



Validação de metodologia analítica do ensaio de ortofosfatos em águas superficiais por espectrofotometria de absorção molecular no visível

Elton Alves de Souza Filho¹, Marcos Denílson de Oliveira Monteiro², Priscila Ketlen Negreiros³, Jelmir Craveiro de Andrade⁴, Larissa Silveira Moreira Wiedemann⁵, Tereza Cristina Souza de Oliveira⁶

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo a validação e implementação em rotina de laboratório, do método de determinação de formas de ortofosfatos (PO_4^{3-}) em águas superficiais utilizando a espectrofotometria de absorção molecular no visível. Realizar a validação de um método garante a confiabilidade e rastreabilidade dos resultados obtidos em um laboratório. Foram realizados testes de linearidade, faixa de trabalho, Sensibilidade, Limite de detecção (LD), Limite de quantificação (LQ), Repetibilidade, Precisão Intermediária (reprodutibilidade), Recuperação e Robustez. Preconizado pela Standard Methods (SM-4500-P) o método sob estudo foi o de colorimetria direta pelo método do ácido ascórbico. As amostras utilizadas para quantificação de fosfatos foram coletadas no leito do igarapé do Mindu na cidade de Manaus-AM e posteriormente filtradas com membranas de 0,45 μm . A validação do método foi realizada em espectrofotômetro de UV/VIS no comprimento de onda de 880 nm. Através dos resultados obtidos concluiu-se que o método em estudo se apresentou dentro da faixa de aceitação estabelecida segundo o documento orientativo do INMETRO DOQ-CGCRE-008 para os testes de linearidade, precisão e exatidão. No teste de robustez o método apresentou-se sensível a qualidade de reagentes (fabricantes) e ao tempo de ensaio conforme descrito no método Standard Methods (SM-4500-P) para quantificação de ortofosfatos. Com relação às amostras analisadas pelo ensaio validado, das cinco amostras analisadas, quatro se apresentaram em desacordo ao preconizado pela Legislação CONAMA 357/2005 e uma amostra da nascente do igarapé enquadrado para os limites de ortofosfatos.

Palavras-chave: figuras de mérito, águas naturais, fosfatos.

Validation of analytical methodology for the orthophosphate assay in surface waters by visible molecular absorption spectrophotometry. This work aimed to validate and implement in a laboratory routine, the method of determining orthophosphate forms (PO_4^{3-}) in surface waters using the molecular absorption spectrophotometry in the visible. Performing the validation of a method guarantees the reliability and traceability of the results obtained in a laboratory. Linearity tests, working range, sensitivity, detection limit (LD), quantification limit (LQ), repeatability, intermediate precision (reproducibility), recovery and robustness were performed. Recommended by Standard Methods (SM-4500-P), the

¹ Doutorando em Química, Departamento de Química, ICE, UFAM, easf891@gmail.com

² Mestrando em Química, Departamento de Química, ICE, UFAM, marcosdenilson@ufam.edu.br

³ Mestranda em Química, Departamento de Química, ICE, UFAM, priscilaneigreiros@gmail.com

⁴ Mestre em Química, Departamento de Química, ICE, UFAM, jelmirandrade@outlook.com

⁵ Professora Associada, Departamento de Química, ICE, UFAM, larissasm@yahoo.com.br

⁶ Professora Associada, Departamento de Química, ICE, UFAM, tcristinaoliveira@gmail.com



method under study was direct colorimetry using the ascorbic acid method. The samples used to quantify phosphates were collected in the stream of the Mindu stream in the city of Manaus-AM and later filtered with 0.45 μm membranes. The method was validated using a UV / VIS spectrophotometer at a wavelength of 880 nm. Through the results obtained, it was concluded that the method under study was within the acceptance range established according to the guiding document of INMETRO DOQ-CGCRE-008 for linearity, precision and accuracy tests. In the robustness test, the method was sensitive to the quality of reagents (manufacturers) and to the test time as described in the Standard Methods method (SM-4500-P) for quantification of orthophosphates. Regarding the samples analyzed by the validated test, of the five samples analyzed, four were in disagreement with what is recommended by CONAMA Legislation 357/2005 and a sample from the source of the stream framed for the orthophosphate limits.

Keywords: figures of merit, natural waters, phosphates

1. Introdução

O uso antrópico da água pelas diferentes atividades gera poluentes que implicam de forma direta na qualidade dos corpos hídricos. Entre eles estão a descarga inadequada de resíduos industriais, agrícolas e os esgotos domésticos que alteram as características físicas, químicas e biológicas do meio hídrico prejudicando a utilização das águas para outros fins (SANTOS et al., 2006; SERRÃO e CHAVES, 2019; SOUZA FILHO et al., 2019; SOUZA FILHO et al., 2020a).

