

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
QUÍMICA TECNOLÓGICA

NATANAEL FONSECA NETO

AVALIAÇÃO DE UM FOTÔMETRO *LAB-MADE* PELA ADAPTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS COLORIMÉTRICOS DE ANÁLISE

BRASÍLIA
2025

NATANAEL FONSECA NETO

AVALIAÇÃO DE UM FOTÔMETRO *LAB-MADE* PELA ADAPTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS COLORIMÉTRICOS DE ANÁLISE

Trabalho apresentado ao Instituto de Química da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Bacharel em Química Tecnológica.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fonseca

BRASÍLIA

2025

AVALIAÇÃO DE UM FOTÔMETRO *LAB-MADE* PELA ADAPTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS COLORIMÉTRICOS DE ANÁLISE

_____
Professor orientador (IQ/UnB): Prof. Dr. Alexandre Fonseca

_____
Membro Titular (IQ/UnB): Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga

_____
Membro Titular (IQ/UnB): Prof. Dr. Tarcisio Silva de Almeida

_____
Membro Suplente (IQ/UnB): Prof. Dr. Cyro Lucas Silva Chagas

BRASÍLIA

2025

Dedicado à um garoto de 7 anos que se divertia com os quadradinhos coloridos nas páginas de um velho livro de química e decidiu ali que seria cientista,

E à sua mãe, que lutou para que ele conseguisse.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Alexandre Fonseca pela orientação de excelência, pela paciência e por se dispor a me ajudar nesse momento tão crítico. Obrigado pelos ensinamentos valiosos, não apenas durante o desenvolvimento deste trabalho, mas ao longo de toda a graduação.

Agradeço aos colegas e equipe do LIAMA por todo o acolhimento e suporte. À Prof. Dra. Claudia Cristina Gatto, Bethânia e Camila, agradeço a gentileza e colaboração com reagentes cruciais para a realização deste trabalho.

Agradeço à minha mãe, Márcia, e meus irmãos, Patrícia, Estella e Rafael, minha família e alicerce, por todo o apoio ao longo dos anos. Obrigado pelos valores que me ensinaram, pela força que herdei e pelo amor incondicional. São vocês a razão primária de eu ter chegado até aqui.

Ao Gabriel, agradeço por segurar minha mão, por ser tão atencioso e, naturalmente, por se dispor a coletar e carregar comigo litros de amostra de água. Obrigado pelos abraços, pelas listas de música, pelos filmes de arte. Por me ensinar a enxergar outras perspectivas, a lidar com os dissabores da vida com leveza, a ter curiosidade de experimentar o mundo – coisas tão importantes de serem lembradas à um cientista. Obrigado por me salvar de mim.

Agradeço à Bianca, Mirthes, Gustavo, Bruna, Edmilson, Regina e Ana por me acolherem em sua família como parte dela. Com vocês aprendi a importância da união e perseverança, elementos essenciais para que eu tenha conseguido levar este trabalho até o fim. Obrigado por partilharem comigo tanto amor e carinho.

Aos amigos Aline, Jacqueline, Isabel, João Marcos, Rebeca, Paula e Júlia, companheiros de curso e de vida, agradeço pelos sorrisos que me trouxeram, pela companhia nos almoços no RU, pelas horas de estudos juntos, pelos conhecimentos compartilhados e por acreditarem tanto em mim ao longo desses 14 anos. Vencemos todos, enfim.

Aos amigos Geraldo, Paul, Paula, Jennyfer, Fernanda, Murilo, Pedro, Gabriela, Rafael, Simone, Doralice, Gabriel, Gabs e Xandra, agradeço pelas palavras de conforto nos momentos difíceis, pelos puxões de orelha necessários e pelos conselhos que me ajudaram a superar obstáculos. Este trabalho se deve em grande parte aos esforços de vocês em não me deixar desistir.

Agradeço à Edna, Monike, Elaine, Cláudio, José Luiz, Cristiane, Belchor, Mônica e Lyvia, amigos da ETE Norte, com quem aprendi as bases da espectrofotometria na prática e cujo trabalho e dedicação me inspiraram a redescobrir meu amor pela química.

Agradeço ainda à Sonia Medeiros, que no início de tudo, ainda em 2011, me possibilitou estar na UnB.

"Não esquecer que a estrutura do átomo não é vista, mas sabe-se dela. Sei de muita coisa que não vi. E vós também. Não se pode dar uma prova da existência do que é mais verdadeiro, o jeito é acreditar. Acreditar chorando".

Clarice Lispector

RESUMO

O presente trabalho descreve a avaliação de um fotômetro LED-VIS desenvolvido no Laboratório de Instrumentação, Automação e Miniaturização Analítica (LIAMA) do Instituto de Química da Universidade de Brasília. O instrumento utiliza um módulo LED RGB como fonte luminosa, um módulo detector modelo OPT101 e é microcontrolado por um Arduíno Uno. Três métodos colorimétricos foram adaptados à execução com o fotômetro, cada um operando com um comprimento de onda diferente: o método de Griess para a determinação de nitrito (λ = 520 nm) e os métodos do cloreto estanoso e do ácido vanadomolibdofosfórico para a determinação de fósforo (λ = 630 nm e λ = 470 nm, respectivamente). Foram obtidas curvas analíticas com excelente correlação linear para os três métodos. Os valores de R^2 para cada método foram 0,9995, 0,9991 e 0,9994, respectivamente. Os Limites de Detecção alcançados foram da ordem de 0,01 $mg.L^{-1}$ para os métodos de Griess e do cloreto estanoso e de 0,4 $mg.L^{-1}$ para o método do ácido vanadomolibdofosfórico. Os Limites de Quantificação alcançados foram de 0,05 $mg.L^{-1}$ para os métodos de Griess e do cloreto estanoso e de 1,0 $mg.L^{-1}$ para o método do ácido vanadomolibdofosfórico. Os três métodos apresentaram resultados satisfatórios nos ensaios de recuperação e de repetibilidade com base nos critérios estabelecidos pela AOAC International. O método de Griess adaptado se mostrou aplicável para a determinação de nitrito em águas superficiais quando comparado o valor do LQ alcançado com a legislação brasileira. Os métodos testados para a determinação de fósforo não atendem estritamente à legislação ambiental. O fotômetro demonstrou potencial para aplicação ao uso em análises de campo, dadas as suas dimensões reduzidas, interface microcontrolada que dispensa o uso de microcomputador para realizar medições e portabilidade dos materiais necessários à execução dos métodos adaptados.

Palavras-chave: Fotômetro LED-VIS. Nitrito. Fósforo. Validação analítica.

ABSTRACT

This work describes the evaluation of a LED-VIS photometer developed at the Laboratory of Instrumentation, Automation and Analytical Miniaturization (LIAMA) of the Chemistry Institute of the University of Brasília. The instrument uses an RGB LED module as a light source, a detector module model OPT101 and is microcontrolled by an Arduino Uno. Three colorimetric methods were adapted to be used with the photometer, each operating at a different wavelength: the Griess method for the determination of nitrite (λ = 520 nm) and the stannous chloride and vanadomolybdophosphoric acid methods for the determination of phosphorus (λ = 630 nm and λ = 470 nm, respectively). Analytical curves with excellent linear correlation were obtained for the three methods. The R^2 values for each method were 0.9995, 0.9991 and 0.9994, respectively. The Limits of Detection achieved were 0.01 $mg.L^{-1}$ for the Griess and stannous chloride methods and 0.4 $mg.L^{-1}$ for the vanadomolybdophosphoric acid method. The Limits of Quantification achieved were 0.05 $mg.L^{-1}$ for the Griess and stannous chloride methods and 1.0 $mg.L^{-1}$ for the vanadomolybdophosphoric acid method. The three methods yielded satisfactory results in the recovery and repeatability tests based on the criteria established by AOAC International. The adapted Griess method proved to be applicable for the determination of nitrite in surface waters when comparing the LQ value achieved with the Brazilian legislation. The methods tested for the determination of phosphorus do not strictly comply with the environmental legislation. The photometer demonstrated potential for application in field analyses, given its reduced dimensions, microcontrolled interface that eliminates the need for a microcomputer to perform measurements, and portability of the materials required to execute the adapted methods.

Keywords: LED-VIS photometer. Nitrite. Phosphorus. Analytical validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da atenuação de um feixe de radiação por uma solução absorvente 17

Figura 2 - Diagrama simplificado de um fotômetro LED-VIS 19

Figura 3 - Reação de Griess modificada, mais empregada atualmente 21

Figura 4 - Amostras de água superficial no momento da coleta 28

Figura 5 - a) Diagrama esquemático dos componentes eletrônicos do fotômetro. b) Vista interna dos componentes eletrônicos no fotômetro 29

Figura 6 - Vista do fotômetro em operação 30

Figura 7 - Soluções da curva de calibração do método de Griess após reação 32

Figura 8 - Soluções da curva de calibração do método do cloreto estanoso após reação 35

Figura 9 - Soluções da curva de calibração do método do ácido vanadomolibdofosfórico após reação 37

Figura 10 - Curva analítica para o método de Griess 40

Figura 11 - Curva analítica para o método do cloreto estanoso 40

Figura 12 - Curva analítica para o método do ácido vanadomolibdofosfórico 41

Figura 13 - Distribuição dos resíduos para o método de Griess 42

Figura 14 - Distribuição dos resíduos para o método do cloreto estanoso 42

Figura 15 - Distribuição dos resíduos para o método do ácido vanadomolibdofosfórico 43

Figura 16 - Curva analítica revisada para o método de Griess 44

Figura 17 - Dispersão dos resíduos revisada para o método de Griess 44

Figura 18 - Material utilizado para execução da análise de nitrito pelo método de Griess adaptado 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alíquotas de MRC de nitrito utilizadas no preparo da curva de calibração do método de Griess adaptado 31

Tabela 2 - Alíquotas de MRC de fósforo utilizadas no preparo da curva de calibração do método do cloreto estanoso 34

Tabela 3 - Alíquotas de MRC de fósforo utilizadas no preparo da curva de calibração do método do ácido vanadomolibdofosfórico 36

Tabela 4 - Resultados do Teste de Cochran para os três métodos adaptados ... 39

Tabela 5 - ANOVA para o método de Griess 45

Tabela 6 - ANOVA para o método do cloreto estanoso 46

Tabela 7 - ANOVA para o método do ácido vanadomolibdofosfórico 46

Tabela 8 - Limites de Detecção e Quantificação para os três métodos adaptados 47

Tabela 9 - Resultados dos ensaios de recuperação para os três métodos testados 49

Tabela 10 - Resultados dos ensaios de repetibilidade para os três métodos testados 50

Tabela 11 - Resultados do Teste de Grubbs para o método de Griess 58

Tabela 12 - Resultados do Teste de Grubbs para o método do cloreto estanoso 59

Tabela 13 - Resultados do Teste de Grubbs para o método do ácido vanadomolibdofosfórico 60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	*Analysis of Variance*
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LED	*Light Emitting Diode*
LIAMA	Laboratório de Instrumentação, Automação e Miniaturização Analítica
MRC	Material de Referência Certificado
PEAD	Polietileno de Alta Densidade
PLA	Ácido Poliláctico
SMEWW	*Standard Methods for the Evaluation of Water and Wastewater*
UV	Ultravioleta
VIS	Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14
1.1. Objetivos Gerais 15
1.2. Objetivos Específicos 15
2. REVISÃO TEÓRICA 16
2.1. Espectrofotometria e Instrumentos LED-VIS 16
2.2. Nitrito 19
2.3. Fósforo 21
2.4. Validação de metodologias analíticas 24
3. MATERIAIS E MÉTODOS 26
3.1. Constituição do Fotômetro LED-VIS 28
3.2. Método de Griess adaptado 30
3.2.1. Reagentes e soluções 30
3.2.2. Procedimento 32
3.3. Método do cloreto estanoso adaptado 33
3.3.1. Reagentes e soluções 33
3.3.2. Procedimento 34
3.4. Método do ácido vanadomolibdofosfórico adaptado 35
3.4.1. Reagentes e soluções 35
3.4.2. Procedimento 37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 38
4.1. Linearidade e Sensibilidade 38
4.2. Limites de Detecção e Quantificação 46
4.3. Exatidão/Recuperação 47
4.4. Precisão/Repetibilidade 49
4.5. Avaliação da aplicabilidade do instrumento 50
5. CONCLUSÃO 53
BIBLIOGRAFIA 54
APÊNDICE I 58

1. INTRODUÇÃO

A espectroscopia de absorção molecular na região do visível (VIS) é largamente utilizada na determinação de substâncias orgânicas e inorgânicas em diversas matrizes. Esta técnica é fundamentada na Lei de Beer, que correlaciona a absorbância de uma solução ao ser atravessada por um feixe de radiação com a concentração da solução e o comprimento do caminho óptico percorrido pelo feixe na solução a partir de uma constante de proporcionalidade, a absortividade. A absorbância é uma grandeza adimensional, calculada a partir dos valores de intensidade luminosa do feixe sem atenuação pela solução e do feixe após atenuação. A razão desses dois valores chama-se transmitância (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2017).

Existem diferentes tipos de instrumentos ópticos dedicados a realizar medições de absorbância, classificados principalmente de acordo com o método de seleção do comprimento de onda da radiação a ser utilizada na análise. Espectrofotômetros são instrumentos mais sofisticados que utilizam estruturas capazes de decompor a luz policromática nos seus diversos comprimentos de onda individuais, como prismas ou redes de difração, permitindo a obtenção de espectros de absorção completos das soluções. Fotômetros por outro lado são instrumentos mais simples que utilizam filtros ópticos para seleção de uma faixa estreita de comprimentos de onda para serem utilizados na medição da absorbância (SKOOG, 2006; SANTOS; et. al., 2023).

Fotômetros LED-VIS são instrumentos que dispensam o uso de filtros ópticos, visto que LEDs são fontes que emitem luz em uma faixa estreita de comprimentos de onda. Esses equipamentos têm se popularizado em aplicações que vão desde laboratórios de ensino a análises clínicas, devido principalmente ao seu baixo custo e operação simplificada em relação aos espectrofotômetros e fotômetros convencionais (PONTES, 2014).

Um fotômetro LED-VIS utilizando um módulo LED RGB como fonte luminosa, fotodiodo como detector e microcontrolado por arduíno foi desenvolvido no Laboratório de Instrumentação, Automação e Miniaturização Analítica (LIAMA) do Instituto de Química da Universidade de Brasília (IQ-UnB), sob orientação do Prof. Dr. Alexandre Fonseca, e viu-se a necessidade de avaliá-lo quanto à sua

capacidade de realizar medições de absorbância nos três comprimentos de onda emitidos e verificar sua aplicabilidade à realização de análises na prática.

