



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
COORDENAÇÃO DO CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

ALLAN JUN BRACIFORTE MAKYAMA

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ELETRODO ÍON SELETIVO PARA DETERMINAÇÃO
DE FLUORETOS EM ÁGUA POTÁVEL**

TOLEDO
2019

ALLAN JUN BRACIFORTE MAKYAMA

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ELETRODO ÍON SELETIVO PARA DETERMINAÇÃO
DE FLUORETOS EM ÁGUA POTÁVEL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos (COPEQ) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientador (a): Viviane da Silva Lobo
Coorientador (a): Jacqueline Ferandin Honorio

TOLEDO
2019

ALLAN JUN BRACIFORTE MAKYAMA

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ELETRODO ÍON SELETIVO PARA DETERMINAÇÃO
DE FLUORETOS EM ÁGUA POTÁVEL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR, câmpus Toledo, como parte das exigências para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Aprovado em ____, de _____ de 20__.

Banca examinadora

Prof^a Dr^a Jacqueline Ferandin Honorio
UTFPR, câmpus Toledo
Coorientador

Prof^a Ms. Daieni Alves Vieira Amado
UTFPR, câmpus Toledo
Avaliador

Prof Dr Clayton Antunes Martin
UTFPR, câmpus Toledo
Avaliador

OBS: A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso de Tecnologia em Processos Químicos.

RESUMO

Makyama, Allan. Validação de método eletrodo íon seletivo para determinação de fluoretos em água potável. 2019. Tecnologia de processos químicos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2019.

O presente trabalho teve como objetivo a otimização e validação de um método analítico de determinação da concentração de fluoretos em água potável, utilizando eletrodo íon-seletivo. A determinação é realizada utilizando eletrodo íon seletivo, que mede um potencial (mV), uma curva de calibração preparada com solução padrão serve como referência, então a concentração da amostra pode ser determinada. Os resultados da validação demonstraram recuperação de 100 % da concentração de fluoretos na presença de Fe^{3+} e 98,7 % em Al^{3+} , principais metais conflitantes na quantificação. O estudo de efeito de tampão demonstrou que o tampão não é um interferente na análise. Os coeficientes angulares obtidos no estudo de efeito da matriz foram iguais ao nível de significância de 5 %, desta forma a quantificação da amostra não sofre interferência da matriz. A linearidade apresentou um coeficiente de correlação (R) de 0,9996 e de determinação (R^2) de 0,9991. O teste de Cochran demonstrou que as variâncias são homocedásticas, com nível de confiança de 95 %. Não foram encontrados valores anômalos (*outliers*) pelo teste de Grubbs. A junção destes resultados demonstraram a linearidade do método na faixa de trabalho. O método aplicado atendeu os critérios de aceitação para a precisão quanto a repetibilidade e precisão intermediária. A exatidão dos resultados foi demonstrada com recuperações e desvio padrão relativo (DPR) dentro do aceitável. A robustez foi avaliada frente ao tempo de estabilização do sinal, ocorreu uma variação na leitura da primeira amostra (DPR de 3,93 %). O resultado está relacionado ao tempo necessário para estabilização do sinal na primeira amostra, visto que todas as demais amostras se mantiveram estáveis. Conclui-se que o método desenvolvido e avaliado, atende às especificações propostas para os parâmetros de validação analítica e pode ser utilizado para a determinação de fluoretos em água potável.

Palavras-chave: Fluoretos; Controle; Íon-seletivo; Água Potável; Validação.

ABSTRACT

Makyama, Allan. Validation of ion selective electrode method for determination of fluorides in drinking water. 2019. Chemical process technology. Federal Technological University of Paraná. 2019.

The present work had as aim the adequation and validation of an analytical method of determination of fluoride concentration in drinking water, using ion selective electrode, to be applied in a pharmaceutical industry. The analytical method was developed based on the method proposed by APHA 1999 with adjustments for its optimization and viability. The determination is performed using an ion selective electrode (ISE) meter, which is connected to a ion selective electrode, measuring the potential signal (mV), a calibration curve prepared with standard solution is applied as a reference, so the sample concentration can be determined. Working Interval was determined between 10–190 % of the 1.5 mg L⁻¹ specification. Selectivity results showed a recovery of 100 % for Fe³⁺ and 98.7 % for Al³⁺, the main conflicting metals in the quantification. The Buffer Effect Study concluded that the angular coefficients are equal to the 5 % significance level, in this way the buffer isnt an interference in the analysis. The angular coefficients obtained in The Matrix Effect Study were equal to the 5 % significance level, so the sample quantification doesnt suffer matrix interference. Linearity showed a correlation coefficient (R) of 0.9996 and a coefficient of determination (R²) of 0.9991. The Cochran test showed that the variances are homoscedastic, with a confidence level of 95 %. No *outliers* were found by the Grubbs test in the results. The combination of these results demonstrate the linearity of the method in the working range. The applied method met the acceptance criteria for Precision (Repeatability and Reproducibility). During the execution of Accuracy the results showed recoveries and relative standard deviation within the acceptable range. The Robustness was evaluated by the the signal stabilization time, wich had a variation in the reading of the first sample (DPR of 3.93%). The result may be related to the signal stabilization time generated by the first sample, since all other samples remained stable. It concludes that the developed and evaluated method meets the proposed specifications for the parameters and can be considered validated and can be use for determination of fluoride in drinking water.

Keywords: Fluorides; Control; Ion-selective; Potable water; Validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comportamento das curvas de calibração fluoretos.	43
Figura 2. Comportamento das curvas de calibração fluoretos efeito da matriz.	45
Figura 3. Gráfico da linearidade.....	48
Figura 4. Gráfico de resíduos.	51
Figura 5. Valores críticos para teste de Cochran nível de significância de 5 %.	61
Figura 6. Tabela do teste de Grubbs.....	61
Figura 7. Alterações no método analítico proposto.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Padrão de potabilidade para algumas substâncias químicas que representam risco à saúde.	16
Tabela 2. Concentração de substâncias causando 0,1 mg L ⁻¹ de erro a uma concentração de 1,0 mg L ⁻¹ F ⁻ em métodos de fluoretos	18
Tabela 3. Substâncias utilizadas no trabalho.....	23
Tabela 4. Equipamentos utilizados no trabalho.....	23
Tabela 5. Curva de calibração para determinação de fluoretos.....	25
Tabela 6. Intervalo de concentração para determinação de fluoretos em água potável.	28
Tabela 7. Concentrações das substâncias interferentes.	28
Tabela 8. Curva de calibração seletividade.	29
Tabela 9. Preparo das soluções para avaliação da precisão.....	35
Tabela 10. Especificação de desvio padrão relativo na precisão (Repetibilidade).....	37
Tabela 11. Especificação de desvio padrão relativo na precisão (Intermediária).	37
Tabela 12. Critérios de aceitação para recuperação na exatidão.....	39
Tabela 13. Critérios de aceitação para desvio padrão relativo na exatidão.....	39
Tabela 14. Preparo das soluções robustez.	40
Tabela 15. Curva de calibração, regressão linear e quantificação das soluções seletividade.....	41
Tabela 16. Recuperação e diferença do padrão de fluoretos das soluções seletividade.	42
Tabela 17. Resultados para curva de calibração com e sem tampão.....	42
Tabela 18. Curva de calibração em relação a condição estudo de efeito do tampão.....	43
Tabela 19. Anova regressão através do método dos mínimos quadrados efeito do tampão.	44
Tabela 20. Coeficientes efeito do tampão.	44
Tabela 21. Medida descritiva da qualidade do ajuste coeficientes efeito do tampão.	44
Tabela 22. Intervalo de confiança para os parâmetros efeito do tampão.	44
Tabela 23. Teste de comparação efeito do tampão.	44
Tabela 24. Curva de calibração fluoretos com padrão e amostra contaminada.	45
Tabela 25. Curva de calibração em relação a condição efeito da matriz.	46
Tabela 26. Anova regressão através do método dos mínimos quadrados efeito da matriz.	46
Tabela 27. Coeficientes efeito da matriz.	46
Tabela 28. Medida descritiva da qualidade do ajuste efeito da matriz.....	46
Tabela 29. Intervalo de confiança para os parâmetros efeito da matriz.	47
Tabela 30. Teste de comparação efeito da matriz.	47
Tabela 310. Regressão linear das curvas de calibração e quantificação das amostras.	47
Tabela 32. Curvas das soluções da linearidade.	49

Tabela 33. Tabela de resultados para o teste de Cochran.....	50
Tabela 34. Anova regressão linear.	50
Tabela 35. Tabela de resultados para o teste de Grubbs	52
Tabela 36. Resultados do teste de precisão 1º dia.....	53
Tabela 37. Resultados do teste de precisão 2º dia.....	54
Tabela 38. Resultados da avaliação da precisão intermediária entre 1º e 2º dias.	55
Tabela 39. Resultados para recuperação e desvio padrão relativo na exatidão.	56
Tabela 40. Resultados para quantificação das amostras.....	56
Tabela 41. Resultados para a curva de calibração de robustez.....	57
Tabela 42. Resultados para determinação de concentração nas amostras.....	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVOS	13
1.1.1 Objetivo geral.....	13
1.1.2 Objetivos específicos.....	13
1.2 JUSTIFICATIVA.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 PROPRIEDADES DE POTABILIDADE DA ÁGUA - LEGISLAÇÃO	16
2.2 MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE FLUORETOS EM ÁGUA.	16
2.3 DETERMINAÇÃO POR ELETRODO COMBINADO DE FLUORETOS PERFECTION™ (METTLER TOLEDO).....	17
2.4 INFLUÊNCIA DA SOLUÇÃO TAMPÃO DE AJUSTE DA FORÇA IÔNICA TOTAL NO MÉTODO DE ELETRODO FLUOR SELETIVO	18
2.5 TEORIA DE OPERAÇÃO DO ELETRODO.....	19
2.6 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA.....	20
2.6.1 PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DE MÉTODO.....	20
2.6.1.1 Intervalo	20
2.6.1.2 Seletividade	20
2.6.1.3 Linearidade.....	21
2.6.1.4 Precisão	21
2.6.1.5 Exatidão.....	22
2.6.1.6 Robustez.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 SUBSTÂNCIAS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	23
3.2 ADEQUAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	24
3.3 MÉTODO ANALÍTICO PROPOSTO.....	25
3.3.1 Determinação de Fluoretos em água potável	25
3.3.1.1 Preparo das soluções analíticas	25
3.3.1.2 Procedimentos	25
3.3.1.3 Cálculos.....	26
3.3.1.4 Especificação.....	27
3.3.1.5 Preparo de soluções reagentes.....	27
3.4 PARÂMETROS DA VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	27
3.4.1 DETERMINAÇÃO DO INTERVALO DE TRABALHO	27

3.4.2 SELETIVIDADE	28
3.4.2.1 Critério de aceitação.....	30
3.4.3 ESTUDO DO EFEITO DO TAMPÃO SOBRE CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	31
3.4.3.1 Critério de aceitação.....	32
3.4.4 ESTUDO DO EFEITO DA MATRIZ SOBRE CURVA DE CALIBRAÇÃO	32
3.4.4.1 Critério de aceitação.....	33
3.4.5 LINEARIDADE.....	33
3.4.5.1 Critério de aceitação.....	34
3.4.6 PRECISÃO	34
3.4.6.1 Repetibilidade	34
3.4.6.2 Precisão intermediária.....	35
3.4.6.3 Critério de aceitação.....	36
3.4.7 EXATIDÃO	37
3.4.7.1 Critério de aceitação.....	38
3.4.8 ROBUSTEZ	39
3.4.8.1 Critério de aceitação.....	40
3.4.9 Tratamento estatístico	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 SELETIVIDADE	41
4.2 ESTUDO DE EFEITO DO TAMPÃO SOBRE A CURVA DE CALIBRAÇÃO	42
4.3 ESTUDO DE EFEITO DA MATRIZ SOBRE CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	45
4.4 LINEARIDADE.....	48
4.5 PRECISÃO	52
4.6 EXATIDÃO	55
4.7 ROBUSTEZ.....	57
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXOS.....	61

1 INTRODUÇÃO

O flúor é o 13º elemento mais encontrado pela superfície terrestre, além disso pertence ao grupo dos halogênios. Naturalmente ocorre na forma iônica monovalente negativa, chamada de fluoreto. Ele é um elemento extremamente reativo e eletronegativo, desta maneira tem uma alta capacidade de se combinar com uma grande quantidade de elementos orgânicos e inorgânicos. Estes compostos ficam conhecidos como compostos fluoretados (SHARMA *et al.*, 2017).

As principais fontes naturais de emissão dos fluoretos se devem, principalmente, a sua presença na composição de diversas rochas. Os compostos fluoretados são liberados para o meio ambiente durante os processos de dissolução, meteorização e lixiviação destas rochas (BALOUCH *et al.*, 2013).

O fluor é considerado um oligoelemento necessário para o corpo humano, pois quando, em concentrações controladas, ele tem grande importância, especialmente no desenvolvimento de ossos e dentes, manutenção de superfícies dentárias na prevenção da perda mineral e importante na redução da atividade enzimática bacteriana (ALTUNDAĞ *et al.*, 2000).

Em torno de 99 % dos fluoretos ingeridos e não excretados, vão para os ossos e os dentes. Os fluoretos reduzem progressão da cárie dentária por dois mecanismos distintos: no primeiro, os fluoretos que entram em contato com o esmalte (a camada dura e branca que recobre a superfície do dente) incrustam se nas estruturas cristalinas da hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{H}_2\text{PO}_4)_6$) que é o principal componente mineral do esmalte dentário. Os íons flúor substituem alguns dos grupos hidroxila nas moléculas de hidroxiapatita do esmalte e o composto híbrido resultante é a fluorhidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{H}_2\text{PO}_4)_6\text{F}_2$), cuja resistência á ácidos é mais elevada (European Food Safety Authority - EFSA, 2013). Esse ácido é excretado pelas bactérias da boca, quando consomem os restos de alimentos. No segundo mecanismo, os fluoretos da superfície dos dentes funcionam como catalisadores que aumentam a deposição de cálcio e fosfato, facilitando a reconstituição dos cristais de esmalte pelo organismo, dissolvidos pela ação das bactérias (EFSA, 2013; CONSELHO NACIONAL DE PESQUISA, 2006).