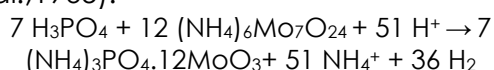
Diante disso, no ano de 2005 o Conselho Nacional do Meio Ambiente estabeleceu as Resoluções nº 274 e nº 357 do CONAMA no intuito de enquadrar os corpos de água segundo suas classes e adequar as melhores condições de qualidade da água a ser utilizada nas mais diversas finalidades (BRASIL, 2005). De acordo com a resolução nº 357 de 2005 do CONAMA (BRASIL, 2005), o teor máximo permitido de P (fósforo) em água doce é de 0,020 mg l⁻¹ de P para ambiente lântico (água parada), para ambiente intermediário é de 0,025 mg l⁻¹ de P para ambiente lótico (em movimento, correnteza) é de 0,1 mg l⁻¹ de P (BRASIL, 2005). O excesso de P nos rios acarreta a eutrofização da água, pois a elevada concentração favorece o crescimento de algas (cianobactérias) e macrófitas aquáticas impactando a fauna e a flora

aquática, através da diminuição de oxigênio dissolvido, liberação de toxinas, além de odor e sabor desagradáveis. (VOLLENWEIDER et al, 1980; PAULA et al, 2016; BARRETO et al, 2013). O P está presente em três formas: fosfato particulado, fosfato orgânico dissolvido e fosfato inorgânico dissolvido. Este último é o mais importante, pois é a principal forma de P assimilada pelos vegetais aquáticos. O P inorgânico dissolvido, na forma de ortofosfato, é facilmente utilizado pelos produtores primários e é, portanto, a principal forma biodisponível de P, mas algumas espécies de P orgânico dissolvido também pode ser utilizado (SANUDO, 2006; MONBET et al 2009; WORSFOLD et al., 2016). O fracionamento e especificação de P são fatores importantes ao considerar o impacto do elemento na qualidade da água. Nas águas naturais o P pode ser encontrado em várias formas "dissolvidas" definida como a fração que passa por um filtro de 0,2 a 0,45 μm e em função do pH do meio e da variação da temperatura pode-se ter diferentes espécies iônicas: H₃PO₄, H₂PO₄⁻, HPO₄²⁻ e PO₄³⁻ (ESTEVES, 2011).

Conforme o método difundido Standard Methods (SM-4500-P) as análises de P em águas naturais englobam dois passos de procedimentos gerais: (a) conversão da forma de P de interesse para ortofosfato dissolvido e (b) determi-



nação colorimétrica de ortofosfato dissolvido. Do ponto de vista químico, os fosfatos que respondem aos testes colorimétricos sem hidrólise ou digestão oxidativa preliminares, são chamados de fósforos reativos. O método mais empregado para determinação do teor de ortofosfato dissolvido (fósforo reativo) é o colorimétrico com quantificação por espectrofotômetro de absorção molecular no visível que mede a transmitância de um feixe de luz num determinado comprimento de onda quando atravessa uma solução colorida dentro de uma cubeta de quartzo ou de vidro (EDWARDS e ALEXANDER, 2017). A determinação da concentração de fosfatos pela técnica espectrofotométrica de absorção molecular no visível relaciona a transmitância e a concentração da solução que está baseada na formação de um complexo colorido, azul de molibdênio, que é formado entre a reação do molibdato de amônio e o fosfato, formando o fosfomolibdênio, com sua posterior redução química mediada pelo ácido ascórbico para espécie colorida no tom de azul, conforme explicita na equação química a seguir (STRICKLAND et al., 1965).



Três métodos de determinação de ortofosfato são descritos na metodologia Standard Methods (SM-4500-P). A seleção depende amplamente da faixa de concentração de ortofosfato. O método do ácido vanadomolibdofosfórico (C) é mais usado para análises de rotina na faixa de 1 a 20 mg P/L. O método do cloreto estanhoso (D) ou o método do ácido ascórbico (E) são mais adequados para a faixa de 0.01 a 6 mg P/L. Neste trabalho o método colorimétrico utilizado foi o da quantificação pelo método do ácido ascórbico (E), mais adequados para a faixa de 0.01 a 6 mg P/L, que compreende a faixa da resolução CONAMA 357/2005 para limites de até 0,1 mg de P/L (Águas da Classe II) na forma

de ortofosfatos dissolvidos como efeito de aplicação da legislação.

