM_01 (1) ^a	-	-	-	-	-	-	5,6	7,6±1	135
SM_02 (0) ^a	-	-	-	-	-	-	6,6	6,3±1	95
SM_03 (0) ^a	16	14±1	92	-	-	-	-	-	-
SM_04 (1) ^a	-	-	-	1,3	1,1±0,1	87	-	-	-

a Número de componentes RBL

b Número de componentes

Esse bom desempenho se repetiu para Ca e K nas amostras de suplemento mineral enriquecidas, com acurácia dentro da faixa ideal para a maior parte das amostras, para o Ca a acurácia ficou entre 76-114%, enquanto para o K a faixa foi de 56-129%. No caso do Mg, o U-PLS/RBL obteve acurácia entre 40-132%, com acurácia satisfatória para metade das amostras (veja Tabela 4.4.8).

Tabela 4.4.8 Valores de referência e preditos pelo algoritmo U-PLS/RBL para as amostras de suplemento mineral enriquecidas (SME).

Amostra	Concentração de Ca (% p p ⁻¹) (1) ^a				Concentração de K (% p p ⁻¹) (1) ^a				Concentração de Mg (% p p ⁻¹) (2) ^a			
	Referência	Predito	Acurácia	RBL ^b	Referência	Predito	Acurácia	RBL ^b	Referência	Predito	Acurácia	RBL ^b
SME_01	13	11 ± 1	88	0	0,7	0,7 ± 0,1	96	0	3,2	4,1 ± 0,5	126	0
SME_02	15	13 ± 2	88	1	0,6	0,7 ± 0,1	129	0	4,7	4,8 ± 0,5	101	1
SME_03	11	11 ± 1	100	0	0,8	0,7 ± 0,1	87	2	4,7	3,8 ± 0,4	81	1
SME_04	13	11 ± 1	84	0	0,8	0,8 ± 0,1	108	2	6,5	2,6 ± 0,6	40	0
SME_05	11	11 ± 1	96	0	0,7	0,4 ± 0,1	56	0	2,0	1,7 ± 0,4	86	0
SME_06	11	9 ± 1	81	0	0,6	0,6 ± 0,1	92	0	7,4	3,4 ± 0,5	46	0
SME_07	18	16 ± 2	88	0	0,7	0,6 ± 0,1	90	0	1,3	1,7 ± 0,5	132	0
SME_08	13	11 ± 1	82	0	0,7	0,6 ± 0,1	90	2	4,1	2,4 ± 0,5	57	1
SME_09	16	12 ± 1	76	0	0,6	0,5 ± 0,1	85	0	2,8	3,1 ± 0,4	112	1
SME_10	13	15 ± 1	114	0	0,9	0,7 ± 0,1	79	0	1,3	0,7 ± 0,6	51	1
SME_11	13	11 ± 1	84	0	1,1	0,7 ± 0,1	60	0	4,3	2,1 ± 0,5	50	1
SME_12	15	14 ± 1	98	0	1,0	0,8 ± 0,1	86	2	2,8	1,9 ± 0,7	66	1

a Número de componentes

b Número de componentes RBL utilizados

Com relação as métricas de desempenho, é evidente que o algoritmo U-PLS/RBL se ajustou muito bem aos dados LIBS resolvidos no tempo, com baixos valores de RMSEP, LoD e LoQ. No caso do Mg, algumas amostras ficaram abaixo do LOQ (Tabela 4.4.9). Apesar disso, o modelo conseguiu prever com confiança satisfatória a concentração de Mg nas duas amostras de suplemento mineral.

Tabela 4.4.9 Resumo das métricas de desempenho obtidas pelo algoritmo U-PLS/RBL.

