

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

ADRYA CAVALCANTE QUEIROZ AGUIAR

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA:
DETERMINAÇÃO DE FLUORETOS EM ÁGUA TRATADA –
MÉTODO SPADNS**

RECIFE/PE

2019

ADRYA CAVALCANTE QUEIROZ AGUIAR

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA:
DETERMINAÇÃO DE FLUORETOS EM ÁGUA TRATADA –
MÉTODO SPADNS**

Trabalho de monografia apresentado ao curso de Licenciatura em Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Licenciada em Química.

Orientadora: Prof^a. Dra^a. Maria José de Filgueiras Gomes.

RECIFE/PE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A282v Aguiar, Adrya
Validação de metodologia analítica: Determinação de Fluoretos em Água Tratada - Método SPADNS / Adrya Aguiar. -
2019.
51 f. : il.
- Orientadora: Maria Jose de Filgueiras Gomes.
Inclui referências e anexo(s).
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Licenciatura em Química,
Recife, 2020.
1. Flúor. 2. Fluoretação. 3. Cárie. 4. Validação. 5. SPADNS. I. Gomes, Maria Jose de Filgueiras, orient. II. Título

CDD 540

ADRYA CAVALCANTE QUEIROZ AGUIAR

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA:
DETERMINAÇÃO DE FLUORETOS EM ÁGUA TRATADA –
MÉTODO SPADNS**

Trabalho de monografia apresentado ao curso de Licenciatura em Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Licenciada em Química.

Orientadora: Prof^a. Dra^a. Maria José de Filgueiras Gomes.

Banca Examinadora

Prof.^a. Dra. Maria José de Filgueiras Gomes.

Prof.^a. Rosangela Maria Da Silva Lucena

Prof. Dr. Manoel De Farias Souza Filho

“A vida não é fácil para ninguém. Mas... O que importa? É necessário preservar e, acima de tudo, confiar em nós próprios. Temos de sentir que somos dotados para realizar uma determinada coisa e que temos de alcançá-la, custe o que custar!” - Marie Curie

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais Amanda e Severino e aos meus avós Crinaura e Oswaldo, pessoas que me deram a base de tudo, que me ensinaram todos os meus valores e princípios. Sei que nunca foi fácil e sei o quanto se esforçaram e fizeram de tudo para me garantir uma educação digna, sou muito grata por tudo.

Agradeço muito ao meu companheiro de vida Lucas Henrique, que acompanhou todos os meus estresses de meio para final de curso e sempre me encorajou, lembrando o quanto sou capaz e que no final tudo sempre dará certo. Te amo e sou grata todos os dias pelo prazer que é compartilhar a vida com você.

Agradeço a Thaís Mendes por sempre estar comigo durante esses quase 5 anos, rindo, chorando, compartilhando alegrias, medos. Realmente ganhei uma pessoa incrível que quero levar para o resto da minha vida. Saiba que te admiro e muito do mérito de eu ter chegado até aqui é seu, obrigada por nunca soltar minha mão e acreditar em mim quando eu não acreditava.

Aos meus amigos de curso que também me acompanharam durante todos esses anos, em especial a Jhonies e Rodrigo, saiba que torço pela felicidade e sucesso de vocês sempre.

Aos companheiros de trabalho que fiz durante essa jornada, em especial a Aleandra Maria por me acompanhar diariamente, me ajudar em tudo e mostrar que a vida pode ser leve e divertida mesmo quando estamos cansados com a rotina do dia a dia. A Larissa Leite por ter dado contribuições importantes em meu trabalho de monografia. A Diogo Lima e Rosemary por terem me ensinado tudo que sei sobre validação de métodos, vocês contribuíram de uma forma muito significativa no meu crescimento como profissional. E a todos os incríveis profissionais que trabalham comigo diariamente, saibam que muito da pessoa que me tornei hoje devo a vocês.

Agradeço a todos os meus professores, desde o jardim de infância até o ensino superior. Cada um foi de fundamental importância na minha vida, em especial a Maria José por ter confiado no meu potencial no decorrer do curso.

Enfim mais uma etapa termina para iniciarem outros ciclos, agradeço a todos que me ajudaram e que torcem por mim de alguma forma. A UFRPE foi a minha segunda casa durante esses 5 anos e sou grata por ter tido a oportunidade de ter feito parte desta universidade.

RESUMO

A validação de um método normalizado garante confiabilidade analítica de acordo com a NBR ISO/IEC 17025 (INMETRO, 2017). Esta norma acredita a confiabilidade de um resultado emitido por laboratórios de ensaios e calibração, evidenciando que modificações e alterações na metodologia normalizada não alterem o objetivo geral do método. De acordo com INMETRO (2018) os passos necessários para a Validação de Métodos Laboratoriais incluem o estudo das seguintes figuras de mérito: Seletividade; Linearidade; Sensibilidade; Precisão; Exatidão; Estabilidade; Robustez; Incerteza de Medição. A avaliação de cada parâmetro de desempenho requer diversos ensaios analíticos, através da utilização de padrões e/ou amostras reais fortificadas com padrões de valores conhecidos e posterior análise estatística. Este trabalho apresenta os testes realizados a fim de validar as alterações realizadas no método colorimétrico para determinação de fluoretos em água tratada, descrito segundo a metodologia nº 4500 F D descrita no livro Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. (APHA, 2017)

PALAVRA-CHAVE: flúor; fluoretação; cárie; fluorose; validação; SPADNS; fluoreto.

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	8
	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	9
	2.1 O ELEMENTO QUÍMICO FLÚOR	9
1	2.1.1 Flúor x cárie dentária	10
2	2.1.2 Água fluoretada	10
	2.1.3 Fluoretação das águas	11
	2.2 DETERMINAÇÃO DE FLUORETO EM ÁGUA	12
	Método SPADNS	12
	2.2.2.3 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS E A NBR ISO/IEC 17025:2017	13
	2.4 PARÂMETROS DE DESEMPENHO	15
	2.4.1 Seletividade	15
	2.4.2 Linearidade	15
	2.4.3 Sensibilidade	16
	2.4.4 Precisão	17
	2.4.5 Exatidão	18
	2.4.6 Robustez	18
3	2.4.7 Incerteza de medição	19
	OBJETIVOS	20
4	3.1 GERAL	20
	3.2 ESPECÍFICOS	20
	METODOLOGIA	21
	4.1 SELETIVIDADE	22
	4.2 LINEARIDADE	23
	4.3 SENSIBILIDADE	25
	4.4 PRECISÃO	26

	4.4.1	Estudo da repetibilidade.....	26
	4.4.2	Estudo da precisão intermediária.....	27
	4.5	EXATIDÃO	27
	4.6	INCERTEZA DE MEDIÇÃO.....	28
		RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
	5.1	SELETIVIDADE.....	30
5	5.2	LINEARIDADE	32
	5.3	SENSIBILIDADE	35
	5.4	PRECISÃO.....	36
	5.4.1	Estudo da repetibilidade.....	36
	5.4.2	Estudo da precisão intermediária.....	38
	5.5	EXATIDÃO	39
	5.6	INCERTEZA DE MEDIÇÃO.....	40
6		CONCLUSÃO	42
7		REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
		ANEXO 1 – PROCEDIMENTO DE ENSAIO DE FLUORETOS EM ÁGUA PELO MÉTODO SPADNS	45
		ANEXO 2 – TABELA DE DISTRIBUIÇÃO F – ALFA DE 0,050 (95% DE CONFIANÇA)	47
		ANEXO 3 – TABELA TESTE DE GRUBBS – ALPHA DE 0,05.....	48
		ANEXO 4 – TABELA PARA TESTE DE COCHRAN – ALPHA DE 0,05.....	49

INTRODUÇÃO

1 A aproximadamente um século o flúor vem sendo utilizado na odontologia sendo considerado um dos instrumentos de maior importância visando o controle da cárie, contudo muito se discute sobre a sua forma de atuação e indicação (ELY, 1998). Este elemento pode estar presente na água naturalmente em diferentes concentrações que variam de acordo com cada região.

A fluoretação é a adição controlada do composto na água de abastecimento público a fim de aumentar sua concentração, atuando na prevenção da cárie dentária. A adição deve ser controlada pois em altas concentrações o flúor causa toxicidade para o ser humano, podendo causar a fluorose dentária e em baixas concentrações a cárie não é prevenida.

Considerando todos os fatores que envolvem a fluoretação, mais importante que adicionar o flúor na água de abastecimento é controlar todo o processo, a fim de que a água se apresente realmente com teores adequados de flúor (NARVAI, 2001). Desta forma a metodologia 4500 F – Método D do livro *Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater*, editado pela *American Public Health Association*, é uma forma rápida e precisa de controlar esse processo de fluoretação, porém a metodologia segundo o procedimento é aplicada para teores de fluoreto de até 1,4 mg/L, não satisfazendo o critério estabelecido pela Portaria de Consolidação nº5/2017 que estabelece como valor máximo permitido 1,5 mg/L de F⁻ para águas tratadas.

Se um método existente for modificado para atender aos requisitos específicos ou um método totalmente novo for desenvolvido, o laboratório deve se assegurar de que as características de desempenho do método atendam aos requisitos para as operações analíticas pretendidas. Para métodos modificados (normalizados ou não) ou desenvolvidos pelo laboratório, existe uma série de parâmetros a serem avaliados para garantir a adequação do método ao uso pretendido (INMETRO, 2018).

Dentre os parâmetros da validação citam-se: seletividade, garantia que o analito é quantificado sem sofrer a interferência de outros componentes da matriz; o limite de detecção que é a menor quantidade de analito que pode ser detectada mas não necessariamente quantificada; o limite de quantificação, parâmetro este que fornece a menor quantidade de analito que pode ser quantificado com precisão e exatidão

satisfatórias; faixa de trabalho onde numericamente os resultados ficarão contidos e o resultado esperado se situe no meio desta faixa, linearidade do método observada pela proporcionalidade entre a concentração e o sinal fornecido; a sensibilidade, referente à variação do sinal obtido em relação a variação da concentração e deve ser a melhor possível; a exatidão é o quanto as concentrações obtidas estão de acordo com uma concentração de referência tida como verdadeira e a precisão que está relacionada com a variabilidade dos resultados levando-se em consideração, tempo, local e diferentes analistas (INMETRO, 2018).

Sendo assim, esta pesquisa se propõe a validar a metodologia 4500 F – Método D do Standard Methods 23ª edição, aumentando a concentração máxima do método para 2 mg/L em concordância com a Portaria de Consolidação nº 5 do Ministério da Saúde. Foram realizadas pesquisas na literatura sobre a existência do tema em questão onde não foi encontrado nenhuma pesquisa similar. As buscas foram realizadas nas plataformas Capes, Scielo e Google Acadêmico do ano de 2015 até 2019, com as seguintes palavras-chaves: *validação, fluoretos, água, SPADNS*.

Desta forma, será possível realizar o controle do processo de fluoretação de forma rápida e segura utilizando a metodologia SPADNS de forma que esta atenda o limite máximo permitido pela Portaria de Consolidação nº 5 do Ministério da Saúde?

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 O ELEMENTO QUÍMICO FLÚOR

O elemento químico flúor (F), do latim *fluere* cujo significado é *fluir* é o mais eletronegativo e reativo de todos os elementos da tabela periódica, ocupando o grupo dos halogênios. Na CNTP o flúor é um gás corrosivo de coloração amarelo pálido, fortemente oxidante.