Foi descoberto o uso dos fluoretos como um agente efetivo para prevenir a cárie dentária quando ingerido em quantidades "ótimas", desta forma as diretrizes da OMS de 1984 sugerem que em áreas com clima quente, a concentração ótima de fluoreto na água potável

devem permanecer abaixo de 1 mg L^{-1} , enquanto em climas mais frios pode chegar a $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ (CONSELHO NACIONAL DE PESQUISA, 2006).

Os íons fluoretos podem ocorrer naturalmente na água ou podem ser adicionados em quantidades controladas. Altas concentrações de flúor podem ser prejudiciais à saúde, ocasionando o que denominamos de fluorose (RIBEIRO, 2018).

As principais proteínas durante a formação dos dentes são as amelogeninas, sua função é regular a formação dos cristais de hidroxiapatita. No momento em que se forma uma matriz de cristal, as amelogeninas decompõem-se e são removidas durante a maturação do esmalte. O aumento dos níveis de flúor na água potável afeta globalmente milhões de pessoas, pois ao consumir altas doses de fluoreto, elas são absorvidas pelo trato digestivo e depois transportadas pela corrente sanguínea até os dentes em formação e os sinais bioquímicos falham. Durante a maturação do esmalte as proteínas permanecem dentro do dente que está germinando por um período maior do que o normal, criando assim falhas na estrutura cristalina do esmalte, este efeito é conhecido como fluorose dentária (BALOUCH *et al.*, 2013; SHILPA, 2017).

A intensidade da alteração e do nível de qualidade da saúde bucal é proporcional à quantidade de fluoreto ingerida. Ao nível da exposição a concentrações de fluoreto mais elevadas, a fluorose dentária pode evoluir para o quadro clínico de fluorose esquelética, causando osteoesclerose, calcificações de ligamentos, osteoporose, osteomalácia ou osteopenia (SIVARAJASEKAR *et al.*, 2017).

A fluorose dentária e a fluorose esquelética são patologias que não possuem a possibilidade de remediação e o tratamento é apenas sintomático, além disso, a única forma de prevenção se dá através da manutenção da ingestão de alimentos saudáveis e fluoretos dentro dos limites seguros (SUSHEELA *et al.*, 1999).

Torna-se evidente que a eficácia da ação benéfica dos fluoretos em relação a saúde bucal fica condicionada a uma quantidade ótima de ingestão, acima desta quantidade existe o risco de fluorose, abaixo desta ocorre a perda da eficácia na redução da cárie dentária (DOVIDAUSKAS *et al.*, 2015).

A determinação precisa dos fluoretos vem ganhando importância, devido ao aumento da prática da fluoretação do suprimento de água, como medida de saúde pública bucal. Além disso, a manutenção de uma concentração ótima de flúor é essencial para manter a eficácia e a segurança do procedimento de fluoretação (FRAZÃO, 2011).

Os métodos utilizando o eletrodo íon seletivo (ISE) são considerados os mais adequados para a determinação do íon fluoreto em água potável, devido a sua alta seletividade e melhor linearidade quando comparado com os métodos espectrofotométricos e colorimétricos (APHA, 2017).

Um eletrodo íon-seletivo (ISE) é uma espécie de eletrodo indicador que responde (propaga um potencial) quando é colocado em uma solução com um determinado íon. Existe atualmente uma grande variação de eletrodos íon seletivos existentes que respondem seletivamente a cátions especiais e ânions (METTLER-TOLEDO, 2011).

A análise potenciométrica do elemento flúor (como íon F^-) em soluções usando eletrodo flúor seletivo é simples, confiável e de baixo custo. Além disso, pequenas concentrações de íons de flúor ($10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$) podem ser determinadas por meio do eletrodo flúor seletivo (APHA, 2017). O método eletrodo seletivo também apresenta a vantagem que utilizando uma solução de correção da força iônica, a determinação da concentração fica seletiva, não sofrendo interferência de íons hidróxido e íons de metais conflitantes (APHA, 2017).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Adequação e validação de um método aplicável para a avaliação da concentração de fluoretos em água potável para ser utilizado em uma indústria farmacêutica.

1.1.2 Objetivos específicos

- Adequar o método analítico para a determinação de fluoretos em água através de eletrodo íon-seletivo, a partir do procedimento descrito pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* otimizando parâmetros e condições para a realização da determinação conforme:
 - **Curva de calibração:** aumento do intervalo de determinação de concentração permitido pelo método;
 - **Preparo do padrão de fluoretos:** alteração de dissolução a partir do sal fluoreto de sódio, para padrão líquido;

- **Preparo do tampão de fluoretos:** alterar para solução tampão comercial de TISAB II;
 - **Forma de quantificação:** alterar o cálculo da determinação de concentração de fluoretos para software matemático.
- Realizar uma validação analítica documentada para o método proposto.
 - Contribuir com o avanço científico e tecnológico dos estudos de qualidade da água.

1.2 JUSTIFICATIVA

Conforme estabelecido pelo Ministério da Saúde, os valores máximos permitidos para a concentração de fluoretos em água devem ser controlados, garantindo assim seu parâmetro de potabilidade. Desta forma, existe uma demanda por métodos de avaliação para realizar o controle desta substância na água.

Pode-se considerar, o desenvolvimento de métodos de determinação de fluoretos em água destinada ao consumo humano, como uma demanda de saúde pública de grande importância para o bem-estar da população.

A literatura pública que apresenta metodologias oficiais para a avaliação dos parâmetros de potabilidade da água mais utilizada é o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Traduzido para o português, Métodos Padrões para a Examinação de Água e Águas de Efluentes, publicada em conjunto pela Associação Americana da Saúde Pública (APHA), Associação Americana de Trabalhos de Água (AWWA) e Federação de Água e Meio Ambiente (WEF), é reconhecida mundialmente, está em constante revisão e apresenta centenas de técnicas analíticas desenvolvidas por vários pesquisadores para determinação de vários parâmetros de qualidade da água.

Standard Methods (APHA, 2017) a informa que o método de eletrodo íon seletivo para avaliação de fluoretos permite determinar concentrações de 0,1 mg L⁻¹ até 10 mg L⁻¹, contudo, o procedimento descrito no compêndio apresenta uma curva de calibração que contempla apenas valores de concentração entre 0,5 e 2,0 mg L⁻¹.

Além disso, no procedimento o preparo da soluções padrão de fluoretos utilizada na curva de calibração é realizado a partir do sal fluoreto de sódio. Atualmente as análises de metais já estão altamente aprimoradas e já são produzidas soluções padrões a partir de íons metálicos, com concentração avaliada e certificada (APHA, 2017).

O presente trabalho pretende apresentar soluções para otimizar este método e reduzir suas fontes de erros, possibilitando ao novo método uma maior confiabilidade na determinação da concentração dos íons fluoretos. Além disso, a melhor maneira de demonstrar que o método é adequado para executar o seu propósito, é realizando sua validação analítica, fornecendo assim evidências documentadas através de estudos e critérios de avaliação bem definidos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PROPRIEDADES DE POTABILIDADE DA ÁGUA - LEGISLAÇÃO

Conforme estabelecido pela Portaria do Ministério da Saúde nº 2.914/2011, o Valor Máximo Permitido (VMP) de concentração de flúor na água potável é de 1,5 mg L⁻¹ (BRASIL, 2011).

A Portaria nº 2.914/2011 ainda cita que os valores de concentração do íon fluoreto devem observar a Portaria nº 635/GM/MS, de 26 de dezembro de 1975. Esta portaria informativa apresenta métodos para a determinação de fluoretos e também recomenda os limites para a concentração de fluoretos em água potável, em relação a variação da temperatura (BRASIL, 2011).

Recentemente, a portaria de consolidação nº 5, de 12 de setembro de 2017, estabelece como apresentado na Tabela 1, os valores máximos permitidos para substâncias que representam risco à saúde e que podem estar presentes na água destinada ao consumo humano proveniente de sistema ou solução alternativa de abastecimento de água, concretizando o limite para fluoretos como 1,5 mg L⁻¹ (BRASIL, 2017).

Tabela 1. Padrão de potabilidade para algumas substâncias químicas que representam risco à saúde

Parâmetro	Valor Máximo Permitido
Fluoretos	1,5 mg L ⁻¹ .
Alumínio	0,2 mg L ⁻¹
Ferro	0,3 mg L ⁻¹

Fonte: PORTARIA Nº 5 MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017.

2.2 MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE FLUORETOS EM ÁGUA.

A determinação de fluoretos em água segundo a Portaria nº 635 pode ser realizada a partir do método de eletrodo seletivo, espectrofotométrico utilizando solução de reagente 2-(Parasulfonilazo)-1,8-di-hidroxi-3,6-naftaleno-dissulfonato (SPADNS) ou colorimétrico utilizando alizarina (BRASIL, 1976). Entre os métodos sugeridos para determinação do íon fluoreto (F⁻) em água, os métodos eletrodo seletivo e colorimétricos são os mais satisfatórios, havendo ainda o método complexométrico, por cromatografia iônica (eletroforese capilar) e mais recentemente fluorometria. No entanto, como todos os métodos estão sujeitos a erros

pela presença de íons interferentes, algumas vezes é necessária uma etapa de destilação (APHA, 2017).

No método colorimétrico utilizando solução SPADNS as determinações de cor são feitas fotometricamente, usando um espectrofotômetro. Basea-se na reação entre o fluoreto e a laca de zircônio com um corante orgânico. O fluoreto forma um complexo $Zr F^-$ que não apresenta coloração. A proporção que a quantidade de íons fluoreto cresce, a coloração da laca diminui. Um pré-tratamento por destilação, é necessário para este método a fim de evitar os íons interferentes, contudo, a destilação não é necessário para o método de eletrodo seletivo (BRASIL, 1976; APHA, 2017).

O método SPADNS é adequado para determinação de fluoretos entre 0 e $1,40 \text{ mg L}^{-1}$, o método de eletrodo seletivo é adequado para concentrações de fluoretos de 0,1 a mais de 10 mg L^{-1} (APHA, 2017).

O método por elétrodo fluoreto seletivo vem sendo amplamente utilizado na determinação de fluoretos, em substituição os métodos cromatográficos e espectrofotométricos, que embora mais sensíveis, também são mais demorados e substancialmente mais caros. Como os eletrodos são fáceis de usar, relativamente económicos, seletivos e sensíveis, acabam por apresentar tempo de análise curta se apresentando assim mais viável para verificação de fluoretos (FOJO, 2011).

2.3 DETERMINAÇÃO POR ELETRODO COMBINADO DE FLUORETOS PERFECTION™ (METTLER TOLEDO)

O eletrodo de fluoretos perfectION™, contém dois eletrodos necessários para realizar a medida, o eletrodo de referência e o sensor integrados em um só corpo, o que diminui a quantidade de solução necessária e também reduz o desperdício de reagentes (METTLER-TOLEDO, 2011).

O perfectION™ apresenta um elemento sensor que fica recoberto por um corpo epóxi, o elemento chave no eletrodo de fluoretos é o cristal recoberto com fluoreto de lantânio através do qual um potencial é estabelecido por soluções de fluoretos de diferentes concentrações (METTLER-TOLEDO, 2011).

O cristal entra em contato com a solução amostra contendo íons fluoreto em uma face e uma solução de referência interna na outra. Um potencial se desenvolve através da membrana, que depende da diferença na atividade do íon específico em cada lado da

membrana. Esse potencial, que varia de acordo com a concentração de íon fluoreto livre em solução, é medido constantemente com um medidor digital de pH/mV ou medidor eletrodo íon seletivo (ISE). O pontencial é avaliado contra a mesma solução interna que contém uma concentração fixa (referência) do íon analito através de outro sensor o de referência, e desta maneira a diferença de potencial desenvolvido através da membrana é relacionado à atividade do analito na solução amostra (METTLER-TOLEDO, 2011; CSUN CHEMISTRY).

2.4 INFLUÊNCIA DA SOLUÇÃO TAMPÃO DE AJUSTE DA FORÇA IÔNICA TOTAL NO MÉTODO DE ELETRODO FLUOR SELETIVO

Os íons fluoretos formam complexos com alumínio (+3), silício, ferro (+3) e outros cátions polivalentes, bem como hidrogênio. A formação destes complexos afeta negativamente a concentração de fluoretos livres na amostra, assim como indicado na Tabela 2 (APHA, 1999). A extensão da complexação depende da concentração do agente complexante, da concentração total de fluoretos, do pH da solução e da força iônica total da solução (METTLER-TOLEDO, 2011).

Tabela 2. Concentração de substâncias causando 0,1 mg L⁻¹ de erro a uma concentração de 1,0 mg L⁻¹ F⁻ em métodos de fluoretos

Substância	Método C (Eletrodo)	
	Conc. mg L ⁻¹	Tipo do Erro *
Alcalinidade (CaCO ₃)	7000	+
Alumínio (Al ³⁺)	3	-
Ferro (Fe ³⁺)	200	-

* + denomina um erro positivo
 - denomina um erro negativo

Fonte: APHA, 1999.