Analito	Métricas de desempenho*		
	RMSEP (% p p ⁻¹)	LoD (% p p ⁻¹)	LoQ (% p p ⁻¹)
Ca	2,0	0,4	1,2
K	0,2	0,1	0,2
Mg	1,7	1,0	3,0

*Os valores de LoD e LoQ foram calculados com base na referência ⁶⁰

É importante enfatizar que em alguns casos para o K e Mg foi necessário aplicar a etapa RBL para remover possíveis interferentes que o modelo detectou. Podemos destacar, por exemplo, as amostras SM_01 e SM_04, nas quais foi necessário 1 componente RBL em cada caso. A Figura 4.4.1 apresenta o perfil interferente recuperado pelo modelo nessas duas amostras, onde é possível observar que o delay time foi fundamental para diferenciar o analito do interferente. Para o Mg, amostra MS 01, o sinal do analito segue um decaimento contínuo entre delay time 0,5 e 2,0 μ s, enquanto que o sinal do interferente decai até 1,1 μ s e ocorre um pequeno aumento do sinal até o delay 1,4 antes de voltar a diminuir o sinal. No entanto, ao analisar o modo das linhas de emissão, o perfil recuperado do interferente não apresenta um comportamento espectral bem definido (veja Figura 4.4.1 a-b). O mesmo foi observado para o K, amostra MS 04, o perfil do analito e do interferente é diferente no modo do delay time, já no modo das linhas de emissão o perfil do interferente se assemelha com o perfil do K (veja Figura 4.4.1 c-d). Porém, esses potenciais interferentes precisam ser avaliados com cuidado, pois vários fenômenos ocorrem entre as espécies durante a formação e decaimento do plasma.