O flúor sempre se encontra combinado na natureza e tem afinidade por muitos elementos, especialmente o silício. Em solução aquosa de seus sais, o elemento apresenta-se normalmente na forma de íons fluoretos F^- , podendo também apresentar outras formas, como os complexos $[FeF_4]^-$, ou o H_2F^+ .

Em 1771 o flúor foi descoberto por Carl Wilhelm Scheele, porém devido a sua alta reatividade este elemento só foi devidamente isolado em 1886 por Henri Moissan. Porém bem antes de sua descoberta existem relatos de experimentos realizados com o ácido fluorídrico por Carl Wilhelm Scheele, Humphry Davy, Gay-Lussac, Antoine Lavoisier e Louis Thenard. Entre os experimentos, pode-se citar o uso do mineral fluorita tratada com ácido para realizar marcações em vidros.

O flúor é o halogênio mais abundante da crosta terrestre, com uma concentração de 950 ppm, já na água do mar a concentração em média é de aproximadamente 1,3 ppm. Os minerais mais importantes são a fluorita, CaF_2 , a fluorapatita, $Ca_5(PO_4)_3F$ e a criolita, Na_3AlF_6 . (APHA, 2017)

O flúor é bastante tóxico, de maneira que para uma exposição diária de oito horas, a concentração máxima permitida do gás na atmosfera é de 0,1 ppm. Para HF, esse valor é de 2-3 ppm, enquanto para o HCN é de 10 ppm. Entretanto, quando ingerido em concentrações inferiores a 1 ppm, os íons fluoreto conferem uma excelente proteção aos dentes contra as cáries. (PEIXOTO, 1998)

2.1.1 Flúor x cárie dentária

A cárie dental representa um grave problema na saúde bucal coletiva afetando grande parte da população. É uma afecção causada pela ação de enzimas liberadas por certas bactérias, presentes na cavidade bucal, que agem sobre resíduos açucarados, fermentando-os, formando ácidos que desmineralizam o esmalte, tornando o dente vulnerável à cavitação (BUENDIA, 1996).

O flúor atua nos tecidos mineralizados do corpo e o seu uso adequado traz benefícios para a integridade óssea e dentária. Desta forma acreditou-se durante certo tempo que a prevenção decorresse da capacidade que esse íon teria de formar fluorapatita, em vez de hidroxiapatita, no processo de formação dos prismas do esmalte dentário.

Porém com o passar do tempo constatou-se que o mecanismo pelo qual o flúor confere maior resistência ao esmalte dentário ocorre na superfície dessa estrutura, ao longo de toda a vida, por meio de sucessivos episódios de desmineralização e remineralização superficial desencadeados pela queda de pH decorrente da produção de ácidos a partir dos carboidratos. (BRITO et al., 2016)

O flúor mantido na cavidade bucal é capaz de interferir na prevenção da cárie e, embora não impeça iniciação da doença, ele é extremamente eficiente em reduzir sua progressão. Desse modo, um dos desafios da atualidade está relacionado em como obter uma exposição adequada ao flúor de forma a garantir os benefícios da redução de cárie. (CURY, 2001)

A ingestão de flúor em dosagens recomendadas pela legislação é benéfica. Entretanto, sua eficácia fica comprometida quando ingerido em baixas dosagens. Por outro lado, o flúor consumido em excesso apresenta toxicidade aguda ou crônica. Desta forma evidencia-se a importância da adição de fluoreto no processo de tratamento de água, pois esta é uma das principais fontes de subsistência humana encontrando-se disponível em abundância na natureza.

2.1.2 Água fluoretada

Toda água contém flúor em variadas concentrações, como por exemplo a água do mar que contém níveis de concentração que variam entre 0,8 a 1,4 mg/L. Em lagos e rios

a concentração é inferior a 0,5 mg/L. No entanto, devido à sua importância para a saúde bucal da população, em 1974, a Lei Federal nº 6.050 tornou obrigatória a adição de fluoretos à água de consumo humano, sendo estabelecido em 1975 pela Portaria nº 635, os padrões para a operacionalização da medida, incluindo os limites recomendados para a concentração do fluoreto em razão da média das temperaturas diárias, de acordo com a tabela 1 abaixo:

Tabela 1 – Concentração de fluoreto recomendada na água de beber em relação à temperatura média da cidade

Média das temperaturas máximas diárias do ar (°C)	Limites recomendados para as concentrações de íon fluoreto		
	Mínimo	Máximo	Ótimo
10,0 – 12,1	0,9	1,7	1,2
12,2 – 14,6	0,8	1,5	1,1
14,7 – 17,7	0,8	1,3	1
17,8 – 21,4	0,7	1,2	0,9
21,5 – 26,3	0,7	1	0,8
26,4 – 32,5	0,6	0,8	0,6

Fonte: Portaria nº 635/Bsb de 26 de dezembro de 1975

No ano de 2000, com a publicação da Portaria nº 1.469, foi definido o teor de 1,5mg/L de fluoreto como valor máximo permitido (VMP), e a concentração de fluoreto passou a ser um parâmetro importante na avaliação da qualidade das águas de consumo, que dependendo da concentração poderá prevenir a cárie ou provocar a fluorose dentária, considerado um efeito colateral indesejado (BRITO et al., 2016)

Atualmente a Portaria de Consolidação do Ministério da Saúde nº 5/17 estabelece o controle e vigilância da qualidade da água potável, distribuída coletivamente por meio de sistema ou solução alternativa. O monitoramento da qualidade da água é realizado pela vigilância (poder público) e pelo controle (sistemas de abastecimento de água), sendo de fundamental importância que os níveis de concentração de flúor na água potável estejam dentro dos parâmetros aceitáveis para consumo humano.

2.1.3 Fluoretação das águas

A fluoretação na água de consumo humano é uma medida obrigatória e efetiva que reduz de 50% a 60% a prevalência de cáries na população. Segundo Portaria nº 635/Bsb, de 26 de dezembro de 1975, a concentração em mg/L recomendada de íon fluoreto nas águas de abastecimento público é obtida pela equação (1):

$$C \text{ (mg/L)} = \frac{22,2}{E} \quad (1)$$

Onde:

$$E = 10,3 + 0,725 T$$

T = média de Temperatura máxima diária observada durante um período mínimo de 1 ano (recomendado 5 anos) em graus centígrados (tabela 1).

A maior ingestão de água se dá nas regiões mais quentes explicando desta forma as menores faixas de concentração em temperaturas mais altas. Alguns compostos de flúor são utilizados no processo de fluoretação que de acordo com a Portaria nº 635/Bsb de 26 de dezembro de 1975 são: o Fluoreto de Cálcio ou Fluorita (CaF_2); Fluossilicato de Sódio (Na_2SiF_6); Fluoreto de sódio (NaF); Ácido Fluossilícico (H_2SiF_6).

Os fluoretos presentes na água de consumo trazem benefícios e malefícios para a população, pois o flúor é essencial para a formação da resistência do esmalte à cárie dentária, porém em baixas concentrações o mesmo não previne a cárie e em excesso favorece o desenvolvimento da fluorose dentária. (BRASIL, 2010)

Segundo Martins, Fortes e Sampaio (2010) a fluoretação das águas de abastecimento público tornou-se o melhor agente na prevenção de cárie dentária, reduzindo aproximadamente 60% de sua incidência no Brasil.

2.2 DETERMINAÇÃO DE FLUORETO EM ÁGUA

Segundo o livro *Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater*, editado pela *American Public Health Association* (APHA, 2017) há quatro metodologias para determinação fluoretos em água. Entre elas estão o método do eletrodo (4500 C) adequado para concentrações que variam de 0,1 mg/L a 10 mg/L. O método SPADNS (4500 D) tendo um alcance analítico de 1,4 mg/L. O método complexo automatizado (4500 E) adequado para concentrações de 0,2 mg/L a 2 mg/L. A cromatografia de íons (4500 F) pode ser um método aceitável se eluentes mais fracos forem usados para separar fluoreto de picos interferentes. (APHA, 2017)

Método SPADNS

O método espectrofotométrico baseia-se em reação similar a da alizarinazircônio, utilizando o reagente [sódio 2-(parassulfofeniázo)-1,8-1111dihidroxi-3,6-naftaleno dissulfonato] (SPADNS). As cores produzidas por esta reação envolvem os matizes do

vermelho. Uma das principais vantagens do método SPADNS é que a reação é quase instantânea. (FERREIRA e BENEDET, 1999)

Este método é utilizado para a determinação de fluoreto em água em um intervalo de 0 à 1,4 mg/L por espectrofotometria na região do visível. É baseado na reação entre o ânion fluoreto e uma laca de corante-zircônio. (APHA, 2017)

O fluoreto reage com a laca de corante provocando sua dissociação formando um complexo incolor do ânion hexafluorozirconato(IV) (ZrF_6^{2-}). Desta maneira a determinação do fluoreto é feita pela medida do grau de descoloração da solução contendo o corante (SPADNS). (APHA, 2017)

Por ser a medida realizada espectrofotometricamente a presença de cor ou turbidez nas amostras são interferentes e precisam ser removidas antes das análises. Cloro livre também interfere e deve ser eliminado por redução com solução de arsenito de sódio. (APHA, 2017)

Como outros possíveis interferentes da técnica tem-se que a alcalinidade acima de 5000 mg/L, os metais alumínio e ferro, assim como a presença do ânion sulfato promovem um erro negativo no método. Ânions cloreto, fosfato e hexametafosfato produzem um erro positivo (tabela 2).

Tabela 2: Possíveis interferentes na determinação de fluoreto pelo método SPANDS (APHA, 2017)

INTERFERENTES	Concentração (mg L⁻¹)
Alcalinidade	5000
Al³⁺	0,1
Cl⁻	7000
Ferro	10
Hexametafosfato	1
PO₄³⁻	16
SO₄²⁻	200

2.3 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS E A NBR ISO/IEC 17025:2017

A validação é uma das etapas do desenvolvimento de um método e tem como objetivo principal eliminar erros nos processos de amostragem e manuseio de amostras,

de maneira que através da avaliação de figuras de mérito como sensibilidade, seletividade, robustez, entre outras, pode-se confirmar ou não a adequabilidade de um método proposto.

Segundo Raya-Rodriguez e Albano (2015) validar métodos laboratoriais é estar com o objetivo voltado para a confiabilidade analítica do método escolhido ou desenvolvido. De acordo com a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017, “validação de métodos é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos”.

O órgão acreditador brasileiro (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO) sugere aos laboratórios acreditados à norma NBR ISO/IEC 17025 a necessidade de validar métodos analíticos reconhecidos internacionalmente como, por exemplo, bibliografias como o Standard Methods, quando se evidencia pequenas mudanças na metodologia ou para confirmar o comportamento do processo.

De acordo com o DOC-CGCRE 008 (2018):

Se um método existente for modificado para atender aos requisitos específicos, ou um método totalmente novo for desenvolvido, o laboratório deve se assegurar de que as características de desempenho do método atendam aos requisitos para as operações analíticas pretendidas. Para métodos modificados (normalizados ou não) ou desenvolvidos pelo laboratório, existe uma série de parâmetros a serem avaliados para garantir a adequação do método ao uso pretendido. [...] O laboratório deve definir os parâmetros de validação que melhor evidenciem a adequação do método ao uso pretendido. (INMETRO, 2018)

As figuras de mérito avaliadas para a validação de métodos laboratoriais incluem o estudo dos seguintes parâmetros de desempenho requeridos como evidência de todo o processo (INMETRO, 2018):

- Seletividade;
- Linearidade;
- Sensibilidade (limites LDM e LQM);
- Exatidão (Tendência/Recuperação);
- Precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade);

- Robustez;
- Incerteza de medição.