Foram então selecionadas na literatura três metodologias analíticas colorimétricas com potencial para aplicação do fotômetro com base nos comprimentos de onda requeridos para sua execução e na relevância dos analitos em termos de análises ambientais: o método de Griess para determinação de nitrito e os métodos do cloreto estanoso e do ácido vanadomolibdofosfórico para determinação de fósforo reativo, para testar a operação nos comprimentos de onda de 520 nm, 630 nm e 470 nm, respectivamente.

Através da validação analítica dos três métodos para a operação com amostras de água superficial, conforme parâmetros estabelecidos em norma internacional, foi possível avaliar a performance analítica do instrumento e sua aplicabilidade.

1.2. Objetivo Geral

Este trabalho visa avaliar a performance analítica de um fotômetro LED-VIS *labmade*, desenvolvido no Laboratório de Instrumentação, Automação e Miniaturização Analítica (LIAMA) do Instituto de Química da Universidade de Brasília (IQ-UnB), através da determinação de teores de substâncias químicas indicadoras da qualidade de águas superficiais utilizando métodos colorimétricos adaptados.

1.3. Objetivos Específicos

I. Avaliar o desempenho do fotômetro LED-VIS *labmade* nos três comprimentos de onda operacionais, 470 nm, 520 nm e 630 nm, a partir de diferentes métodos colorimétricos de análise.

II. Realizar a adaptação e validação analítica do método de Griess para determinação de nitrito em água segundo diretrizes estabelecidas pelo INMETRO através da Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos (DOQ-CGCRE-008 Revisão 09, de junho de 2020).

III. Realizar a adaptação e validação analítica dos métodos do cloreto estanoso e do ácido vanadomolibdofosfórico para determinação de fósforo em água

segundo diretrizes estabelecidas pelo INMETRO através da Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos (DOQ-CGCRE-008 Revisão 09, de junho de 2020).

IV. Verificar a aplicabilidade do fotômetro LED-VIS para a determinação dos teores dos três analitos em água superficial atendendo aos limites estabelecidos na legislação ambiental brasileira vigente.

V. Verificar a aplicabilidade do fotômetro LED-VIS ao uso em campo.

2. REVISÃO TEÓRICA

2.1. Espectrofotometria e Instrumentos LED-VIS

A espectroscopia é um ramo da Física que lida com as diversas formas de interação da radiação com a matéria, seja por absorção, emissão, reflexão ou espalhamento (AZEVEDO; SOUSA; CASTRO, 2019). Além da natureza da interação, as diferentes ramificações da espectroscopia são classificadas também pela região do espectro eletromagnético envolvida, como o infravermelho (IV), o visível (VIS) e o ultravioleta (UV) e pela natureza da matéria (atômica, molecular, etc.). A espectroscopia de absorção molecular na região VIS é particularmente relevante para a determinação do teor de substâncias químicas em diversas matrizes de amostras (SKOOG; et. al., 2006).

A absorção de radiação na região do VIS por espécies moleculares envolve a ocorrência de transições eletrônicas a níveis energéticos mais elevados, levando essas espécies de seu estado fundamental à um estado excitado, sendo que cada transição está associada a um comprimento de onda específico. É possível estabelecer uma relação entre a concentração de uma espécie molecular em um meio e a atenuação de um feixe de radiação monocromática incidido sobre ele devido à absorção através da Lei de Beer ou Lei de Absorção (AZEVEDO; SOUSA; CASTRO, 2019). Esta lei correlaciona a absorbância (*A*), uma grandeza adimensional que indica a quantidade de radiação absorvida por uma substância em um meio, à concentração do meio (*c*), ao comprimento percorrido pelo feixe no meio (*b*) e a uma constante de proporcionalidade (*a*) chamada absortividade, resultando na seguinte equação:

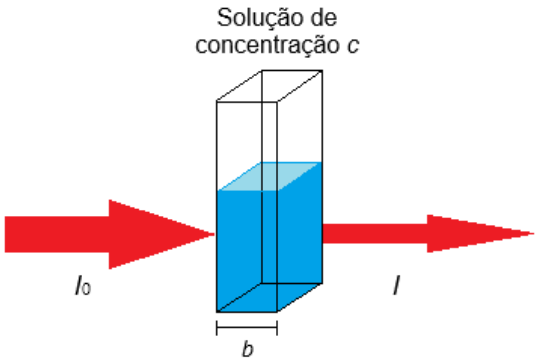
$$A = abc \quad (1)$$

Onde *A* é dada por:

$$A = -\log\frac{I}{I_0} \quad (2)$$

Sendo I_0 a intensidade inicial do feixe e *I* a intensidade atenuada. Quando a concentração é expressa em mol.L^{-1} a constante *a* recebe o nome de absortividade molar (ε). A partir dessa relação é possível utilizar soluções padrão do analito para construir uma curva *A* x *c* e obter uma equação de calibração por regressão linear. Contudo, esta relação apresenta limitações em alguns casos, como o de meios mais concentrados, onde a interação entre as moléculas ou íons absorventes muito próximos em solução gera desvios significativos da linearidade (SKOOG; et. al., 2006). A Lei de Beer serve como base para a espectrofotometria.

Figura 1 – Representação da atenuação de um feixe de radiação por uma solução absorvente.



Fonte: Adaptado de SKOOG; et. al. (2006).

Instrumentos ópticos que utilizam fontes de radiação policromática, tipicamente lâmpadas de tungstênio para a região do VIS, em conjunto com dispositivos capazes de separá-la nos diversos comprimentos de onda individuais, como prismas e redes de difração, são espectrofotômetros. Já os fotômetros (ou colorímetros, no caso de alguns instrumentos que operam na região do VIS) são instrumentos que utilizam filtros ópticos para selecionar uma faixa de comprimentos de onda a partir da fonte policromática. Estes últimos são instrumentos mais simples e têm aplicações mais diretas (SANTOS; et. al., 2023). Seus componentes básicos

são a fonte de radiação, filtro óptico para seleção do comprimento de onda, compartimento para amostras, um detector responsável por converter o sinal luminoso em sinal elétrico, amplificador que aumenta este sinal para que seja lido mais facilmente, e uma interface que permita ao usuário acionar comandos, ajustar parâmetros do equipamento e visualizar as medidas (SKOOG, et. al., 2006).

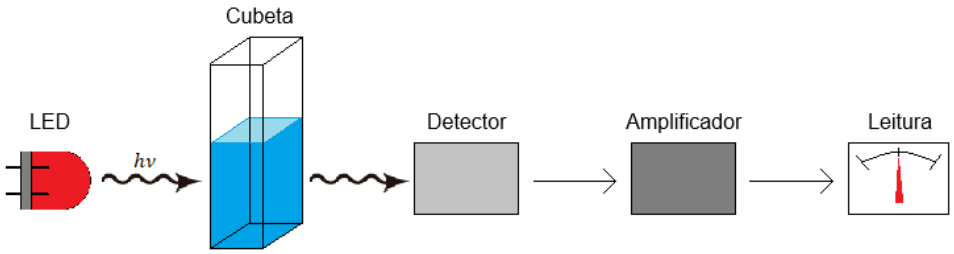
Uma vez que espectrofotômetros são equipamentos mais complexos, de custo elevado, e em geral requerem manutenção por técnicos altamente treinados (CHAIANANTAKU; et. al., 2018), fotômetros se apresentam como uma alternativa de melhor custo-benefício para aplicações em diversas áreas, como laboratórios de análise ambiental, análises clínicas, análises em campo e laboratórios de ensino (GAIÃO; et. al., 2005; AZEVEDO; SOUSA; CASTRO, 2019).

Uma alternativa mais recente aos fotômetros que utilizam filtros ópticos são os fotômetros que utilizam LEDs (*Light Emitting Diodes*) como fonte de luz (GAIÃO; et. al., 2005). Ao contrário das lâmpadas policromáticas tradicionais, LEDs emitem apenas uma faixa estreita de comprimentos de onda (da ordem de ±20 nm) (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2017), portanto dispensam o uso de filtros ópticos para seleção destes, além de possuírem custo substancialmente mais baixo e estarem disponíveis comercialmente de forma mais acessível. Diversos modelos de fotômetros LED-VIS estão descritos na literatura, como os que utilizam LEDs individuais e em apenas uma faixa de comprimentos de onda (GUADAGNINI; ROCHA; BARLETTE, 2019), os que utilizam LEDs individuais em várias faixas de comprimentos de onda (GAIÃO; et. al., 2005; CHAIANANTAKU; et. al., 2018) e ainda os que utilizam um LED RGB, capaz de operar em três faixas de comprimentos de onda, nas regiões do azul (463 ± 20 mn), verde (525 ± 30 nm) e vermelho (645 ± 20 nm), respectivamente (SANTOS; et. al., 2023). Alguns dos autores se referem aos equipamentos nas duas últimas categorias também como espectrofotômetros, dado que operam em múltiplos comprimentos de onda, porém SKOOG, HOLLER, CROUCH (2017) os classificam como fotômetros.

Fotômetros LED-VIS podem operar com vários tipos de detectores, sendo os principais os fotodiodos, fotoresistores, fototransistores e até mesmo outro LED. Alguns módulos de detector utilizados em fotômetros dessa natureza têm o amplificador integrado ao circuito. O uso de LEDs reduziu o custo e a complexidade desses instrumentos, mas a necessidade de um microcomputador para operá-los e realizar o tratamento de dados ainda era um inconveniente, então foram

desenvolvidos modelos microcontrolados e mais autônomos. (PONTES, 2014). São descritas versões desses instrumentos que operam com a plataforma arduíno, que permite o acoplamento de diferentes módulos de detectores, LEDs, *displays* digitais, etc., facilitando a montagem, operação dos equipamentos e transmissão de dados coletados (PONTES, 2014; GUADAGNINI; ROCHA; BARLETTE, 2019).

Figura 2 - Diagrama simplificado de um fotômetro LED-VIS.



Fonte: Adaptado de SKOOG, HOLLER, CROUCH (2017).

2.2. Nitrito

Entre as principais formas em que o Nitrogênio é encontrado no meio ambiente, os íons nitrito (NO_2^-) são espécies relevantes em termos de composição de águas e esgotos (APHA, 2023), sendo parte do ciclo biogeoquímico desse elemento e tendo ampla distribuição em ambientes terrestres e aquáticos. Neste ciclo, nitrogênio atmosférico (N_2) é convertido em espécies que as plantas podem utilizar em seu desenvolvimento - íons amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) - após uma série de reações, em geral realizadas por microrganismos. O ciclo envolve as etapas de fixação (conversão de N_2 a NH_3), amonificação (conversão de NH_3 a NH_4^+), nitrificação (conversão NH_4^+ a NO_3^-) e desnitrificação (redução de NO_2^- ou NO_3^- a NO, N_2O ou N_2) (VIEIRA, 2017; CETESB, 2022).

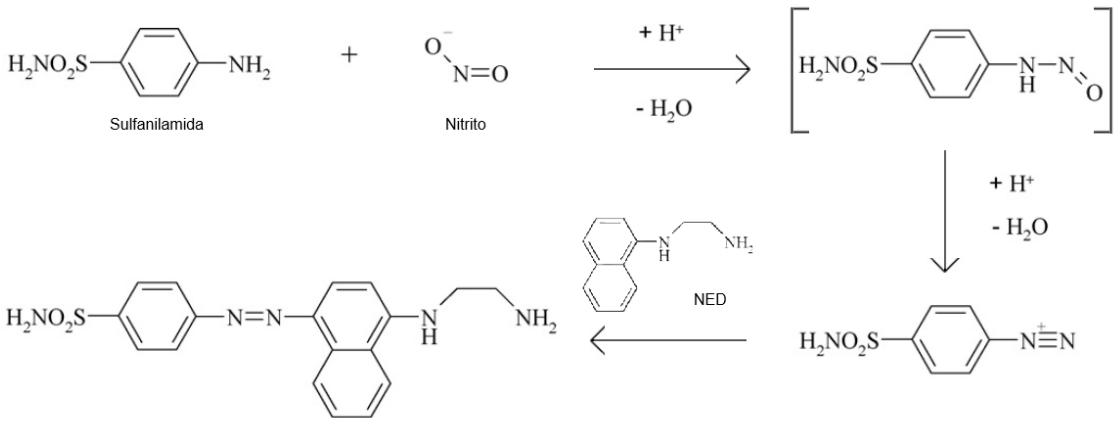
Apesar da presença natural desses compostos no meio ambiente, o aporte dessas espécies em águas superficiais advindo de fontes antrópicas pode causar desequilíbrios nesse ciclo. O nitrito é facilmente oxidado a nitrato no ambiente, sendo esta última a forma mais estável e mais comumente encontrada como poluente em solos e águas superficiais. Nitrato é bastante utilizado na agricultura em forma de sais inorgânicos como parte de fertilizantes, uma vez que é um dos nutrientes essenciais a espécies vegetais (CETESB, 2022). Nitrito é

empregado como inibidor de corrosão em águas utilizadas para circulação em equipamentos industriais, como sistemas de refrigeração e caldeiras (APHA, 2023). Ambos são utilizados na indústria alimentícia como preservantes, principalmente para carnes e embutidos. Outros usos dessas espécies incluem as indústrias farmacêutica e de explosivos. Essas atividades e seus efluentes, além de efluentes domésticos, podem ser fontes de contaminação por nitrito e nitrato em águas superficiais (APHA, 2023; CETESB, 2022).

O Ministério da Saúde do Brasil estabelece, através do Anexo XX da Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017, os limites de concentração de nitrito e nitrato em águas potáveis como, respectivamente, 1 mg N-NO_2^-.L^{-1} (um miligrama de nitrogênio como nitrito por litro) e 10 mg N-NO_3^-.L^{-1} (dez miligramas de nitrogênio como nitrato por litro). O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), através da Resolução N° 357, de 17 de março de 2005, traz estes mesmos limites nos padrões de qualidade estipulados para águas doces classes I, II e III.

A colorimetria é uma das principais técnicas empregadas na determinação de nitrito em águas e efluentes. O método colorimétrico para determinação de nitrito, conhecido como método de Griess, envolve sua reação com ácido sulfanílico ($HO_3SC_6H_4NH_2$), em meio ácido, formando um cátion de diazônio ($HO_3SC_6H_4–N{\equiv}N^+$) que se combina com 1-naftilamina ($C_{10}H_7NH_2$) para formar um azo-corante ($C_{16}H_{13}N_3SO_3$), com pico de absorção na região do visível em torno de 540 nm. Esta reação foi reportada pela primeira vez por Johann Peter Griess, em 1879 (TSIKAS, 2007). Também são reportadas variações modernas do método partindo-se da sulfanilamida ($C_6H_8N_2O_2S$) em vez do ácido sulfanílico e da N-(1-naftil)etilenodiamina (NED, $C_{12}H_{14}N_2$) em vez da 1-naftilamina (TSIKAS, 2007; APHA, 2023), conforme descrito na figura 3.