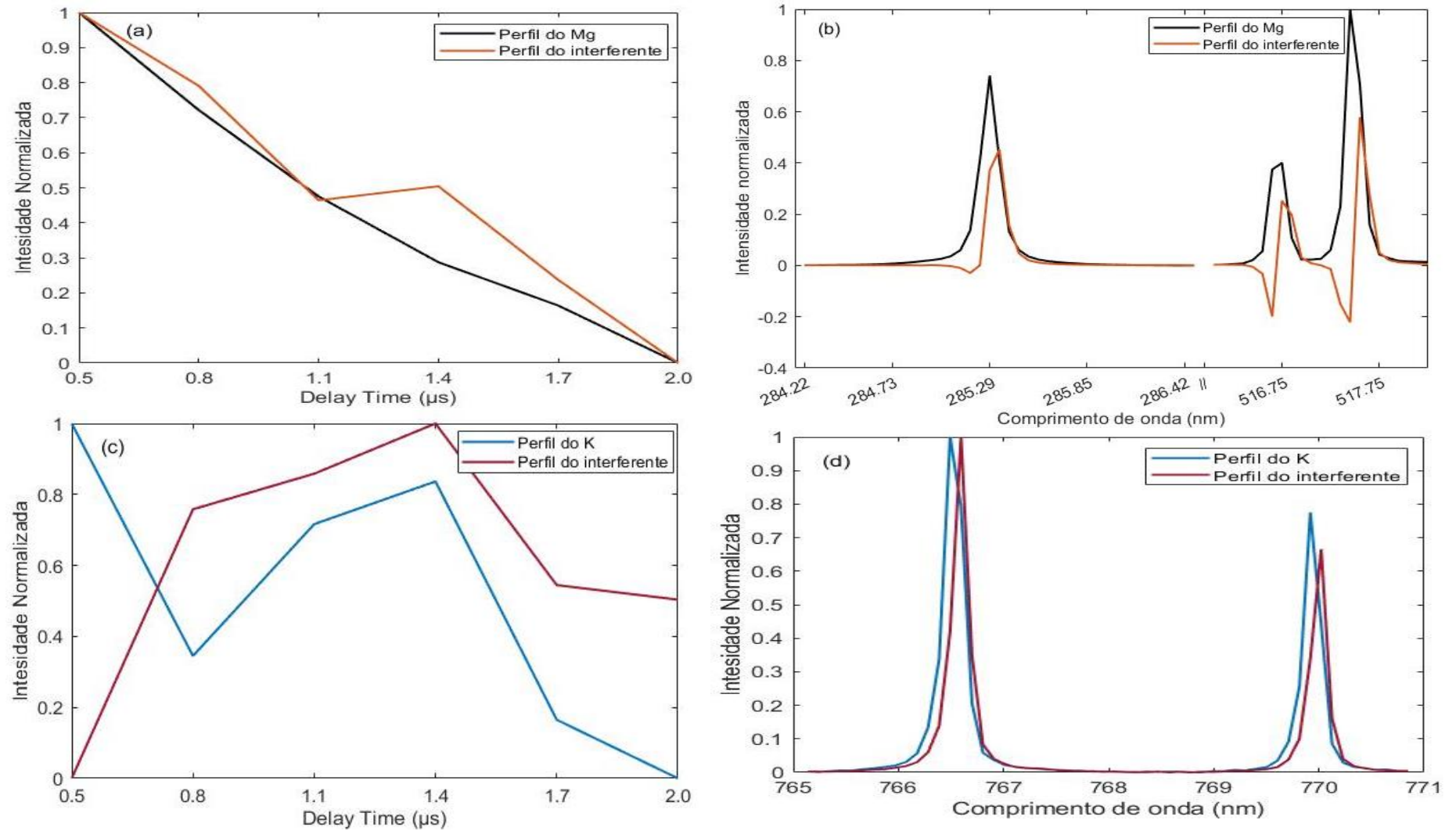


Figura 4.4.1 Comparação dos perfis do analito puro e potenciais interferentes recuperados pelo algoritmo U-PLS / RBL na amostra de suplemento mineral de Mg (MS 01) nos modos (a) tempo de atraso e (b) linhas de emissão, bem como na amostra mineral de suplemento de K.

Estes resultados demonstram que os espectros LIBS resolvidos no tempo, associado ao algoritmo U-PLS/RBL, podem ser uma alternativa promissora para contornar as interferências não modeladas na etapa de calibração e, assim, alcançar a vantagem de segunda ordem. Por outro lado, os algoritmos MCR-ALS e PARAFAC não se ajustaram muito bem aos dados, com valores previstos por ambos os modelos, na maior parte das amostras, abaixo ou próximo do LoQ, demonstrando que o MCR-ALS e o PARAFAC não são capazes de prever com confiança aceitável o analito de interesse em amostras desconhecidas.

4.5 PARTE 3: AVALIAÇÃO DOS ALGORITMOS MULTIVARIAS COM A INCLUSÃO DE MAIS AMOSTRAS NO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO

Além da avaliação realizada na Parte 2 deste trabalho, também foi feita uma análise da capacidade preditiva dos algoritmos multivariados quando mais amostras são utilizadas para construir os modelos. Dessa forma, as amostras dos conjuntos de calibração e validação, preparadas na Parte 1 deste trabalho (6 amostras do conjunto de calibração e 11 amostras de validação), foram utilizadas para calibrar os algoritmos MCR-ALS, PARAFAC e U-PLS/RBL.

A Tabela 4.5.1 apresenta um resumo das métricas de desempenho dos algoritmos estudados antes e após a inclusão de mais amostras no conjunto de calibração. De acordo com a tabela apresentada, é notável que para o Ca os resultados obtidos por MCR-ALS e PARAFAC melhoraram significativamente, mas mesmo assim os valores de LoD e LoQ ainda estão acima dos valores previstos por ambos os modelos em todas as amostras. Em relação ao U-PLS/RBL observou-se uma pequena queda no desempenho quando mais amostras foram incluídas no conjunto de calibração. Quanto aos resultados obtidos para o K não foi observado nenhuma melhora significativa para nenhum dos modelos estudados, com mudanças discretas nos valores de RMSEP, LoD e LoQ. Já em relação ao Mg uma certa melhora foi observada para todos os algoritmos apresentados, destacando-se o U-PLS/RBL, no qual obteve baixos valores de LoD e LoQ.

Tabela 4.5.1 Resumo das métricas de desempenho obtidos pelos algoritmos MCR-ALS, PARAFAC e U-PLS/RBL antes e após a inclusão de mais amostras no conjunto de calibração.

Métricas de desempenho	Ca			K			Mg		
	MCR-ALS (2) ^c	PARAFAC (1) ^c	U-PLS/RBL (1) ^c	MCR-ALS (2) ^c	PARAFAC (2) ^c	U-PLS/RBL (1) ^c	MCR-ALS (1) ^c	PARAFAC (2) ^c	U-PLS/RBL (2) ^c
RMSEP (% p p ⁻¹) ^a	4	11	2	0,4	1,6	0,2	1,4	1,2	1,7
LOD (% p p ⁻¹) ^a	22	24	0,4	1,8	1,0	0,1	4	2,0	1,0
LOQ (% p p ⁻¹) ^a	65	71	1,2	5,5	3,0	0,2	12	6,0	3,0
RMSEP (% p p ⁻¹) ^b	4	5	3	1	1,6	0,3	1,4	1,6	1,3
LOD (% p p ⁻¹) ^b	18	12	0,5	2,7	0,8	0,5	2,7	1,1	0,2
LOQ (% p p ⁻¹) ^b	54	37	1,5	8,3	2,5	1,5	8,2	3,2	0,7