Sendo a robustez um procedimento opcional, todos os demais parâmetros são obrigatórios para métodos quantitativos. A avaliação de cada um deles requer diversos ensaios analíticos, com padrões ou amostras reais fortificadas de valores conhecidos e posterior análise estatística dos dados.

2.4 PARÂMETROS DE DESEMPENHO

2.4.1 Seletividade

A seletividade é a capacidade do método de discriminação entre a substância a ser analisada e substâncias análogas. Dependendo do quanto esta metodologia é indiferente à presença na amostra de espécies que poderiam interferir na determinação do analito. (RAYA-RODRIGUEZ E ALBANO, 2015)

Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo (INMETRO, 2018). Uma das maneiras de avaliar a seletividade de um método é através da construção de uma curva analítica utilizando a matriz de trabalho como solvente. Baseia-se na comparação de uma curva analítica na presença e ausência da matriz (branco) ambas contaminadas com a substância de interesse.

Segundo Raya-Rodriguez e Albano (2015) o sinal analítico da espécie de interesse deve ser isento de interferências que possam confundir a sua identificação, produzindo desta forma a não confiabilidade do resultado quantitativo.

2.4.2 Linearidade

A linearidade do processo analítico é a capacidade de produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, em uma faixa de concentração. A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente, expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico. (RAYA-RODRIGUEZ E ALBANO, 2015)

A faixa de trabalho de um procedimento analítico é o intervalo entre a menor concentração e a maior concentração de analito na amostra para o qual se demonstrou que

o procedimento analítico tem um nível aceitável de precisão, exatidão e linearidade (ICH, 2005).

Os pontos para obtenção da curva devem objetivar uma variação de 20% em torno do valor estimado para a substância mensurada. O número de pontos que deve conter uma curva de calibração deve ser de no mínimo 5 (LEITE, 1998). A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A equação da reta que relaciona as duas variáveis é descrita na equação (2):

$$y = a + bx \quad (2)$$

Onde:

y: resposta medida (sinal instrumental como absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x: concentração;

a : coeficiente linear (interseção com o eixo y, quando $x = 0$);

b: coeficiente angular (inclinação da curva analítica = sensibilidade). (INMETRO, 2018)

A adequabilidade da curva como modelo matemático é indicada através do coeficiente de regressão linear (R^2). Devem ser mencionados os intervalos de aceitação dos parâmetros da curva, como por exemplo, $R^2 > 0,99$ ou $r > 0,9$. (RAYA-RODRIGUEZ E ALBANO, 2015)

A linearidade de um método não pode ser observada apenas por meio do gráfico dos resultados de resposta em função da concentração do analito. Antes de fazer a regressão linear, deve ser verificada a ausência de valores aberrantes (em inglês, outliers) para cada nível de concentração e a homocedasticidade (igualdade das variâncias) dos dados. (INMETRO, 2018)

A verificação da ausência de valores aberrantes pode ser feita pelo teste de Grubbs (ISO 5725- 3,1994 e ISO 5725-2, 1994) ou com base nos resíduos padronizados Jackknife (SOUZA e JUNQUEIRA, 2005) e a homocedasticidade, isto é, homogeneidade da variância dos resíduos pelos testes de Cochran (ISO 5725-3:1994), de Levene (SOUZA e JUNQUEIRA, 2005) ou de Brown-Forsythe (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005). Deve-se também avaliar a linearidade por meio do teste F (também conhecido como F-Snedecor) na análise da variância (ANOVA) da regressão

2.4.3 Sensibilidade

A sensibilidade de um método pode ser avaliada através das seguintes ferramentas: Cálculo do Limite de Detecção do Método (LDM) e Cálculo do Limite de Quantificação do Método (LQM).

O Limite de Detecção do Método (LDM) é definido como a concentração mínima de uma substância medida, com 95% ou 99% de confiança, que é maior do que zero (RAYA-RODRIGUEZ E ALBANO, 2015). Ou seja, o LDM representa a mais baixa concentração do analito que pode ser detectada com uma dada confiabilidade, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas.

O Limite de Quantificação do Método (LQM) representa a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível de exatidão e precisão. É comum calcular o LQM como a média de uma solução em “branco” com uma quantidade mínima de analito adicionado, somando 5, 6 ou 10 desvios padrão da média da mesma solução. Após determinar este limite, o mesmo deve ser testado para verificar se a exatidão e precisão são satisfatórias neste ponto (RAYA-RODRIGUEZ E ALBANO, 2015).

2.4.4 Precisão

A precisão reflete a concordância entre vários valores experimentais obtidos. Quanto menor a variabilidade das medidas, maior será a precisão e menor será o erro. Este erro pode ser expresso pelo desvio padrão (s) da série de valores de um experimento, ou pelo coeficiente de variação (CV) que é o desvio padrão expresso em percentagem de acordo com a equação (3):

$$CV = DPR = (DP / CMD) \times 100 \quad (3)$$

Sendo: DP é o desvio padrão;

CMD é a concentração média determinada. (INMETRO, 2018)

A repetibilidade (repe) e a reprodutibilidade (repro) são parâmetros estatísticos relacionados com a precisão, a qual está associada com o erro da medição. (RAYA-RODRIGUEZ E ALBANO, 2015).

A repetibilidade é a máxima diferença aceitável entre duas repetições, quando tem-se o conjunto: mesma amostra, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo momento, mesmo ajuste e mesma calibração. Enquanto a reprodutibilidade é a máxima

diferença aceitável entre dois resultados individuais obtidas no conjunto: amostras diferentes da mesma amostragem, ou diferentes analistas, ou diferentes equipamentos, ou diferentes momentos, ou diferentes técnicas, ou diferentes ajustes e calibrações. (LEITE, 1998)

A reprodutibilidade não é executada por um único laboratório, é obtida quando o laboratório busca a verificação do desempenho do seu método em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparações interlaboratoriais. A precisão avaliada no mesmo laboratório, com a mesma amostra e o mesmo método variando condições como: analistas, equipamentos ou condições ambientais denomina-se reprodutibilidade interna ou precisão intermediária. (RAYA-RODRIGUEZ E ALBANO, 2015).

2.4.5 Exatidão

Exatidão é o grau de concordância entre o resultado de uma medição e o valor verdadeiro de um mensurado. A exatidão traduz a concordância dos valores experimentais e verdadeiros. (RAYA-RODRIGUEZ E ALBANO, 2015)

A exatidão pode ser avaliada pelos seguintes testes: percentual de recuperação, Z-score interlaboratorial e Z-score intralaboratorial.

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo (spike). As amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações (baixa, média e alta) da faixa de uso do método (INMETRO, 2018). No teste do percentual de recuperação (%R) se avalia, percentualmente, quão próximo está o resultado obtido ao se analisar um material de referencia (MR). A metodologia estatística do Z-score é usada para a avaliação do desempenho dos laboratórios participantes em programas de ensaio de proficiência realizados interna ou externamente. (RAYA-RODRIGUEZ E ALBANO, 2015)

2.4.6 Robustez

A robustez de um método analítico é a capacidade do método em não ser afetado por pequenas variações nos parâmetros de execução do método. A robustez fornece uma indicação da confiança do método durante uma aplicação rotineira (Eurachem, 2014). Embora seja um parâmetro opcional no estudo da validação, esta técnica aplicam-se a todas as condições experimentais que possam na prática estar sujeitas a variações como:

estabilidade dos reagentes, composição das amostras, pH, temperatura, entre outros fatores. (RAYA-RODRIGUEZ E ALBANO, 2015)

2.4.7 Incerteza de medição

Incerteza de medição é um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando com base nas informações utilizadas.

A incerteza de medição compreende muitos componentes. Alguns deles podem ser estimados com base na distribuição estatística dos resultados das séries de medições e podem ser caracterizados por desvios padrão experimentais. Os outros componentes, que também podem ser caracterizados por desvios padrão, são avaliados por meio de distribuição de probabilidades assumidas, baseadas na experiência ou em outras informações. (EURACHEM, 2014)

OBJETIVOS

3.1 GERAL

Realizar a validação da metodologia para a Determinação de Fluoretos em Águas
3 (*Standard Methods 4500 F – Método D*), com a seguinte alteração no método original:

- Aumento da concentração limite da metodologia para 2 mg/L ao invés de 1,4 mg/L, atendendo com isso a Portaria de Consolidação nº5/2017 que estabelece como valor máximo permitido 1,5 mg/L de F⁻ para águas tratadas.

3.2 ESPECÍFICOS

- Analisar o íon fluoreto em água tratada com base no Standard Methods 23ª edição, método D.
- Realizar os testes estatísticos para comprovação da adequação do limite máximo da metodologia para 2 mg/L de fluoreto.

METODOLOGIA

4 Todos os testes foram realizados em um laboratório prestador de serviços que possui acreditação junto a Norma NBR ISO/IEC 17025, logo todos os controles previstos estão em funcionamento, como: utilização de procedimentos operacionais padrões (POP's) nos ensaios, controle de documentos, monitoramento das condições ambientais, limpeza e umidade do laboratório, controle de materiais de referência, vidrarias, materiais rastreados e certificados.

O laboratório utiliza como referência para o ensaio de fluoretos em águas a metodologia nº 4500 F método D descrita no livro *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2017) que como citado anteriormente possui uma faixa linear de 0 a 1,4 mg/L, porém para atender a Portaria de consolidação do MS nº5/2017, que dispõe sobre as normas e padrão de potabilidade da água para consumo humano, onde relaciona os fluoretos com uma concentração recomendada máxima de 1,5 mg/L, realizou-se o processo de validação da metodologia cumprindo o previsto na NBR ISO/IEC 17025, item 5.4.5.2. Vale ressaltar que esse valor limite máximo também é recomendado pelos Guias de Controle da Qualidade da Água da Organização Pan-americana de Saúde – OPAS, edição de 1996.

Desta forma, o processo de validação foi realizado aumentando-se o limite máximo do método para 2 mg/L. O laboratório analisa apenas água tratada (consumo humano) portanto os testes relacionados a seletividade do método foram realizados utilizando-se a matriz de trabalho coletada na torneira situada no próprio laboratório.

As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro de marca MERCK e modelo Spectroquant Prove 300 devidamente calibrado na faixa de comprimento de onda utilizada no ensaio, utilizou-se padrão de referência certificado de fluoreto de sódio 1000 mg/L de marca INORGANIC VENTURES, o reagente SPADNS utilizado no método foi a solução pronta contendo ácido clorídrico, oxiclureto de zircônio (IV) e arsenito de sódio. Os dados foram tratados em Microsoft Office Excel 2010. Os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão e incerteza de medição; as seções 4.1 a 4.6 apresentam a metodologia utilizada no estudo dos parâmetros de desempenho realizados para esta validação.

4.1 SELETIVIDADE

Avaliou-se a seletividade segundo o DOC-CGCRE 008 (2018) para a matriz de trabalho do laboratório (água tratada) no intervalo de 0,2 a 2 mg/L . Foram analisadas 3 (três) replicatas preparadas de modo independente, em 5 (cinco) níveis de concentração (0,2 mg/L; 0,5 mg/L; 1 mg/L; 1,5 mg/L e 2 mg/L) com e sem a adição da matriz de amostra. O procedimento

Primeiramente a amostra de água tratada deverá ser coletada diretamente da torneira existente no interior do laboratório. Preparar um padrão de fluoreto 10 mg/L dissolvendo-se 1 mL de um padrão de 1000 mg/ L em um balão volumétrico de 100 mL. Preparar a curva analítica conforme tabela 3 na presença e ausência de matriz utilizando dois tipos de solventes: água tratada e água deionizada.