Figura 3 - Reação de Griess modificada, mais empregada atualmente.



Fonte: Adaptado de TSIKAS (2007).

É possível realizar a determinação de nitrato a partir do mesmo método, empregando-se uma etapa prévia de redução do nitrato a nitrito utilizando-se uma coluna contendo grânulos de cádmio tratados com sulfato de cobre ($CuSO_4$), porém este método é menos usual para esta espécie, visto que essa etapa gera resíduos perigosos, e tem sido substituído por métodos mais consonantes com a química verde (MELCHERT; ROCHA, 2004).

2.3. Fósforo

O fósforo é um elemento essencial a todas as formas de vida, compondo desde a estrutura do DNA aos fosfolipídeos formadores de membrana celular em organismos vivos. Ocorre na natureza quase exclusivamente na forma de fosfatos e tem ampla distribuição em ambientes terrestres e aquáticos, porém seu ciclo não tem um componente atmosférico expressivo. Sua movimentação pela poeira no ar tem importância para alguns ecossistemas, mas essa contribuição é insignificante em termos globais. (ADUAN; VILELA, JÚNIOR, 2004; ZHU; MA, 2020).

Em ambientes naturais está distribuído entre as espécies ortofosfato (forma iônica, PO_4^{3-}), polifosfatos (forma condensada) e o fósforo orgânico (fosfatos ligados organicamente). Em águas naturais são mais comuns as formas iônicas protonadas $H_2PO_4^-$ e HPO_4^{2-}. A fração solúvel de fosfatos está imediatamente disponível para ser aproveitada no desenvolvimento de plantas e microrganismos,

mas a fração particulada, seja a presente em rochas, na matéria orgânica ou adsorvida em superfícies, funciona como uma fonte secundária desse elemento a longo prazo (FRANZEN, 2009; WORSFOLD; MCKELVIE; MONBET, 2016).

A atividade antrópica apresenta forte influência no ciclo do fósforo, acelerando drasticamente sua disponibilidade no ambiente através de atividades de mineração, fertilização de solos para plantio, produção de gado, geração de efluentes domésticos, etc. A partir desses processos pode ocorrer o aporte excessivo de fósforo em solos e corpos aquáticos, causando fortes impactos aos ecossistemas (FREITAS; et. al., 2020; ZHU; MA, 2020).

Em termos de poluição de corpos aquáticos, a presença de fósforo em excesso pode levar ao processo de eutrofização, que se caracteriza pelo aumento exacerbado de nutrientes essenciais (nitrogênio e fósforo) dissolvidos, promovendo o desenvolvimento excessivo de alguns organismos primários, prejudicando o crescimento de outros. O desenvolvimento desenfreado de cianobactérias tóxicas em águas para consumo humano constitui grave ameaça à saúde da população, uma vez que tratamentos convencionais não são eficientes para remoção de toxinas dessa natureza. Ambientes lênticos, isto é, ambientes de água parada como lagos e lagoas, são ainda mais sensíveis à eutrofização, dada sua dinâmica mais lenta em relação aos ambientes lóticos (rios, riachos, etc.). Reservatórios de água, dependendo do tempo de retenção, são considerados ambientes intermediários entre lênticos e lóticos (FRANZEN, 2009; FREITAS, et. al., 2020).

A análise de fósforo constitui um parâmetro importante na avaliação da qualidade de águas superficiais (NAGUL; et. al., 2015). A legislação brasileira estabelece diferentes limites para as concentrações desse nutriente com base no tipo de ambiente aquático (lótico, intermediário ou lêntico) e na classe de qualidade ambiental exigida (I, II ou III), através da Resolução N° 357 do CONAMA, de 17 de março de 2005. O limite mais restritivo, de 0,02 mg $P.L^{-1}$ (miligramas de fósforo por litro), é para água doce classe I em ambiente lêntico, o que é esperado, visto que entre as destinações possíveis das águas nessa classe está o abastecimento para consumo humano após tratamento simplificado (BRASIL, 2005).

Dada a importância da determinação do teor de fósforo em matrizes aquáticas, diversos métodos de análise para determinação de fósforo foram desenvolvidos, desde métodos colorimétricos simples às versões adaptadas à análise por injeção em fluxo (FIA), além de determinações via cromatografia iônica.

Os métodos colorimétricos apresentam menor custo, bons limites de deteção e ainda são dominantes em laboratórios de análise ambientais (WORSFOLD; MCKELVIE; MONBET, 2016).

Os principais métodos colorimétricos para determinação de fósforo são baseados na detecção da intensidade da cor do azul de molibdênio, que tem pico de absorção por volta de 690 nm em soluções aquosas, porém a partir de 625 mn já exibe absorbâncias apreciáveis em outros solventes (APHA, 2023). A execução desse método envolve a reação entre fosfato e molibdatos em meio fortemente ácido, formando um heteropoliácido (ácido molibdofosfórico) que é então reduzido para formar azul de molibdênio, tipicamente pela adição de solução de cloreto estanoso ou ácido ascórbico. O azul de molibdênio não é apenas uma espécie, mas uma família de compostos formados após a redução de molibdatos. A descoberta dessa reação é atribuída a Berzelius, ainda em 1826, porém a resolução da complexa estrutura formada só foi proposta por James F. Keggin em 1934 (NAGUL; et. al., 2015; WORSFOLD; MCKELVIE; MONBET, 2016).

$$PO_4^{3-} + 12\ MoO_4^{2-} + 27H^+ \rightarrow H_3PO_4(MoO_3)_{12} + 12\ H_2O \quad (I)$$

$$H_3PMo(VI)_{12}O_{40} + \text{Redutor} \rightarrow [H_4PMo(VI)_8Mo(V)_4O_{40}]^{3-} \quad (II)$$

O método do azul de molibdênio apresenta boa sensibilidade e é capaz de alcançar limites de detecção bastante baixos, sendo possível realizar através dele determinações de teores de fósforo da ordem de 7 µg $P.L^{-1}$ quando empregados caminhos ópticos e tratamentos de amostra adequados, porém apresenta desvantagens relacionadas à estabilidade da cor do complexo formado, que é bastante dependente das condições e do tempo de reação (APHA, 2023).

Outro método bastante utilizado para a determinação colorimétrica de fósforo é baseado na detecção da intensidade da cor do ácido vanadomolibdofosfórico, que absorve na região entre 400 e 490 nm (APHA, 2023). Quando a reação I é conduzida na presença de íons vanadato (VO_3^-) forma-se essa espécie, conferindo coloração amarela à solução. (HESLOP; RAMSAY, 1969). Esse método apresenta menor sensibilidade e limites de detecção maiores em relação ao método do azul de molibdênio, porém tem a vantagem de produzir uma coloração

bastante estável a longo prazo sem a necessidade de um controle tão rigoroso das condições de reação (APHA, 2023).

A especiação do fósforo em soluções aquosas é complexa e frequentemente definida de forma operacional. A fração dissolvida compreende ortofosfatos, polifosfatos e fosfatos organicamente ligados que estejam em solução e passem por um filtro de 0,45 µm, os demais constituem a fração suspensa. (WORSFOLD; MCKELVIE; MONBET, 2016). Apesar da fração disponível para sofrer as reações com molibdato ser majoritariamente composta de ortofosfatos, algum grau de hidrólise de polifosfatos ocorre dadas as condições reacionais extremas, então define-se a fração que reage prontamente com o molibdato como fósforo reativo. Ao se realizar hidrólise ácida para converter polifosfatos a ortofosfato algum fosfato orgânico é liberado, então a fração determinada após esse preparo é definida como fósforo total hidrolisável. Determinações de fósforo total na amostra são realizadas empregando-se uma etapa prévia de oxidação, tipicamente utilizando-se permanganato, que converte todo o fósforo na amostra a ortofosfato, sejam fosfatos organicamente ligados ou polifosfatos (APHA, 2023).

2.4. Validação de metodologias analíticas

A ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 é uma norma internacional na qual são estabelecidos os requisitos de competência para laboratórios. Essa norma define validação como um processo de verificação onde requisitos são adequados a um uso pretendido. A validação de um método analítico diz respeito à sua adequação para fornecer o resultado que se presta a fornecer, isto é, considerando suas condições de operação, esse método é capaz de gerar resultados com um nível de qualidade adequado (SKOOG, et. al., 2006).

Dada a necessidade de se uniformizar os critérios para avaliar se um método produz resultados adequados, diversas figuras de mérito são utilizadas como parâmetros de avaliação. As principais figuras de mérito envolvidas em estudos de validação analítica são seletividade, linearidade, faixa linear de trabalho, sensibilidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão (RODRIGUES, 2014).

A Seletividade de um método diz respeito à sua capacidade de quantificar inequivocamente um analito na presença de outras substâncias que possam causar

interferências ou alterações no sinal analítico. Uma vez que amostras reais são constituídas por matrizes mais complexas, contendo diversas substâncias diferentes, é necessário avaliar se o método é seletivo o suficiente para detectar o analito nas matrizes que o método se propõe a analisar (RODRIGUES, 2014; INMETRO, 2020).

A Linearidade é avaliada para métodos cuja resposta seja diretamente proporcional à concentração de um dado analito em uma faixa de concentração. A faixa linear de trabalho corresponde à faixa de concentrações onde essa relação é válida. Tipicamente esse critério é atendido em soluções mais diluídas, com soluções mais concentradas exibindo desvios da linearidade progressivamente maiores devido a interações entre espécies presentes em solução (SKOOG, et. al., 2006). Diversos testes estatísticos são utilizados na avaliação da linearidade de um método. Uma vez que o modelo de regressão linear simples tipicamente utilizado na obtenção de equações que correlacionem o sinal analítico com a concentração do analito tem uma série de pressupostos, como a normalidade da distribuição dos erros, é necessário garantir estatisticamente que todos os pressupostos são atendidos antes de se utilizarem dados experimentais para obter uma equação de calibração (CHEIN, 2019). A sensibilidade de um método indica a capacidade do método em distinguir duas concentrações próximas com um certo nível de confiança, estimada pela medida da variação do sinal analítico em função da variação da concentração do analito, o que em um modelo linear é dado pela inclinação da equação de calibração (coeficiente angular) (BRITO; et. al., 2014).

O Limite de Detecção (LD) é a menor concentração que o método é capaz de distinguir, mas não necessariamente quantificar, com certo nível de confiança. O Limite de Quantificação (LQ) é a concentração mínima que o método é capaz de quantificar com níveis aceitáveis de precisão e exatidão. O procedimento para determinar estes limites depende da natureza do método analítico e da faixa de trabalho. (BRITO; et. al., 2014; INMETRO, 2020).

A exatidão indica o nível de concordância entre resultados obtidos a partir do método analítico testado e um valor aceito como verdadeiro. São decritas quatro modalidades principais ensaios de avaliação da exatidão: ensaios com Materiais de Referência Certificados, onde são comparados os resultados obtidos com o Certificado de Análise do material, ensaios de comparação entre resultados obtidos com o método em validação com aqueles obtidos por um método de referência já validado, ensaios de recuperação, onde amostras são fortificadas com quantidades

conhecidas de analito e os resultados obtidos são comparados aos valores teóricos, e ainda ensaios interlaboratoriais, onde os resultados são comparados entre métodos executados em laboratórios distintos. Para cada uma dessas modalidades são estabelecidos critérios específicos de aceitação, baseados nos níveis de concentração testados (BRITO; et. al. 2014; INMETRO, 2020).

A precisão indica o nível de concordância entre diferentes medidas obtidas a partir da mesma amostra. Em geral é avaliada em termos de coeficiente de variação (ou desvio-padrão relativo) de vários resultados. Pode ser avaliada em três níveis: repetibilidade, onde se comparam os resultados obtidos sob as mesmas condições em um curto período; precisão intermediária, onde são comparados resultados obtidos pelo mesmo método com variação de algum fator, como o analista responsável, a data de análise, equipamentos utilizados, etc.; e a reprodutibilidade, que compara resultados obtidos entre laboratórios diferentes (ANVISA, 2017).

A partir da avaliação dessas figuras de mérito são elaborados relatórios detalhados de validação analítica. Tais relatórios podem ser utilizados pelo laboratório na obtenção de certificações, como a acreditação pela ISO/IEC 17025:2017, concedida no Brasil pela Coordenação Geral de Acreditação do INMETRO (CGCRE). Esta comissão foi a responsável pela elaboração da Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos (DOQ-CGCRE-008 Revisão 09, de junho de 2020), documento que não substitui as diretrizes presentes na ISO, mas as sumariza e esclarece, auxiliando os laboratórios na elaboração dos relatórios de validação (INMETRO, 2020). Este documento serviu como base para selecionar os critérios a serem avaliados no desenvolvimento deste trabalho.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A montagem do fotômetro LED-VIS foi realizada no LIAMA previamente ao desenvolvimento deste trabalho, sob orientação do Prof. Dr. Alexandre Fonseca. Os métodos para determinação de nitrito e fósforo reativo foram adaptados a partir do *Standard Methods for the Evaluation of Water and Wastewater* (APHA, 2023). Nos três métodos foram feitas alterações nos volumes de reagentes e amostras, reduzindo-os de 5 a 10 vezes para minimizar o consumo de reagentes e a geração de resíduos, porém mantendo-se as proporções originais para que as faixas de

aplicação e resultados se mantivessem consistentes com a literatura. Uma vez que o SMEWW traz as faixas de concentração onde os métodos apresentam boa correlação linear, não foram preparadas soluções preliminares para a delimitação da faixa de trabalho, procedendo-se diretamente ao preparo de soluções nas concentrações descritas, tanto para a verificação da linearidade quanto para obtenção da equação de calibração. Também não foram realizados ensaios para avaliação da seletividade, visto que se tratam de métodos com perfis de interferentes bastante elucidados pelo SMEWW para as matrizes utilizadas neste trabalho.

Para cada um dos métodos adaptados foram preparados reagentes de cor, soluções para obtenção das curvas analíticas, soluções para ensaios de repetibilidade em três faixas de concentração (baixa, média e alta) e soluções para ensaios de recuperação de padrão na matriz de água superficial, também nas três faixas de concentração. Toda a água utilizada no preparo de soluções foi purificada por osmose reversa, equipamento Gehaka OS10LX. As pesagens de reagentes sólidos foram realizadas em balança analítica Shimadzu AX200. As transferências de volumes acima de 10 mL foram realizadas com provetas de vidro e as demais foram realizadas com micropipetas automáticas monocanal de volume variável cujas faixas de trabalho estão indicadas nos procedimentos. As curvas analíticas foram preparadas utilizando-se as unidades de concentração presentes na legislação ambiental – miligramas de nitrogênio como nitrito por litro (mg $N\text{-}NO_2^-.L^{-1}$) e miligramas de fósforo por litro (mg $P.L^{-1}$).