O método selecionado neste estudo foi o de colorimetria direta, que em relação aos métodos que utilizam do procedimento de oxidação, apresenta menos interferentes, o que apresenta viabilidade devido a redução de custos para aquisição de reagentes, menor consumo de tempo e aparelhagem mais simples em relação ao necessário para realização da digestão e emprego dos métodos; ácido nítrico-ácido sulfúrico, oxidação com persulfato, além do método com ácido perclórico, o mais drástico e que consome maior tempo de análise, sendo esta última recomendável somente para amostras particularmente difíceis como os sedimentos. O método pelo ácido ascórbico tem sido amplamente utilizado para determinação de P em águas superficiais e residuais, solo e água para fins alimentícios (SANTOS et al., 2014; COLZANI et al., 2017). Do ponto de vista de precisão, o método selecionado para validação, pelo ácido ascórbico está entre os que possuem menor desvio padrão relativo (Entre 4,0 a 9,1%) e menor erro relativo (Entre 4,4 a 10%) associados ao ensaio conforme Standard Methods (SM-4500-P).

Nesse intuito o presente trabalho teve como objetivo realizar a validação da metodologia de determinação de ortofosfatos dissolvido por intermédio de uma curva analítica da concentração de fosfatos relacionando com a absorbância resultante, através da verificação dos parâmetros de aceitação e confiabilidade determinados pelo DOQ-CGCRE-008 – INMETRO de 2018. Como forma de verificar a aplicabilidade do método para o ensaio validado foi escolhido um igarapé na cidade de Manaus-AM para tomar como local de referência (Matriz) para esta validação, igarapé este que apresenta atualmente concentração de fosfatos em concentração acima do estabelecido pela legislação CONAMA de



2005 (OLIVEIRA et al., 2016; ARCOS et al., 2018; SOUZA FILHO et al., 2019; SOUZA FILHO et al., 2020a; SOUZA FILHO et al., 2020b).

2. Material e Métodos

2.1 Materiais, Reagentes e Equipamentos

Todas as vidrarias utilizadas para este estudo foram submetidas à desmineralização com ácido nítrico a 5%, com o intuito de diminuir o risco de contaminação. O Padrão de P utilizado foi da fabricante Sigma-Aldric na concentração 1000 mg l⁻¹, preparado em água ultrapura pureza de 99,5% ± 5% do tipo Milli-Q (Tipo 1). Os demais reagentes utilizados foram de qualidade P.A. O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro de absorção molecular no visível modelo Evolution 220 da fabricante Thermo Scientific, acoplado em um computador. As análises foram realizadas nos meses de novembro e dezembro de 2018 no Laboratório de Métodos Espectroscópicos – LAMESP e a preparação de solução e reagentes no Laboratório de Qualidade Ambiental – LAQUA na Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

2.2 Coleta de amostras no Igarapé do Mindu

As amostras foram coletadas conforme metodologia de coleta e preservação de amostras de águas descritas por Souza Filho et al. (2019), realizadas no período de execução da metodologia de validação analítica do ensaio, na área urbana da cidade de Manaus-AM no norte do Brasil. Foram coletados cinco amostras de águas com características distintas de qualidade, partindo da área de nascente do igarapé (montante) denominado ponto P1 até pontos com características antropizadas, passando por trechos do meio do curso alto do iga-

rapé no ponto P2 no bairro Novo Aleixo, P3 no conjunto residencial Petros, no P4 – Parque municipal do Mindu, e nas proximidades da foz do curso (jusante), no ponto P5 no Parque dos Bilhares. As amostras foram previamente filtradas através de uma membrana de filtro de diâmetro de poro de 0.45 µm conforme Standard Methods (SM-4500-P).

2.3 Validação do Método analítico em Laboratório

O método proposto foi validado conforme as orientações normativas do DOQ-CGCRE-008 INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), conforme o trabalho de Albano e Raya-Rodrigues (2015) e por último, através do descrito por Leite (2008). Foram analisados os seguintes parâmetros: Linearidade, Faixa de trabalho ou Faixa linear de trabalho (INMETRO, 2018), Sensibilidade, Limite de detecção (LD), Limite de quantificação (LQ), Repetibilidade, Precisão Intermediária (reprodutibilidade), Recuperação e Robustez. O método selecionado (Figura 1) para validação foi o de colorimetria direta (4) na forma de fósforo reativo dissolvido (ortofosfato dissolvido) pelo método do ácido ascórbico (E) conforme descrito em Standard Methods (SM-4500-P).