a Resultados obtidos com 6 amostras no conjunto de calibração

b Resultados obtidos com 17 amostras no conjunto de calibração

c Número de componentes

De acordo com esses resultados é evidente que para alguns analitos houve uma melhora significativa no desempenho dos algoritmos multivias, principalmente para o MCR-ALS e PARAFAC. No entanto, mesmo com a inclusão de mais amostras no conjunto de calibração, o algoritmo que melhor se adequou aos dados LIBS resolvidos no tempo foi o U-PLS/RBL, apresentando baixos valores de RMSEP, LoD e LoQ tanto na Parte 2 quanto na Parte 3 deste trabalho.

4.6 PARTE 4: CALIBRAÇÃO UNIVARIADA

Modelos univariados foram construídos para cada analito a fim de comparar os resultados com a calibração multivias. Dessa forma, foram selecionadas as linhas II 393,36 para Ca, I 766,49 para K e I 517,27 para Mg e o *Delay time* foi fixado em 1,4 μ s. Em seguida, doze (12) modos de normalização foram avaliados e calculados usando a rotina "libs_treat": (1) média dos espectros; (2) sinal normalizado pela norma individual e então calculado a média; (3) normalizado pela área e então calculado a média; (4) normalização do sinal pelo máximo e então calculado a média; (5) soma; (6) sinal somado após normalização pela norma individual; (7) sinal normalizado pela área e então somado; (8) normalização do sinal pelo máximo e depois somado; (9) sinal calculado após normalização por C I 193,09 nm, (10) sinal somado após normalização por C I 193,09 nm; (11) média do sinal após normalização por C I 247,85 nm; (12) sinal somado após normalização por C I 247,85 nm. Os melhores resultados foram escolhidos com base no erro padrão de calibração (*Standard Error of Calibration*, SEC). A rotina (libs par2) foi utilizada para calcular a área do sinal para a região da linha de emissão de interesse⁶¹.

Os melhores resultados foram obtidos com a Normalização 3 (normalizada por área e então calculada a média) para Ca, Normalização 6 (soma do sinal após normalização por norma individual) para K e normalização 11 (sinal médio após normalização por CI 247,85 nm) para Mg. Os resultados podem ser vistos na Figura 4.6.1. Para Ca, a acurácia variou de 76% a 186% e algumas amostras de SMS ficaram dentro da faixa aceitável, por outro lado o modelo não foi capaz de obter uma boa previsão para a amostra de suplemento de Ca (SM_03). Em relação ao K, a maioria das amostras não apresentou boas previsões, incluindo a amostra de suplemento mineral. Quanto ao Mg a precisão variou entre 31-143%, e a maioria das amostras estava fora da faixa considerada ideal.