Os ensaios de recuperação de padrão na matriz de água superficial foram realizados com amostras de água do Lago Paranoá, coletadas na altura do Centro Olímpico da UnB (15°45'34.8"S 47°51'35.6"W). As amostras foram coletadas em bombonas de plástico PEAD de 5 L (figura 4) e armazenadas sob refrigeração na faixa de 1-5°C, sem adição de preservantes. Para a realização dos ensaios de recuperação a amostra foi filtrada em membrana de porosidade 0,45 µm, visto que a presença de sólidos em suspensão é interferente para os três métodos (APHAA, 2023).

Figura 4 - Amostras de água superficial no momento da coleta.

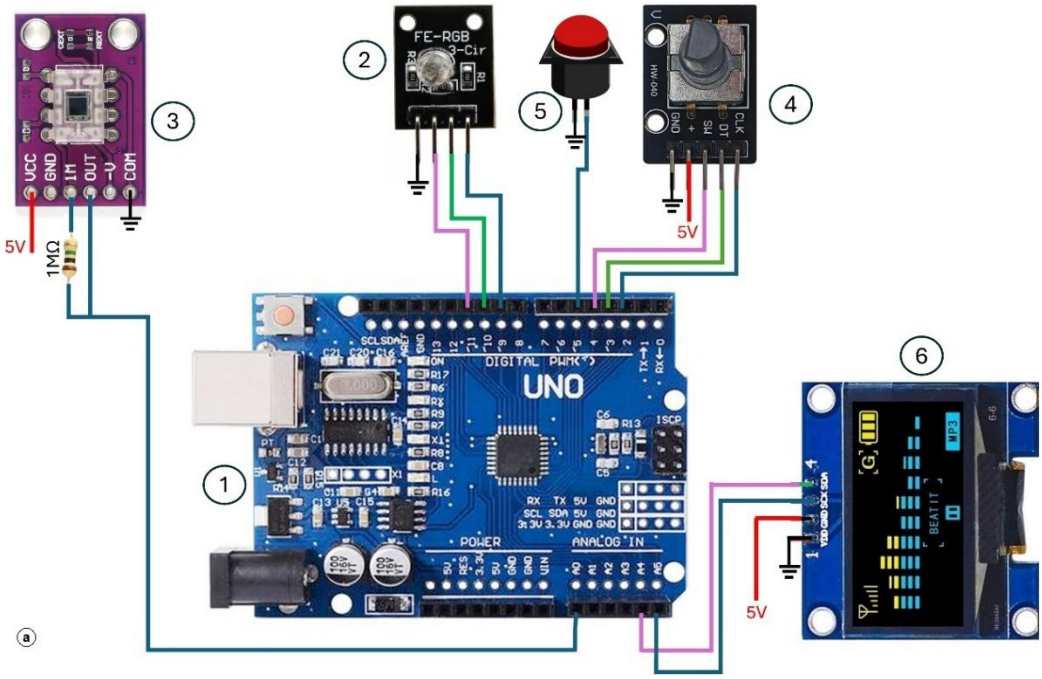


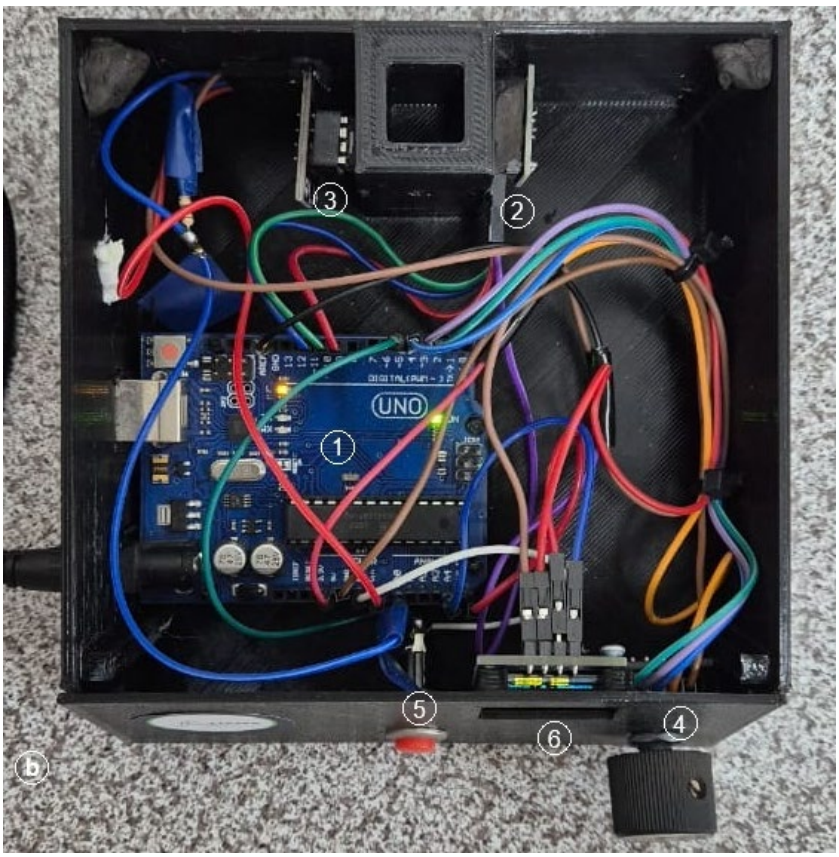
Fonte: Acervo próprio.

3.1. Constituição do Fotômetro LED-VIS

O fotômetro LED-VIS desenvolvido no LIAMA é operado a partir de um microcontrolador arduíno uno. A fonte luminosa utilizada é um módulo LED RGB, capaz de emitir luz nos comprimentos de onda 470 nm (azul), 520 nm (verde) e 630 nm (vermelho). O módulo detector utilizado é um fotodiodo, modelo OPT101, que possui um amplificador integrado. O módulo recebe o sinal luminoso que atravessa o compartimento de cubetas, o converte em um sinal analógico elétrico (em volts) e o amplifica. Este sinal analógico é então convertido a um sinal digital pelo arduíno uno. O arduíno foi programado para realizar o cálculo descrito no item 2.1, equação 2. Ao inserir a cubeta com o branco e pressionar o *push button* vermelho, o arduíno zera o instrumento e registra essa medida como I_0. Ao inserir a cubeta com a amostra o arduíno imediatamente lê o valor como I e realiza o cálculo, mostrando o valor calculado da absorbância (A) no *display* OLED. Além do *push button*, o instrumento também é operado pelo *encoder* rotativo, que permite alternar entre os diferentes comprimentos de onda ao ser pressionado por um segundo e alterar o brilho do LED RGB (em uma escala de 0 a 9) ao ser girado. A estrutura do fotômetro com o compartimento para cubetas foi impressa em 3D utilizando filamento de PLA preto, medindo 12 cm de largura, 13 cm de profundidade na base e 5,5 cm de altura.

Figura 5 – a) Diagrama esquemático dos componentes eletrônicos do fotômetro, sendo: 1. Microcontrolador arduino uno; 2. Módulo de LED RGB; 3. Módulo detector do tipo fotodiodo, modelo OPT101; 4. *Encoder* rotativo; 5. *Push button*; 6. *Display* OLED. **b)** Vista interna dos componentes eletrônicos no fotômetro.





Fonte: Elaboração própria.

Figura 6 - Vista do fotômetro em operação.



Fonte: Acervo próprio.

3.2. Método de Griess adaptado

3.2.1. Reagentes e Soluções

O Reagente de Griess foi preparado adicionando-se inicialmente 70 mL de água purificada e 10 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4, Vetec, 85%) a um béquer de vidro de 150 mL. Foram pesados 1,0006 g de sulfanilamida ($C_6H_8O_2N_2S$, Synth, P.A.) e adicionados à solução ácida até sua completa dissolução. Em seguida foram pesados 0,1008 g de N-(1-naftil)-etilenodiamina diidrocloridrato ($C_{12}H_{14}N_2 \cdot 2HCl$, Sigma Aldrich, 98%) e adicionados à solução resultante até sua completa dissolução. O conteúdo do béquer foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado até a marcação com água purificada. A solução foi transferida a um frasco âmbar de 100 mL e mantida sob refrigeração quando fora de uso.

As soluções-padrão de nitrito para obtenção da curva analítica foram preparadas em oito níveis de concentração, de 0,025 a 0,200 mg $N\text{-}NO_2^-.L^{-1}$, em triplicata para cada nível, totalizando 24 replicatas independentes. Cada solução foi preparada adicionando-se uma alíquota adequada (Tabela 1) de MRC de nitrito (Sigma Aldrich, 304,35 mg $N\text{-}NO_2^-.L^{-1}$) a um balão volumétrico de 100 mL e

completando-se o volume com água purificada. Para o preparo destas soluções foram utilizadas micropipetas nas faixas de 0,5 - 20 µL e 10 - 100 µL.

Tabela 1 – Alíquotas de MRC de nitrito utilizadas no preparo da curva de calibração do método de Griess adaptado.

Nível	Concentração (mg $N\text{-}NO_2^-.L^{-1}$)	Alíquota de MRC (µL)
1	0,025	8,21
2	0,050	16,4
3	0,075	24,6
4	0,100	32,9
5	0,125	41,1
6	0,150	49,3
7	0,175	57,5
8	0,200	65,7

Fonte: Elaboração própria.

Foram preparadas soluções-padrão de $N\text{-}NO_2^-$ de Faixa Baixa (0,050 mg $N\text{-}NO_2^-.L^{-1}$), Faixa Média (0,125 mg $N\text{-}NO_2^-.L^{-1}$) e Faixa Alta (0,175 mg $N\text{-}NO_2^-.L^{-1}$), de forma análoga àquelas preparadas para a curva analítica nessas concentrações, para a verificação da repetibilidade. Para cada faixa foram preparadas seis replicatas independentes, em um curto período, a partir de um MRC de nitrito idêntico ao utilizado para o preparo da curva analítica, porém de lote diferente.

As soluções para recuperação de padrão foram preparadas de forma análoga às soluções para ensaios de repetibilidade, substituindo-se a água purificada por amostra de água superficial filtrada. Uma vez que o volume de MRC adicionado é menor que o volume de amostra por várias ordens de grandeza, o efeito de diluição pela adição das alíquotas de MRC é negligenciável. Os níveis de fortificação (*spikes*) correspondem às concentrações de 0,050 mg $N\text{-}NO_2^-.L^{-1}$ (Faixa Baixa), 0,100 mg $N\text{-}NO_2^-.L^{-1}$ (Faixa Média) e 0,150 mg $N\text{-}NO_2^-.L^{-1}$ (Faixa Alta).

3.2.2. Procedimento

Para a realização das medições de absorbância neste método o fotômetro LED-VIS foi configurado para o comprimento de onda de 520 nm (luz verde) e brilho 5. Foram utilizados *vials* de 25 mL para realizar as reações e micropipetas nas faixas de 1000 – 10000 µL, e 100 – 1000 µL para as transferências de volume. Inicialmente foram adicionados 10 mL de água purificada ao primeiro *vial* (que será o branco utilizado para zerar o instrumento) e 10 mL de solução padrão ou amostra aos demais. Em seguida foram adicionados 0,4 mL do reagente de Griess aos *vials*, que foram levemente agitados por 10 segundos em movimentos circulares até completa mistura dos líquidos e deixados em repouso por 10 minutos. Após este tempo de reação, foram transferidos 2 mL do branco reagido para uma cubeta de plástico com caminho óptico de 1 cm e esta foi tampada para minimizar a entrada de luz externa no instrumento. Em seguida a cubeta foi inserida no fotômetro na orientação adequada, aguardou-se a estabilização do valor de absorbância no *display* e pressionou-se o botão vermelho para zerar o instrumento. A cubeta foi então retirada e enxaguada com água destilada. A medição da absorbância das demais amostras ou soluções é feita de forma análoga, omitindo-se a última etapa de zerar o instrumento.

Figura 7 - Soluções da curva de calibração do método de Griess após reação.



Fonte: Acervo próprio.

3.3. Método do cloreto estanoso adaptado

3.3.1. Reagentes e Soluções

A solução reagente I de molibdato de amônio foi preparada adicionando-se inicialmente 30 mL de água purificada e 28 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4, Vetec, 97%) a um béquer de vidro de 150 mL. Durante essa etapa o béquer foi mantido em banho de gelo para conter o aquecimento excessivo da solução. Em seguida foram pesados 2,5 g de molibdato de amônio tetrahidratado ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$, Synth, 81-83% MoO_3) em um segundo béquer de 150 mL, ao qual foram adicionados 15 mL de água. O béquer foi agitado até a completa dissolução do sal e a solução resultante foi adicionada à solução ácida em banho de gelo. Após o resfriamento da solução, esta foi quantitativamente transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água purificada até a marcação. A solução foi transferida para um frasco âmbar e armazenada em temperatura ambiente.

A solução reagente II de cloreto estanoso foi preparada pesando-se 1,25 g de cloreto estanoso diidratado ($SnCl_2\cdot 2H_2O$, Vetec, 98-103%) um béquer de 150 mL. Em seguida foram adicionados ao béquer 100 mL de glicerol ($C_3H_8O_3$, Vetec, 99%). O béquer foi colocado em banho-maria a 80°C e agitado suavemente em movimentos circulares até completa solubilização do sal. A solução foi transferida para um frasco âmbar, resfriada e armazenada em temperatura ambiente.

As soluções-padrão de fósforo para obtenção da curva analítica foram preparadas em oito níveis de concentração, de 0,020 a 1,000 mg $P.L^{-1}$, em triplicata para cada nível, totalizando 24 replicatas independentes. Cada solução foi preparada adicionando-se uma alíquota adequada (Tabela 2) de MRC de Fósforo (Absolute Standards, 1000 mg $P.L^{-1}$) a um balão volumétrico de 100 mL e completando-se o volume com água purificada. Foram utilizadas micropipetas nas faixas de 0,5 - 20 µL e 10 - 100 µL para o preparo destas soluções.

Tabela 2 – Alíquotas de MRC de fósforo utilizadas no preparo da curva de calibração do método do cloreto estanoso

Nível	Concentração (mg $P.L^{-1}$)	Alíquota de MRC (µL)
1	0,020	2,0
2	0,050	5,0
3	0,075	7,5
4	0,100	10,0
5	0,250	25,0
6	0,500	50,0
7	0,750	75,0
8	1,000	100,0

Fonte: Elaboração própria.