Com o intuito de equilibrar força iônica da solução e evitar a complexação dos íons fluoretos, utiliza-se um tampão chamado Tampão de Ajuste de Força Iônica Total (Total Ionic Strength Adjustment Buffer - TISAB), que contém água [80-90 %], acetato de sódio [0-10 %] ácido acético [0-10 %], cloreto de sódio [0-10 %] e o reagente ácido 1,2-

ciclohexilenodinitrilotetraacético mono-hidratado (CDTA) [0-10 %], que preferencialmente, complexa com alumínio, ferro e outros interferentes da amostra. A adição do tampão prescrito permite que o método de determinação de fluoretos por eletrodo seletivo, fique livre da maioria das interferências que afetam negativamente o método (METTLER-TOLEDO, 2011; METTLER-TOLEDO, 2016).

Desta maneira diferentemente das técnicas colorimétricas e complexométricas o método de eletrodo seletivo se torna seletivo sem a necessidade de um pré-tratamento por destilação, sendo assim, mais simples de se executar, mais rápido e com um bom intervalo para a determinação visto que a especificação brasileira para fluoretos é de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ (BRASIL, 2017).

Para manter a força iônica da solução, descomplexar os íons fluoreto e ajustar o pH da solução, várias formulações de TISAB (Total Ionic Strength Adjustment Buffer/Tampão de Ajuste de Força Iônica Total) têm sido propostas, sendo que a escolha depende da concentração de fluoreto e dos íons interferentes, recomenda-se que para a determinação de fluoretos em água o volume de TISAB adicionado seja proporcional ao volume de amostra. O desenvolvimento de novos tampões, elevou tanto a capacidade de descomplexação, de forma que, em uma amostra de fluoreto de 1 mg L^{-1} com uma relação de volume 1:1 com o tampão, o TISAB II consiga complexar com cerca de 5 mg L^{-1} de alumínio Al^{3+} ou ferro Fe^{3+} . (METTLER-TOLEDO, 2011).

2.5 TEORIA DE OPERAÇÃO DO ELETRODO

Quando o elemento sensor está em contato com uma solução contendo íons de flúor, um potencial de eletrodo desenvolve-se através do elemento sensor. Este potencial, que depende da concentração de íon fluoreto livre em solução, é medido contra um potencial de referência constante com um potenciômetro. O potencial medido correspondente a concentração de íon fluoreto em solução é descrito pela equação de Nernst:

$$E = E_o + (S \times \log (A)) \quad (1)$$

Onde:

E = potencial do eletrodo medido.

E_o = potencial de referência (constante a).

A = concentração de íon fluoretos livres em solução.

S = inclinação do eletrodo (constante b).

2.6 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

Considerando o potencial de seletividade e de sensibilidade do método de determinação de fluoretos por eletrodo seletivo, assim como a grande importância da avaliação da potabilidade da água para suprir as diversas demandas humanas, o presente trabalho pretende realizar o desenvolvimento de um método de determinação da concentração de fluoretos em água potável, utilizando eletrodo íon-seletivo. No entanto, com o intuito de comprovar que o método analítico pode ser aplicado para seu propósito, o método deve ser testado e avaliado, em um procedimento documentado com critérios para aceitação bem definidos chamamos isto de validação de método (ANVISA 2017).

2.6.1 PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DE MÉTODO

2.6.1.1 Intervalo

O intervalo não é um parâmetro com caráter reprobatório, pois não possui um critério de aceitação. No entanto, como um dos objetivos do desenvolvimento do desenvolvimento método é estender o intervalo de determinação em relação ao método APHA, é importante que ele seja definido antes da realização de quaisquer outros testes.

2.6.1.2 Seletividade

Seletividade é a capacidade que o método possui em identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocadamente, na presença de componentes que possam estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz. Para métodos quantitativos, deve-se obter a comprovação de que a resposta analítica se deve exclusivamente ao analito, sem interferência do diluente, da matriz, de impurezas ou produtos de degradação (ANVISA, 2017).

Para métodos quantitativos e ensaios limite, a seletividade deve ser demonstrada por meio da comprovação de que a resposta analítica se deve exclusivamente ao analito, sem interferência do diluente, da matriz, de impurezas ou de produtos de degradação (ANVISA, 2017).

Para quantificação de fluoretos na amostra faz-se uso de um eletrodo específico para fluoretos. O eletrodo de fluoretos é um dos eletrodos mais seletivos, é constituído de um cristal único de fluoreto de lantânio, dopado com cátion európio. Devido a estrutura do eletrodo os únicos íons que podem migrar através da membrana, além do fluoreto, são os La^{+3} , Eu^{+2} (extremamente raros) e OH^- , que possui tamanho semelhante ao íon fluoreto e a mesma carga, o que faz com que também possa migrar através da membrana.

No entanto como mencionado anteriormente a maior interferência pode ser evidenciada com o efeito negativo na determinação da concentração de fluoretos pela complexação de íons fluoretos com outros íons, impossibilitando que os fluoretos sejam detectados pelo eletrodo.

Para manter a força iônica da solução, evitar complexação dos íons fluoreto e ajustar o pH da solução, costuma-se adicionar uma solução de TISAB II. Os valores de concentração de Alumínio (Al^{3+}) e Ferro (Fe^{3+}) são determinados por outros métodos e tem seus limites máximo permitido para água potável respectivamente como $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,3 \text{ mg L}^{-1}$. A solução de TISAB II tem a capacidade de absorver 5 mg L^{-1} de interferentes, levando em consideração os valores máximos para Alumínio o TISAB II tem a capacidade para absorver cerca de 25 vezes a concentração máxima permitida e para Ferro cerca de 17 vezes a concentração máxima permitida. Capacidade que garante aos métodos de eletrodo íon seletivo uma seletividade a matriz e a maioria dos elementos contaminantes.

2.6.1.3 Linearidade

A linearidade de um método é demonstrada por meio da capacidade de apresentar respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. Uma relação linear deve ser avaliada em toda a faixa estabelecida para o método. As soluções utilizadas para avaliação da linearidade devem ser preparadas de maneira independente e deve ser utilizada substância química de referência para o estudo (MAPA, 2011).

2.6.1.4 Precisão

A precisão tem como objetivo avaliar a proximidade entre resultados obtidos na análise de uma mesma amostra preparada conforme método analítico (devendo ser preparadas de maneira independente desde o início do procedimento), no mesmo laboratório, em pelo

menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos e a mesma deve ser demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições (ANVISA, 2017).

2.6.1.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. Deve ser verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível. As amostras devem ser preparadas de maneira independente, podendo ser utilizadas soluções diluídas de uma mesma solução mãe de padrão. Para a determinação da exatidão, deve ser utilizada a abordagem mais adequada, de acordo com o método analítico em estudo (ANVISA, 2017).

2.5.1.6 Robustez

A robustez é o parâmetro que indica a capacidade do método analítico em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas. No caso de métodos quantitativos, o impacto das variações propostas nos resultados obtidos deverá ser avaliado com os mesmos critérios utilizados para a exatidão. Caso haja susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, essas deverão ser controladas por meio de precauções descritas no método (ANVISA, 2017).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SUBSTÂNCIAS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Para a realização do trabalho e avaliação de fluoretos em água potável através da determinação por eletrodo íon-seletivo foram utilizadas as substâncias e equipamentos descritas nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Substâncias utilizadas no trabalho.

Substâncias	Fabricante	Teor (%/mg L ⁻¹)	Lote/certificado	Validade
Água potável	Local	NA	NA	NA
Solução Padrão Fluoretos 1000 mg L ⁻¹	Reagecon	1000 mg L ⁻¹	ISEF517G1	30/06/2020
Cloreto de Alumínio hexahidratado	Sigma Aldrich	≥ 99,0 %	211110	19/10/2020
Cloreto de Ferro (III) hexahidratado	Sigma Aldrich	≥ 99,0 %	STBH7964	23/08/2021
Solução Tampão TISAB II	Mettler Toledo	NA	VW1	18/04/2020

Tabela 4. Equipamentos utilizados no trabalho.

Equipamentos	Marca / Modelo	Especificação (Lote, n° de Série, Identificação)	Validade da calibração
Balança Analítica	Mettler Toledo / XP56	WI113	08/2019
Eletrodo íon-seletivo combinado	Mettler Toledo / perfectION™	NA	07/2019
Potenciômetro pH/Ion	Mettler Toledo / SevenCompact S220-Uni	UI021	09/2019
Agitador Magnético	Atom / Vis 2000	AG087	NA
Pipetador 20 µL	Eppendorf / Reference	YN068	05/2019
Pipetador 100 µL	Eppendorf / Reference	YN070	10/2019
Pipetador 10 mL	Eppendorf / Reference	YN073	18/2019

3.2 ADEQUAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

A adequabilidade do método analítico foi realizada a partir do método de determinação de fluoretos por eletrodo íon-seletivo (Método C), proposto por APHA 1999, realizando adequações no método para otimização e viabilidade para o fim proposto.

Em relação às alterações, elas foram realizadas sobre os seguintes parâmetros:

1. A **Curva de calibração** foi alterada para aumentar o intervalo de determinação da concentração de fluoretos permitido pelo o método. É importante determinar valores de concentração de fluoretos abaixo de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ou acima de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$, permitindo assim um melhor controle e correção da concentração durante o tratamento de fluoretação, para assim garantir a sua segurança e eficácia;
2. Preparo do **padrão de fluoretos**, que será alterado de dissolução a partir do sal fluoreto de sódio, para padrão líquido certificado de 1000 mg L^{-1} . A alteração irá reduzir os erros de concentração associados aos desvios durante a pesagem do sal fluoreto de sódio e também pela absorção de umidade, aumentando a confiabilidade dos resultados e diminuindo erros;
3. Preparo do **tampão de fluoretos TISAB** do método APHA, que será alterado para solução tampão comercial com a mesma capacidade e concentração, porém certificada e com capacidade de complexação com íons metálicos pré-determinada, chamada de TISAB II;
4. **Forma de quantificação**, que será alterada de papel gráfico semilogarítmico de dois ciclos, para linearização e regressão linear através de software matemático, visando reduzir o tempo e o erros na quantificação de fluoretos, desta forma o cálculo para a determinação de concentração de fluoretos também deverá ser alterado e igualmente realizado em software matemático.

Para que o estudo cumpra o objetivo proposto, foi ainda, adicionado ao método a especificação limite para concentração de fluoretos conforme legislação vigente (BRASIL, 2011; BRASIL, 2017).

3.3 MÉTODO ANALÍTICO PROPOSTO

3.3.1 Determinação de Fluoretos em água potável

3.3.1.1 Preparo das soluções analíticas

Curva de calibração

Para cada nível de concentração, em um béquer de 100mL, realizar a adição do volume de solução padrão de fluoretos $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de acordo com a Tabela 5 e adicionar o volume de água purificada suficiente para completar 25 mL. Transferir 25,0 mL de solução tampão TISAB II para o mesmo béquer, adicionar uma barra magnética (peixinho) e agitar em agitador magnético com agitação lenta e constante.

Tabela 5. Curva de calibração para determinação de fluoretos.

Ponto da Curva	Concentração (mg L ⁻¹)	Porcentagem da especificação (%)	Volume a ser pipetado da solução padrão de fluoretos $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ (mL)	Volume de água purificada para completar 25 mL
1	0,15	10	0,75	24,25
2	1,50	100	7,50	17,50
3	2,85	190	14,25	10,75

Solução amostra

Transferir 25 mL da amostra para um béquer de 100 mL, adicionar 25,0 mL de solução tampão TISAB II, adicionar uma barra magnética (peixinho) e agitar em agitador magnético com agitação lenta e constante.

3.3.1.2 Procedimentos

Nota: Adicione antes de usar o eletrodo a solução de preenchimento todos os dias. O nível da solução de enchimento deve estar pelo menos 2,5 cm acima do nível de amostra no béquer para garantir uma taxa de fluxo adequada. O orifício de enchimento deve estar sempre aberto ao fazer medições.

Leitura: Mantendo a agitação mergulhar o eletrodo íon seletivo para fluoreto na solução que deseja quantificar, de maneira que o nível da amostra esteja acima do elemento

de referência indicado por um pequeno círculo na lateral do eletrodo, esperar estabilizar e anotar o valor do potencial (U) expresso em milivolts (mV).

3.3.1.3 Cálculos

Cálculo da curva de calibração

Calcular o logaritmo da concentração em mg L^{-1} , das concentrações de cada ponto da curva. Tabelar em software matemático juntamente com os dados de potencial de cada ponto, plotar um gráfico do potencial de cada ponto no eixo y, em função do logaritmo das respectivas concentrações, no eixo x e realizar a regressão linear da curva analítica através do método dos mínimos quadrados, permitindo assim realizar a determinação da equação geral da reta e o valor do coeficiente de correlação r. Anotar o valor de r e retirar os valores do coeficiente angular e coeficiente linear (interceptação).

A equação geral da reta é dada por $y = (A \times x) + B$, em que y corresponde ao potencial (U) medido em milivolts, A (coeficiente angular) é a inclinação da reta, x é o logaritmo da concentração da solução em mg L^{-1} , e B (interceptação) é o coeficiente linear da reta. Desta forma a equação da reta será:

$$U = (A \times \log[F^-]) + B \quad (2)$$

Onde U é o potencial da solução em mV, A é o coeficiente angular, $\log [F^-]$ é o logaritmo da concentração teórica de fluoretos em mg L^{-1} e B é o coeficiente linear da reta.

Cálculo da concentração de fluoretos na da amostra

Antes de calcular o valor da concentração de fluoretos deve-se avaliar o valor obtido para o coeficiente de correlação r da curva de calibração, se o coeficiente for menor que 0,99 a curva não deve ser aceita e o preparo deve ser repetido. Caso o coeficiente r fique $\geq 0,99$ (linear) calcular a concentração de fluoretos presente na amostra pela equação:

$$[F^-] = 10^{\left(\frac{U-B}{A}\right)} \quad (3)$$

Onde: $[F^-]$ é a concentração de fluoretos em mg L^{-1} , U é a medida da potência da solução amostra, em mV e A e B são os valores obtidos na equação da reta da curva de calibração.