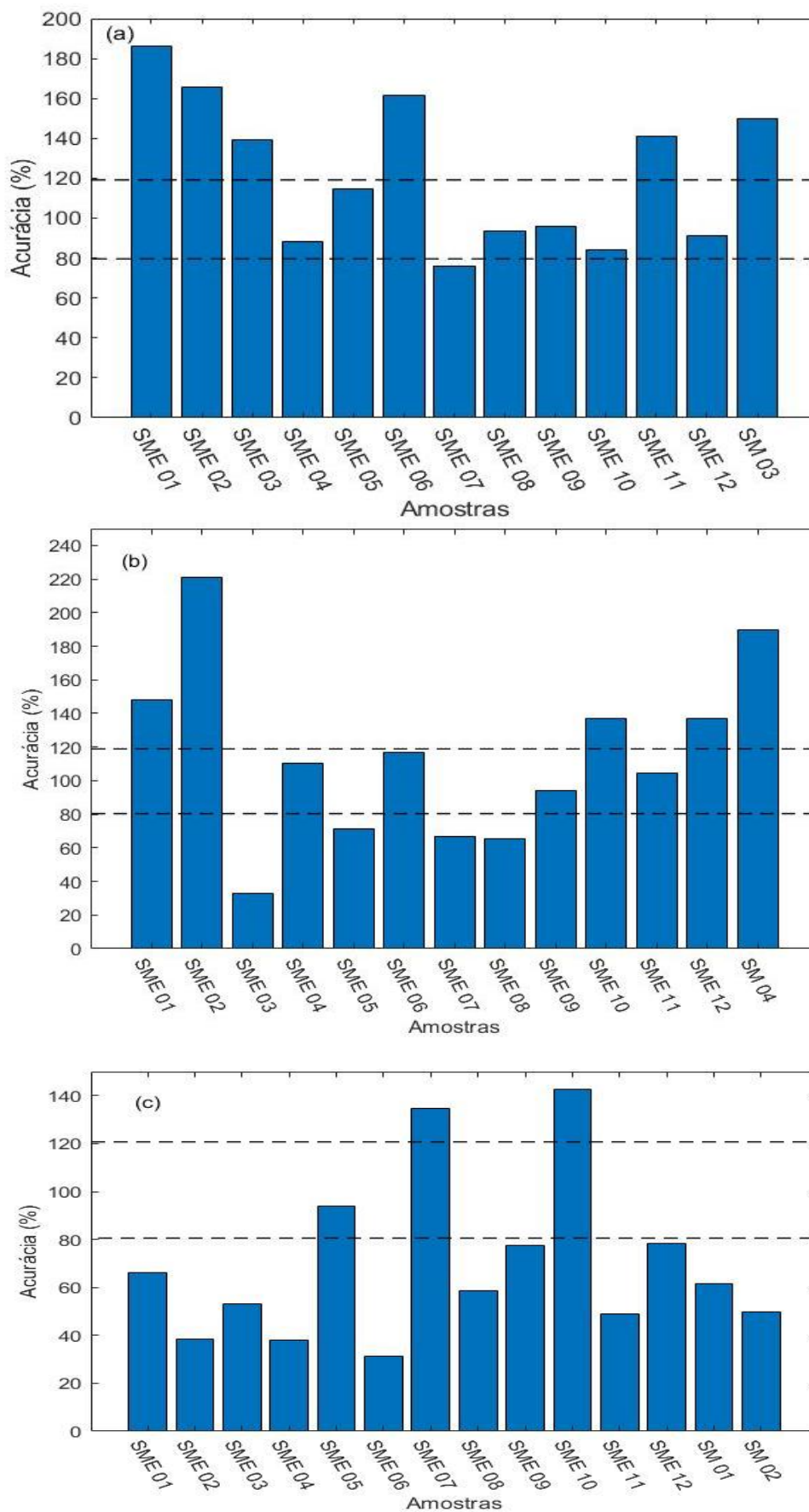


Figura 4.6.1 Acurácia (%) para (a) Ca, (b) K e (c) Mg para Amostras de suplemento mineral enriquecidas (SME) e suplemento mineral humano (SM).

Comparando os resultados obtidos na calibração univariada convencional com aquelas do algoritmo U-PLS/RBL, estratégia que mostrou o melhor desempenho, é notável que os dados se ajustaram melhor ao algoritmo multivariadas, conforme esperado, uma vez que a calibração univariada requer seletividade total para obter resultados consistentes. Assim, esses resultados demonstram que os espectros LIBS resolvidos no tempo, associado ao algoritmo U-PLS/RBL, podem ser uma alternativa promissora para contornar as interferências não modeladas na etapa de calibração e, assim, atingir a "vantagem de segunda ordem".

CAPÍTULO 5

Conclusão e perspectivas

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Neste estudo, uma nova abordagem foi apresentada usando os algoritmos MCR-ALS, PARAFAC e U-PLS/RBL na modelagem dos dados LIBS ao longo do tempo, objetivando alcançar a “vantagem de segunda ordem” e assim contornar os problemas que tanto afetam a análise quantitativa em LIBS, como os efeitos de matriz e interferências espectrais.