Tabela 3: Preparo de curva analítica para estudo da seletividade.

Ponto (mg L⁻¹)	Balão Volumétrico (mL)	Alíquota do Padrão 10 mg L⁻¹ (mL)	Volume de Solvente (mL)
0,2	50	1	49
0,5	50	2,5	47,5
1	50	5	45
1,5	50	7,5	42,5
2	50	10	40

Analisar 3 (três) vias de cada ponto por tipo de solvente. Registrar os valores em mg/ L. A partir dos resultados, duas curvas analíticas devem ser plotadas no mesmo gráfico, considerando a concentração do padrão analisado no eixo “x” e a resposta analítica de acordo com a equação (2) no eixo “y” para cada matriz.

Calcular a regressão linear e o R² (coeficiente de determinação) para as duas curvas. Considera-se o R² igual ao coeficiente de correlação (r), ao quadrado. Comparar as duas curvas analíticas e caso elas sejam paralelas e com coeficientes angulares próximos, resultados cuja razão é próxima a 1, pode-se afirmar que não há interferência

da matriz na determinação da substância de interesse. Neste caso, seguir para o teste F, caso a resposta seja negativa deve-se avaliar os resultados e proceder novas análises. Caso seja confirmado efeito de matriz, a linearidade, a precisão e a tendência/recuperação também deverão ser estudadas na matriz (INMETRO, 2018).

Para o teste F, primeiramente deve-se calcular a média dos resultados, o desvio padrão (s) entre os resultados e a sua respectiva variância (s^2), sempre considerando cada ponto de cada curva separadamente. Calcular o F calculado (F_{cal}) pela equação (4).

$$F = \text{VARIÂNCIA}_{\text{MAIOR}} / \text{VARIÂNCIA}_{\text{MENOR}} \quad (4)$$

Comparar o F tabelado (F_{tab}) encontrado na “TABELA DE DISTRIBUIÇÃO F” (Anexo 2) com (n-1) graus de liberdade. No caso, três vias equivalem a dois graus de liberdade, logo $F_{tab} = 19$ com 95% de confiança. Se $F_{cal} < F_{tab}$, a precisão das duas curvas não possui diferença significativa.

Portanto, se $F_{calculado} < F_{tabelado}$, logo não existem diferenças significativas entre a variabilidade das análises nas diferentes curvas (com e sem matriz). Esta é uma indicação da seletividade do método.

4.2 LINEARIDADE

A linearidade foi avaliada de acordo com o DOC-CGCRE 008 (2018) em água deionizada no intervalo de 0,2 a 2 mg/L. O ensaio foi realizado em toda a faixa onde foram analisadas 3 (três) vias dos padrões preparados, para cada concentração da faixa utilizada.

Primeiramente, preparar um padrão de fluoreto 10 mg/L dissolvendo-se 1 mL de um padrão de 1000 mg/L em um balão volumétrico de 100 mL. Preparar os pontos da curva analítica de acordo com a tabela 4, utilizando a água deionizada como solvente.

Tabela 4: Pontos necessários para estudo da linearidade

Ponto (mg L ⁻¹)	Balão Volumétrico (mL)	Alíquota do Padrão 10 mg L ⁻¹ (mL)	Volume de Solvente (mL)
0,2	50	1	49
0,5	50	2,5	47,5
1	50	5	45
1,5	50	7,5	42,5
2	50	10	40

A partir dos resultados, plotar a curva analítica no gráfico considerando a concentração do padrão analisado no eixo “x” e a resposta analítica de acordo com a equação (2) no eixo “y”.

Calcular a regressão linear e o R^2 (coeficiente de determinação) para as duas curvas. Considera-se o R^2 igual ao coeficiente de correlação (r), ao quadrado. Avaliar o R^2 , que deve ser maior do que 0,99 e o r , que também deverá ser maior do que 0,9.

Calcular os resíduos de regressão, que são obtidos através das diferenças entre os valores medidos e os valores esperados. Plotar estes valores no gráfico “Perfil dos resíduos de regressão”. Analisar o gráfico que deve possuir uma ordem aleatória na sua distribuição.

Verificar a homocedasticidade da distribuição dos dados. Aplicar a regressão linear adequada e calcular o coeficiente de correlação (r).

Antes de fazer a regressão linear, deve ser verificada a ausência de valores aberrantes (em inglês, outliers) para cada nível de concentração e a homocedasticidade (igualdade das variâncias) dos dados. A verificação da ausência de valores aberrantes pode ser feita pelo teste de Grubbs (teste G). O cálculo de G deve ser executado diminuindo o valor do possível *outlier* da média do conjunto de dados investigados, dividindo esse valor pelo desvio padrão dos dados investigados. Caso G calculado seja maior do que G tabelado,

encontrado na “TABELA PARA TESTE DE GRUBBS” (Anexo 3), tem-se evidência de um *outlier*. Recomenda-se que este valor seja excluído para o cálculo da curva de calibração. A homocedasticidade, isto é, homogeneidade da variância dos resíduos, é executado pelo teste de Cochran. O cálculo do teste consiste na divisão entre a maior variância encontrada com a soma do conjunto de variâncias. Caso o C calculado seja maior que o C tabelado, encontrado na “TABELA PARA TESTE DE COCHRAN” (Anexo 4), a curva é homocedástica.

Portanto, se o coeficiente de determinação (R^2) for maior que 0,99; o gráfico de “Perfil dos resíduos de regressão” possuir uma ordem aleatória, $G_{cal} < G_{tab}$ e $C_{cal} < C_{tab}$, pode-se considerar o método linear.

4.3 SENSIBILIDADE

Os cálculos do LDM e LQM foram realizados conforme o DOC-CGCRE 008 (2018) através do ensaio de uma solução padrão¹ 0,05 mg/L de F^- . Primeiramente preparar 500 mL da Solução Padrão de Fluoreto 0,05 mg/L. Analisar 7 (sete) alíquotas diferentes desta solução. Calcular a média (\bar{x}) dos resultados e o desvio padrão (s) amostral das concentrações obtidas. Como se trata do branco de amostra com adição da menor concentração aceitável do analito, calcular o LDM multiplicando o valor do desvio padrão calculado por 3,14 e somando a zero de acordo com a equação (5):

$$LDM = 0 + (3,14 * s) \quad (5)$$

No caso de se analisar 7 alíquotas, tem-se $7-1 = 6$ graus de liberdade de uma matriz de branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito. Para esses graus de liberdade, o valor de t unilateral, para 99% de confiança é 3,143 (INMETRO, 2018).

O LQM deve ser calculado multiplicando-se o valor do desvio padrão calculado por 10 e somando ao valor da média de acordo com a equação (6):

$$LQM = \bar{x} + (10 * s) \quad (6)$$

¹ A solução padrão de fluoreto 0,05 mg/L foi escolhida para o cálculo de LDM e LQM pois é a menor concentração possível de ser preparada a fim de se obter respostas analíticas viáveis para os cálculos dos limites de detecção e quantificação.

4.4 PRECISÃO

A repetibilidade e a precisão intermediária foram avaliadas segundo o DOC-CGCRE 008 (2018) e RAYA-RODRIGUEZ E ALBANO, 2015 através da fortificação de um branco de água deionizada nas concentrações de 0,2; 1,0 e 2,0 mg/L de F⁻. A variação de características no estudo da precisão intermediária deu-se pela variação de analista.

Portanto, para o estudo de precisão se a repetibilidade e a precisão intermediária forem satisfatórias, pode-se concluir que o ensaio é preciso.

4.4.1 Estudo da repetibilidade

Primeiramente, preparar os pontos para análise conforme tabela 5 utilizando água deionizada como solvente a partir de um padrão de fluoreto 10 mg/L.

Tabela 5: Preparo dos pontos para estudo da repetibilidade.

Ponto (mg L⁻¹)	Balão Volumétrico (mL)	Alíquota do Padrão 10 mg L⁻¹ (mL)	Volume de Solvente (mL)
0,2	500	10	490
1	500	50	450
2	500	100	400

Em seguida, analisar 7 (sete) alíquotas de 50 mL de cada ponto. Registrar os resultados. Calcular a média (\bar{x}), o desvio padrão amostral (s) dos resultados e o coeficiente de variação (CV) de acordo com a equação (3).

Calcular o limite máximo de variação aceitável pelo coeficiente de Horwitz (CV_H) através da equação (7):

$$CV_H = 2^{(1-0,5\log C)} \quad (7)$$

Onde C é a concentração da substância em g/g.

De acordo com o DOC-CGCRE 008 (2018) é importante que os laboratórios estabeleçam critérios de aceitação para o desvio padrão relativo (DPR), também chamado de coeficiente de variação (CV). Desta forma, neste estudo, além do coeficiente de

Horwitz analisou-se o critério de aceitação segundo a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2016) a qual estabelece o critério de aceitação para analito apresentando razão de 10^{-6} (1 ppm) igual a 11%. Comparar os CV obtidos no estudo nos 3 (três) níveis com os CV_H calculados na fórmula de Horwitz e estabelecido pelo critério de aceitação AOAC (2016).

Portanto, se o $CV < CV_H$ e o $CV < 11$ a repetibilidade é satisfatória.

4.4.2 Estudo da precisão intermediária

Primeiramente, preparar os pontos para análise conforme tabela 6 utilizando água deionizada como solvente a partir de um padrão de fluoreto 10 mg/L.

Tabela 6: Preparo dos pontos para estudo da precisão intermediária.

Ponto (mg L ⁻¹)	Balão Volumétrico (mL)	Alíquota do Padrão 10 mg L ⁻¹ (mL)	Volume de Solvente (mL)
0,2	1000	20	980
1	1000	100	900
2	1000	200	800

Em seguida, o primeiro analista deverá analisar 7 (sete) alíquotas de 50 mL de cada ponto (Analista 1). O outro analista deverá repetir o mesmo ensaio em mais 7 (sete) vias de cada ponto (Analista 2).

Em cada ponto deverá ser calculado a média relativa aos 14 (quatorze) resultados, desvio padrão relativo e CV. Portanto, segundo RAYA-RODRIGUEZ E ALBANO (2015) para a faixa de concentração trabalhada, considera-se que exista uma boa reprodutibilidade intralaboratorial quando todos os valores de CVs são menores que 10%.

4.5 EXATIDÃO

A exatidão foi avaliada segundo o DOC-CGCRE 008 (2018) de acordo com o percentual de recuperação (%R). Primeiramente, preparar os pontos para análise conforme tabela 7 utilizando água deionizada como solvente a partir de um padrão de fluoreto 10 mg/L.

Tabela 7: Preparo dos pontos para estudo da recuperação.

Ponto (mg L ⁻¹)	Balão Volumétrico (mL)	Alíquota do Padrão 10 mg L ⁻¹ (mL)	Volume de Solvente (mL)
0,2	500	10	490
1	500	50	450
2	500	100	400

Em seguida, analisar 7 (sete) alíquotas de 50 mL de cada ponto. Registrar os resultados. Calcular o percentual de recuperação (%R) do analito pela equação (8).

$$\%R = \frac{C1 - C2}{C3} \times 100 \quad (8)$$

Onde:

C1 : concentração do analito na amostra fortificada.