3.3.1.4 Especificação

A amostra não contém mais que $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de fluoretos (BRASIL, 2011; BRASIL 2017).

3.3.1.5 Preparo de soluções reagentes

Solução padrão de Fluoretos $5,0 \text{ mg L}^{-1}$

Transferir 5 mL de padrão de fluoretos 1000 mg L^{-1} para um balão volumétrico de 1000 mL, contendo 100 mL de água purificada e completar o volume com o mesmo solvente.

Solução TISAB II

A solução TISAB II é uma solução tampão adquirida comercialmente e para o presente estudo foi utilizada a solução PerfectION™ TISAB II with CDTA do fabricante Mettler Toledo, que apresenta a capacidade de complexar com 5 mg L^{-1} de interferentes alumínio ou ferro presentes na amostra.

3.4 PARÂMETROS DA VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação analítica é um processo que prove evidência documentada de que um método realiza aquilo para o qual está indicado para fazer. Desta forma, a validação do método analítico será comprovada avaliando-a em parâmetros analíticos documentados. Serão considerados aprovados, os parâmetros em que o método atingir o critério de aceitação proposto. Os critérios de aceitação para cada parâmetro deverão estar de acordo com órgãos regulamentadores de estudos analíticos para cada área de estudo.

3.4.1 DETERMINAÇÃO DO INTERVALO DE TRABALHO

O intervalo será definido entre 10 e 190 % da especificação de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$, que é o valor máximo permitido para concentração de fluoretos em água potável pela portaria de Consolidação nº 5, de 12 de dezembro de 2017. Permitindo assim, ao método determinar concentrações entre $0,15$ e $2,85 \text{ mg L}^{-1}$ de fluoretos em amostras de água potável, conforme Tabela 6.

Tabela 6. Intervalo de concentração para determinação de fluoretos em água potável.

Concentração (mg L ⁻¹)	Porcentagem da especificação (%)
0,15	10
0,60	40
1,05	70
1,50	100
1,95	130
2,40	160
2,85	190

3.4.2 SELETIVIDADE

É importante verificar a capacidade do tampão TISAB II em evitar a complexação de íons fluoretos com íons interferentes, principalmente nos valores de concentração máxima permitida pela legislação para estes elementos, considerando que em amostras consideradas aceitáveis a concentração será sempre mantida abaixo deste valor.

Contudo, a manutenção da seletividade frente a condições não controladas destes parâmetros é considerada mais relevante visto que indica o comportamento em casos críticos.

Para tanto, a seletividade do método em questão será avaliada por meio da comparação de resultados obtidos com uma solução teste de padrão de fluoretos (Solução Controle) e duas soluções testes contendo a mesma concentração de íons fluoretos e a adição de íons interferentes: a primeira utilizando alumínio (Al³⁺) (Solução Alumínio) e uma outra utilizando Ferro (Fe³⁺) (Solução Ferro) todas com uma concentração 1,5 ml L⁻¹ dos analitos que é a concentração máxima permitida para fluoretos. As concentrações podem ser verificadas conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7. Concentrações das substâncias interferentes.

Solução	Concentração F ⁻ (mg L ⁻¹)	Concentração Al ³⁺ (mg L ⁻¹)	Concentração Fe ³⁺ (mg L ⁻¹)
Controle	1,5	-	-
Alumínio	1,5	1,5	-
Ferro	1,5	-	1,5

➤ **Preparo das soluções analíticas**

Curva de calibração – Para cada nível de concentração foram transferir 25,0 mL de solução tampão TISAB II, 25 mL de água purificada para um béquer de 100 mL, adicionar uma barra magnética (peixinho) e agitar em agitador magnético com agitação lenta e constante. Em seguida realizar a adição de cada volume de padrão de fluoretos 1000 mg L⁻¹ de acordo com a Tabela 8.

Tabela 8. Curva de calibração seletividade.

Ponto da Curva	Concentração (mg L ⁻¹)	Porcentagem da especificação (%)	Volume a ser pipetado do padrão de 1000 mg L ⁻¹ (mL)
1	0,15	10	3,8
2	0,60	40	15,0
3	1,05	70	26,3
4	1,50	100	37,5
5	1,95	130	48,8
6	2,40	160	60,0
7	2,85	190	71,3

Solução Controle (F⁻ 1,5 mg L⁻¹)

Transferir 37,5 µL do padrão de fluoretos 1000 mg L⁻¹ para um béquer de 100 mL, adicionar 25 mL de água purificada e adicionar 25,0 mL de solução tampão TISAB II, adicionar uma barra magnética (peixinho) e agitar em agitador magnético com agitação lenta e constante.

Solução Alumínio (F⁻ 1,5 mg L⁻¹+ Al³⁺ 1,5 mg L⁻¹)

Transferir 37,5 µL do padrão de fluoretos para um béquer de 100 mL, adicionar 12,5 mL de água purificada e 12,5 mL da solução de Alumínio 3,0 mg L⁻¹, adicionar 25,0 mL de solução tampão TISAB II, adicionar uma barra magnética (peixinho) e agitar em agitador magnético com agitação lenta e constante.

Solução Ferro (F⁻ 1,5 mg L⁻¹+ Fe³⁺ 1,5 mg L⁻¹)

Transferir 37,5 µL do padrão de fluoretos para um béquer de 100 mL, adicionar 12,5 mL de água purificada e 12,5 mL da solução de Ferro 3,0 mg L⁻¹, adicionar 25,0 mL de

solução tampão TISAB II, adicionar uma barra magnética (peixinho) e agitar em agitador magnético com agitação lenta e constante.

➤ **Procedimento experimental**

Realizar a determinação conforme o procedimento descrito no método analítico, item 3.3.1.2.

➤ **Cálculo da concentração encontrada de fluoretos**

Conforme item 3.3.1.3

➤ **Preparo de soluções reagentes**

Solução padrão de Alumínio (Al^{3+}) $3,0 \text{ mg L}^{-1}$

Pesar 26,8 mg de cloreto de alumínio hexahidratado $\geq 99,0\%$, transferir para um béquer de 100 mL. Dissolver em 100 mL de água purificada, transferir para um balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com o mesmo solvente. Tampar e homogeneizar por inversão. Armazenamento – Em frasco de vidro âmbar, bem fechado.

Solução padrão de Ferro (Fe^{3+}) $3,0 \text{ mg L}^{-1}$

Pesar 14,5 mg de cloreto de ferro (III) hexahidratado $\geq 99,0 \%$, transferir para um béquer de 100 mL. Dissolver em 100 mL de água purificada, transferir para um balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com o mesmo solvente. Tampar e homogeneizar por inversão. Armazenamento – Em frasco de vidro âmbar, bem fechado.

3.4.2.1 Critério de aceitação

A seletividade deve ser demonstrada por meio da comprovação de que a resposta analítica se deve exclusivamente ao analito. Contudo, variações nas respostas avaliadas através da recuperação podem ser permitidas, desde que mínimas.

Considerando que a variação encontrada na precisão, é a variação decorrente dos fatores provenientes de preparo e provenientes do equipamento faz sentido que essa variação ocorra também e seja permitida na avaliação de interferência das substâncias na seletividade.

Desta forma, as variações encontradas na recuperação das soluções seletividade serão avaliadas frente ao valor do desvio padrão apresentado no estudo de Precisão (Repetibilidade), na concentração de analito adicionada (100 % da especificação).

3.4.3 ESTUDO DO EFEITO DO TAMPÃO SOBRE CURVA DE CALIBRAÇÃO

A existência de efeito do tampão será verificado através do preparo de duas curvas de calibração, com os mesmos níveis de concentração de fluoretos. A adição da quantidade de tampão utilizada no teste será feita em uma das curvas, na outra a quantidade será substituída por água purificada.

➤ **Preparo das soluções analíticas**

Curva de calibração Tampão – Para cada nível de concentração transferir 25,0 mL de solução tampão TISAB II, 25 mL de água purificada para um béquer de 100 mL, adicionar uma barra magnética (peixinho) e agitar em agitador magnético com agitação lenta e constante. Em seguida realizar a adição de cada volume de padrão de fluoretos 1000 mg L⁻¹ de acordo com a Tabela 8.

Curva de calibração água purificada – Para cada nível de concentração transferir 50,0 mL de água purificada, para um béquer de 100 mL, adicionar uma barra magnética (peixinho) e agitar em agitador magnético com agitação lenta e constante. Em seguida realizar a adição de cada volume de padrão de fluoretos 1000 mg L⁻¹ de acordo com a Tabela 8.

➤ **Procedimentos**

Realizar a determinação conforme o procedimento descrito no método analítico, item 3.3.1.2

3.4.3.1 Critério de aceitação

O método será considerado seletivo após a comprovação de que não há interferência da matriz da amostra na quantificação do ativo.

3.4.4 ESTUDO DO EFEITO DA MATRIZ SOBRE CURVA DE CALIBRAÇÃO

A existência de efeito de matriz será verificada através do preparo de duas curvas de calibração, com os mesmos níveis de concentração de fluoretos e uma das curvas receberá a adição da quantidade de amostra utilizada no teste, a verificação será realizada através de teste estatístico.

Além disso, três amostras serão analisadas e quantificadas em cada uma das curvas.

➤ **Preparo das soluções analíticas**

Curva de calibração 1 – Para cada nível de concentração transferir 25,0 mL de solução tampão TISAB II, 25 mL de água purificada para um béquer de 100 mL, adicionar uma barra magnética (peixinho) e agitar em agitador magnético com agitação lenta e constante. Em seguida realizar a adição de cada volume de padrão de fluoretos 1000 mg L⁻¹ de acordo com a Tabela 8.

Curva de calibração 2 – Para cada nível de concentração transferir 25,0 mL de solução tampão TISAB II, 25 mL de água potável (amostra) para um béquer de 100 mL, adicionar uma barra magnética (peixinho) e agitar em agitador magnético com agitação lenta e constante. Em seguida realizar a adição de cada volume de padrão de fluoretos 1000 mg L⁻¹ de acordo com a Tabela 8.

Solução amostra

Preparar em triplicata. - Transferir 25 mL da amostra para um béquer de 100 mL, adicionar 25,0 mL de solução tampão TISAB II, adicionar uma barra magnética (peixinho) e agitar em agitador magnético com agitação lenta e constante.

➤ **Procedimentos**

Realizar a determinação conforme o procedimento descrito no método analítico, item 3.3.1.2

3.4.4.1 Critério de aceitação

O método será considerado seletivo após a comprovação de que não há interferência da matriz da amostra na quantificação do ativo.

3.4.5 LINEARIDADE

A avaliação deste parâmetro será realizada através do preparo de 3 curvas de calibração, cada uma com 7 pontos de concentração equidistantes e com a adição da mesma quantidade de amostra (matriz), contabilizando um total de 21 amostras. Cada curva será avaliada no intervalo de 0,15 a 2,85 mg L⁻¹, com o ponto central à 100 % da concentração máxima nominal na amostra (1,50 mg L⁻¹) do método analítico.

➤ **Preparo das soluções analíticas**

Soluções Linearidade – Preparar três amostras para cada nível de concentração, transferindo 25,0 mL de solução tampão TISAB II, 25 mL de água potável (amostra) para um béquer de 100 mL, adicionar uma barra magnética (peixinho) e agitar em agitador magnético com agitação lenta e constante. Em seguida realizar a adição dos volumes indicados de padrão de fluoretos 1000 mg L⁻¹ para cada concentração de acordo com a Tabela 8.

➤ **Procedimentos**

Realizar a leitura seguindo o procedimento descrito no método analítico, item 3.3.1.2
Tabelar todos os resultados e realizar a regressão linear da curva analítica através do método por mínimos quadrados e avaliar:

- Coeficiente angular (inclinação da reta);
- Coeficiente linear (intercepto com o eixo y);

- Coeficiente de correlação (r);
- Coeficiente de Determinação (R^2);
- Plotar o gráfico dos resíduos padronizados resultante da regressão linear;
- Avaliar visualmente o gráfico da linearidade e dos resíduos padronizados.
- Realizar o teste da igualdade de variâncias (Teste de Cochran) com nível de significância de 5 %.
- Avaliar a existência de valores anômalos através do Teste de Grubbs.

3.4.5.1 Critério de aceitação

Conforme ANVISA (2017):

- O coeficiente de correlação de Pearson (R) deve ser igual ou maior que 0,99;
- O coeficiente de determinação (R^2) deve ser igual ou superior a 0,98 para o modelo de Mínimos Quadrados Ordinários;
- O Teste de Cochran deve indicar homogeneidade entre as variâncias dos diversos níveis da linearidade (homocedasticidade).
- O Teste de Grubbs: este teste será aplicado nos valores de resíduos, que forem obtidos pelo teste ANOVA, para verificar a presença de *outliers* nos resultados do gráfico gerado. Não deve apresentar tendência na distribuição dos resíduos (os resíduos devem estar distribuídos aleatoriamente em torno do eixo x, ou seja, devem apresentar homocedasticidade);
- Os resultados dos resíduos devem apresentar-se dentro do intervalo de \pm duas vezes o erro padrão obtido na regressão linear.

3.4.6 PRECISÃO

A precisão do método analítico será verificada em dois níveis: repetibilidade e a precisão intermediária.

3.4.6.1 Repetibilidade

Serão avaliadas 3 (três) amostras em concentrações baixa, média e alta com 3 (três) réplicas em cada nível (190 %, 100 % e 10 %) da concentração do teste concentração,

individualmente preparadas, sob as mesmas condições de operação e instrumentação e mesmo operador.

3.4.6.2 Precisão intermediária

Será preparada conforme repetibilidade, porém, em um segundo dia sendo realizada por outro operador ou/em outro laboratório.