Dentre os algoritmos avaliados apenas o U-PLS/RBL apresentou resultados satisfatórios tanto na etapa de validação quanto na etapa de teste, quando amostras de suplemento mineral enriquecidas e não enriquecidas foram utilizadas para avaliar a capacidade preditiva dos modelos, obtendo baixos valores de RMSEP, LoD e LoQ. Por outro lado, os algoritmos MCR-ALS e PARAFAC não alcançaram um bom desempenho quando foram testados nas amostras de teste. Uma possível justificativa para o baixo desempenho destes algoritmos seria devido a alguns processos não lineares que ocorrem durante a evolução temporal do plasma e, portanto, tais algoritmos podem ser mais sensíveis a esses problemas, enquanto que o U-PLS/RBL se mostra mais robusto a estes fenômenos e assim se ajusta melhor aos dados.

O uso de algoritmos multivias em dados LIBS pode ser entendido como uma alternativa atraente em análises quantitativas, uma vez que esses métodos permitem o uso de sais com os elementos de interesse para construir os modelos e prever a concentração de analitos em amostras reais. Essa possibilidade pode minimizar ou resolver problemas associados à quantificação por LIBS, como contornar a matriz e os efeitos espectrais pela vantagem de segunda ordem.

Apesar do ótimo desempenho obtido pelo algoritmo U-PLS/RBL, estudos mais aprofundados e com diferentes tipos de amostras devem ser realizados para entender as propriedades dos dados LIBS resolvidos no tempo e, assim, melhorar o desempenho de algoritmos multivias em dados LIBS.

CAPÍTULO 6

Referências bibliográficas

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kamili, A.; Faye, B.; Mbesse Kongbonga, Y. G.; Bengoumi, M.; Tligui, N. S.; Ghalila, H. ;*Biol. Trace Elem. Res.* **2020**, 472.
2. Cherni, I.; Hamzaoui, S.; Jaïdane, N. ;*J. Appl. Spectrosc.* **2020**, 87, 758.
3. Stefas, D.; Gyftokostas, N.; Couris, S. ;*Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **2020**, 172, 105969.
4. Fahad, M.; Ali, S.; Shahzad, A.; Shah, K. H. ;*Laser Phys.* **2020**, 30.
5. Marín Roldán, A.; Dwivedi, V.; Yravedra Sainz de los Terreros, J.; Veis, P. ;*Optik (Stuttg).* **2020**, 218, 164992.
6. Hussain Shah, S. K.; Iqbal, J.; Ahmad, P.; Khandaker, M. U.; Haq, S.; Naeem, M. ;*Radiat. Phys. Chem.* **2020**, 170, 108666.
7. Costa, V.; Augusto, A.; Castro, J.; Machado, R.; Andrade, D.; Babos, D.; Sperança, M.; Gamela, R.; Pereira-Filho, E. ;*Quim. Nova* **2019**, 42, 527.
8. Fernandes Andrade, D.; Pereira-Filho, E. R.; Amarasiriwardena, D. ;*Appl. Spectrosc. Rev.* **2020**, 0, 1.
9. Costa, V. C.; dos Santos Ferreira, S.; Santos, L. N.; Sperança, M. A.; da Silva, C. S.; Sodr e, G. A.; Pereira-Filho, E. R. ;*J. Appl. Spectrosc.* **2020**, 87, 378.
10. Morita, M. M.; Zilio, L.; Bilmes, G. M. ;*J. Archaeol. Sci. Reports* **2020**, 33, 102575.
11. Ruan, F.; Hou, L.; Zhang, T.; Li, H. ;*Analyst* **2021**, 146, 1023.
12. Costa, V.; Babos, D.; Castro, J.; Andrade, D.; Gamela, R.; Machado, R.; Sperança, M.; Araújo, A.; Garcia, J.; Pereira-Filho, E. ;*J. Braz. Chem. Soc.* **2021**, 00, 1.
13. Wu, H. L.; Li, Y.; Kang, C.; Yu, R. Q. *Multiway Calibration Based on Alternating Multilinear Decomposition*; 1st ed.; Elsevier B.V., 2015; Vol. 29.
14. Parastar, H. *Multivariate Curve Resolution Methods for Qualitative and Quantitative Analysis in Analytical Chemistry*; 1st ed.; Elsevier B.V., 2015; Vol. 29.
15. Ortiz, M. C.; Sarabia, L. A.; Sánchez, M. S.; Herrero, A.; Sanllorente, S.; Reguera, C. *Usefulness of PARAFAC for the Quantification, Identification, and Description of Analytical Data*; 2015; Vol. 29.
16. Olivieri, A. C.; Escandar, G. M.; Goicoechea, H. C.; de la Peña, A. M. *Unfolded and Multiway Partial Least-Squares with Residual Multilinearization: Applications*; 2015; Vol. 29.
17. El Haddad, J.; de Lima Filho, E. S.; Vanier, F.; Harhira, A.; Padioleau, C.; Sabsabi, M.; Wilkie, G.; Blouin, A. ;*Miner. Eng.* **2019**, 134, 281.
18. Castro, J. P.; Pereira-Filho, E. R.; Bro, R. ;*J. Anal. At. Spectrom.* **2020**, 35, 1115.
19. Sezer, B.; Bilge, G.; Boyaci, I. H. ;*TrAC - Trends Anal. Chem.* **2017**, 97, 345.
20. Aberkane, S. M.; Safi, A.; Botto, A.; Campanella, B.; Legnaioli, S.; Poggialini, F.; Raneri, S.; Rezaei, F.; Palleschi, V. ;*Appl. Sci.* **2020**, 10.
21. Babos, D. V.; Cruz-Conesa, A.; Pereira-Filho, E. R.; Anzano, J. M. ;*J. Hazard. Mater.* **2020**, 399, 122831.
22. Zhang, B.; Ling, P.; Sha, W.; Jiang, Y.; Cui, Z. ;*Sensors (Switzerland)* **2019**, 19.
23. Zivkovic, S.; Savovic, J.; Kuzmanovic, M.; Petrovic, J.; Momcilovic, M. ;*Microchem. J.* **2018**, 137, 410.
24. Augusto, A. S.; Castro, J. P.; Sperança, M. A.; Pereira-Filho, E. R. ;*J. Braz. Chem. Soc.* **2019**, 30, 804.