C2 : concentração do analito na amostra não fortificada.

C3 : concentração do analito adicionado à amostra fortificada.

Comparar o resultado da recuperação com o critério de aceitação previsto pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2016) o qual estabelece um critério de aceitação na faixa de 80 a 110 % para analito apresentando razão de 10⁻⁶ (1 ppm).

Portanto caso todas as recuperações atendam ao limite especificado na AOAC (2016), o método cumpre o critério de exatidão.

4.6 INCERTEZA DE MEDIÇÃO

O cálculo para incerteza de medição foi realizado segundo RAYA-RODRIGUEZ E ALBANO (2015) seguindo critérios dispostos no guia EURACHEM (2014). A figura 1 resume as etapas a serem seguidas no cálculo de estimativa de incerteza de medição.

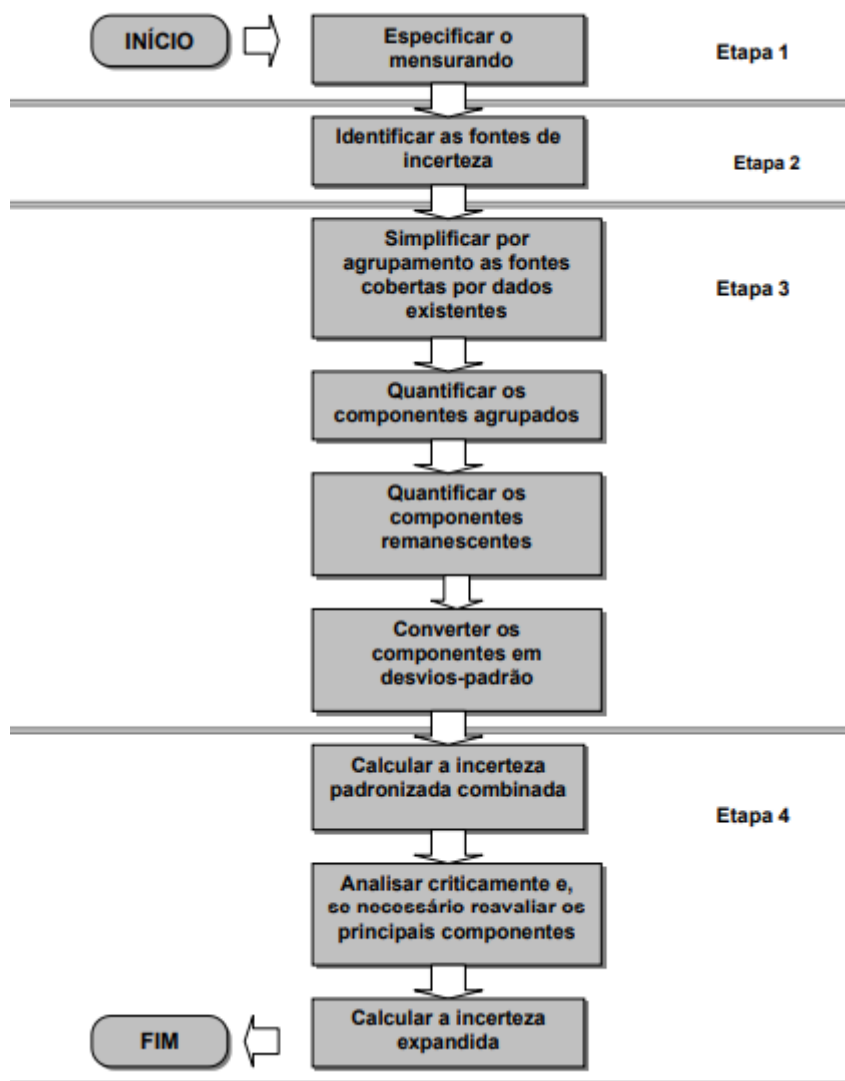


Figura 1: Fluxograma com etapas do processo de estimativa de incerteza de medição (EURACHEM, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELETIVIDADE

Para a construção das curvas analíticas para análise da seletividade, preparou-se 3 (três) vias de 5 (cinco) diferentes concentrações (0,2 mg/L; 0,5 mg/L; 1,0 mg/L; 1,5 mg/L e 2,0 mg/L) a partir de solução padrão de fluoreto 10 mg/L conforme tabela 3. Foram comparados o comportamento do analito em água tratada com relação a água deionizada. Os resultados expressos em mg/L de F⁻ são apresentados na tabela 8.

Tabela 6: Resultados obtidos no estudo da seletividade em água deionizada x água tratada.

Ponto (mg L ⁻¹)	Água Deionizada	Água Tratada
0,2	0,18	0,32
0,2	0,19	0,35
0,2	0,21	0,35
0,5	0,45	0,62
0,5	0,44	0,59
0,5	0,45	0,61
1,0	0,93	1,10
1,0	0,92	1,08
1,0	0,94	1,10
1,5	1,32	1,38
1,5	1,32	1,36
1,5	1,29	1,38
2,0	1,62	1,73
2,0	1,61	1,77
2,0	1,62	1,79

A partir dos resultados obtidos na tabela 6 foi possível construir a curva analítica considerando o efeito da matriz água tratada *versus* a curva de água deionizada sem o efeito da matriz. A figura 2 apresenta a curva analítica plotada no gráfico “Seletividade – Água Tratada x Água Deionizada”.

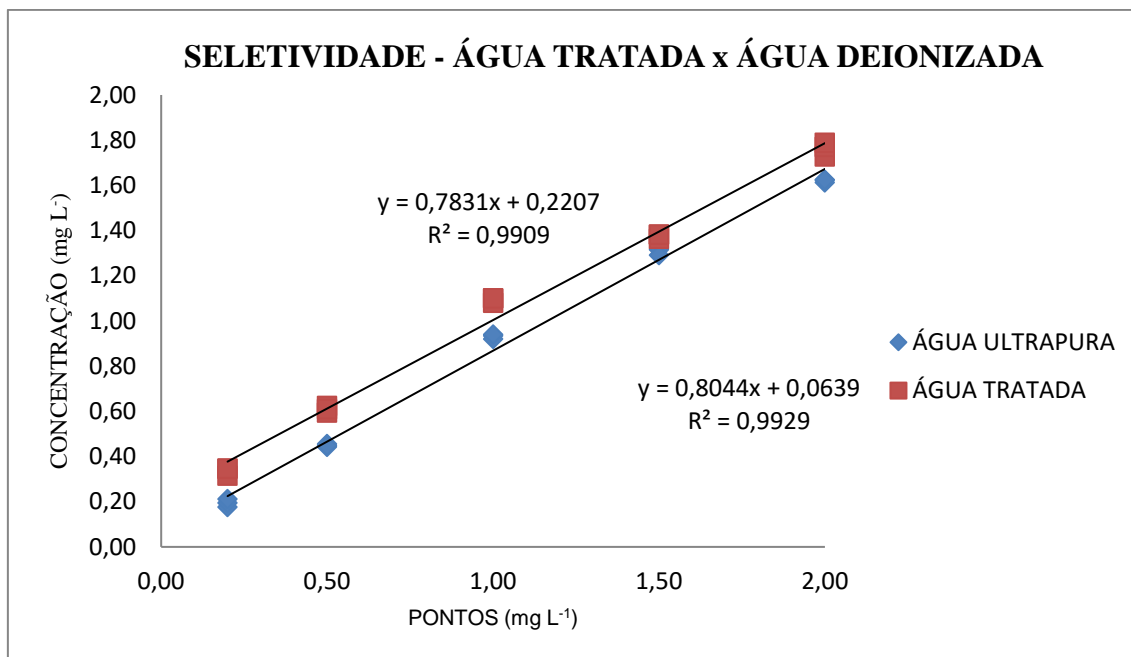


Figura 2: Gráfico seletividade comparando o efeito da matriz água tratada frente à água deionizada.

Por meio do gráfico de Seletividade pode-se verificar que a curva analítica é paralela quando comparada com a curva analítica da água deionizada. A partir dos resultados apresentados na tabela 6 podem-se calcular os valores de F_{cal} de acordo com a equação (4), onde a média das variâncias maior e menor é obtida através do cálculo da média, desvio padrão e variância de cada ponto da curva analítica com e sem o efeito da matriz. A tabela 7 apresenta os resultados obtidos para F_{cal} em cada ponto da curva analítica.

Tabela 7: Resultados obtidos de F_{cal} em todos os pontos da curva analítica na matriz de trabalho.

Ponto (mg L ⁻¹)	F calculado
0,2	1,08
0,5	4,04
1,0	1,28
1,5	2,20
2,0	1,69

Desta forma, comparou-se os valores de F_{cal} com o valor de F_{tab} sabendo-se que para 3 (três) vias (dois graus de liberdade) na construção da curva analítica é igual a 19 (com 95% de confiança), conforme coluna 02 (dois) linha 02 (dois) do Anexo 2 (TABELA DE DISTRIBUIÇÃO F), pode-se afirmar então que para a água tratada, o $F_{cal} < F_{tab}$ no estudo da seletividade realizado.

5.2 LINEARIDADE

Para a construção da curva analítica, para análise da linearidade, preparou-se 3 (três) vias de 5 (cinco) diferentes concentrações (0,2 mg/L; 0,5 mg/L; 1,0 mg/L; 1,5 mg/L e 2,0 mg/L) a partir de solução padrão de fluoreto 10 mg/L conforme tabela 4. Os resultados expressos em mg L⁻¹ de F⁻ são apresentados na tabela 8.

Tabela 8: Resultados obtidos no estudo de linearidade

Ponto (mg L⁻¹)	Resultado Obtido (mg L⁻¹)	Resultado Esperado (mg L⁻¹)	Resíduo (Esperado – Obtido)	Resíduos (%)
0,2	0,21	0,22	-0,01	-9,22
0,2	0,20	0,22	-0,02	-14,68
0,2	0,21	0,22	-0,01	-9,22
0,5	0,45	0,46	-0,01	-3,93
0,5	0,44	0,46	-0,02	-6,29
0,5	0,43	0,46	-0,03	-8,76
1,0	0,93	0,86	0,07	7,00
1,0	0,92	0,86	0,06	5,99
1,0	0,94	0,86	0,08	7,99
1,5	1,32	1,26	0,06	4,39
1,5	1,29	1,26	0,03	2,16
1,5	1,28	1,26	0,02	1,40
2,0	1,62	1,66	-0,04	-2,43
2,0	1,61	1,66	-0,05	-3,06
2,0	1,60	1,66	-0,06	-3,71

Por meio dos resultados obtidos na tabela 8 foi possível construir a curva analítica e obter sua regressão linear. Os resultados esperados são obtidos por meio da equação da reta, sendo os resíduos de regressão linear a subtração do valor esperado pelo obtido. A curva analítica obtida assim como o perfil dos resíduos de regressão linear estão apresentados respectivamente nas figuras 3 e 4.