2.3.1 Linearidade, Faixa de trabalho, e Sensibilidade

A execução do método de validação foi realizada em etapas. Na Etapa 1 (Figura 2) foram preparados os reagentes para a reação de redução do P em ortofosfatos dissolvidos. A separação dos reagentes e preparo das soluções para execução do método foi realizado conforme descrito na referência do Standard Method (SM 4500-P), pelo método de redução com ácido ascórbico (E) para determinação de fosfatos em águas.

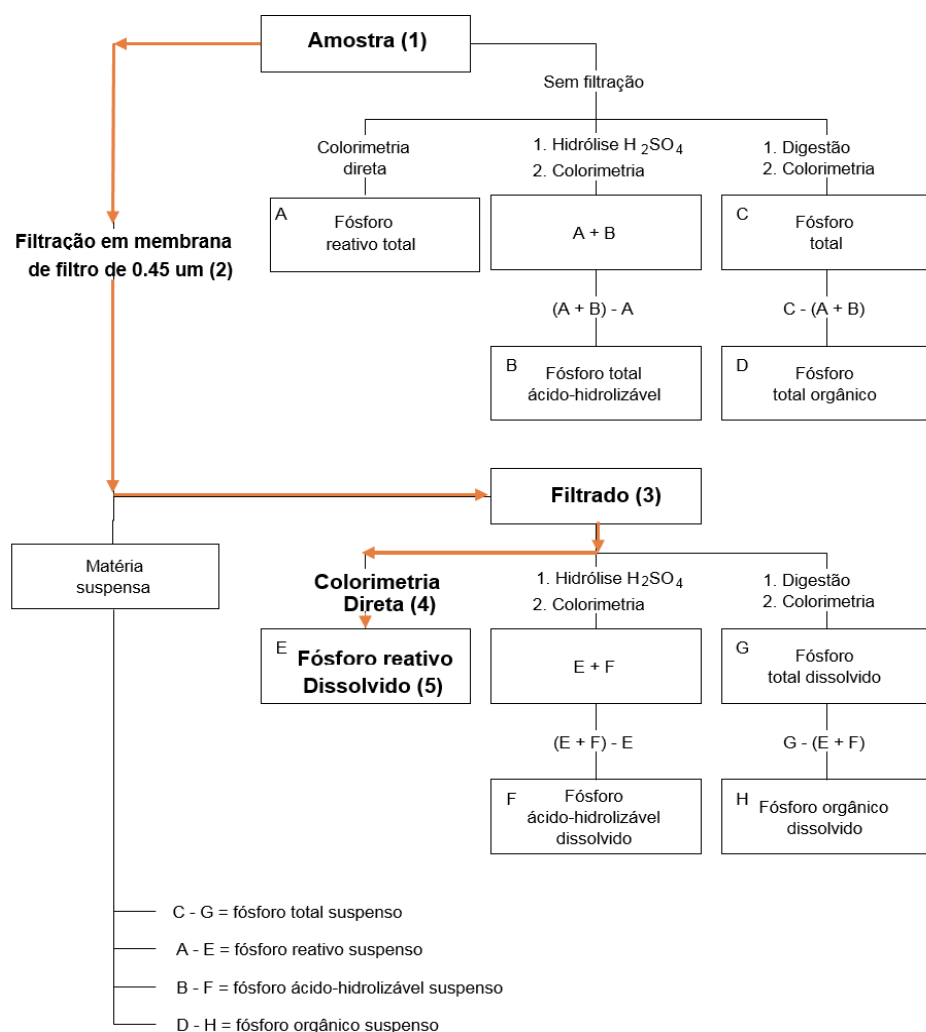


Figura 1 – Rota para análise de fosfatos pelo método Standard Methods 4500-P em águas naturais. Em negrito, com seta laranja em ênfase, a rota utilizada neste trabalho. Fonte: Standard Methods 4500-P pelo método do ácido ascórbico (E).