Foram preparadas soluções-padrão de fósforo de Faixa Baixa (0,050 mg $P.L^{-1}$), Faixa Média (0,250 mg $P.L^{-1}$) e Faixa Alta (0,750 mg $P.L^{-1}$), de forma análoga àquelas preparadas para a curva analítica, para a verificação da repetibilidade. Para cada faixa foram preparadas seis replicatas independentes a partir de um MRC de fósforo idêntico ao utilizado para o preparo da curva analítica, porém de lote diferente.

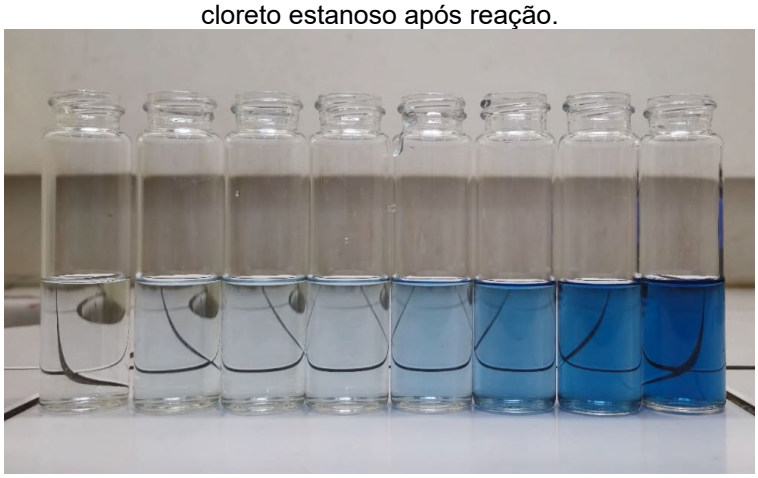
As soluções para recuperação de padrão foram preparadas de forma análoga às soluções para ensaios de repetibilidade, substituindo-se a água purificada por amostra de água superficial filtrada. Os níveis de fortificação (*spikes*) correspondem às concentrações de 0,050 mg $P.L^{-1}$ (Faixa Baixa), 0,250 mg $P.L^{-1}$ (Faixa Média) e 0,750 mg $P.L^{-1}$ (Faixa Alta).

3.3.2. Procedimento

Para a realização das medições de absorbância neste método o fotômetro LED-VIS foi configurado para o comprimento de onda de 630 nm (luz vermelha) e brilho 5. Foram utilizados *vials* de 25 mL para realizar as reações, micropipetas nas faixas de 1000 – 10000 µL e 100 – 1000 µL para as transferências de volume e pipeta *pasteur* como conta-gotas. Inicialmente foram adicionados 10 mL de água purificada ao primeiro *vial* (que será o branco utilizado para zerar o instrumento) e 10 mL de solução padrão ou amostra aos demais. Em seguida foram adicionados 0,4

mL do reagente I aos *vials*, que foram agitados por 10 segundos em movimentos circulares até completa mistura dos líquidos. Foram adicionadas 2 gotas do reagente II aos *vials* e estes foram vigorosamente agitados até completa mistura do reagente. Aguardou-se um período de reação de 10 minutos para realizar a medição da absorbância, porém não excedendo os 12 minutos, pois a cor começa a perder intensidade após este período (APHAA, 2023). A seguir o procedimento de medição foi realizado de forma idêntica ao descrito para o método de Griess no item 3.2.2.

Figura 8 - Soluções da curva de calibração do método do cloreto estanoso após reação.



Fonte: Acervo próprio.

3.4. Método do ácido vanadomolibdofosfórico

3.4.1. Reagentes e Soluções

A solução reagente de vanadato-molibdato foi preparada pesando-se inicialmente 0,250 g de metavanadato de amônio (NH_4VO_3, P.A.) em um béquer de 250 mL ao qual foram adicionados 60 mL de água purificada. O béquer foi levado à uma chapa de aquecimento a 250°C até a água atingir fervura e dissolver o sal completamente. Em seguida o béquer foi retirado do aquecimento e aguardou-se o resfriamento da solução à temperatura ambiente. Foram então adicionados 66 mL de ácido clorídrico concentrado (HCl, Bio-Grade, 37%) à solução e novamente aguardou-se o seu resfriamento. A seguir foram pesados 2,5 g de molibdato de amônio tetrahidratado ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$, Synth, 81-83% MoO_3) em um béquer de 50 mL, ao qual foram adicionados 15 mL de água purificada. O béquer foi agitado até a completa dissolução do sal e a solução resultante foi adicionada à solução

ácida de vanadato. O conteúdo do béquer foi então quantitativamente transferido para um balão volumétrico de 200 mL e o volume completado com água purificada até a marcação. A solução foi transferida para um frasco âmbar e armazenada em temperatura ambiente.

As soluções-padrão de fósforo para obtenção da curva analítica foram preparadas em oito níveis de concentração, de 1,00 a 8,00 mg $P.L^{-1}$, em triplicata para cada nível, totalizando 24 replicatas independentes. Cada solução foi preparada adicionando-se uma alíquota adequada (Tabela 3) de MRC de Fósforo (Absolute Standards, 1000 mg $P.L^{-1}$) a um balão volumétrico de 100 mL e completando-se o volume com água purificada. Foi utilizada micropipeta na faixa de 100 - 1000 µL para o preparo destas soluções.

Tabela 3 – Alíquotas de MRC de fósforo utilizadas no preparo da curva de calibração do método do ácido vanadomolibdofosfórico.

Nível	**Concentração (mg $P.L^{-1}$)**	**Alíquota de MRC (µL)**
1	1,00	100
2	2,00	200
3	3,00	300
4	4,00	400
5	5,00	500
6	6,00	600
7	7,00	700
8	8,00	800

Fonte: Elaboração própria.

Foram preparadas soluções-padrão de fósforo de Faixa Baixa (1,00 mg $P.L^{-1}$), Faixa Média (4,00 mg $P.L^{-1}$) e Faixa Alta (7,00 mg $P.L^{-1}$), de forma análoga àquelas preparadas para a curva analítica, para a verificação da repetibilidade. Para cada faixa foram preparadas seis replicatas independentes a partir de um MRC de fósforo idêntico ao utilizado para o preparo da curva analítica, porém de lote diferente.

As soluções para recuperação de padrão foram preparadas de forma análoga às soluções para ensaios de repetibilidade, substituindo-se a água purificada por amostra de água superficial filtrada. Os níveis de fortificação (*spikes*)

correspondem às concentrações de 1,00 mg $P.L^{-1}$ (Faixa Baixa), 4,00 mg $P.L^{-1}$ (Faixa Média) e 7,00 mg $P.L^{-1}$ (Faixa Alta).

3.4.2. Procedimento

Para a realização das medições de absorbância neste método o fotômetro LED-VIS foi configurado para o comprimento de onda de 470 nm (luz azul) e brilho 5. Foram utilizados *vials* de 25 mL para realizar as reações e micropipetas nas faixas de 1000 – 10000 µL, 1000 – 5000 µL e 100 – 1000 µL para as transferências de volume. Inicialmente foram adicionados 7 mL de água purificada ao primeiro *vial* (que será o branco utilizado para zerar o instrumento) e 7 mL de solução padrão ou amostra aos demais. Em seguida foram adicionados 2 mL do reagente de vanadato-molibdato aos *vials*, que foram agitados por 10 segundos em movimentos circulares até completa mistura dos líquidos. A seguir adicionou-se 1 mL de água purificada aos *vials* e estes foram agitados novamente. Aguardou-se um período de reação de 10 minutos para realizar a medição da absorbância. A seguir o procedimento de medição é realizado de forma idêntica ao descrito para o método de Griess no item 3.2.2.

Figura 9 - Soluções da curva de calibração do método do ácido vanadomolibdofosfórico após reação.



Fonte: Acervo próprio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos foram organizados em seções e avaliados estatisticamente conforme parâmetros estipulados na Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos do INMETRO (DOQ-CGCRE-008 Revisão 09, de junho de 2020). Uma vez que os métodos normalizados presentes no SMEEW (APHA, 2023) sofreram alterações para atender às especificidades da operação com o fotômetro LED-VIS, foram verificados a linearidade, a sensibilidade, limites de detecção e quantificação (LD e LQ), a exatidão (avaliada pela recuperação analítica) e a precisão (avaliada pela repetibilidade) para realizar sua validação.

4.1. Linearidade e Sensibilidade

A primeira etapa para a avaliação da performance analítica do fotômetro LED-VIS foi a obtenção de curvas analíticas para os três métodos adaptados conforme faixas de concentração descritas no SMEEW (APHHA, 2023). Para assegurar que a relação concentração *x* absorbância segue um modelo linear nas condições de operação do fotômetro e obter uma equação de calibração é importante que o conjunto de dados utilizado não conte com valores aberrantes (*outliers*) que possam causar desvios significativos da linearidade e que para todos os níveis de concentração o método apresente comportamento homocedástico das variâncias (INMETRO, 2020), isto é, para todos os níveis de concentração (variável independente) não há diferença significativa entre as variâncias na absorbância (variável dependente).

Para avaliar a presença de *outliers* foi aplicado o Teste de Grubbs nos três conjuntos de dados. Neste teste, para cada valor de absorbância, foi obtido o valor de G_{calc} (SILVA, 2011):

$$G_{calc} = \frac{|x_i - \bar{x}|}{s} \quad (3)$$

Onde x_i é o i-ésimo valor de absorbância, $\bar{x}$ é a média das absorbâncias e *s* é o desvio padrão, em dado nível de concentração. Neste teste a hipótese nula (H_0) é de que o valor testado não é considerado um *outlier*. Se H_0 for rejeitada o

valor não deve ser utilizado na construção da curva analítica. Os valores de G_{calc} foram então comparados a um valor de $G_{crítico}$ tabelado (SILVA, 2011, p. 96). Se $G_{calc} > G_{crítico}$ rejeita-se H_0. Para um nível de confiança de 95% e três replicatas por nível de concentração (n = 3), temos $G_{crítico}$ = 1,153. Nenhum dos três métodos apresentou *outliers* em seus conjuntos de dados. Os resultados detalhados do Teste de Grubbs para os três métodos estão elencados no Apêndice I.

Para avaliar a homocedasticidade das variâncias nos vários níveis de concentração, foi aplicado o Teste de Cochran em cada um dos três conjuntos de dados. Neste teste calcula-se a variância das absorbâncias (s^2) em cada um dos oito níveis de concentração (p) e depois o valor de C_{calc}, que consiste na razão entre a maior variância do conjunto e a soma das variâncias do conjunto (SILVA, 2011):

$$C_{calc} = \frac{s^2_{máx}}{\sum_{i=1}^{p} s_i^2} \quad (4)$$

Neste teste a hipótese nula é de que não há diferença entre as variâncias testadas, ou seja, $H_0: s_1^2 = s_2^2 = \cdots = s_8^2$. Comparou-se o valor de C_{calc} com o valor de $C_{crítico}$ tabelado (SILVA, 2011, p. 95). Se $C_{calc} > C_{crít}$ rejeita-se H_0. Para um nível de confiança de 95%, oito níveis de concentração (p = 8) e três replicatas por nível (n=3), temos $C_{crítico}$ = 0,516. Para os três conjuntos de dados H_0 foi aceita e não se observou diferença entre as variâncias (Tabela 4). Em termos práticos isso indica que não há uma diferença significativa de precisão entre as diferentes regiões das curvas analíticas testadas.

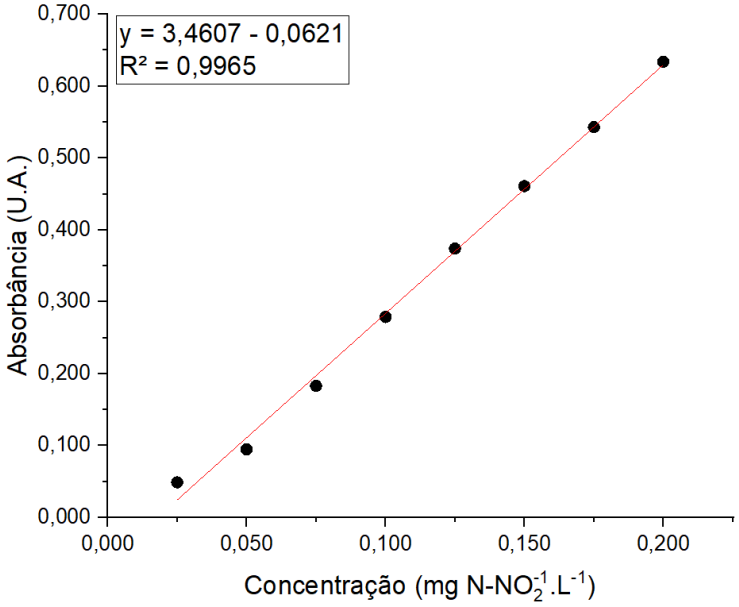
Tabela 4 - Resultados do Teste de Cochran para os três métodos adaptados.

Método	$s^2_{máx}$	$\sum_{i=1}^{p} s_i^2$	C_{calc}	H_0
Griess	$1{,}10\times10^{-4}$	$4{,}27\times10^{-4}$	0,2586	Aceita
Cloreto Estanoso	$3{,}96\times10^{-4}$	$9{,}24\times10^{-4}$	0,4286	Aceita
Ácido VMF	$4{,}30\times10^{-6}$	$1{,}55\times10^{-5}$	0,2782	Aceita

Fonte: Elaboração Própria.

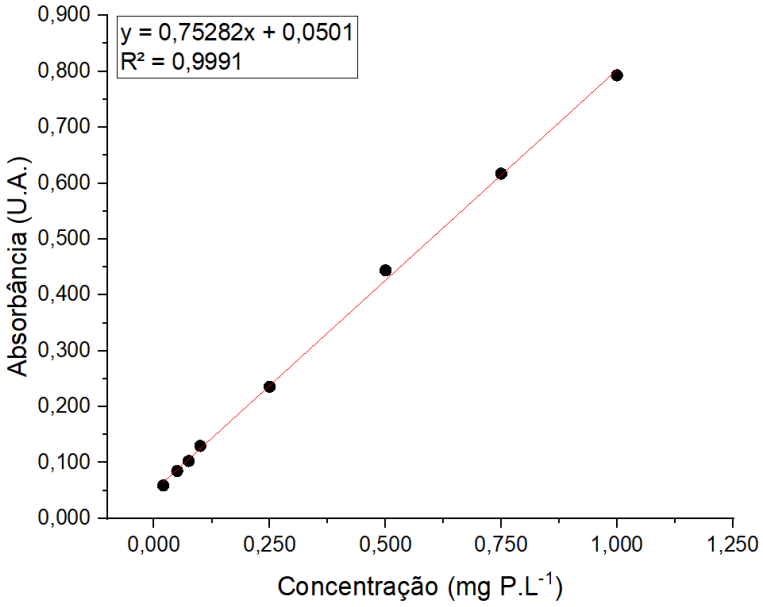
Dados os resultados satisfatórios dos testes de Grubbs e Cochran, foram obtidas as curvas analíticas para os três métodos (Gráficos 1, 2 e 3) no modelo de regressão linear simples através do método dos Mínimos Quadrados Ordinários. As curvas apresentaram ótimo ajuste linear ($R^2 > 0,99$) nos três métodos adaptados.