25. Babos, D. V.; Barros, A. I.; Nóbrega, J. A.; Pereira-Filho, E. R. ; *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **2019**, *155*, 90.
26. Hao, Z. Q.; Liu, L.; Zhou, R.; Ma, Y. W.; Li, X. Y.; Guo, L. B.; Lu, Y. F.; Zeng, X. Y. ; *Opt. Express* **2018**, *26*, 22926.
27. Nunes, L. C.; Rocha, F. R. P.; Krug, F. J. ; *J. Anal. At. Spectrom.* **2019**, *34*, 2314.
28. Costa, V. C.; de Mello, M. L.; Babos, D. V.; Castro, J. P.; Pereira-Filho, E. R. ; *Microchem. J.* **2020**, *159*.
29. Yuan, R.; Tang, Y.; Zhu, Z.; Hao, Z.; Li, J.; Yu, H.; Yu, Y.; Guo, L.; Zeng, X.; Lu, Y. ; *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1064*, 11.
30. Lu, Y.; Guo, H.; Shen, T.; Wang, W.; He, Y.; Liu, F. ; *Anal. Methods* **2019**, *11*, 6124.
31. Zhang, Y.; Xiong, Z.; Ma, Y.; Zhu, C.; Zhou, R.; Li, X.; Li, Q.; Zeng, Q. ; *Anal. Methods* **2020**, *12*, 3530.
32. Gamela, R. R.; Costa, V. C.; Sperança, M. A.; Pereira-Filho, E. R. ; *Food Res. Int.* **2020**, *132*, 109037.
33. Kokot, S.; Grigg, M.; Panayiotou, H.; Phuong, T. D. ; *Electroanalysis* **1998**, *10*, 1081.
34. Dyar, M. D.; Ytsma, C. R. ; *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **2021**, *177*, 106073.
35. Andrade, D. F.; de Almeida, E.; de Carvalho, H. W. P.; Pereira-Filho, E. R.; Amarasiriwardena, D. ; *Talanta* **2021**, *225*, 122025.
36. Zaytsev, S. M.; Krylov, I. N.; Popov, A. M.; Zorov, N. B.; Labutin, T. A. ; *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **2018**, *140*, 65.
37. Singh, M.; Sarkar, A. ; *J. Appl. Spectrosc.* **2018**, *85*, 962.
38. Sperança, M. A.; Andrade, D. F.; Castro, J. P.; Pereira-Filho, E. R. ; *Opt. Laser Technol.* **2019**, *109*, 648.
39. Rifai, K.; Özcan, L.; Doucet, F.; Azami, N.; Deshays, L.; Lebbardi, A.; Vidal, F. ; *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **2020**, *163*, 105735.
40. Olivieri, A. C.; Escandar, G. M. ; *Pract. Three-w. Calibration* **2014**, *1*.
41. Tauler, R. ; *J. Chemom.* **2020**, *1*.
42. Guizellini, F. C.; Marcheafave, G. G.; Rakocevic, M.; Bruns, R. E.; Scarminio, I. S.; Soares, P. K. ; *Food Res. Int.* **2018**, *113*, 9.
43. Wang, T.; Liu, Q.; Long, W. J.; Chen, A. Q.; Wu, H. L.; Yu, R. Q. ; *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2021**, *246*, 118988.
44. Tauler, R.; de Juan, A. *Multivariate Curve Resolution for Quantitative Analysis*; 2015; Vol. 29.
45. Galindo-Luján, R.; Pont, L.; Sanz-Nebot, V.; Benavente, F. ; *Food Chem.* **2021**, *341*, 128207.
46. Badaró, A. T.; Amigo, J. M.; Blasco, J.; Aleixos, N.; Ferreira, A. R.; Clerici, M. T. P. S.; Barbin, D. F. ; *Food Chem.* **2021**, *343*.
47. Hugelier, S.; Van den Eynde, R.; Vandenberg, W.; Dedecker, P. ; *Talanta* **2021**, *226*, 122117.
48. Castro, R. C.; Ribeiro, D. S. M.; Santos, J. L. M.; Páscoa, R. N. M. J. ; *Food Control* **2021**, *123*.
49. Metzinger, A.; Rajkó, R.; Galbács, G. ; *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **2014**, *94–95*, 48.
50. El Rakwe, M.; Rutledge, D. N.; Moutiers, G.; Sirven, J. B. ; *J. Chemom.* **2017**, *31*, 1.
51. Martí, R. B.; Baldrich, J. F. ; *Data Handl. Sci. Technol.* **2015**, *29*, 7.
52. Luo, Y.; Zhang, Y.; Lang, M.; Guo, X.; Xia, T.; Wang, T.; Jia, H.; Zhu, L. ; *Front.*