➤ Preparo das soluções

Soluções Precisão – Preparar em triplicata cada nível de concentração, transferindo 25,0 mL de solução tampão TISAB II, 25 mL de água potável (amostra) para um béquer de 100 mL, adicionar uma barra magnética (peixinho) e agitar em agitador magnético com agitação lenta e constante. Em seguida realizar a adição dos volumes indicados de padrão de fluoretos 1000 mg L⁻¹ para cada concentração de acordo com a Tabela 9.

Tabela 9. Preparo das soluções para avaliação da precisão.

Solução Precisão (%)	Concentração (mg L ⁻¹)	Volume a ser pipetado do padrão de 1000 mg L ⁻¹ (mL)
10	0,15	3,8
100	1,50	37,5
190	2,85	71,3

Solução amostra

Preparar em Triplicata - Transferir 25 mL da amostra (água potável) para um béquer de 100 mL, adicionar 25,0 mL de solução tampão TISAB II, adicionar uma barra magnética (peixinho) e agitar em agitador magnético com agitação lenta e constante.

➤ Procedimentos

Realizar a leitura seguindo o procedimento descrito no método analítico, item 3.3.1.2

Avaliar o desvio padrão relativo (DPR %) entre as 3 amostras de cada nível de concentração e este deve estar de acordo com a relação massa/massa da tabela da AOAC.

➤ Cálculos

Para calcular o desvio padrão relativo das réplicas (DPR) de cada nível de concentração, primeiramente é necessário calcular o valor da concentração para cada solução, de acordo com a equação:

$$[F^-] = 10^{\left(\frac{U-B}{A}\right)} \quad (4)$$

Onde: $[F^-]$ é a concentração de fluoretos em mg L^{-1} obtida, U é a medida do potencial obtido na análise da solução, A é o coeficiente angular obtido através da regressão das três curvas de linearidade e B é o coeficiente linear da reta obtido através da regressão das três curvas de linearidade.

Calcular o desvio padrão (s) das concentrações obtidos entre as réplicas cada nível conforme equação abaixo:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\text{Concentração} - \overline{M\text{Concentração}})^2}{n-1}} \quad (5)$$

Onde s é o desvio padrão **Concentração** são os valores individuais de concentração em mg L^{-1} obtidas de cada solução no mesmo nível e $\overline{M\text{Concentração}}$ é a média dos valores individuais de concentração determinada, e n é o número de soluções preparadas.

E calcular o desvio padrão relativo pela seguinte equação:

$$DPR = \frac{s \times 100}{\overline{M\text{Concentração}}} \quad (6)$$

Onde: DPR é o desvio padrão relativo entre as amostras, s é o desvio padrão das amostras e $\overline{M\text{Concentração}}$ a média dos valores individuais de concentração.

3.4.6.3 Critério de aceitação

Repetibilidade: A avaliação dos resultados na recuperação total será realizada através do desvio padrão relativo de cada nível (baixo, médio e alto). O desvio padrão relativo das três réplicas de cada nível de concentração deve estar abaixo da especificação, conforme Tabela 10.

Tabela 10. Especificação de desvio padrão relativo na precisão (Repetibilidade).

Concentração da impureza em relação a massa total (%)	DPR (%) ¹
0,15 mg L ⁻¹ (10 % da especificação)	≤ 15
De 1,50 mg L ⁻¹ (100 % da especificação) e 2,85mg L ⁻¹ (190% da especificação)	≤ 11

¹AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures.

Intermediária: A precisão intermediária será avaliada através do desvio padrão relativo entre as recuperações totais obtidos em cada nível de concentração no primeiro e no segundo dia de análise. O desvio padrão relativo dos resultados obtidos nos dois dias de análise, quando comparadas as 6 réplicas, não deve ser superior aos apresentados para as respectivas concentrações na Tabela 11.

Tabela 11. Especificação de desvio padrão relativo na precisão (Intermediária).

Conc. da impureza em relação a massa total (%)	DPR (%) ¹
0,15 mg L ⁻¹ (10 % da especificação)	≤ 22
De 1,50 mg L ⁻¹ (100 % da especificação) e 2,85mg L ⁻¹ (190% da especificação)	≤ 16

¹AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures.

3.4.7 EXATIDÃO

Para este parâmetro será realizado o preparo de 3 (três) determinações, cada uma com 3 concentrações (10, 100 e 190 % da especificação máxima), representando baixa média e alta concentração de analito, além disto será realizada adição de amostra (matriz) em cada ponto. Cada curva será avaliada em 0,15 e 2,85 mg L⁻¹, além de um ponto central 100 % na concentração máxima nominal na amostra (até 1,50 mg L⁻¹) do método analítico de determinação. Três amostras controle serão analisadas para verificação do incremento da concentração de fluoretos por conta da amostra.

➤ Preparo das soluções

Soluções Exatidão – Preparar três amostras para cada nível de concentração, transferindo 25,0 mL de solução tampão TISAB II, 25 mL de água potável (amostra) para um béquer de 100 mL, adicionar uma barra magnética (peixinho) e agitar em agitador magnético

com agitação lenta e constante. Em seguida realizar a adição dos volumes indicados de padrão de fluoretos 1000 mg L⁻¹ para cada concentração de acordo com a Tabela 9.

Solução amostra

Preparar três amostras transferindo 25 mL da amostra para um béquer de 100 mL, adicionar 25,0 mL de solução tampão TISAB II, adicionar uma barra magnética (peixinho) e agitar em agitador magnético com agitação lenta e constante.

➤ Procedimentos

Realizar a determinação conforme o procedimento descrito no método analítico, item 3.3.1.2

➤ Cálculos

A exatidão será expressa pela relação entre a concentração determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, relação esta, denominada de recuperação e será calculada pela equação de acordo com cada nível de concentração (10, 100 e 190 %):

$$Exatidão = \frac{Concentração\ média\ experimental \times 100}{Concentração\ teórica} \quad (7)$$

Calcular o desvio padrão (*s*) das concentrações obtidos entre as réplicas cada nível conforme equação (5).

E calcular o desvio padrão relativo pela equação (6).

3.4.7.1 Critério de aceitação

A diferença entre a quantidade adicionada (teórica) e a recuperada (experimental) deve estar contida na faixa descrita, seguindo critério de aceitação conforme a Tabela 12 (AOAC, 2012).

Tabela 12. Critérios de aceitação para recuperação na exatidão

Nível (mg L ⁻¹)	Recuperação (%) ¹
2,85 mg L ⁻¹	
1,50 mg L ⁻¹	80–110
0,15 mg L ⁻¹	

¹AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures.

O desvio padrão relativo das três réplicas de cada nível de concentração deve estar abaixo da especificação, conforme Tabela 13 (AOAC, 2012).

Tabela 13. Critérios de aceitação para desvio padrão relativo na exatidão

Conc. da impureza em relação a massa total (%)	DPR (%) ¹
0,15 mg L ⁻¹ (10 % da especificação)	≤ 15
De 1,50 mg L ⁻¹ (100 % da especificação) e 2,85 mg L ⁻¹ (190% da especificação)	≤ 11

¹AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures.

3.4.8 ROBUSTEZ

Para indicar a capacidade do método analítico em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas, o método em questão, será analisado verificando o tempo de estabilização do potencial medido pelo eletrodo. Os resultados serão avaliados para verificar o impacto desta variação sobre os resultados.

➤ Preparo das soluções

Soluções Robustez – Preparar cada concentração em Triplicata - Transferir 25,0 mL de solução tampão TISAB II, 25 mL de água potável (amostra) para um béquer de 100 mL, adicionar uma barra magnética (peixinho) e agitar em agitador magnético com agitação lenta e constante. Em seguida realizar a adição dos volumes indicados de padrão de fluoretos 1000 mg L⁻¹ para cada concentração de acordo com a Tabela 9.

Tabela 14. Preparo das soluções robustez.

Solução Robustez (%)	Concentração (mg L ⁻¹)	Volume a ser pipetado do padrão de 1000 mg L ⁻¹ (mL)
10	0,15	3,8
100	1,50	37,5
190	2,85	71,3

➤ Procedimentos

Realizar a leitura seguindo o procedimento descrito no método analítico, item 3.3.1.2

Os valores de potencial devem ser aferidos e os dados anotados a partir do momento em que o eletrodo é colocada na solução e também em um intervalo de 1 em 1 minuto até completar 10 minutos.

3.4.8.1 Critério de aceitação

A robustez não é um parâmetro que inviabiliza uma validação analítica. Desde que o método atenda os demais parâmetros de validação e as condições de operação utilizadas durante a validação sejam mantidas constantes, o método ainda pode ser considerado validado. Como o teste de robustez permite conhecer quais variáveis influenciam no método, para a implementação do mesmo na rotina de análise, deve-se adicionar ao método, uma forma de controle destas condições durante a execução da análise.

3.4.9 Tratamento estatístico

O tratamento dos dados foi realizado em software estatístico PortalAction versão 3.6.331.450 build 7, juntamente com software matemático *Microsoft Excel 2017 32 bits* (ESTATCAMP, 2014).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SELETIVIDADE

Para garantir a seletividade do método analítico, foi preparada uma curva de calibração, juntamente com as soluções seletividades descritas no preparo de soluções analíticas. A leitura foi realizada conforme procedimento e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 14.

Tabela 15. Curva de calibração, regressão linear e quantificação das soluções seletividade.

Concentração (mg L ⁻¹)	Log concentração (mg L ⁻¹)	U (mV)	
0,15	-0,8239	157,4	
0,6	-0,2218	124,1	
1,05	0,0212	109,9	
1,5	0,1761	101,1	
1,95	0,2900	94,5	
2,4	0,3802	89,3	
2,85	0,4548	84,8	
Regressão Linear Seletividade			
A	B	R ²	R
-56,7731	110,972	0,9999	0,9999
Solução Fluoretos			
Potencial (mV)		100,9	
Concentração recuperada F ⁻ (mg L ⁻¹)		1,50	
Solução Alumínio			
Potencial (mV)		101,3	
Concentração recuperada F ⁻ (mg L ⁻¹)		1,48	
Solução Ferro			
Potencial (mV)		100,9	
Concentração recuperada F ⁻ (mg L ⁻¹)		1,50	

A regressão foi considerada linear com um R² de 0,9999 e as recuperações dos padrões de fluoretos sobre a adição em cada uma das soluções seletividade está demonstrada pelos resultados expostos na Tabela 15.

Tabela 16. Recuperação e diferença do padrão de fluoretos das soluções seletividade.

Identificação	Concentração determinada mg L ⁻¹	Recuperação (%)	Varição (%)	Desvio Padrão Precisão (%)
Fluoreto	1,50	100,0	0,0	1,3
Alumínio	1,48	98,7	1,3	
Ferro	1,50	100,0	0,0	

A concentração de fluoretos recuperada na solução contaminada com Alumínio apresentou uma diferença de 1,3 % em relação a solução controle adicionada somente de fluoretos e obteve 98,7 % de recuperação de fluoretos. A solução seletividade contaminada com Ferro, não apresentou diferença em relação a concentração adicionada e obteve uma recuperação de 100 %.

Através dos dados é possível observar pequenas diferenças na recuperação da concentração adicionada e que a variação apresentada ficou dentro do valor de desvio padrão obtido durante a precisão. Portanto, o método atendeu o critério de aceitação e foi considerado seletivo.

4.2 ESTUDO DE EFEITO DO TAMPÃO SOBRE A CURVA DE CALIBRAÇÃO

Para verificar a interferência do tampão, comparou-se os resultados obtidos a partir de duas curvas preparadas conforme preparo das soluções analíticas, a leitura foi realizada conforme procedimento e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 16, a regressão dos dados está expressos na figura 1.

Tabela 17. Resultados para curva de calibração com e sem tampão.

Concentração mg L ⁻¹	Log Concentração mg L ⁻¹	U (mV) Água	U (mV) Tampão
0,15	-0,8239	145,7	157,4
0,6	-0,2218	112,3	124,1
1,05	0,0212	98	109,9
1,5	0,1761	88,7	101,1
1,95	0,2900	82	94,5
2,4	0,3802	77	89,3
2,85	0,4548	72,6	84,8

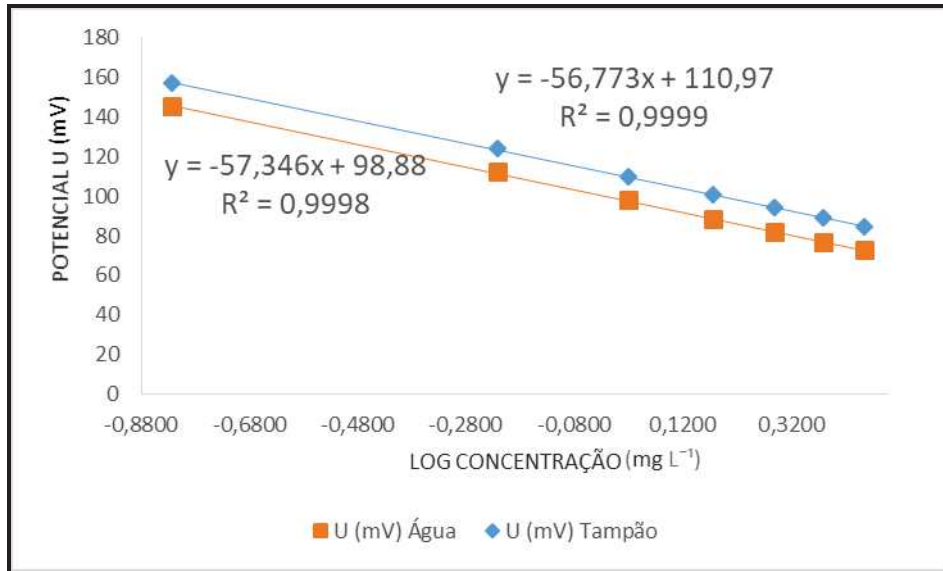


Figura 1. Comportamento das curvas de calibração fluoretos.