Figura 100 - Curva analítica para o método de Griess.



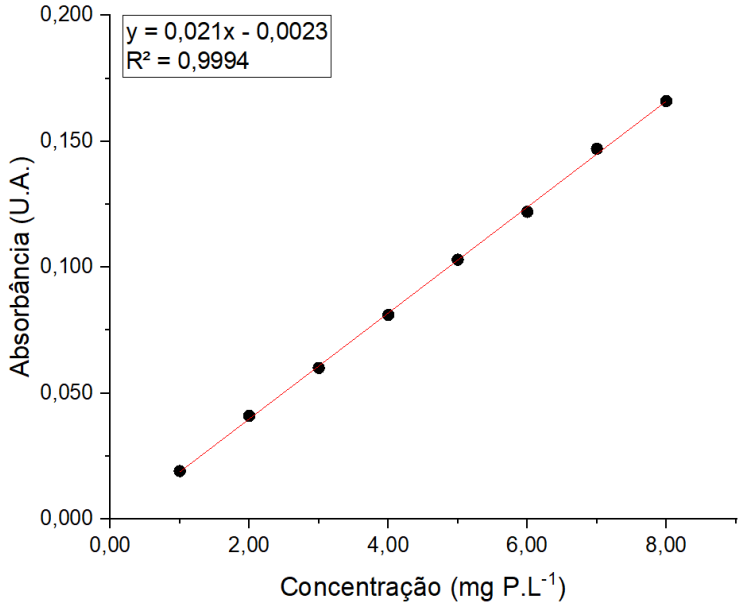
Fonte: Elaboração própria.

Figura 11 - Curva analítica para o método do cloreto estanoso.



Fonte: Elaboração própria.

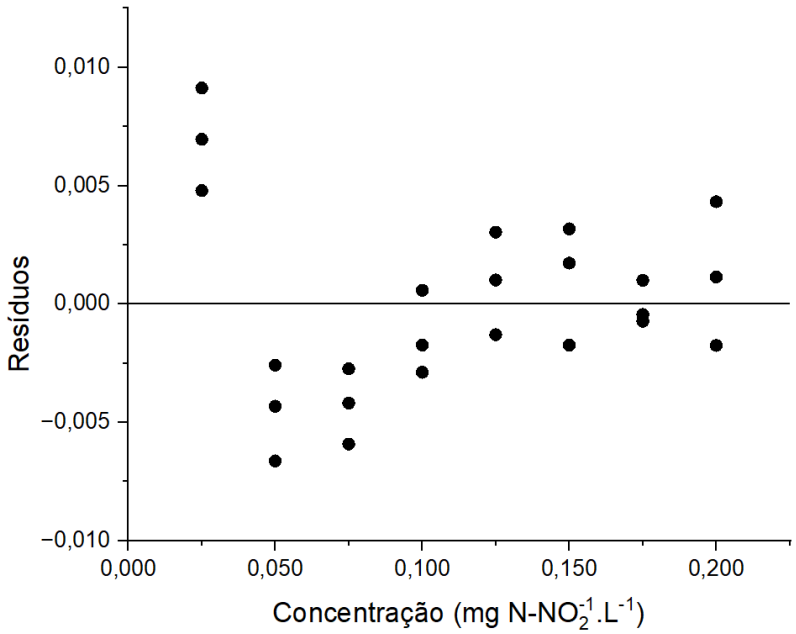
Figura 12 - Curva analítica para o método do ácido vanadomolibdofosfórico.



Fonte: Elaboração própria.

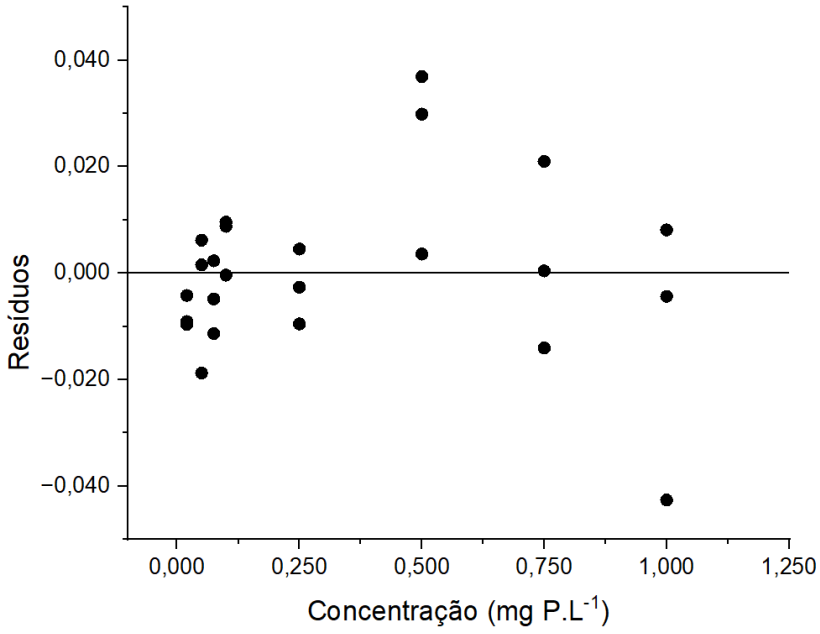
Apesar do valor de R^2 ser um bom indicativo de que as relações concentração x absorbância testadas são descritas por um modelo linear, ele não é conclusivo (INMETRO, 2020). O modelo linear supõe que os erros são aleatórios, não correlacionados entre si e tem distribuição normal, utilizando os resíduos, isto é, a diferença entre os valores previstos pelo modelo e os valores observados, para estimá-los (CHEIN, 2019). Para calcular os resíduos, as medidas individuais de absorbância foram lançadas nas curvas analíticas correspondentes para calcular o valor de concentração e subtraído destes o valor da concentração nominal. Assim, foram elaborados gráficos dos resíduos *versus* concentração (variável independente) para verificar a presença de tendências ou comportamentos não-aleatórios dos resíduos que sugiram que as suposições para uso do modelo linear não foram satisfeitas (CHEIN, 2019).

Figura 13 – Distribuição dos resíduos para o método de Griess.



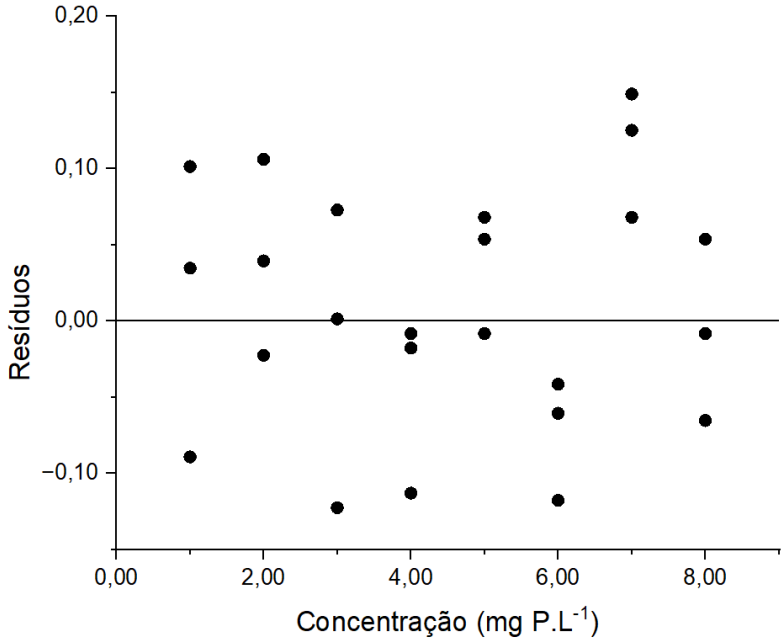
Fonte: Elaboração própria.

Figura 14 – Distribuição dos resíduos para o método do cloreto estanoso.



Fonte: Elaboração própria.

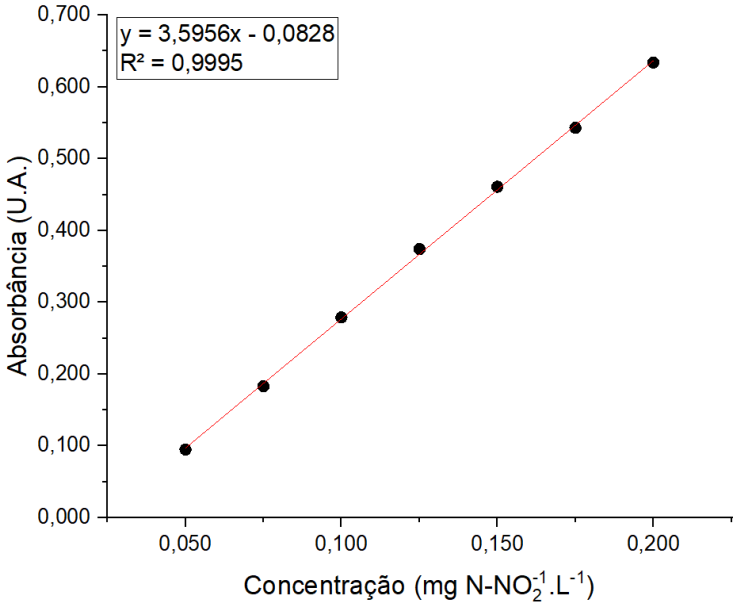
Figura 15 – Distribuição dos resíduos para o método do ácido vanadomolibdofosfórico.



Fonte: Elaboração própria.

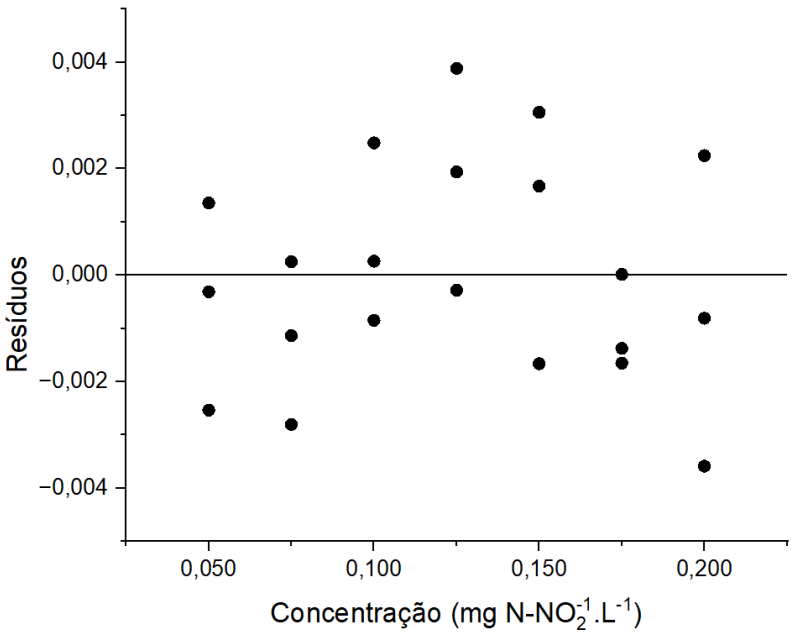
Entre as três regressões, a curva para o método do ácido vanadomolibdofosfórico foi a que apresentou a melhor dispersão dos resíduos, com comportamento de nuvem de pontos bem distribuídos ao redor da linha central sem evidências de tendências ou *outliers*. O método do cloreto estanoso apresentou dispersão satisfatória ao redor da linha central. O ponto mais isolado dos demais na concentração de 1,0 mg $P.L^{-1}$ é suspeito, porém o Teste de Grubbs o descartou como *outlier*. Já a curva do método de Griess apresentou um conjunto de pontos bastante isolados na concentração de 0,025 mg $N\text{-}NO^{2-}.L^{-1}$, indicando um forte desvio do comportamento linear do método nessa concentração. Optou-se então pela exclusão desse nível de concentração e reelaboração da curva analítica para verificar se as condições de linearidade seriam satisfeitas. A nova curva apresentou valor de R^2 ainda mais elevado (0,9995) e os resíduos apresentaram dispersão razoável ao redor da linha central do gráfico, indicando um melhor ajuste ao modelo desta forma.

Figura 16 - Curva analítica revisada para o método de Griess.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 17 – Dispersão dos resíduos revisada para o método de Griess.



Fonte: Elaboração própria.

Para avaliar se a regressão é significativa foi realizada uma análise da variância (ANOVA), aplicando-se um teste F. A hipótese nula (H_0) nesse caso é a de que a variância total em *y* (absorbância) é igual a variância devida ao erro (SKOOG, 2006). Em outras palavras, esta hipótese propõe que *x* (concentração) não tem efeito sobre y e que, portanto, sua variação é explicada pelos resíduos. Naturalmente, para uma curva analítica espera-se exatamente que a variação das absorbâncias seja explicada pela variação da concentração, logo, para uma regressão ser considerada significativa é necessário que H_0 seja rejeitada, de preferência por larga margem (SKOOG, 2006). Foram elaboradas tabelas ANOVA para as três curvas, utilizando o software OriginPro 2025 para realização dos cálculos. As tabelas constituíram uma ferramenta útil para organizar as somas de quadrados necessárias para obter o valor de F_{calc}, que é dado por:

$$F_{calc} = \frac{SS_{regr}/GL_1}{SS_{resid}/GL_2} \quad (5)$$

Onde SS_{regr} é a soma dos quadrados devido à regressão, SS_{resid} é a soma dos quadrados dos resíduos e GL_1 e GL_2 são os graus de liberdade associados a elas, respectivamente. Valores de F_{calc} substancialmente maiores que os tabelados (SKOOG, 2006, p.147) levam à rejeição da hipótese nula e indicam a significância da regressão. Para os três métodos foram obtidos valores de F_{calc} bastante elevados (>10000), indicando que todos satisfazem os critérios de aceitação da linearidade.

Tabela 5 - ANOVA para o método de Griess.