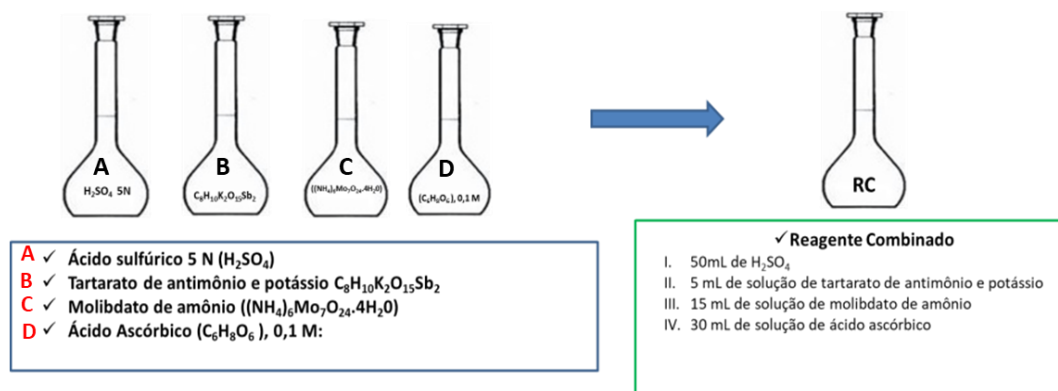


Figura 2 – Soluções preparadas para execução da Etapa 3 deste estudo.

Na Etapa 2 (Figura 3A) para a determinação da linearidade foi utilizado o método do padrão externo a partir de uma solução padrão de 1000 mg l^{-1} de P da

marca Sigma Aldrich. Foram preparadas duas soluções (mães) de 50 mg l^{-1} , e a partir destas soluções foram preparadas novas soluções (soluções filhas) de forma

alternada para a determinação da curva analítica com valores de concentração; 0,050; 0,10; 0,25; 0,50, 075 e 1,0 mg l⁻¹

¹ e avolumadas em balão volumétrico de 50 mL (Figura 3A).