O efeito matriz deve ser determinado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração, através do paralelismo das retas, indicando assim a ausência de interferência dos constituintes da matriz.

▪ Tratamento estatístico

A seguir, nas Tabelas 17, 18, 19, 20, 21 e 22 estão apresentamos os dados referentes ao tratamento estatístico.

Tabela 18. Curva de calibração em relação a condição estudo de efeito do tampão.

Log Concentração (mg L ⁻¹)	Potencial (mV)	Condição
-0,8239	145,7	Água
-0,2218	112,3	Água
0,0212	98,0	Água
0,1761	88,7	Água
0,2900	82,0	Água
0,3802	77,0	Água
0,4548	72,6	Água
-0,8239	157,4	Tampão
-0,2218	124,1	Tampão
0,0212	109,9	Tampão
0,1761	101,1	Tampão
0,2900	94,5	Tampão
0,3802	89,3	Tampão
0,4548	84,8	Tampão

Tabela 19. Anova regressão através do método dos mínimos quadrados efeito do tampão.

	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Log Concentração (mg L ⁻¹)	1	7710,5865	7710,5865	52737,6115	0
Condição	1	513,6457	513,6457	3513,1501	0
Log Concentração (mg L ⁻¹):Condição	1	0,1943	0,1943	1,3287	0,2758
Resíduos	10	1,4621	0,1462		

Tabela 20. Coeficientes efeito do tampão.

	Estimativa	Desvio Padrão	Estat.t	P-valor
Intercepto	98,8804	0,1452	681,0522	0
Log Concentração (mg L ⁻¹)	-57,346	0,3514	-163,1998	0
Condição Tampão	12,0916	0,2053	58,8899	0
Log Concentração (mg L ⁻¹): Condição Tampão	0,5728	0,4969	1,1527	0,2758

Tabela 21. Medida descritiva da qualidade do ajuste coeficientes efeito do tampão.

Desvio Padrão dos Resíduos	Graus de Liberdade	R ²	R ² Ajustado
0,3824	10	0,9998	0,9998

Tabela 22. Intervalo de confiança para os parâmetros efeito do tampão.

	2.5 %	97.5 %
Intercepto	98,5569	99,2039
Log Concentração (mg L ⁻¹)	-58,1289	-56,563
Condição Tampão	11,6342	12,5491
Log Concentração (mg L ⁻¹):Condição Tampão	-0,5344	1,6801

Tabela 23. Teste de comparação efeito do tampão.

	G.L.	Soma de Quadrados	Estat. F	P-valor
Paralelismo	1	0,1943	1,3287	0,2758

Para a comparação entre os métodos, o teste de paralelismo é formulado sobre as seguintes hipóteses:

- Ho: $\beta_1 = \beta_2$ (as retas possuem o mesmo coeficiente angular);
- Ha: $\beta_1 \neq \beta_2$ (as restas possuem coeficiente angular distintos).

Como P-valor (0,2758) do teste de paralelismo é maior que 0,05, neste caso, ao nível de significância de 5 % pode-se dizer que as retas são paralelas ficando assim comprovado que o tampão não interfere na determinação da análise.

4.3 ESTUDO DE EFEITO DA MATRIZ SOBRE CURVA DE CALIBRAÇÃO

Para garantir a seletividade do método analítico, comparou-se os resultados obtidos a partir de duas curvas preparadas conforme preparo das soluções analíticas, a leitura foi realizada conforme procedimento e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 23 e a regressão dos dados está expressa na figura 2.

Tabela 24. Curva de calibração fluoretos com padrão e amostra contaminada.

[Concentração] (mg L ⁻¹)	Log concentração (mg L ⁻¹) ¹⁾	U (mV) Amostra + Padrão F ⁻	U (mV) Padrão F ⁻
0,15	-0,82	158,5	157,4
0,60	-0,22	126,0	124,1
1,05	0,02	111,9	109,9
1,50	0,18	102,8	101,1
1,95	0,29	96,1	94,5
2,40	0,38	90,7	89,3
2,85	0,45	86,2	84,8

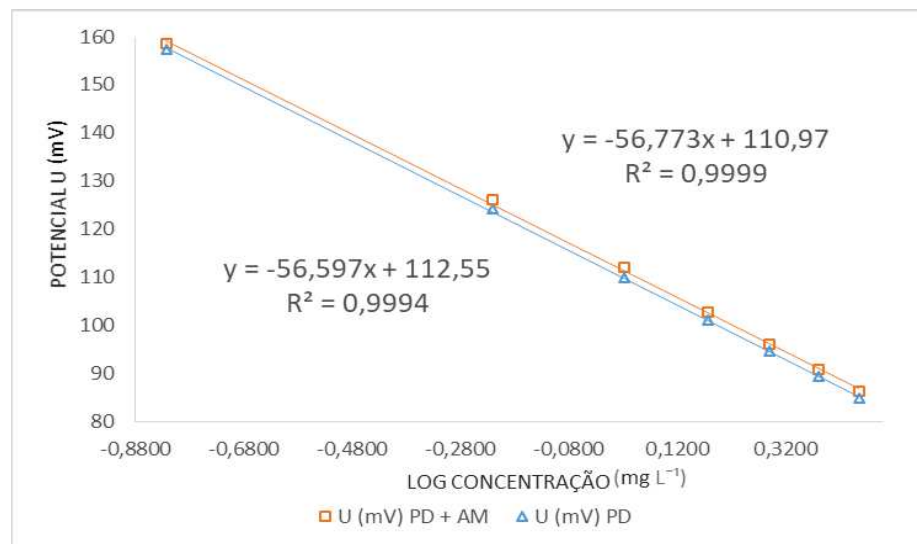


Figura 2. Comportamento das curvas de calibração fluoretos efeito da matriz.

▪ Tratamento estatístico

A seguir, nas Tabelas 24, 25, 26, 27, 28 e 29 estão apresentamos os dados referentes ao tratamento estatístico.

Tabela 25. Curva de calibração em relação a condição efeito da matriz.

Log Concentração (mg L ⁻¹)	U (mV)	Condição
-0,8239	158,5	Com Amostra
-0,2218	126,0	Com Amostra
0,0212	111,9	Com Amostra
0,1761	102,8	Com Amostra
0,2900	96,1	Com Amostra
0,3802	90,7	Com Amostra
0,4548	86,2	Com Amostra
-0,8239	157,4	Sem Amostra
-0,2218	124,1	Sem Amostra
0,0212	109,9	Sem Amostra
0,1761	101,1	Sem Amostra
0,2900	94,5	Sem Amostra
0,3802	89,3	Sem Amostra
0,4548	84,8	Sem Amostra

Tabela 26. Anova regressão através do método dos mínimos quadrados efeito da matriz.

	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Log Concentração (mg L ⁻¹)	1	7609,7266	7609,7266	28630,8906	0
Condição	1	8,8007	8,8007	33,1119	0,0002
Log Concentração (mg L ⁻¹):Condição	1	0,0183	0,0183	0,069	0,7981
Resíduos	10	2,6579	0,2658		

Tabela 27. Coeficientes efeito da matriz.

	Estimativa	Desvio Padrão	Estat.t	P-valor
Intercepto	112,5508	0,1958	574,9568	0
Log Concentração (mg L ⁻¹)	-56,5971	0,4738	-119,4614	0
Condição Sem amostra	-1,5788	0,2768	-5,7028	0
Log Concentração (mg L ⁻¹): Condição Sem amostra	-0,176	0,67	-0,2627	0,2758

Tabela 28. Medida descritiva da qualidade do ajuste efeito da matriz.

Desvio Padrão dos Resíduos	Graus de Liberdade	R ²	R ² Ajustado
0,5155	10	0,9997	0,9995

Tabela 29. Intervalo de confiança para os parâmetros efeito da matriz.

	2.5 %	97.5 %
Intercepto	112,1146	112,987
Log Concentração (mg L ⁻¹)	-57,6528	-55,5415
Condição Sem Amostra	-2,1956	-0,9619
Log Concentração (mg L ⁻¹): Condição Sem Amostra	-1,6689	1,3169

Tabela 30. Teste de comparação efeito da matriz.

	G.L.	Soma de Quadrados	Estat. F	P-valor
Paralelismo	1	0,0183	0,069	0,7981

O teste de paralelismo é formulado na forma:

- Ho: $\beta_1 = \beta_2$ (as retas possuem o mesmo coeficiente angular);
- Ha: $\beta_1 \neq \beta_2$ (as restas possuem coeficiente angular distintos).

Como P-valor (0,7981) do teste de paralelismo é maior que 0,05, neste caso, ao nível de significância de 5 % pode-se dizer que as retas são paralelas, comprovando assim que o tampão não influência na quantificação dos fluoretos.

▪ Quantificação das amostras frente as curvas

Os resultados da determinação de fluoretos presentes nas amostras quantificadas por ambas as curvas indicaram ausência de fluoretos nas amostras, conforme Tabela 30.

Tabela 310. Regressão linear das curvas de calibração e quantificação das amostras.

Regressão Curva Amostra + Padrão			
A	B	R2	R
-56,5971	112,5508	0,99945	0,99972
Regressão Curva Padrão			
A	B	R2	R
-56,7731	110,9720	0,99985	0,99993
Quantificação da amostra Curva Padrão			
Identificação	Potencial (mV)	Concentração (mg L ⁻¹)	
Amostra 1	226	< 0,15	
Amostra 2	228	< 0,15	
Amostra 3	224	< 0,15	

Quantificação da amostra Curva Amostra + Padrão		
Identificação	Potencial (mV)	Concentração (mg L ⁻¹)
Amostra 1	226	< 0,15
Amostra 2	228	< 0,15
Amostra 3	224	< 0,15

Nas amostras a evidenciou-se concentrações inferiores à 0,15 mg L⁻¹ de fluoretos, os resultados obtidos demonstram que a diferença entre o comportamento das curvas com e sem adição de matriz não foi significativa, assim como se verificou que a quantificação da amostra não sofreu interferência quando comparadas as duas curvas. Portanto, o método é considerado seletivo.

4.4 LINEARIDADE

As amostras e as curvas foram preparadas conforme o preparo de soluções analíticas e as leituras foram realizadas conforme o procedimento. Os resultados obtidos para cada nível de concentração estão dispostos na Tabela 31.

Na Figura 3, está apresentado o gráfico de linearidade com sua respectiva equação da reta. O resultado obtido para o coeficiente de correlação (R) foi 0,9996 e para o coeficiente de determinação (R²) 0,9991, sendo estes considerados satisfatórios, visto que o critério mínimo aceitável para o R é 0,99 e para o R² é de 0,98.

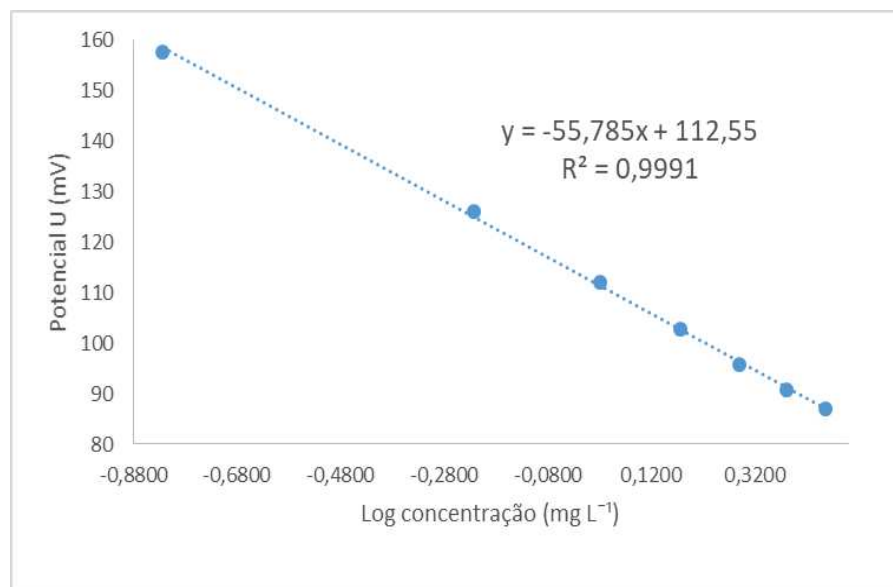


Figura 3. Gráfico da linearidade.

Tabela 32. Curvas das soluções da linearidade.

Amostra	Concentração (mg L ⁻¹)	Log concentração (mg L ⁻¹)	U (mV)	Concentração (mg L ⁻¹)	DPR
			157,7	0,15	
10 %	0,15	-0,8239	157,8	0,15	0,9
			157,4	0,16	
			126,1	0,57	
40 %	0,60	-0,2218	125,8	0,57	1,2
			125,5	0,58	
			112,2	1,00	
70 %	1,05	0,0212	112,0	1,01	1,3
			111,6	1,03	
			102,7	1,49	
100 %	1,50	0,1761	102,5	1,50	1,3
			102,1	1,52	
			95,9	1,97	
130 %	1,95	0,2900	95,9	1,97	0,7
			95,6	1,99	
			90,8	2,42	
160 %	2,40	0,3802	90,6	2,44	1,3
			90,2	2,49	
			87,0	2,84	
190 %	2,85	0,4548	86,3	2,92	1,5
			86,5	2,89	

Os resultados para o teste de Cochran estão demonstrados na Tabela 32 os valores tabelados de pela tabela de Cochran a um nível de significância de 5% utilizados para a avaliação estão apresentados no anexo figura 5.

O teste de Cochran demonstrou que as variâncias são homocedásticas, uma vez que $C_{\text{calculado}}$ 0,0018, foi inferior ao valor C_{tabelado} 0,6771 (depende do número de repetições e do número de níveis de concentração).

Tabela 33. Tabela de resultados para o teste de Cochran.