Fonte da Variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Quadrados Médios (QM)	F_{calc}
Modelo	0,6802	1	0,6802	12228
Erro	0,0011	19	$5,56\times10^{-5}$	
Total	0,6813	20		

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 6 - ANOVA para o método do cloreto estanoso.

Fonte da Variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Quadrados Médios (QM)	F_{calc}
Modelo	1,617	1	1,617	10739
Erro	0,0033	22	$1,51\times10^{-4}$	
Total	1,620	23		

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 7 - ANOVA para o método do ácido vanadomolibdofosfórico.

Fonte da Variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Quadrados Médios (QM)	F_{calc}
Modelo	0,0557	1	0,0557	19943
Erro	$6,00\times10^{-5}$	22	$2,79\times10^{-6}$	
Total	0,0558	23		

Fonte: Elaboração própria.

Foi avaliada ainda a sensibilidade da calibração dos métodos, que é a variação da resposta (absorbância) pela variação da concentração (SKOOG, 2006). O método de Griess se mostrou o mais sensível, com um coeficiente angular de 3,5956. O método do cloreto estanoso apresentou sensibilidade intermediária, com um coeficiente angular de 0,75282. O método do ácido vanadomolibdofosfórico apresentou sensibilidade bastante reduzida, 0,021, indicando que para esse método são necessárias variações de concentração consideráveis para produzir variações no sinal.

4.2. Limites de Detecção e Quantificação

A determinação dos limites de detecção para os três métodos analíticos foi realizada pelo método simplificado (INMETRO, 2020). Segundo SKOOG (2006), a estimativa do LD pode ser dada por:

$$LD = \frac{ks_b}{m}$$

Onde *m* é a inclinação da curva (sensibilidade), s_b é o desvio padrão da resposta do branco e *k* é um fator de confiança escolhido de acordo com o nível de

confiança. Para o cálculo do LD dos três métodos foi utilizado o fator k = 3,3 (INMETRO, 2020). Uma vez que os três métodos produzem valores zerados para o branco, utilizou-se os valores dos desvios-padrão das respostas do fotômetro no primeiro ponto de cada curva.

O Limite de Quantificação (LQ) pode ser calculado de forma análoga ao LD, com k = 10 (INMETRO, 2020). Os Limites de Detecção e Quantificação para os três métodos estão resumidos na Tabela 8. O LQ deve ser verificado experimentalmente e ser, necessariamente, uma concentração maior ou igual ao primeiro ponto da curva analítica (INMETRO, 2020). Para os métodos de Griess e do ácido vanadomolibdofosfórico os valores adotados de LQ foram os primeiros pontos de cada curva. Para o método do cloreto estanoso o menor ponto da curva ficou abaixo da estimativa, portanto optou-se por utilizar o segundo como LQ praticado. A confirmação dos três valores de LQ foi realizada em conjunto com os ensaios de Recuperação e Repetibilidade, onde o LQ corresponde à concentração de faixa baixa. Dados os valores de LQ atingidos – da ordem de 0,05 $mg.L^{-1}$ para os métodos de Griess e do cloreto estanoso e de 1 $mg.L^{-1}$ para o método do ácido molibdofosfórico – os resultados foram considerados bastante satisfatórios.

Tabela 8 – Limites de Detecção e Quantificação para os três métodos adaptados.

Método	s_b	**LD Calculado (mg analito. L^{-1})**	**LQ Calculado (mg analito. L^{-1})**	**LQ Praticado (mg analito. L^{-1})**
Griess	0,007	0,006	0,020	0,050
Cloreto Estanoso	0,002	0,010	0,030	0,050
Ácido VMF	0,002	0,319	0,967	1,00

Fonte: Elaboração Própria.

4.3. Exatidão/Recuperação

A determinação de analitos em amostras reais requer que o método seja capaz de detectar o analito em matrizes mais complexas com um grau substancial de exatidão e precisão (SKOOG, 2006). Dado que as soluções preparadas para o preparo da curva analítica representam um meio homogêneo e idealizado, é necessário realizar ensaios de recuperação em matrizes mais complexas para avaliar a performance do método.

A exatidão de um método pode ser definida como a proximidade dos resultados obtidos em relação a um valor verdadeiro (ANVISA, 2003). Ensaios de recuperação constituem uma forma de avaliar a exatidão do método, fortificando-se a matriz com uma quantidade conhecida do analito e procedendo-se à determinação. A recuperação é então calculada como (INMETRO, 2020):

$$Recuperação\ (\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3}\right) \times 100$$

Onde C_1 é a concentração da amostra fortificada, C_2 é a concentração da amostra não fortificada e C_3 é a concentração de fortificação. Os ensaios de fortificação para os três métodos foram conduzidos em três faixas de concentração – baixa, média e alta. A faixa baixa corresponde aos valores de LQ e os ensaios confirmam a capacidade do método de detectar com segurança o analito nesse nível de concentração. A faixa média corresponde à região central da curva e tende a ter exatidão mais elevada, visto que para uma dada curva analítica obtida por regressão linear o desvio padrão da concentração calculada é minimizado quando os valores se aproximam do ponto centróide $(\hat{x}, \hat{y})$ (SKOOG, 2006), onde $\hat{x}$ é o valor médio de todas as concentrações e $\hat{y}$ é o valor médio de todas as absorbâncias. A faixa alta corresponde à região limítrofe superior onde o método mantém resultados consistentes.

Os critérios de aceitação podem variar entre laboratórios de acordo com a finalidade do método proposto e com o nível de concentração a ser determinado. A ANVISA (2017) permite que o laboratório apresente justificativa para os critérios adotados. O INMETRO (2020, p. 21) utiliza os critérios propostos pela *AOAC International*. Entre os três métodos testados as concentrações estão na faixa de 0,020 a 8,0 $mg.L^{-1}$. Para essa faixa de concentração é necessário que a recuperação esteja entre 80 e 110%. O teor dos analitos na matriz de água superficial (C_1) foram determinados em triplicata e os ensaios de recuperação foram realizados em sextuplicata (n=6) para cada método. Foram calculados ainda os coeficientes de variação, cuja aceitação segue os mesmos critérios dos ensaios de repetibilidade, discutidos na próxima seção. Os resultados para os ensaios de recuperação estão resumidos na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados dos ensaios de recuperação para os três métodos testados.

Método	Faixa	C_1 ($mg.L^{-1}$)	Fortificação ($mg.L^{-1}$)	Recuperação Média (%)	CV (%)	Resultado
Griess	Baixa	<LQ	0,050	108,54	0,96	Aceito
	Média	<LQ	0,125	104,11	1,26	Aceito
	Alta	<LQ	0,175	101,91	0,44	Aceito
Cloreto Estanoso	Baixa	<LQ	0,050	94,49	4,59	Aceito
	Média	<LQ	0,250	104,89	0,62	Aceito
	Alta	<LQ	0,750	96,25	2,14	Aceito
Ácido VMF	Baixa	<LQ	1,00	100,16	4,91	Aceito
	Média	<LQ	4,00	100,04	1,63	Aceito
	Alta	<LQ	7,00	100,04	1,63	Aceito

Fonte: Elaboração prória.

Para os três métodos os resultados da amostra de água superficial ficaram abaixo do LQ. Os três métodos apresentaram valores de recuperação e coeficientes de variação aceitáveis nas três faixas de concentração, indicando que são capazes de detectar os analitos com boa exatidão na matriz testada.

4.4. Precisão/Repetibilidade

A precisão de um método diz respeito à reprodutibilidade dos resultados obtidos por ele, ou seja, o quão concordantes entre si são os resultados obtidos pelo método (SKOOG, 2006).

A repetibilidade foi avaliada a partir da análise de padrões preparados em um curto período, nas três faixas de concentração. Os critérios de aceitação da repetibilidade propostos pela *AOAC International* (INMETRO, 2020, p. 23) são baseados nos coeficientes de variação obtidos, com valores máximos de CV diferentes para cada faixa de concentração. Os resultados dos ensaios de repetibilidade para os três métodos estão resumidos na Tabela 10. Os valores de $C_{nominal}$ são as concentrações testadas e os valores de $C_{média}$ são as médias experimentais (com n=6 para cada faixa).

Tabela 10 - Resultados dos ensaios de repetibilidade para os três métodos testados.

Método	Faixa	$C_{nominal}$	$C_{média}$	Desv. Pad.	CV (%)	CV Máx. (%)	Resultado
Griess	Baixa	0,050	0,052	$5,76\times10^{-4}$	1,11	15	Aceito
	Média	0,125	0,124	$2,22\times10^{-3}$	1,79	11	Aceito
	Alta	0,175	0,173	$9,08\times10^{-4}$	0,52	11	Aceito
Cloreto Estanoso	Baixa	0,050	0,049	$2,00\times10^{-3}$	4,12	15	Aceito
	Média	0,250	0,244	$2,61\times10^{-3}$	1,07	11	Aceito
	Alta	0,750	0,741	$1,65\times10^{-2}$	2,23	11	Aceito
Ácido VMF	Baixa	1,00	0,91	$2,46\times10^{-2}$	2,71	7,3	Aceito
	Média	4,00	3,92	$7,78\times10^{-2}$	1,98	7,3	Aceito
	Alta	7,00	6,83	$7,17\times10^{-2}$	1,05	7,3	Aceito

Fonte: Elaboração própria.

A repetibilidade dos três métodos foi satisfatória nas três faixas de concentração testadas, indicando que os métodos têm boa precisão em toda a faixa de trabalho.

4.5. Avaliação da aplicabilidade do instrumento

Os resultados satisfatórios nos testes de validação analítica conduzidos com o uso do fotômetro LED-VIS *labmade* demonstraram que é possível utilizá-lo para realizar medições de absorbância nos três comprimentos de onda operacionais, podendo ser utilizado para conduzir análises colorimétricas que atendem aos critérios estabelecidos pelo INMETRO para validação analítica. Foram alcançados limites de detecção e quantificação bastante satisfatórios nos três métodos testados. Com as devidas adaptações e ações para mitigar interferências é possível incluir ainda mais matrizes no escopo de aplicação do instrumento, expandindo sua capacidade de atender às demandas de laboratórios análises ambientais.

O limite de quantificação obtido para o método de Griess de 0,050 mg N-NO_2^-.L^{-1} permite que o instrumento seja utilizado na determinação de nitrito para fins de controle ambiental na matriz de água superficial, dado que é bastante inferior ao menor limite dessa espécie em corpos aquáticos de água doce Classes 1, 2 e 3, estabelecido pela Resolução N° 357, de 17 de Março de 2005 do CONAMA como 1,0 mg N-NO_2^-.L^{-1}.

Os limites para fósforo em águas doces Classes I, II e III não estão estabelecidos pelo CONAMA em termos de fósforo reativo na forma de ortofosfato, mas como fósforo total, e são diferentes para cada classe e tipo de ambiente (lêntico, intermediário e lótico). A determinação de fósforo total a partir dos dois métodos testados poderia ser realizada aplicando-se uma etapa prévia de digestão da amostra com persulfato, convertendo todo o fósforo da amostra à forma reativa (APHA, 2023). Satisfeita essa condição, o método do cloreto estanoso seria capaz de atender aos limites de fósforo total estabelecidos pelo CONAMA para águas de Classe I em ambiente lótico e tributários de ambiente intermediário (0,1 mg $P.L^{-1}$), Classe II em ambientes intermediários e tributários de ambiente lêntico (0,05 mg $P.L^{-1}$) e Classe III em todos os ambientes (sendo 0,05 mg $P.L^{-1}$ o limite mais restritivo, para ambientes lênticos), porém este procedimento não fez parte do escopo deste trabalho, sendo necessária a realização de ensaios de validação que incluam a etapa de digestão para que o método seja considerado adequado para esta finalidade.

O método do ácido vanadomolibdofosfórico tem faixa de aplicação mais alta e pode ser utilizado para a determinação de fósforo em amostras de água cujo teor esteja acima da faixa de trabalho do método do cloreto estanoso sem haver a necessidade de realizar diluição da amostra, etapa que contribui para o aumento da incerteza dos resultados de análise.

O instrumento apresenta dimensões reduzidas, peso leve e boa robustez, visto que seus constituintes estão firmemente fixados e não há partes móveis ou pontos particularmente sensíveis, além de ser possível operá-lo utilizando como fonte de energia uma porta USB ou *powerbank* que tenham tensão de saída de 5V. A adaptação com sucesso dos métodos à uma execução utilizando materiais portáteis (figura 18) e volumes de reagentes bastante reduzidos, aliada às características do instrumento, indicou a viabilidade do uso do equipamento para análises em campo. Isso é particularmente útil no caso da determinação de nitrito, visto que este é facilmente convertido a nitrato em amostras de água doce (CETESB, 2022) e, portanto, sua determinação em laboratório requer que a amostra seja analisada prontamente, sob o risco de haver subestimação do teor dessa espécie na amostra.

Figura 118 - Material utilizado para execução da análise de nitrito pelo método de Griess adaptado.



Fonte: Acervo próprio.

Além da portabilidade, a redução de volumes de amostra e reagentes utilizados contribuiu para minimizar o volume de resíduos gerados durante a execução das análises. Após todos os testes, foi gerado um total de 3,1 L de resíduos, entre soluções reagidas e águas de enxágue dos materiais. Levando-se em conta que foram realizadas aproximadamente 70 medições de absorbância por método e que cada uma contribui com aproximadamente o mesmo volume de resíduo após reação, estima-se que foram gerados aproximadamente 15 mL de resíduo por medição em qualquer um dos três métodos. Com base nessa quantidade e sem levar em conta as águas de enxágue, os métodos de Griess e do ácido vanadomolibdofosfórico antes da adaptação teriam gerado aproximadamente 3,5 L de resíduos cada, enquanto o método do cloreto estanoso geraria 7,0 L. Mesmo com a inclusão das águas de enxágue, os métodos adaptados apresentaram redução de aproximadamente 78% nos resíduos gerados.

5. CONCLUSÃO

O fotômetro LED-VIS *labmade* apresentou desempenho analítico bastante satisfatório nos três comprimentos de onda operacionais, permitindo a execução dos três métodos colorimétricos de análise com excelente precisão e exatidão.

Os três métodos testados foram validados com sucesso, conforme parâmetros propostos pelo INMETRO – linearidade, sensibilidade, limites de detecção e quantificação, recuperação e repetibilidade.

O fotômetro se mostrou viável à aplicação para a determinação de nitrito em águas superficiais pelo método de Griess adaptado. Os métodos testados para a determinação de fósforo não atendem estritamente à legislação ambiental, necessitando a inclusão de etapas adicionais de preparo amostra e realização de novos ensaios de validação para que sejam utilizados para este fim.