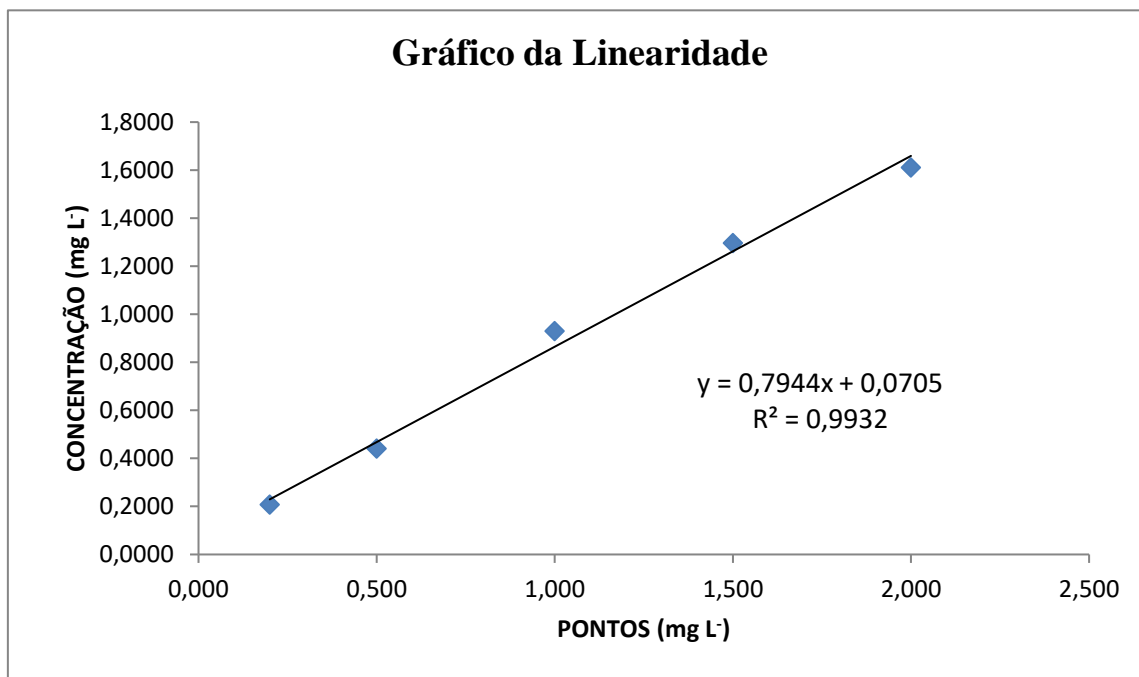


Figura 3: Curva analítica obtida no estudo da linearidade

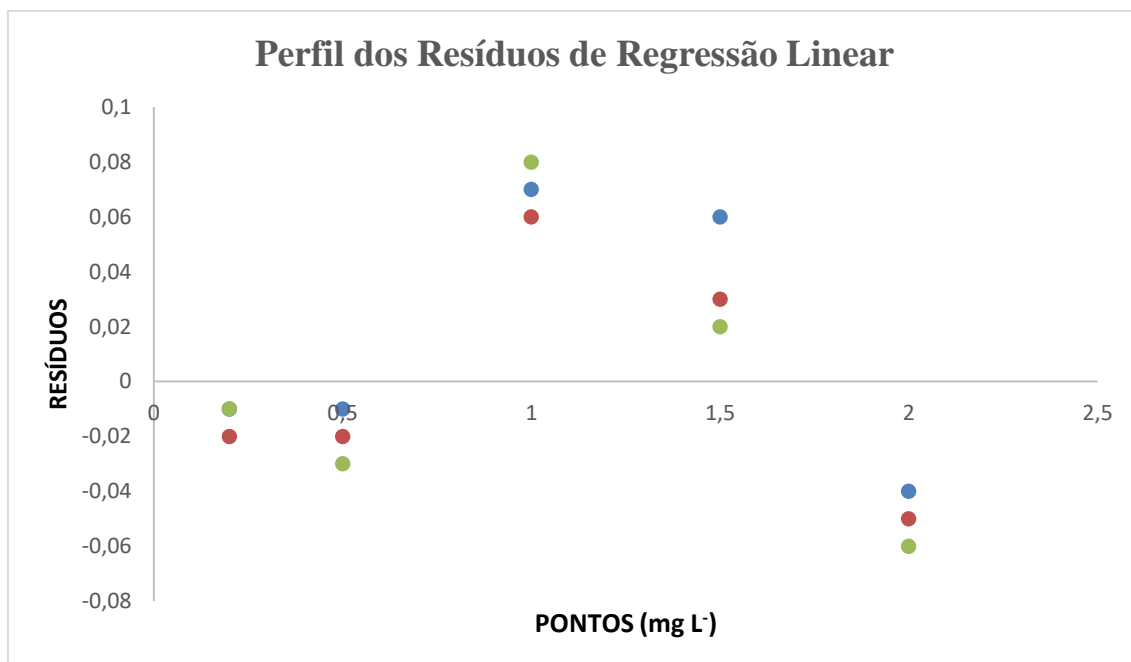


Figura 4: Perfil dos resíduos de regressão linear

Por meio do Gráfico da Linearidade (figura 3) pode-se verificar o coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9932 e por meio deste calcular o coeficiente de correlação (r) que é igual a 0,9966. O gráfico do Perfil dos Resíduos de Regressão Linear apresenta-se de forma aleatória com variações não superiores a 20% para mais ou para menos.

A ausência de valores aberrantes (*outliers*) foi determinada por meio do teste de Grubbs (teste G), onde os valores de G_{cal} foram calculados de acordo com a equação (9).

$$Z = \frac{|x_i - \bar{x}|}{s} \quad (9)$$

Onde:

x_i : valor do resíduo obtido;

\bar{x} : média amostral;

s : desvio padrão amostral.

O valor da média amostral de todos os resíduos obtidos foi de $7,40 \times 10^{-18}$ e o desvio padrão amostral foi de 0,0455. A tabela 9 mostra os valores de G_{cal} obtidos em cada ponto das curvas analíticas.

Tabela 9: Resultados obtidos de G_{cal} em todos os pontos das três curvas analíticas estudadas.

Ponto (mg L ⁻¹)	Resultado Obtido (mg L ⁻¹)
0,2	0,4258
0,2	0,6456
0,2	0,4258
0,5	0,3888
0,5	0,6087
0,5	0,8285
1,0	1,4312
1,0	1,2114
1,0	1,6511
1,5	1,2729
1,5	0,6135
1,5	0,3937

2,0	0,8637
2,0	1,0836
2,0	1,3034

Desta forma, comparou-se os valores de G_{cal} com o valor de G_{tab} , de acordo com a “TABELA PARA TESTE DE GRUBBS” (Anexo 3) onde para $n=15$ (com 95% de confiança) tem-se $G = 2,409$. Portanto, pode-se afirmar que em todos os casos $G_{cal} < G_{tab}$ no estudo de *outliers*.

Em relação a homocedasticidade da curva, foi realizado o teste de Cochran, onde os valores de C_{cal} foram calculados de acordo com a equação (10).

$$C = \frac{s_{max}^2}{\sum_{i=1}^k s_i^2} = \frac{\text{maior variância}}{\text{soma de todas as variâncias}}, \quad (10)$$

A tabela 10 mostra os resultados obtidos no teste de Cochran para a curva analítica estudada.

Tabela 10: Resultados de C_{cal} para teste de homocedasticidade da curva analítica.

Maior variância	0,00043
Soma das variâncias	0,00077
Ccal	0,57

Desta forma, comparou-se os valores de C_{cal} com o valor de C_{tab} , de acordo com a “TABELA PARA TESTE DE COCHRAN” (Anexo 4) onde para 5 grupos e 3 réplicas (com 95% de confiança) tem-se $C = 0,684$. Portanto, pode-se afirmar que em todos os casos $C_{cal} < C_{tab}$ no estudo da homocedasticidade da curva analítica.

5.3 SENSIBILIDADE

Na sensibilidade devem ser avaliados os valores obtidos para os limites de detecção e quantificação do método (LDM e LQM). Desta forma, sete (07) vias de uma Solução Padrão de Fluoreto $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ foram preparadas e analisadas obtendo-se os resultados listados na tabela 11.

Tabela 11: Resultados obtidos na análise da solução padrão para o estudo da seletividade.

Vias	Resultado Obtido (mg L⁻¹)
1	0,032
2	0,032
3	0,011
4	0,027
5	0,016
6	0,027
7	0,011

A partir dos resultados obtidos na tabela 11 foi possível calcular a média dos valores que foi de 0,022 e o desvio padrão amostral que foi de 0,01. Em seguida o valor do desvio padrão foi substituído na equação 5 para obtenção do LDM e ambos os valores foram substituídos na equação 6 para obtenção do LQM. A tabela 12 apresenta os valores obtidos para LDM e LQM no estudo de seletividade.

Tabela 12: Valores obtidos no estudo de LDM e LQM.

Limite de detecção (LD) calculado	0,03 mg L ⁻¹
Limite de detecção (LQ) calculado	0,118 mg L ⁻¹

Os valores obtidos na tabela 12 foram arredondados para os valores inteiros mais próximos obtendo-se 0,03 mg L⁻¹ para LDM e 0,2 mg L⁻¹ para LQM no estudo da sensibilidade.

5.4 PRECISÃO

5.4.1 Estudo da repetibilidade

Para o estudo da precisão baseada na repetitividade avalia-se o coeficientes de variação (CV) comparando-se com o coeficiente de variação de Horwitz (CV_H) e o critério de aceitação baseado na *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2016) a qual estabelece um critério de aceitação de 11% para analito apresentando razão de 10⁻⁶ (1 ppm). Desta forma, sete (07) vias de três diferentes concentrações (0,2 mg/L; 1,0 mg/L e 2,0 mg/L) foram preparadas a partir de uma solução padrão de fluoreto 10 mg/L de acordo com a tabela 05. Os resultados estão listados na tabela 13.

Tabela 13: Resultados obtidos no estudo da repetibilidade.

Vias	Nível 1 (0,2 mg/L)	Nível 2 (1,0 mg/L)	Nível 3 (2,0 mg/L)
1	0,18	0,93	1,62
2	0,19	0,98	1,61
3	0,21	1,01	1,62
4	0,21	0,94	1,63
5	0,21	0,96	1,66
6	0,18	0,98	1,61
7	0,19	0,99	1,63

A partir dos dados obtidos na tabela 13 é possível calcular o coeficiente de variação, faixa de concentração e seus respectivos limites aceitáveis, ou seja, o coeficiente de variação de Horwitz. A tabela 14 apresenta os resultados obtidos para o CV e o CV_H assim como o critério de aceitação baseado na AOAC (2016).

Tabela 14: Critérios de aceitação, CV e CV_H calculados no estudo da repetibilidade.

	Nível 1 (0,2 mg/L)	Nível 2 (1,0 mg/L)	Nível 3 (2,0 mg/L)
Coeficiente de variação (CV%)	7,53	2,78	1,07
Coeficiente de variação de Horwitz (CV_H %)	20,38	16,00	14,41
% Critério de aceitação (AOAC, 2016)	11	11	11

Desta forma, comparou-se o coeficiente de variação (CV) com seus respectivos critérios de aceitação e coeficiente de variação de Horwitz, calculado de acordo com a equação 7. Assim, evidenciou-se que em toda a faixa de concentração estudada CV < CV_H e CV < 11 no estudo da repetibilidade.

5.4.2 Estudo da precisão intermediária

No estudo da precisão intermediária é necessário que algumas condições do ensaio sejam alteradas, como: mudança de analista, equipamento, local e data do ensaio. Como variações para o estudo, adotou-se a reprodução do ensaio por dois analistas diferentes.

Cada analista ensaiou sete (07) vias de uma solução padrão de fluoreto 10 mg/L preparadas em três (03) níveis de concentração conforme tabela 6. A tabela 15 apresenta os resultados obtidos pelos dois analistas nas diferentes concentrações estudadas.

Tabela 15: Resultados obtidos no estudo da precisão intermediária.