Concentração (mg L-1)	Variâncias	Maior Variância
0,15		0,0018
0,15	0,0000	
0,16		Cochran calculado
0,57		
0,57	0,0001	
0,58		0,5131
1,00		
1,01	0,0002	Cochran Tabelado (k=3 n=7)
1,03		
1,49		
1,50	0,0004	0,6771
1,52		
1,97		
1,97	0,0002	
1,99		
2,42		
2,44	0,0010	
2,49		
2,84		
2,92	0,0018	
2,89		

A Tabela 33 demonstra os resultados da análise dos mínimos quadrados para o intervalo de 10 a 190 %, na qual pode-se observar que o F de significação se mostrou menor que 0,05 (nível de significância) em ambos os casos, garantido a validade da regressão linear com nível de confiança de 95 %.

Tabela 34. Anova regressão linear.

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	11114,47	11114,47	22001,34	1,41E ⁻³⁰
Resíduo	19	9,598275	0,505172		
Total	20	11124,07			
		Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P
Interseção		112,3151027	0,155813631	720,8297642	1,27657E ⁻⁴³
Variável X 1		-55,93497729	0,377102026	-148,3284985	1,40719E ⁻³⁰

Nota-se também que o p-valor para a Variável X (1,40719E⁻³⁰) é menor que 0,05 (nível de significância α).

Logo, rejeita-se a hipótese nula (H_0) de que estatisticamente o coeficiente angular é igual a zero, portanto, pode-se concluir que estatisticamente o coeficiente angular é significativamente diferente de zero.

Constata-se que o resultado para o p-valor para o valor do intercepto ($1,27657E^{-43}$) é menor que o valor do nível de significância α (0,05), logo rejeita-se a hipótese nula (H_0) de que o intercepto (coeficiente linear) é estatisticamente igual a zero.

O gráfico dos resíduos (Figura 4) mostra que os erros são independentes, de média nula e de variância constante, uma vez que os pontos se apresentaram distribuídos de forma aleatória em torno da reta de resíduo zero, com variância homogênea no início e no final das observações.

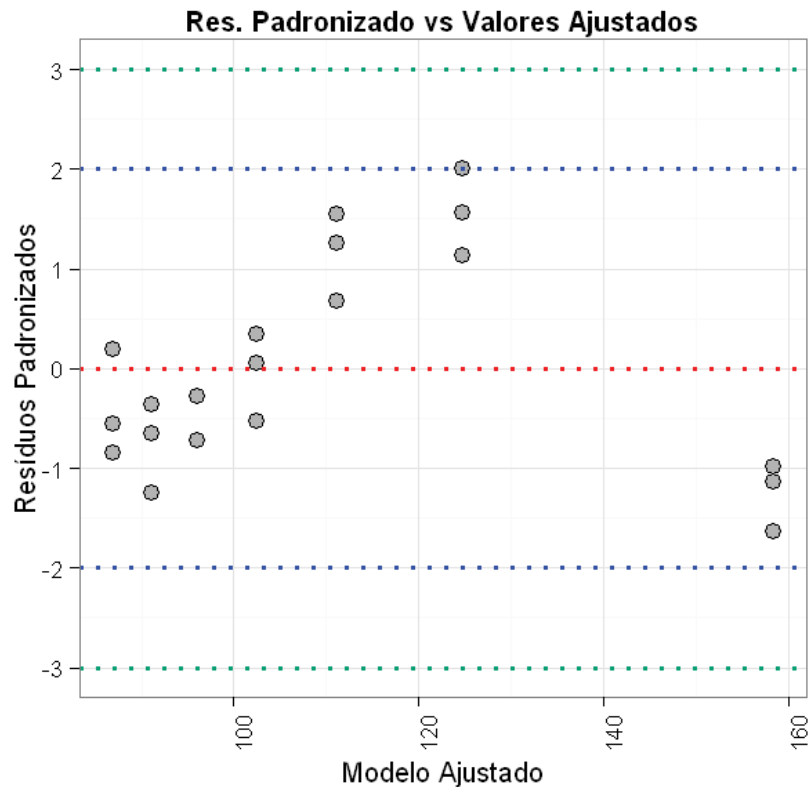


Figura 4. Gráfico de resíduos.

O teste de Grubbs tem como objetivo verificar a existência de valores considerados anômalos (*outliers*) em relação ao seu espaço amostral. Este teste foi aplicado nos valores de resíduos, obtidos pelo teste ANOVA, para verificar a presença de *outliers* nos resultados dos resíduos (Figura 4). A Tabela 35 apresenta os resultados dos resíduos obtidos para a análise de Grubbs na determinação de Fluoretos.

Tabela 35. Tabela de resultados para o teste de Grubbs

Observação	Resíduos	Valor calculado	Especificação (n = 21)
1	-1,011059	1,01	
2	-0,866709	0,87	
3	-1,444111	1,44	
4	1,985964	1,99	
5	1,552912	1,55	
6	1,119861	1,12	
7	1,544724	1,54	
8	1,256023	1,26	
9	0,678621	0,68	
10	0,338586	0,34	
11	0,049884	0,05	$\leq 2,58$
12	-0,527518	0,53	
13	-0,277187	0,28	
14	-0,277187	0,28	
15	-0,710238	0,71	
16	-0,357983	0,36	
17	-0,646684	0,65	
18	-1,224086	1,22	
19	0,182797	0,18	
20	-0,827657	0,83	
21	-0,538955	0,54	

Considerando o valor de $n = 21$, com nível de confiança de 95 %, tem-se que o valor tabelado para o número de replicatas é 2,58 (depende do número de repetições e do número de níveis de concentração, utiliza-se 0,05 % de significância, conforme anexo figura 6). Comparando este valor (2,58) com os valores calculados pelo teste de Grubbs verifica-se que nenhum dos valores calculados é maior que o valor tabelado, portanto, não há presença de *outliers* nos resultados da análise.

A partir dos dados apresentados, pode-se concluir que o método proposto para análise de Fluoretos possui resposta linear para a quantificação nas condições da análise.

4.5 PRECISÃO

Para avaliação da precisão, foram realizadas nove determinações, triplicada em cada nível das concentrações de 190 %, 100 % e 10 % da concentração máxima permitida 1,5 mg L⁻¹. Os resultados obtidos no primeiro e segundo dia de análise, bem como a comparação de precisão intermediária, estão representados na Tabela 36 e 37.

Tabela 36. Resultados do teste de precisão 1º dia.

Amostra	Concentração (mg L ⁻¹)	Log concentração (mg L ⁻¹)	U (mV)	Concentração (mg L ⁻¹)	DPR
10 %	0,15	-0,8239	157,7	0,15	0,9
	0,15	-0,8239	157,8	0,15	
	0,15	-0,8239	157,4	0,16	
40 %	0,60	-0,2218	126,1	0,57	1,2
	0,60	-0,2218	125,8	0,57	
	0,60	-0,2218	125,5	0,58	
70 %	1,05	0,0212	112,2	1,00	1,3
	1,05	0,0212	112,0	1,01	
	1,05	0,0212	111,6	1,03	
100 %	1,50	0,1761	102,7	1,49	1,3
	1,50	0,1761	102,5	1,50	
	1,50	0,1761	102,1	1,52	
130 %	1,95	0,2900	95,9	1,97	0,7
	1,95	0,2900	95,9	1,97	
	1,95	0,2900	95,6	1,99	
160 %	2,40	0,3802	90,8	2,42	1,3
	2,40	0,3802	90,6	2,44	
	2,40	0,3802	90,2	2,49	
190 %	2,85	0,4548	87,0	2,84	1,5
	2,85	0,4548	86,3	2,92	
	2,85	0,4548	86,5	2,89	
CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO DPR (AOAC, 2012)			0,15 mg L ⁻¹ (10 % da especificação) ≤ 15 1,50 mg L ⁻¹ a 2,85mg L ⁻¹ ≤ 11		

Tabela 37. Resultados do teste de precisão 2º dia.

Amostra	Concentração (mg L ⁻¹)	Log concentração (mg L ⁻¹)	U	Concentração (mg L ⁻¹)	DPR
10 %	0,15	-0,8239	158,7	0,16	1,6
	0,15	-0,8239	159,3	0,15	
	0,15	-0,8239	159,4	0,15	
40 %	0,60	-0,2218	127,9	0,57	1,2
	0,60	-0,2218	127,6	0,57	
	0,60	-0,2218	127,3	0,58	
70 %	1,05	0,0212	114,0	1,01	2,1
	1,05	0,0212	113,3	1,04	
	1,05	0,0212	113,0	1,05	
100 %	1,50	0,1761	104,8	1,48	1,1
	1,50	0,1761	104,3	1,51	
	1,50	0,1761	104,4	1,50	
130 %	1,95	0,2900	98,0	1,96	0,6
	1,95	0,2900	98,2	1,94	
	1,95	0,2900	97,9	1,97	
160 %	2,40	0,3802	92,8	2,43	0,5
	2,40	0,3802	92,6	2,45	
	2,40	0,3802	92,8	2,43	
190 %	2,85	0,4548	88,5	2,90	0,2
	2,85	0,4548	88,4	2,92	
	2,85	0,4548	88,4	2,92	
CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO DPR (AOAC, 2012)		0,15 mg L ⁻¹ (10 % da especificação) ≤ 15			
		1,50 mg L ⁻¹ a 2,85mg L ⁻¹ ≤ 11			

Como demonstrado nas tabelas acima, o desvio padrão relativo entre a triplicata de cada concentração analisada (inferiores a 2,1 %) foi menor que os valores propostos (AOAC 2012), tanto no primeiro quanto no segundo dia de análise, demonstrando assim a Repetibilidade do método.

A Tabela 38 demonstra o Desvio padrão relativo apresentado entre as amostras de mesma concentração levando em consideração as duas precisões.

Tabela 38. Resultados da avaliação da precisão intermediária entre 1° e 2° dias.

CONCENTRAÇÃO TEÓRICA (mg L ⁻¹)	PRECISÃO 1° DIA Concentração (mg L ⁻¹)	PRECISÃO 2° DIA Concentração (mg L ⁻¹)	DPR
0,15	0,15	0,16	1,1
	0,15	0,15	
	0,16	0,15	
0,60	0,57	0,57	1,1
	0,57	0,57	
	0,58	0,58	
1,05	1,00	1,01	1,8
	1,01	1,04	
	1,03	1,05	
1,50	1,49	1,48	1,1
	1,50	1,51	
	1,52	1,50	
1,95	1,97	1,96	0,8
	1,97	1,94	
	1,99	1,97	
2,40	2,42	2,43	0,9
	2,44	2,45	
	2,49	2,43	
2,85	2,84	2,90	1,1
	2,92	2,92	
	2,89	2,92	
CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO DPR (AOAC, 2012)		0,15 mg L ⁻¹ (10 % da especificação) ≤ 22	
		1,50 mg L ⁻¹ a 2,85mg L ⁻¹ ≤ 16	

Da mesma maneira, a comparação dos resultados entre dias diferentes (precisão intermediária), também apresentou o desvio padrão relativo entre as seis amostras de mesma concentração, dentro dos critérios de aceitação (inferiores a 1,8 %). Desta forma, considerando os resultados apresentados, o método é considerado preciso.

4.6 EXATIDÃO

A exatidão foi realizada em três níveis de concentração: baixo, médio e alto. Sendo preparadas soluções nos níveis de concentração de 10, 100 e 190 % da especificação máxima de 1,5 mg L⁻¹. As recuperações obtidas em cada solução, em cada nível de concentração, bem como o DPR de cada triplicata, estão dispostas na Tabela 39.

Tabela 39. Resultados para recuperação e desvio padrão relativo na exatidão.

Amostra	Concentração (mg L ⁻¹)	Log concentração (mg L ⁻¹)	U (mV)	Concentração (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	DPR
10 %	0,15	-0,8239	157,7	0,15	103	0,9
	0,15	-0,8239	157,8	0,15	103	
	0,15	-0,8239	157,4	0,16	104	
100 %	1,5	0,1761	102,7	1,49	99	1,3
	1,5	0,1761	102,5	1,50	100	
	1,5	0,1761	102,1	1,52	102	
190 %	2,85	0,4548	87,0	2,84	99	1,5
	2,85	0,4548	86,3	2,92	102	
	2,85	0,4548	86,5	2,89	102	

CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO EXATIDÃO (AOAC, 2012) 0,15 à 2,85mg L⁻¹ Recuperação de 80 à 110%

Os resultados de potencial e quantificação da concentração de fluoretos obtidos para as amostras estão dispostos na Tabela 40.

Tabela 40. Resultados para quantificação das amostras.

Regressão Linear			
A	B	R2	R
-55,9350	112,3151	0,9991	0,9996
Quantificação da amostra Curva Padrão			
Identificação	U (mV)	Concentração (mg L ⁻¹)	
Amostra 1	226	< 0,15	
Amostra 2	228	< 0,15	
Amostra 3	224	< 0,15	

Nas amostras a evidenciou-se concentrações inferiores à 0,15 mg L⁻¹ de fluoretos quando quantificadas frente à curva de linearidade, o resultado corrobora com o fato da fonte da água ser proveniente de poço artesiano.

Através dos resultados é possível verificar que os valores de recuperação obtidos em cada amostra nos níveis avaliados atendem o critério de aceitação estabelecido de 80 a 110 %, bem como os valores para Desvio Padrão Relativo entre as três réplicas de cada nível de concentração (inferiores a 1,5 %). Desta forma, comprova-se a exatidão do método analítico em questão.

4.7 ROBUSTEZ

A robustez foi testada em três níveis de concentração: baixo, médio e alto. Sendo preparadas soluções nos níveis de concentração de 10, 100 e 190 % da especificação máxima de 1,5 mg L⁻¹. As recuperações de concentrações obtidas nos diferentes níveis de concentração, bem como o DPR de durante o tempo de análise, estão dispostas nas Tabelas 41 e 42.

Tabela 41. Resultados para a curva de calibração de robustez.