- Environ. Sci. Eng.* **2021**, 15.
53. Mengistu, D.; Heistad, A.; Coutris, C. ;*Sci. Total Environ.* **2021**, 769, 144785.
 54. Olivieri, A. C.; Escandar, G. M.; Goicoechea, H. C.; de la Peña, A. M. ;*Data Handl. Sci. Technol.* **2015**, 29, 347.
 55. Anzardi, M. B.; Arancibia, J. A.; Olivieri, A. C. ;*Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2020**, 199, 103972.
 56. Zhu, W.; Zhao, N. J.; Yang, R. F.; Chen, Y. N.; Chen, X. W.; Yin, G. F.; Liu, J. G.; Liu, W. Q. ;*Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2020**, 239, 118511.
 57. Palomino-Vasco, M.; Mora-Diez, N. M.; Rodríguez-Cáceres, M. I.; Acedo-Valenzuela, M. I.; Alcaraz, M. R.; Goicoechea, H. C. ;*Anal. Chim. Acta* **2021**, 1141, 63.
 58. Vishalli; Kaur, R.; Raina, K. K.; Dharamvir, K. ;*AIP Conf. Proc.* **2015**, 1661, 1.
 59. Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R. ;*Pure Appl. Chem.* **2002**, 74, 835.
 60. Olivieri, A. C. ;*Chem. Rev.* **2014**, 114, 5358.
 61. Costa, V. C.; Castro, J. P.; Andrade, D. F.; Victor Babos, D.; Garcia, J. A.; Sperança, M. A.; Catelani, T. A.; Pereira-Filho, E. R. ;*TrAC - Trends Anal. Chem.* **2018**, 108, 65.