ANALISTA 1			
Vias	Nível 1 (0,2 mg/L)	Nível 2 (1,0 mg/L)	Nível 3 (2,0 mg/L)
1	0,18	0,93	1,62
2	0,19	0,98	1,61
3	0,21	1,01	1,62
4	0,21	0,94	1,63
5	0,21	0,96	1,66
6	0,18	0,98	1,61
7	0,19	0,99	1,63
ANALISTA 2			
Vias	Nível 1 (0,2 mg/L)	Nível 2 (1,0 mg/L)	Nível 3 (2,0 mg/L)
1	0,18	1,00	1,70
2	0,20	1,01	1,62
3	0,19	0,99	1,65
4	0,18	0,98	1,61
5	0,21	0,95	1,65
6	0,18	0,95	1,64
7	0,21	0,95	1,68

O coeficiente de variação (CV) foi calculado para cada analista em todos os níveis de concentração trabalhados, os resultados estão apresentados na tabela 16.

Tabela 16: Coeficientes de variação do estudo da precisão intermediária.

ANALISTA 1			
	Nível 1 (0,2 mg/L)	Nível 2 (1,0 mg/L)	Nível 3 (2,0 mg/L)
Coefficiente de variação (CV%)	7,53	2,78	1,07
ANALISTA 2			
Coefficiente de variação (CV%)	7,22	2,81	1,88

Desta forma, evidenciou-se que para todos os níveis de concentração estudados e para os diferentes analista, o CV obtido é menor do que 10%.

5.5 EXATIDÃO

No estudo da exatidão foram avaliados os percentuais de recuperação (%R), calculados de acordo com a equação 8, de um branco (água deionizada) contaminado com um padrão de fluoreto nas concentrações de 0,2 mg/L; 1,0 mg/L e 2,0 mg/L preparados de acordo com a tabela 7. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 17.

Tabela 17: Resultados obtidos no estudo da exatidão baseado na recuperação.

Vias	Nível 1 (0,2 mg/L)	Nível 2 (1,0 mg/L)	Nível 3 (2,0 mg/L)
1	0,18	0,93	1,62
2	0,19	0,98	1,61
3	0,21	1,01	1,62
4	0,21	0,94	1,63
5	0,21	0,96	1,66
6	0,18	0,98	1,61
7	0,19	0,99	1,63
Percentuais de recuperação (%R)			
Vias	Nível 1 (0,2 mg/L)	Nível 2 (1,0 mg/L)	Nível 3 (2,0 mg/L)
1	87,88	93,33	81,21
2	96,97	97,58	80,61
3	106,06	100,61	81,21
4	103,03	93,94	81,52

5	106,06	96,36	83,03
6	90,91	98,18	80,30
7	93,94	99,39	81,52

Como critério de aceitação utilizou-se o intervalo de 80% a 110% conforme a AOAC (2016). Portanto, evidenciou-se que em todos os níveis estudados o $80 \leq \%R \leq 110$ no estudo da exatidão baseado na recuperação.

5.6 INCERTEZA DE MEDIÇÃO

De acordo com as instruções do Standard Methods (APHA, 2017), INMETRO (2017) e EURACHEM (2014) pode-se criar um diagrama de causa e efeito para o ensaio de fluoretos em águas. A figura 5 apresenta este diagrama com as fontes de incerteza consideradas para o ensaio.

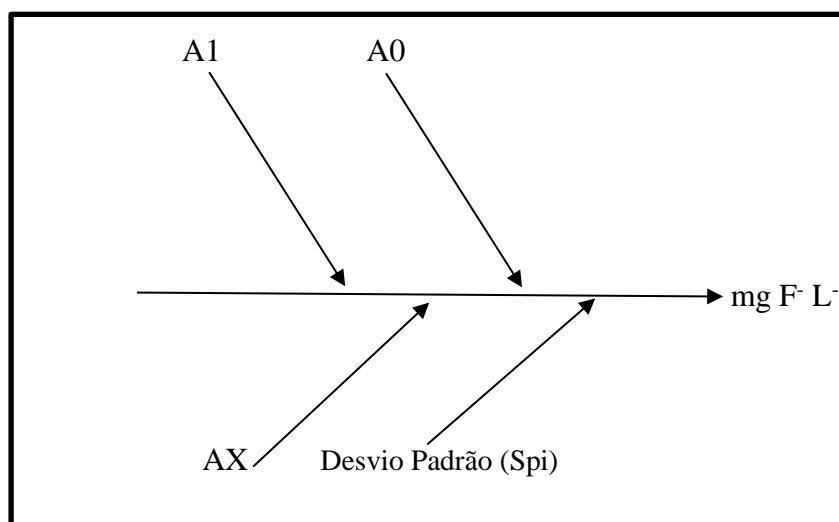


Figura 5: Diagrama causa e efeito para o ensaio de fluoretos em água.

Todas as fontes de incerteza são combinadas de acordo com a equação (11).

$$\frac{mg}{L} \text{ Fluoreto} = \frac{A0-AX}{AX-A1} + Spi \quad (11)$$

Onde: A0 = absorvância da água deionizada + reagente SPADNS;

A1 = absorvância do padrão de fluoreto 1 mg/L + reagente SPADNS;

AX = absorvância da amostra + reagente SPADNS.

Após o levantamento das fontes de incerteza, avaliou-se a contribuição de cada variável calculando-se a incerteza combinada e em seguida a incerteza expandida para um nível de 95% de confiança. Os valores calculados estão apresentados na tabela 18.

Tabela 18: Resultados de incerteza combinada, expandida e % incerteza.

Concentração (mg/L)	Incerteza combinada (\pm)	Incerteza expandida (\pm)	Incerteza (%)
0,2	0,03	0,06	32,15
1,0	0,04	0,07	7,87
2,0	0,04	0,08	4,25

CONCLUSÃO

A metodologia encontra-se validada apresentando precisão e exatidão satisfatórias. Os resultados obtidos em cada parâmetro do processo de validação foram:

- 6 • Seletividade: o método mostrou-se seletivo para a matriz em estudo, apresentado $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$.
- Linearidade: a metodologia mostrou-se linear em toda a faixa de estudo, apresentando $R^2 > 0,99$; gráfico de “Perfil dos resíduos de regressão” em ordem aleatória, $G_{\text{cal}} < G_{\text{tab}}$ evidenciando ausência de valores aberrantes (outliers) e $C_{\text{cal}} < C_{\text{tab}}$ evidenciando a homocedasticidade da curva analisada.
- Sensibilidade: o método apresentou limite de detecção (LDM) igual a 0,03 mg/L e limite de quantificação (LQM) igual a 0,2 mg/L.
- Precisão: a metodologia apresentou repetibilidade satisfatória, com $CV < 11\%$ e $CV < CV_H$. Em relação a reprodutibilidade, a mesma também mostrou-se satisfatória apresentando $CV < 10\%$.
- Exatidão: o método apresentou em toda a faixa estudada um $80 \leq \%R \leq 110$, apresentando uma recuperação satisfatória.
- Incerteza de Medição: no limite de quantificação, a metodologia apresenta uma maior incerteza (32,15%), tendo seu impacto reduzido a medida em que se aumentam as concentrações do analito.

Portanto, conclui-se que a alteração na metodologia normalizada (*Standard Methods 4500 F – Método D*) não gerou resultados inválidos na determinação de fluoretos em água pelo método SPADNS. Observou-se que ao aumentar a concentração limite da metodologia para 2 mg/L ao invés de 1,4 mg/L; o maior nível de concentração mostrou-se preciso e apesar do percentual de recuperação ter diminuído comparando-se com níveis inferiores este ainda se encontra dentro do critério de aceitação de 80% a 110%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 7 ALBANO, F. M., RAYA-RODRIGUEZ, M. T. **Validação e Garantia da Qualidade de Ensaios Laboratoriais – Guia Prático**. Porto Alegre, Rede Metrológica RS, 2015.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 4500 F D. In.: **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 23 st ed. Washington, 2017.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, **Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater**, 23 st ed, Washington, 2017.
- AOAC International., Official methods of analysis of AOAC International, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F). Gaithersburg: AOAC International, 2016.
- BRASIL, V. L. M. **Fluoretos in natura em águas de poços na zona rural da Paraíba**. 2010. Disponível em: <http://www.ccs.ufpb.br/dor/templates/joomla-vortex/TCC/10.2/21.pdf>>. Acesso em: 04/10/2019.
- BRITO, C. S. et al. **Vigilância da concentração de flúor nas águas de abastecimento público na cidade de Passo Fundo – RS**. Cadernos Saúde Coletiva, 24(4), 452-459, dezembro, 2016.
- BUENDIA, O. C. **Fluoretação de águas: manual de orientação prática**. São Paulo: American Med Editora Ltda, PNUD. 1996. 138 p.
- CURY, J. A. **Uso do flúor e controle da cárie como doença**. 2001. Disponível em <https://w2.fop.unicamp.br/dcf/bioquimica/downloads/mat_consulta4usofluorcontrolecarie.pdf>. Acesso em: 07/10/2019.
- ELY H.C, LOCH J.A. **Utilização de flúor na prática pediátrica: indicações e risco**. Rev. Med. PUCRS. v. 8, n. 4, 172-81. 1998
- EURACHEM . **Guia EURACHEM / CITAC: Determinando a incerteza na medição analítica**. Primeira Edição Brasileira. Sociedade Brasileira de Metrologia, 2014. Disponível em: <<https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv>>. Acesso em: 15/10/2019.

FERREIRA, R.; BENEDET, H. D. **Comparação de Métodos para Determinação de Flúor**. B.CEPPA, Curitiba, v. 17, n.1, p. 53-58, jan./jun.1999.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre Validade de Métodos Analíticos**. Revisão 07 – JUL/2018. Disponível em:

<https://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ-CGCRE-8_07.pdf>.

Acesso em: 02/10/2019.

ISO 5725-2:1994(1998). Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results - Part 2: basic method for the Determination of Repeatability and Reproducibility of a Standard Measurement Method.

ISO 5725-3:1994(2001). Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results - Part 3: Intermediate Measures of Precision of a Standard Measurement Method.

LEITE, F. **Validação em análise química**. Campinas, São Paulo: Editora Átomo, 1998. 224 p. 3º edição.

MARTINS, A. T. L.; FORTE, F. D. S.; SAMPAIO, F. C. **Mapeamento dos teores residuais de flúor de águas da zona rural do sertão nordestino no Brasil**. 2010.

Disponível

em:

<

<https://www.revodontolunesp.com.br/article/588018fb7f8c9d0a098b4efa/pdf/rou-41-3-147.pdf>>. Acesso em: 04/10/2019.

NARVAI PC. **Saúde bucal coletiva: um conceito**. *Odontol Soc.* 2001;3:47-52.

PEIXOTO, E. M. A., **FLÚOR**. *Química Nova na Escola*, nº 8, novembro, 1998.

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 552, issue 1-2, November 2005, p. 25-35.

ANEXO 1 – PROCEDIMENTO DE ENSAIO DE FLUORETOS EM ÁGUA PELO MÉTODO SPADNS

TÍTULO: DETERMINAÇÃO DE FLUORETOS EM ÁGUA PELO MÉTODO SPADNS

OBJETIVO

Descrever a metodologia analítica para determinação de fluoretos em água pelo método Spadns.