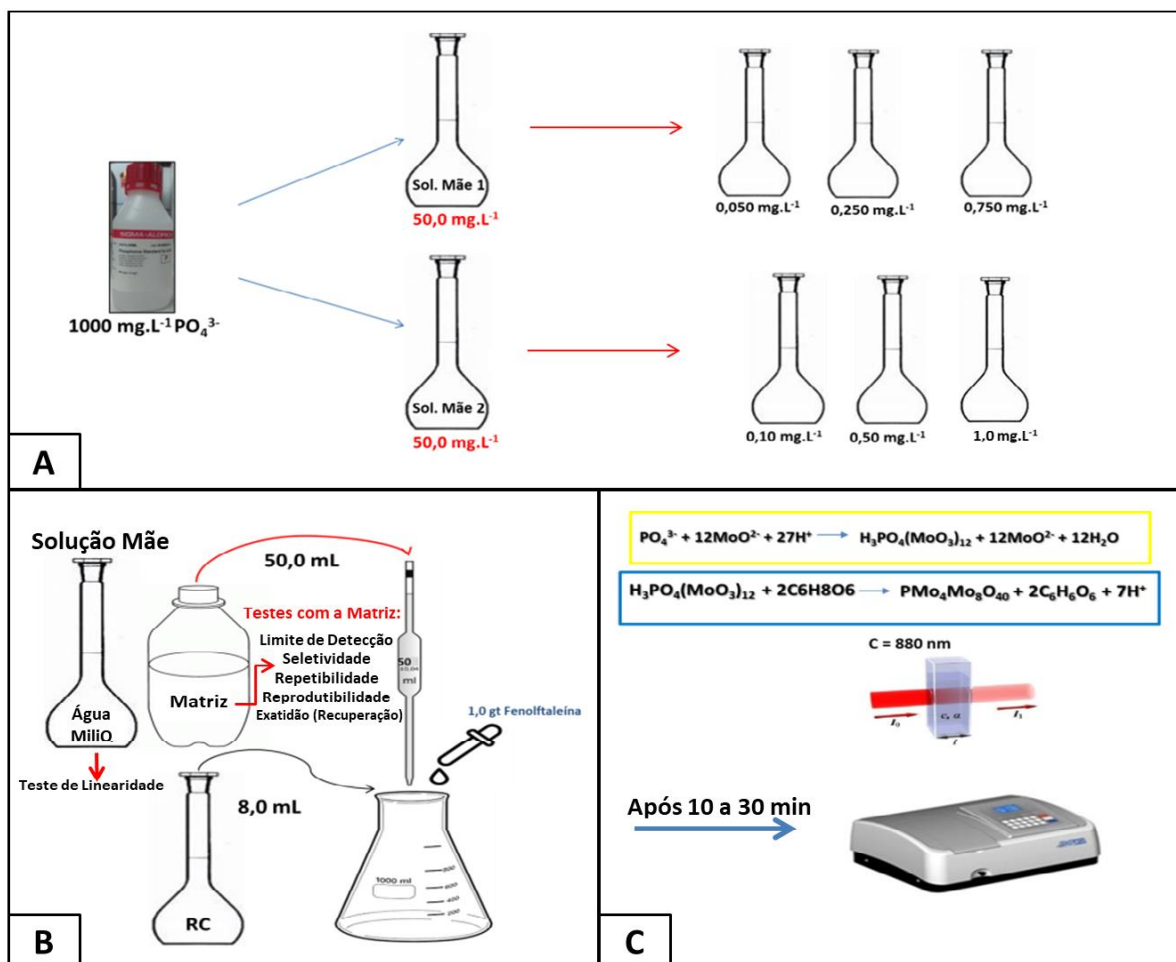


Figura 3– Em (3A) Soluções mães um e dois preparadas a partir de um padrão de 1000 mg l⁻¹ de P marca Sigma Aldrich. Em (3B) mistura com reagentes da água deionizada (tipo MiliQ) para determinação da linearidade ou utilização da Matriz (amostra) para realização dos testes complementares da validação. Em (3C) quantificação das amostras de água e matriz em espectrofotômetro de absorção molecular no visível com comprimento de onda de 880 nm após interstício de 10 a 30 min de reação.

A Etapa 3 (Figura 3B e 3C) foi executada através da obtenção de alíquota de 50 mL de água deionizada (tipo MiliQ) com adição de padrão de cada uma das concentrações definidas e adição de 0,05 mL (1 gota) de fenolftaleína em um erlenmeyer de 125 mL. Em seguida adicionado 8,0 mL do reagente combinado preparado na Etapa 1, após o interstício entre 10 e 30 minutos foi realizado leitura no equipamento em comprimento de onda de 880 nm. O proces-

samento das reações foi destacado na Figura 4C; Em amarelo é apresentada a reação de redução dos fosfatos presente na amostra, e em azul a reação de complexação na forma de fosfomolibdênio para quantificação em 880 nm. Para o preparo da linearidade foram executadas sete curvas, em cada uma delas foi realizada a leitura em triplicata de cada padrão de concentração definido, gerando ao final do teste uma média final das sete curvas obtidas.

A faixa de trabalho ou faixa linear de trabalho (faixa de concentração do analito em que os resultados do método são proporcionais à concentração do analito) foi definida a partir de um padrão central de $0,10 \text{ mg l}^{-1}$ (limite da resolução CONAMA nº357/2005 para o parâmetro de P inorgânico (fosfatos) em curso lótico de corpos receptores de Classe II desta resolução), com uma concentração inferior a $0,10 \text{ mg l}^{-1}$ e três concentrações superiores a $0,10 \text{ mg l}^{-1}$ com limite máximo de $1,0 \text{ mg l}^{-1}$. Foram preparadas sete curvas, sendo que cada uma delas foi elaborada com leituras em triplicata de sua respectiva concentração. As mesmas leituras em triplicatas foram inferidas para os outros parâmetros de validação elaborados.

Após as Etapas 1, 2 e 3 foi calculada a regressão linear obtida através do método dos mínimos quadrados (equação da reta ou equação do 1º grau) explícita na equação 1. A partir da curva de linearidade obtida foi determinada a faixa de trabalho através da regressão linear e sensibilidade do método que foram calculadas conforme a Equação 1 e 2 respectivamente.

$$y = ax \pm b \quad (1)$$

em que y é variável dependente, x é a variável independente, a é o coeficiente angular e b é coeficiente linear.

$$S = \frac{dx}{dy} \quad (2)$$

Em que S é a sensibilidade, dx é a variação da resposta e dy a variação da concentração.

2.3.2 Resíduos

A partir da curva de linearidade plotada a partir da Equação 1, foram analisados o perfil do gráfico dos resíduos. Conforme destacou Albano e Raya-Rodrigues (2015), o gráfico de resíduos deve possuir uma ordem aleatória de distribuição, onde, se o "coeficiente de determinação" da equação da reta