Concentração (%)	Concentração (mg L ⁻¹)	Log concentração (mg L ⁻¹)	U (mV)
10 %	0,15	-0,8239	135
100 %	1,50	0,1760	99
190 %	2,85	0,4548	85
Regressão Curva Amostra + Padrão			
A	B	R2	R
-38,0859	104,5502	0,9999	0,9999

Tabela 42. Resultados para determinação de concentração nas amostras.

Tempo	Concentração (mg L ⁻¹)										DPR
	1 min	2 min	3 min	4 min	5 min	6 min	7 min	8 min	9 min	10 min	
10 % - 1	0,16	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,14	0,14	0,14	0,14	3,93
10 % - 1	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,93
10 % - 3	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,42
100 % - 1	1,29	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	0,19
100 % - 2	1,35	1,34	1,34	1,34	1,34	1,33	1,33	1,33	1,33	1,33	0,42
100 % - 3	1,33	1,33	1,33	1,33	1,32	1,32	1,32	1,32	1,32	1,32	0,31
190 % - 1	3,16	3,16	3,14	3,14	3,14	3,14	3,14	3,13	3,11	3,11	0,64
190 % - 2	3,22	3,22	3,22	3,18	3,16	3,16	3,16	3,14	3,14	3,13	1,11
190 % - 3	3,18	3,18	3,16	3,16	3,16	3,14	3,13	3,11	3,11	3,09	1,08

Como pode ser verificado pelos dados, a variação de concentração em função de tempo apresentou a maior variação na concentração de 0,15 mg L⁻¹ na leitura da amostra (DPR de 3,93 %).

O resultado pode estar relacionado ao tempo de estabilização do sinal gerado no eletrodo que, demora um maior tempo para estabilizar quando em baixas concentrações. No

entanto é possível verificar que esta variação diminui mesmo em baixas concentrações conforme as réplicas 2 e 3 na mesma concentração de $0,15 \text{ mg L}^{-1}$.

Desta forma, com o intuito de controlar esta variação na análise, será adicionado ao método um tempo de 10 minutos para estabilização do sinal antes da leitura na primeira amostra.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a adequação e validação do método analítico, conclui-se por meio da avaliação dos resultados, que o mesmo se mostrou seletivo, linear, preciso e exato. O método não se demonstrou robusto quando avaliado o tempo de estabilização, contudo quando controlado este fator através das alterações no método proposto conforme anexo figura 7, mantém-se as características já apresentadas na validação analítica. Desta forma conclui-se que considerando o método analítico em questão atende as especificações propostas nos para os parâmetros de validação analítica, podendo desta forma, ser considerado validado e está apto a ser utilizado para a determinação de fluoretos em água potável.

REFERÊNCIAS

- ANVISA, BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada-RDC Nº 166. Guia para validação de métodos analíticos 2017.
- AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures (1998) AOAC INTERNATIONAL, Rockville, MD, USA.
- AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements. 2012.
- APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 23th ed. Washington, 2017.
- APHA Method 4500-F: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 20th ed. Washington, 1999.
- BALOUCHE, A. et al. Sorption Kinetics, Isotherm and Thermodynamic Modeling of Defluoridation of Ground Water Using Natural Adsorbents. **American Journal Of Analytical Chemistry**. New York, p. 221-228. 15 abr. 2013. Disponível em: <<http://www.scirp.org/journal/ajac>>. Acesso em: 10 Agosto. 2019.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria de consolidação nº 2, de 28 de setembro de 2017. Promoção, proteção e recuperação da saúde. Diário Oficial da União, Seção 1, 2017.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 635, de 26 de dezembro de 1975. Aprova as Normas e Padrões, a seguir, sobre a fluoretação da água dos sistemas públicos de abastecimento destinadas ao consumo humano. Diário Oficial União, Seção 1, 1976.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União, nº 239, 2011.
- CONSELHO NACIONAL DE PESQUISA (U.S.). Fluoride in Drinking Water : A Scientific Review of EPA's Standards. Washington, D.C.: National Academies Press, 2006. Disponível em: <<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=186017&lang=pt-br&site=eds-live&scope=site>>. Acesso em: 13 Junho. 2019.
- CSUN Chemistry 321 Laboratory Manual Department of Chemistry, CSUN. Disponível em: <http://www.csun.edu/~hcchm003/321/321lmtoc.pdf>. Acesso em 10 agosto. 2019
- ESTATCAMP (2014). Software Action. Estatcamp- Consultoria em estatística e qualidade, São Carlos - SP, Brasil. Disponível em: <<http://www.portalaction.com.br/>>. Acesso em 21 Setembro. 2019.

FOJO, C. E. S. Ocorrência de fluoretos em sumos, néctares e refrigerantes comercializados em Portugal Continental. 2011. Tese de Doutoramento. Disponível em: <https://repositorio.ul.pt/handle/10451/11219>. Acesso em: 10 agosto. 2019.

FRAZÃO, P.; *et al.* Qualidade da água para consumo humano e concentração de fluoreto. *Revista de Saúde Pública*, v. 45, nº 5, p. 964-973, 2011.

METTLER-TOLEDO AG, PerfectION™ Guidebook. PerfectION™ Combination Fluoride Electrode ©, Abril. 2011.

METTLER-TOLEDO AG, Ficha de Dados de Segurança (FDS): PerfectION™ TISAB II with CDTA, 02 de Agosto. 2016.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Guia: Validação e Controle de Qualidade Analítica (Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários), Brasília, 2011.

SHARMA, B. *et al.* Occurrence, Detection and Defluoridation of Fresh Waters. *American Journal of Water Resources*, v. 5, nº 1, p. 5-12, 2017

SHILPA, R. Fluorosis and its relation to Dental Caries. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, v. 9, nº 7, p. 1237, 2017.

ANEXOS

k \ n	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	17	37	145	∞
2	0,9985	0,9750	0,9392	0,9057	0,8772	0,8534	0,8332	0,8159	0,8010	0,7880	0,7341	0,6602	0,5813	0,5000
3	0,9669	0,8709	0,7977	0,7457	0,7071	0,6771	0,6530	0,6333	0,6167	0,6025	0,5466	0,4748	0,4031	0,3333
4	0,9065	0,7679	0,6841	0,6287	0,5895	0,5598	0,5365	0,5175	0,5017	0,4884	0,4366	0,3720	0,3093	0,2500
5	0,8413	0,6838	0,5931	0,5441	0,5065	0,4783	0,4564	0,4387	0,4241	0,4118	0,3645	0,3066	0,2513	0,2000
6	0,7808	0,6161	0,5321	0,4803	0,4447	0,4194	0,3980	0,3817	0,3682	0,3568	0,3135	0,2612	0,2119	0,1667
7	0,7271	0,5612	0,4800	0,4307	0,3974	0,3726	0,3535	0,3384	0,3299	0,3154	0,2756	0,2278	0,1833	0,1429
8	0,6798	0,5157	0,4377	0,3910	0,3595	0,3362	0,3185	0,3043	0,2926	0,2829	0,2462	0,2022	0,1616	0,1250
9	0,6385	0,4775	0,4027	0,3584	0,3286	0,3067	0,2901	0,2768	0,2659	0,2568	0,2226	0,1820	0,1446	0,1111
10	0,6020	0,4450	0,3733	0,3311	0,3029	0,2823	0,2666	0,2541	0,2439	0,2353	0,2032	0,1655	0,1308	0,1000
12	0,5410	0,3924	0,3264	0,2880	0,2624	0,2439	0,2299	0,2187	0,2098	0,2020	0,1737	0,1403	0,1100	0,0833
15	0,4709	0,3346	0,2758	0,2419	0,2195	0,2034	0,1911	0,1815	0,1736	0,1671	0,1429	0,1144	0,0889	0,0667
20	0,3894	0,2705	0,2205	0,1921	0,1735	0,1602	0,1501	0,1422	0,1357	0,1303	0,1108	0,0879	0,0675	0,0500
24	0,3434	0,2354	0,1907	0,1656	0,1493	0,1374	0,1246	0,1216	0,1160	0,1113	0,0942	0,0743	0,0567	0,0417
30	0,2929	0,1980	0,1593	0,1377	0,1237	0,1137	0,1061	0,1002	0,0958	0,0921	0,0771	0,0604	0,0457	0,0333
40	0,2370	0,1576	0,1259	0,1082	0,0968	0,0887	0,0827	0,0780	0,0745	0,0713	0,0595	0,0462	0,0347	0,0250
60	0,1737	0,1131	0,0895	0,0765	0,0682	0,0625	0,0583	0,0552	0,0520	0,0497	0,0411	0,0316	0,0234	0,0167
120	0,0998	0,0632	0,0495	0,0419	0,0371	0,0337	0,0312	0,0292	0,0279	0,0266	0,0218	0,0165	0,0120	0,0083
∞	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Figura 5. Valores críticos para teste de Cochran nível de significância de 5 %.

n	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005
18	2,336	2,504	2,652	2,821	2,932
19	2,361	2,531	2,681	2,853	2,968
20	2,385	2,557	2,708	2,884	3,001
21	2,408	2,58	2,734	2,912	3,031
22	2,429	2,603	2,758	2,939	3,06
23	2,449	2,624	2,78	2,963	3,087
24	2,468	2,644	2,802	2,987	3,112

Figura 6. Tabela do teste de Grubbs.

ALTERAÇÕES NO MÉTODO ANALÍTICO PROPOSTO

Determinação de fluoretos em água potável

Preparo das soluções analíticas

Curva de calibração – Para cada nível de concentração, em um béquer de 100mL, realizar a adição do volume de solução padrão de fluoretos 5 mg L^{-1} de acordo com a Tabela 1 e adicionar o volume suficiente para completar 25 mL. Transferir 25,0 mL de solução tampão TISAB II para o

mesmo béquer, adicionar uma barra magnética (peixinho) e agitar em agitador magnético com agitação lenta e constante.

Tabela 1. Curva de calibração fluoretos

Ponto da Curva	Concentração (mg L ⁻¹)	Porcentagem da especificação (%)	Volume a ser pipetado da solução padrão de fluoretos 5 mg L ⁻¹ (mL)	Volume de água purificada para completar 25 mL
1	0,15	10	0,75	24,25
2	1,50	100	7,50	17,50
3	2,85	190	14,25	10,75

Solução amostra – Transferir 25 mL da amostra para um béquer de 100 mL, adicionar 25,0 mL de solução tampão TISAB II, adicionar uma barra magnética (peixinho) e agitar em agitador magnético com agitação lenta e constante.

Procedimentos:

Nota: A primeira medição realizada na análise, deve aguardar um tempo de 10 minutos para a estabilização da leitura do potencial, tempos menores podem impactar em variações na determinação.

Adicione antes de usar o eletrodo a solução de preenchimento todos os dias. O nível da solução de enchimento deve estar pelo menos 2,5 cm acima do nível de amostra no béquer para garantir uma taxa de fluxo adequada. O orifício de enchimento deve estar sempre aberto ao fazer medições.

Leitura: Mantendo a agitação mergulhar o eletrodo íon seletivo para fluoreto na solução que deseja quantificar, de maneira que o nível da amostra esteja acima do elemento de referência indicado por um pequeno círculo na lateral do eletrodo, esperar a leitura estabilizar e anotar o valor do potencial (U) expresso em milivolts (mV).

Cálculos

Cálculo da curva de calibração – Calcular o logaritmo da concentração em mg L⁻¹, das concentrações de cada ponto da curva. Tabelar em software matemático juntamente com os dados de potencial de cada ponto, plotar um gráfico do potencial de cada ponto no eixo y, em função do logaritmo das respectivas concentrações, no eixo x e realizar a regressão linear da curva analítica através do método dos mínimos quadrados, permitindo assim realizar a determinação da equação geral da reta e o valor do coeficiente de correlação r. Anotar o valor de r e retirar os valores do coeficiente

angular e coeficiente linear (interceptação).

A equação geral da reta é dada por $y = (A \times x) + B$, em que y corresponde ao potencial (U) medido em milivolts, A (coeficiente angular) é a inclinação da reta, x é o logaritmo da concentração da solução em mg L^{-1} , e B (interceptação) é o coeficiente linear da reta. Desta forma a equação da reta será:

$$U = (A \times \log[F^-]) + B$$

Onde U é o potencial da solução em mV, A é o coeficiente angular, $\log [F^-]$ é o logaritmo da concentração teórica de fluoretos em mg L^{-1} e B é o coeficiente linear da reta.

Cálculo da concentração de fluoretos na da amostra – Antes de calcular o valor da concentração de fluoretos deve-se avaliar o valor obtido para o coeficiente de correlação r da curva de calibração, se o coeficiente for menor que 0,99 a curva não deve ser aceita e o preparo deve ser repetido. Caso o coeficiente r fique $\geq 0,99$ (linear) calcular a concentração de fluoretos presente na amostra pela equação:

$$[F^-] = 10^{\left(\frac{U-B}{A}\right)}$$

Em que, $[F^-]$ é a concentração de fluoretos em mg L^{-1} , U é a medida da potência da solução amostra, em mV e A e B são os valores obtidos na equação da reta da curva de calibração.

Especificação

A amostra não contém mais que $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de fluoretos (BRASIL, 2011; BRASIL 2017).

Preparo de soluções reagentes

Solução padrão de fluoretos 5 mg L^{-1}

Transferir 5 mL de padrão de fluoretos 1000 mg L^{-1} para um balão volumétrico de 1000 mL, contendo 100 mL de água purificada e completar o volume com o mesmo solvente.

Solução TISAB II

A solução TISAB II é uma solução tampão adquirida comercialmente e para o presente estudo foi utilizada a solução PerfectION™ TISAB II with CDTA do fabricante Mettler Toledo, que apresenta a capacidade de absorver 5 mg L⁻¹ de interferentes alumínio ou ferro presentes na amostra.

Figura 7. Alterações no método analítico proposto