MATERIAIS E REAGENTES

- Espectrofotômetro;
- Reagente Spadns;
- Micropipetador 10 mL;
- Balão volumétrico de 50 e 100 mL;
- Béquer 100 mL;
- Bastão de vidro;
- Água ultrapura;
- Ácido Clorídrico P.A;
- Padrão Fluoreto 1000 ppm.

PROCEDIMENTO

1 – Solução de referencia

Medir 5 mL de Solução SPADNS e adicionar em um béquer. Acrescentar 5 mL de água ultrapura e misturar com auxílio de bastão de vidro. Medir 6 mL de Ácido Clorídrico PA, misturar. Esta solução será utilizada para zerar o espectrofotômetro no momento da medição.

2- Solução Padrão de 10 mg/L

Medir 1 mL de Solução Padrão de 1000 ppm de fluoretos em balão volumétrico de 100 mL e aferir com água ultrapura.

3- Solução Padrão 1 mg/L

Medir 5 mL da Solução Padrão de 10 mg/L em balão volumétrico de 50 mL e aferir com água ultrapura.

4- Determinação de Fluoretos

Realizar a leitura do branco utilizando 50 mL de água ultrapura, adicionar com auxílio de micropipeta 10 mL do reagente SPADNS. Misturar com bastão de vidro e realizar a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 580 nm com cubeta de 10 mm.

Realizar a leitura do padrão de 1 mg/L adicionando 50 mL da Solução Padrão de 1 mg/L, 10 mL do reagente SPADNS. Misturar com bastão de vidro e realizar a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 580 nm com cubeta de 10 mm.

Realizar leitura da amostra adicionando 50 mL da mesma com auxílio de balão volumétrico de 50 mL. Adicionar 10 mL do reagente SPADNS. Misturar com bastão de vidro e realizar a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 580 nm com cubeta de 10 mm.

CÁLCULO

Calcular a concentração de fluoreto em mg/L de acordo com a equação abaixo:

$$[F^-] \text{ (mg/L)} = \frac{A_0 - A_x}{A_0 - A_1}$$

Onde:

A₀ = Absorbância do branco;

A_x = Absorbância da amostra;

A₁ = Absorbância da solução de 1 mg/L.

ANEXO 2 – TABELA DE DISTRIBUIÇÃO F – ALFA DE 0,050 (95% DE CONFIANÇA)

GL V2	V1																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	20	40	60	120	240
1	39.864	49.500	53.593	55.833	57.240	58.204	58.906	59.439	59.857	60.195	60.473	60.705	60.902	61.073	61.220	61.740	62.529	62.794	63.061	63.194
2	8.526	9.000	9.162	9.243	9.293	9.326	9.349	9.367	9.381	9.392	9.401	9.408	9.415	9.420	9.425	9.441	9.466	9.475	9.483	9.487
3	5.538	5.462	5.391	5.343	5.309	5.285	5.266	5.252	5.240	5.230	5.222	5.216	5.210	5.205	5.200	5.184	5.160	5.151	5.143	5.138
4	4.545	4.325	4.191	4.107	4.051	4.010	3.979	3.955	3.936	3.920	3.907	3.896	3.886	3.878	3.870	3.844	3.804	3.790	3.775	3.768
5	4.060	3.780	3.619	3.520	3.453	3.405	3.368	3.339	3.316	3.297	3.282	3.268	3.257	3.247	3.238	3.207	3.157	3.140	3.123	3.114
6	3.776	3.463	3.289	3.181	3.108	3.055	3.014	2.983	2.958	2.937	2.920	2.905	2.892	2.881	2.871	2.836	2.781	2.762	2.742	2.732
7	3.589	3.257	3.074	2.961	2.883	2.827	2.785	2.752	2.725	2.703	2.684	2.668	2.654	2.643	2.632	2.595	2.535	2.514	2.493	2.482
8	3.458	3.113	2.924	2.806	2.726	2.668	2.624	2.589	2.561	2.538	2.519	2.502	2.488	2.475	2.464	2.425	2.361	2.339	2.316	2.304
9	3.360	3.006	2.813	2.693	2.611	2.551	2.505	2.469	2.440	2.416	2.396	2.379	2.364	2.351	2.340	2.298	2.232	2.208	2.184	2.172
10	3.285	2.924	2.728	2.605	2.522	2.461	2.414	2.377	2.347	2.323	2.302	2.284	2.269	2.255	2.244	2.201	2.132	2.107	2.082	2.069
11	3.225	2.860	2.660	2.536	2.451	2.389	2.342	2.304	2.274	2.248	2.227	2.209	2.193	2.179	2.167	2.123	2.052	2.026	2.000	1.986
12	3.177	2.807	2.606	2.480	2.394	2.331	2.283	2.245	2.214	2.188	2.166	2.147	2.131	2.117	2.105	2.060	1.986	1.960	1.932	1.918
13	3.136	2.763	2.560	2.434	2.347	2.283	2.234	2.195	2.164	2.138	2.116	2.097	2.080	2.066	2.053	2.007	1.931	1.904	1.876	1.861
14	3.102	2.726	2.522	2.395	2.307	2.243	2.193	2.154	2.122	2.095	2.073	2.054	2.037	2.022	2.010	1.962	1.885	1.857	1.828	1.813
15	3.073	2.695	2.490	2.361	2.273	2.208	2.158	2.119	2.086	2.059	2.037	2.017	2.000	1.985	1.972	1.924	1.845	1.817	1.787	1.771
16	3.048	2.668	2.462	2.333	2.244	2.178	2.128	2.088	2.055	2.028	2.005	1.985	1.968	1.953	1.940	1.891	1.811	1.782	1.751	1.735
17	3.026	2.645	2.437	2.308	2.218	2.152	2.102	2.061	2.028	2.001	1.978	1.958	1.940	1.925	1.912	1.862	1.781	1.751	1.719	1.703
18	3.007	2.624	2.416	2.286	2.196	2.130	2.079	2.038	2.005	1.977	1.954	1.933	1.916	1.900	1.887	1.837	1.754	1.723	1.691	1.674
19	2.990	2.606	2.397	2.266	2.176	2.109	2.058	2.017	1.984	1.956	1.932	1.912	1.894	1.878	1.865	1.814	1.730	1.699	1.666	1.649
20	2.975	2.589	2.380	2.249	2.158	2.091	2.040	1.999	1.965	1.937	1.913	1.892	1.875	1.859	1.845	1.794	1.708	1.677	1.643	1.626
21	2.961	2.575	2.365	2.233	2.142	2.075	2.023	1.982	1.948	1.920	1.896	1.875	1.857	1.841	1.827	1.776	1.689	1.657	1.623	1.605
22	2.949	2.561	2.351	2.219	2.128	2.060	2.008	1.967	1.933	1.904	1.880	1.859	1.841	1.825	1.811	1.759	1.671	1.639	1.604	1.586
23	2.937	2.549	2.339	2.207	2.115	2.047	1.995	1.953	1.919	1.890	1.866	1.845	1.827	1.811	1.796	1.744	1.655	1.622	1.587	1.568
24	2.927	2.538	2.327	2.195	2.103	2.035	1.983	1.941	1.906	1.877	1.853	1.832	1.814	1.797	1.783	1.730	1.641	1.607	1.571	1.552
25	2.918	2.528	2.317	2.184	2.092	2.024	1.971	1.929	1.895	1.866	1.841	1.820	1.802	1.785	1.771	1.718	1.627	1.593	1.557	1.538
26	2.909	2.519	2.307	2.174	2.082	2.014	1.961	1.919	1.884	1.855	1.830	1.809	1.790	1.774	1.760	1.706	1.615	1.581	1.544	1.524
27	2.901	2.511	2.299	2.166	2.073	2.005	1.952	1.909	1.874	1.845	1.820	1.799	1.780	1.764	1.749	1.695	1.603	1.569	1.531	1.511
28	2.894	2.503	2.291	2.157	2.064	1.996	1.943	1.900	1.865	1.836	1.811	1.790	1.771	1.754	1.740	1.685	1.592	1.558	1.520	1.500
29	2.887	2.495	2.283	2.149	2.057	1.988	1.935	1.892	1.857	1.827	1.802	1.781	1.762	1.745	1.731	1.676	1.583	1.547	1.509	1.489
30	2.881	2.489	2.276	2.142	2.049	1.980	1.927	1.884	1.849	1.819	1.794	1.773	1.754	1.737	1.722	1.667	1.573	1.538	1.499	1.478
40	2.835	2.440	2.226	2.091	1.997	1.927	1.873	1.829	1.793	1.763	1.737	1.715	1.695	1.678	1.662	1.605	1.506	1.467	1.425	1.402
50	2.809	2.412	2.197	2.061	1.966	1.895	1.840	1.796	1.760	1.729	1.703	1.680	1.660	1.643	1.627	1.568	1.465	1.424	1.379	1.354
60	2.791	2.393	2.177	2.041	1.946	1.875	1.819	1.775	1.738	1.707	1.680	1.657	1.637	1.619	1.603	1.543	1.437	1.395	1.348	1.321
80	2.769	2.370	2.154	2.016	1.921	1.849	1.793	1.748	1.711	1.680	1.653	1.629	1.609	1.590	1.574	1.513	1.403	1.358	1.307	1.278
100	2.756	2.356	2.139	2.002	1.906	1.834	1.778	1.732	1.695	1.663	1.636	1.612	1.592	1.573	1.557	1.494	1.382	1.336	1.282	1.250
120	2.748	2.347	2.130	1.992	1.896	1.824	1.767	1.722	1.684	1.652	1.625	1.601	1.580	1.562	1.545	1.482	1.368	1.320	1.265	1.232
240	2.727	2.325	2.107	1.968	1.871	1.799	1.742	1.696	1.658	1.625	1.598	1.573	1.552	1.533	1.516	1.451	1.332	1.281	1.219	1.180

ANEXO 3 – TABELA TESTE DE GRUBBS – ALPHA DE 0,05

N	Critical Z	N	Critical Z
3	1.15	27	2.86
4	1.48	28	2.88
5	1.71	29	2.89
6	1.89	30	2.91
7	2.02	31	2.92
8	2.13	32	2.94
9	2.21	33	2.95
10	2.29	34	2.97
11	2.34	35	2.98
12	2.41	36	2.99
13	2.46	37	3.00
14	2.51	38	3.01
15	2.55	39	3.03
16	2.59	40	3.04
17	2.62	50	3.13
18	2.65	60	3.20
19	2.68	70	3.26
20	2.71	80	3.31
21	2.73	90	3.35
22	2.76	100	3.38
23	2.78	110	3.42
24	2.80	120	3.44
25	2.82	130	3.47
26	2.84	140	3.49

ANEXO 4 – TABELA PARA TESTE DE COCHRAN – ALPHA DE 0,05

p	n=2	n=3	n=4	n=5
2	-	0,975	0,939	0,906
3	0,967	0,871	0,798	0,748
4	0,906	0,788	0,684	0,626
5	0,841	0,684	0,598	0,544
6	0,781	0,616	0,532	0,48
7	0,727	0,561	0,48	0,431
8	0,68	0,516	0,438	0,391
9	0,638	0,478	0,403	0,358
10	0,602	0,445	0,373	0,331
11	0,57	0,417	0,348	0,308
12	0,541	0,392	0,326	0,288
13	0,515	0,371	0,307	0,271
14	0,492	0,352	0,291	0,255
15	0,471	0,335	0,276	0,242
16	0,452	0,319	0,262	0,23
17	0,434	0,305	0,25	0,219
18	0,418	0,293	0,24	0,209
19	0,403	0,281	0,23	0,2
20	0,389	0,27	0,22	0,192