for maior que 0,995 e o gráfico de perfil dos resíduos de regressão possuir ordem aleatória de distribuição, então o método pode ser considerado linear. Um dos pressupostos do modelo de regressão linear é a de que os erros devem ter variância constante, esta condição é designada por homoscedasticidade. A variância ser constante equivale a supor que não existem observações incluídas na variável residual cuja influência seja mais intensa na variável dependente. Uma das técnicas usadas para verificar a suposição de que os resíduos são homoscedásticos, é a análise do gráfico dos resíduos versus valores ajustados. Este gráfico deve apresentar pontos dispostos aleatoriamente sem nenhum padrão definido. Por isso, se os pontos estão aleatoriamente distribuídos em torno da reta $y = 0$, sem nenhum comportamento ou tendência, tem-se indícios de que a variância dos resíduos é constante, a presença, por exemplo, de "funil" é um indicativo da presença de heteroscedasticidade. Podemos dizer que homoscedasticidade é o termo para designar variância constante dos erros experimentais para observações distintas (RODRIGUES, 2012). Caso a suposição de homoscedasticidade não seja válida, podemos listar alguns efeitos no ajuste do modelo: Os erros padrões dos estimadores, obtidos pelo método dos mínimos quadrados, são incorretos, portanto, a inferência estatística não é válida. Em resumo não basta apenas a equação da reta se apresentar na forma linear, o gráfico de resíduos é importante para avaliar se o modelo apresenta homoscedasticidade ou heteroscedasticidade, isto é, σ^2 constante.

Para verificação de valores discrepantes em cada nível de concentração da curva analítica foi aplicado o teste de Grubbs a 95% de confiança (GRUBBS, 1969). O teste de Grubbs é primeiramente realizado para verificar a existência de um valor anômalo em cada extremida-

de do conjunto de dados. Se nesta primeira análise, um dos dois valores for considerado anômalo, ele é rejeitado, retirado do conjunto e um novo teste, verificando a existência de um valor anômalo em cada extremidade do conjunto, é realizado e assim sucessivamente; caso contrário, se nesta primeira análise, ambos os valores forem aceitos como não anômalos, o teste é encerrado e utilizamos o conjunto de dados remanescentes para análise (FERREIRA, 2017).

2.3.3 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção (LD) é definido como a menor concentração detectada, mas não necessariamente quantificada. O limite de detecção pode ser determinado mediante o sinal/ruído, o desvio-padrão da resposta e do coeficiente angular e por processos estatísticos. O sinal/ruído pode ser aplicado somente para processos analíticos que exibem linha de base. Conforme Brito et al (2003) a determinação da razão sinal/ruído é realizada por meio da comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o analito pode ser detectado, o documento orientativo do INMETRO (2016) sugere no mínimo sete replicatas para a estimação do LD. A razão sinal/ruído com valor três é geralmente considerada aceitável para estimar o limite de detecção (BRITO et al, 2003; RIBEIRO e FERREIRA, 2008; SOARES et al., 2012; SOUZA et al., 2016). Neste trabalho o LD foi determinado pela Equação 3:

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{b} \quad (3)$$

em que LD é o Limite de detecção, s é o desvio padrão da resposta da matriz de menor concentração e b a inclinação (coeficiente angular) da curva analítica.

2.3.4 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação é definido como a menor concentração que pode ser quantificada pelo método, com exatidão e precisão, geralmente adota-se o menor valor de concentração da faixa de trabalho (LEITE, 2008; BRITO et al., 2003; RIBEIRO e FERREIRA, 2008; SOARES et al., 2012; SOUZA et al., 2016). Para esse fim, o LQ foi determinado pela Equação 4:

$$LD = 10 \times \frac{s}{b} \quad (4)$$

Onde LQ é o Limite de quantificação, s é o desvio padrão da resposta da matriz de menor concentração e b a inclinação (coeficiente angular) da curva analítica.

2.4 Teste de Precisão do Método

A precisão de um método é quando existe concordância entre os valores experimentais obtidos e quanto mais próximos entre si estiverem, maior será a precisão. A precisão foi determinada a partir da repetitividade e reprodutibilidade (precisão intermediária). De acordo com o documento DOQ-CGCRE-008 INMETRO, quando não houver métodos com quais possam ser comparadas as características de precisão, então, os valores teóricos de repetibilidade e reprodutibilidade podem ser calculados a partir da equação de Horwitz, que leva em consideração a concentração do analito. A forma mais adequada é o uso dos valores de HORRAT para avaliar a aceitabilidade das características de precisão de um método. O valor de HORRAT é dado pela Equação 5.

$$\text{Valor de Horrat} = \frac{DPR_{(R)} \text{ (Derivado do Estado Colaborativo)}}{DPR_{(P)} \text{ (Previsto da Equação de Horwitz)}} \quad (5)$$

Sendo a Equação de Horwitz:

$$DPR_{(R)} = 2^{(1-0,5 \text{ Log } C)} \quad (6)$$

Em que DPR é o desvio padrão relativo e C a concentração do analito. Se os valores de HORRAT forem menores ou iguais a 2,0; os valores de repetibilidade e re-

produtibilidade dos métodos podem ser considerados satisfatórios.