O fotômetro apresentou potencial para aplicação em análises de campo, dadas as suas dimensões, peso e robustez, além da adaptação dos métodos, que favorecem a portabilidade do instrumento.

BIBLIOGRAFIA

ADUAN, Roberto; VILELA, Marina; JÚNIOR, Fábio. **Os grandes ciclos biogeoquímicos do planeta**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2004. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/569371/1/doc119.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2025.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Evaluation of Water and Wastewater**, 22. ed. Washington, 2012.

AZEVEDO, Aissa; SOUSA, Anderson; CASTRO, Tiago. Espectroscopia óptica de baixo custo: uma estratégia para a introdução de conceitos de física quântica no ensino médio. **Revista Brasileira de Ensino de Física**. *[S. l.],* v. 41, n. 4, 2019. Disponível em: < https://www.scielo.br/j/rbef/a/vHfts85vGQtRvwvqfpyjNFG/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 15 fev. 2025.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfcda_altrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2025.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfcda_altrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2025.

BRITO, Natilene; et. al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, *[S. l.]*, v. 13, 2003. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/pesticidas/article/view/3173>. Acesso em: 17 fev. 2025.

CETESB. **Ficha de informação toxicológica: FIT – Nitrato e Nitrito**. São Paulo, dez. 2022. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2022/12/Nitrato-e-Nitrito.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2025

CHAIANANTAKU, Natpasit; et. al. Development of mini-spectrophotometer for determination of plasma glucose. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. *[S. l.]*, v. 204, p. 670-676. 5 nov. 2018. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386142518306504?fr=RR-2&ref=pdf_download&rr=912a15a20ae18aef>. Acesso em: 16 fev. 2025.

CHEIN, Flávia. **Introdução aos modelos de regressão linear: um passo inicial para compreensão da econometria como uma ferramenta de avaliação de políticas públicas**. **Arquivos em Movimento**. Brasília: Enap, 2019.
FRANZEN, Melissa. **Dinâmica do fósforo na interface água-sedimento em reservatórios**. Tese (Doutorado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) – Instituto de Pesquisas Hidráulicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, p. 244. 2009. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/32460/000736718.pdf;jsessionid=C7602DD49273A74A60636C75ED5C85A2?sequence=1>. Acesso em: 17 fev. 2025.

FREITAS, Lucas. et. al. Assessment of surface water quality using the water quality index (WQI) in a river located in northern Minas Gerais (Brazil). **Brazilian Journal of Environment**. *[S. l.],* v. 8, n. 4, p. 245-255. Set. 2020. Disponível em: <https://revistabrasileirademeioambiente.com/index.php/RVBMA/article/view/528/267>. Acesso em: 16 fev. 2025.

HESLOP, R. B.; RAMSEY, Ann. The solvent extraction of vanadomolybdophosphoric acid as the basis of a substoichiometric method for the determination of phosphorus. **Analytica Chimica Acta**. *[S. l.],* v. 47, n. 2, p. 305-314. Set. 1969. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326700195682X?via%3Dihub>. Acesso em: 16 fev. 2025.

INMETRO. DOQ-CGCRE-008 Revisão 09, de Junho de 2020. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Disponível em: < https://www.gov.br/cdtn/pt-br/assuntos/documentos-cgcre-abnt-nbr-iso-iec-17025/doq-cgcre-008/view>. Acesso em: 17 fev. 2025.

GAIÃO, Edvaldo; et. al. Um fotômetro multi-LED microcontrolado, portátil e de baixo custo. **Química Nova**. *[S. l.]*, v. 28, n. 6, p. 1102-1105. Ago. 2005. Disponível em: < https://www.scielo.br/j/qn/a/TBky9384MrgMZxfJmNnCKgC/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 15 fev. 2025.

GUADAGNINI, Paulo; ROCHA, Fábio; BARLETTE, Vania. Um medidor de luminosidade com módulo sensor integrado e aquisição automática de dados com aplicações didáticas. **Revista Brasileira de Ensino de Física**. *[S. l.]*, v. 41, n. 3, 2019. Disponível em: < https://www.scielo.br/j/rbef/a/VxcxgDHbZ7PTTBTd9mSxWDG/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 15 fev. 2025.

MELCHERT, Wanessa; ROCHA, Fábio. A green analytical procedure for flow-injection determination of nitrate in natural waters. **Talanta**. *[S. l.]*, v. 65, n. 2, p. 461-465, jan. 2005.

NAGUL, Edward. et. al. The molybdenum blue reaction for the determination of orthophosphate revisited: Opening the black box. **Analytica Chimica Acta**. *[S. l.]*, v. 890. p. 60-82. Ago. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326701500882X?via%3Dihub>. Acesso em: 15 fev. 2025.

PONTES, Aline. **Desenvolvimento de um fotômetro LED-Vis portátil e microcontrolado por Arduino**. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, p. 76. 2014. Disponível em: < https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/tede/7136/1/arquivototal.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2025.

RODRIGUES, Maria Eduarda. **Validação e controlo de qualidade de métodos para a determinação dos iões nitrato, nitrito e amónio em águas naturais**. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Ciências, Universidade do Porto. Porto, p. 110. 2014. Disponível em: < https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/78339/2/34280.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2025.

SANTOS, Vagner; et. al. RGB-LED-photometer and the digital image-based method using a smartphone for chemistry and physics teaching. **Química Nova**. *[S. l.]*, v. 46, n. 9, p. 924-930. Jun. 2023. Disponível em: < https://www.scielo.br/j/rbef/a/vHfts85vGQtRvwvqfpyjNFG/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 15 fev. 2025.

SILVA, Matheus. **Um modelo para análise e tratamento de dados de demanda de energia elétrica**. Monografia (Bacharelado em Ciência da Computação) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Alfenas. Alfenas, p. 111. 2011.

SKOOG, Douglas; et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. Tradução: Marco Tadeu Grassi. São Paulo: Cengage Learning, 2006.

SKOOG, Douglas; HOLLER, F. James; CROUCH, Stanley. **Principles of Instrumental Analysis**. 7 ed. Boston: Cengage Learning, 2017.

TSIKAS, Dimitrios. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, *[S. l.]*,v. 851, n. 1–2, p. 51–70, maio 2007. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023206006398>. Acesso em: 15 fev. 2025.

WORSFOLD, Paul; MCKELVIE, Ian; MONBET, Phil. Determination of phosphorus in natural waters: A historical review. **Analytica Chimica Acta**. *[S. l.]*,v. 918, p. 8-20. 28 abr. 2016. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267016302860?via%3Dihub> . Acesso em: 16 fev. 2025.

VALGAS, Ricardo A.; et. al. **Análise de Dados Experimentais e Verificação dos Pressupostos da ANOVA: Abordagem Prática com o Software R**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2019. Disponível em: < https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1137716/1/DOCUMENTOS-504.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2025.

VIEIRA, Rosana. **Ciclo do nitrogênio em sistemas agrícolas**. Brasília: Embrapa, 2017. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1090589>. Acesso em: 15 fev. 2025.

ZHU, Xiangyu; MA, Jian. Recent advances in the determination of phosphate in environmental water samples: Insights from practical perspectives. **Trends in Analytical Chemistry**. *[S. l.]*, v. 127, p. 1-16, jun. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993620301370?ref=pdf_download&fr=RR-2&rr=9132d8877ecedf45>. Acesso em: 16 fev. 2025.

APÊNDICE I

Resultados detalhados do Teste de Grubbs para os métodos de Griess para determinação de nitrito e dos métodos do cloreto estanoso e do ácido vanadomolibdofosfórico para determinação de fósforo reativo. Para um nível de confiança de 95% e três replicatas por nível de concentração (n = 3), temos $G_{crítico}$ = 1,153.

Tabela 11 - Resultados do Teste de Grubbs para o método de Griess

Concentração (mg $N\text{-}NO_2^-.L^{-1}$)	ABS	ABS Média	s	G_{calc}	H_0
0,025	0,049	0,049	$7{,}50\times10^{-3}$	0,000	Aceita
0,025	0,056	0,049	$7{,}50\times10^{-3}$	1,000	Aceita
0,025	0,041	0,049	$7{,}50\times10^{-3}$	1,000	Aceita
0,050	0,088	0,095	$7{,}02\times10^{-3}$	1,044	Aceita
0,050	0,096	0,095	$7{,}02\times10^{-3}$	0,095	Aceita
0,050	0,102	0,095	$7{,}02\times10^{-3}$	0,949	Aceita
0,075	0,177	0,183	$5{,}51\times10^{-3}$	1,029	Aceita
0,075	0,183	0,183	$5{,}51\times10^{-3}$	0,061	Aceita
0,075	0,188	0,183	$5{,}51\times10^{-3}$	0,968	Aceita
0,100	0,274	0,279	$6{,}11\times10^{-3}$	0,873	Aceita
0,100	0,278	0,279	$6{,}11\times10^{-3}$	0,218	Aceita
0,100	0,286	0,279	$6{,}11\times10^{-3}$	1,091	Aceita
0,125	0,366	0,374	$7{,}51\times10^{-3}$	1,021	Aceita
0,125	0,374	0,374	$7{,}51\times10^{-3}$	0,044	Aceita
0,125	0,381	0,374	$7{,}51\times10^{-3}$	0,977	Aceita
0,150	0,451	0,461	$8{,}74\times10^{-3}$	1,106	Aceita
0,150	0,463	0,461	$8{,}74\times10^{-3}$	0,267	Aceita
0,150	0,468	0,461	$8{,}74\times10^{-3}$	0,839	Aceita
0,175	0,542	0,543	$3{,}21\times10^{-3}$	0,415	Aceita
0,175	0,541	0,543	$3{,}21\times10^{-3}$	0,726	Aceita
0,175	0,547	0,543	$3{,}21\times10^{-3}$	1,141	Aceita
0,200	0,645	0,634	$1{,}05\times10^{-2}$	1,015	Aceita
0,200	0,624	0,634	$1{,}05\times10^{-2}$	0,984	Aceita
0,200	0,634	0,634	$1{,}05\times10^{-2}$	0,032	Aceita

Fonte: Elaboração Própria.

Tabela 12 - Resultados do Teste de Grubbs para o método do cloreto estanoso.

Concentração (mg $P.L^{-1}$)	ABS	ABS Média	s	G_{calc}	H_0
0,020	0,062	0,059	$2,26\times10^{-3}$	1,15	Aceita
0,020	0,058	0,059	$2,26\times10^{-3}$	0,487	Aceita
0,020	0,058	0,059	$2,26\times10^{-3}$	0,664	Aceita
0,050	0,092	0,085	$1,00\times10^{-2}$	0,743	Aceita
0,050	0,089	0,085	$1,00\times10^{-2}$	0,393	Aceita
0,050	0,074	0,085	$1,00\times10^{-2}$	1,137	Aceita
0,075	0,108	0,103	$5,15\times10^{-3}$	1,016	Aceita
0,075	0,103	0,103	$5,15\times10^{-3}$	0,032	Aceita
0,075	0,098	0,103	$5,15\times10^{-3}$	0,983	Aceita
0,100	0,133	0,130	$4,17\times10^{-3}$	0,648	Aceita
0,100	0,125	0,130	$4,17\times10^{-3}$	1,152	Aceita
0,100	0,132	0,130	$4,17\times10^{-3}$	0,504	Aceita
0,250	0,242	0,236	$5,30\times10^{-3}$	1,006	Aceita
0,250	0,236	0,236	$5,30\times10^{-3}$	0,013	Aceita
0,250	0,231	0,236	$5,30\times10^{-3}$	0,994	Aceita
0,500	0,429	0,444	$1,32\times10^{-2}$	1,131	Aceita
0,500	0,449	0,444	$1,32\times10^{-2}$	0,365	Aceita
0,500	0,454	0,444	$1,32\times10^{-2}$	0,766	Aceita
0,750	0,631	0,617	$1,33\times10^{-2}$	1,053	Aceita
0,750	0,615	0,617	$1,33\times10^{-2}$	0,116	Aceita
0,750	0,604	0,617	$1,33\times10^{-2}$	0,937	Aceita
1,000	0,800	0,793	$1,99\times10^{-2}$	0,325	Aceita
1,000	0,809	0,793	$1,99\times10^{-2}$	0,797	Aceita
1,000	0,771	0,793	$1,99\times10^{-2}$	1,122	Aceita

Fonte: Elaboração Própria.

Tabela 13 - Resultados do Teste de Grubbs para o método do ácido vanadomolibdofosfórico.

Concentração (mg P.L^{-1})	ABS	ABS Média	s	G_{calc}	H_0
1,000	0,017	0,019	$2{,}03\times10^{-3}$	1,084	Aceita
1,000	0,021	0,019	$2{,}03\times10^{-3}$	0,887	Aceita
1,000	0,019	0,019	$2{,}03\times10^{-3}$	0,197	Aceita
2,000	0,039	0,041	$1{,}35\times10^{-3}$	0,987	Aceita
2,000	0,042	0,041	$1{,}35\times10^{-3}$	1,012	Aceita
2,000	0,041	0,041	$1{,}35\times10^{-3}$	0,025	Aceita
3,000	0,058	0,060	$2{,}07\times10^{-3}$	1,077	Aceita
3,000	0,062	0,060	$2{,}07\times10^{-3}$	0,900	Aceita
3,000	0,061	0,060	$2{,}07\times10^{-3}$	0,177	Aceita
4,000	0,079	0,081	$1{,}22\times10^{-3}$	1,151	Aceita
4,000	0,082	0,081	$1{,}22\times10^{-3}$	0,658	Aceita
4,000	0,081	0,081	$1{,}22\times10^{-3}$	0,493	Aceita
5,000	0,103	0,103	$8{,}50\times10^{-4}$	1,137	Aceita
5,000	0,104	0,103	$8{,}50\times10^{-4}$	0,745	Aceita
5,000	0,104	0,103	$8{,}50\times10^{-4}$	0,392	Aceita
6,000	0,121	0,122	$8{,}33\times10^{-4}$	1,121	Aceita
6,000	0,123	0,122	$8{,}33\times10^{-4}$	0,801	Aceita
6,000	0,122	0,122	$8{,}33\times10^{-4}$	0,320	Aceita
7,000	0,146	0,147	$8{,}74\times10^{-4}$	1,106	Aceita
7,000	0,148	0,147	$8{,}74\times10^{-4}$	0,839	Aceita
7,000	0,147	0,147	$8{,}74\times10^{-4}$	0,267	Aceita
8,000	0,166	0,166	$1{,}25\times10^{-3}$	0,027	Aceita
8,000	0,164	0,166	$1{,}25\times10^{-3}$	0,986	Aceita
8,000	0,167	0,166	$1{,}25\times10^{-3}$	1,013	Aceita

Fonte: Elaboração Própria.