2.5 Teste de Exatidão (Recuperação)

Nesse estudo foi determinada a recuperação do método, que consiste na adição (fortificação) de uma quantidade conhecida de analito à amostra para testar se a resposta da amostra corresponde ao esperado a partir da curva de calibração. Nesse estudo, a amostra foi fortificada com uma concentração conhecida de concentração de P e em seguida foram analisadas em triplicata, em três níveis de concentração (baixa, média e alta) da mesma forma que as desconhecidas. No final do procedimento foi calculado o Fator de Recuperação (FR) conforme Equação 7 (INMETRO, 2018) ou seja, o FR é uma resposta sobre a eficiência do método (FILHO, 2010).

$$\text{Recuperação}(\%) = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \times 100 \quad (7)$$

em que Recuperação (%) é o fator de recuperação, C_1 é a concentração do analito na amostra fortificada, C_2 é a concentração do analito na amostra não fortificada, e C_3 a concentração do analito adicionado à amostra.

2.6 Teste de Robustez

Segundo a International Conference on Harmonisation (ICH), a robustez do método é a medida da sua capacidade de permanecer inalterado sob pequenas, mas estudadas variações nos parâmetros do método e prover indicação da sua dependência durante o uso normal (MAROTO et al., 1999; NIJHUIS et al., 1999; VAN DER HEYDEN et al., 1999; BRITO et al., 2003). A robustez neste trabalho foi calculada de acordo com Albano e Raya-Rodriguez (2015) por meio da média de seis réplicas para cada uma das combinações testadas. As variáveis relacionadas para o cálculo da robustez foram dispostas através do cálculo entre os fatores:

1. O cálculo do efeito dos fatores Reagente (F_r) e fator Tempo (F_t) calculados através das seguintes equações 8 e 9;

$$F_r^* = \frac{\frac{MRA(\text{tempo1}) + MRA(\text{tempo2})}{2} - \frac{MRB(\text{tempo1}) - MRB(\text{tempo2})}{2}}{2} \quad (8)$$

Sendo: *Média dos reagentes A no tempo 1 (MRAtempo1), *Média dos reagentes A no tempo 2 (MRAtempo2), *Média dos reagentes B no tempo 1 (MRBtempo1), e a *Média dos reagentes B no tempo 2 (MRBtempo1)

$$F_t^* = \frac{\frac{MRA(\text{tempo1}) + MRB(\text{tempo1})}{2} - \frac{MRA(\text{tempo2}) - MRB(\text{tempo2})}{2}}{2} \quad (9)$$

2. Elevar estas diferenças dos fatores ao quadrado F_r^2 e F_t^2 ;
3. Somar os desvios e fazer à média;

$$\frac{F_r^2 + F_t^2}{2} = \text{Média (M)}$$
4. E por fim calcular o desvio (S_{rob}) pela Equação 10:

$$S_{rob}(\text{desvio da robustez}) = \sqrt{2 \times (M)} \quad (10)$$

Calcula-se então o desvio da Robustez (S_{rob}) de cada concentração e compara-se com o desvio da reprodutibilidade interna (S_{repro}) de cada concentração caso o desvio da robustez seja menor que o desvio da reprodutibilidade interna ($S_{rob} < S_{repro}$) então o método é considerado robusto.

3. Resultados e Discussão

3.1 Teste de Regressão Linear

Os resultados das absorvâncias com leituras no comprimento de onda de 880 nm foram reunidos na Tabela 1.

A curva analítica média, obtida por meio do método dos mínimos quadrados, apresentou a equação: $y = 0,6136x + 0,0033$ e um "coeficiente de determinação" de 0,9999. No gráfico da Figura 4 foram plotados os dados da linearidade obtidas para as sete curvas obtidas.

Tabela 1 – Dados de absorbância obtidos em comprimento de onda de 880 nm para as sete curvas de linearidade.

Concentração (m g l ⁻¹)	Curva							MÉDIA
	1	2	3	4	5	6	7	
0,050	0,033	0,030	0,035	0,033	0,035	0,031	0,033	0,033
0,100	0,062	0,061	0,062	0,059	0,069	0,064	0,072	0,064
0,250	0,149	0,159	0,163	0,152	0,162	0,147	0,153	0,155
0,500	0,310	0,314	0,316	0,308	0,330	0,321	0,306	0,315
0,750	0,453	0,477	0,460	0,472	0,443	0,463	0,461	0,461
1,000	0,603	0,626	0,625	0,616	0,610	0,600	0,620	0,616

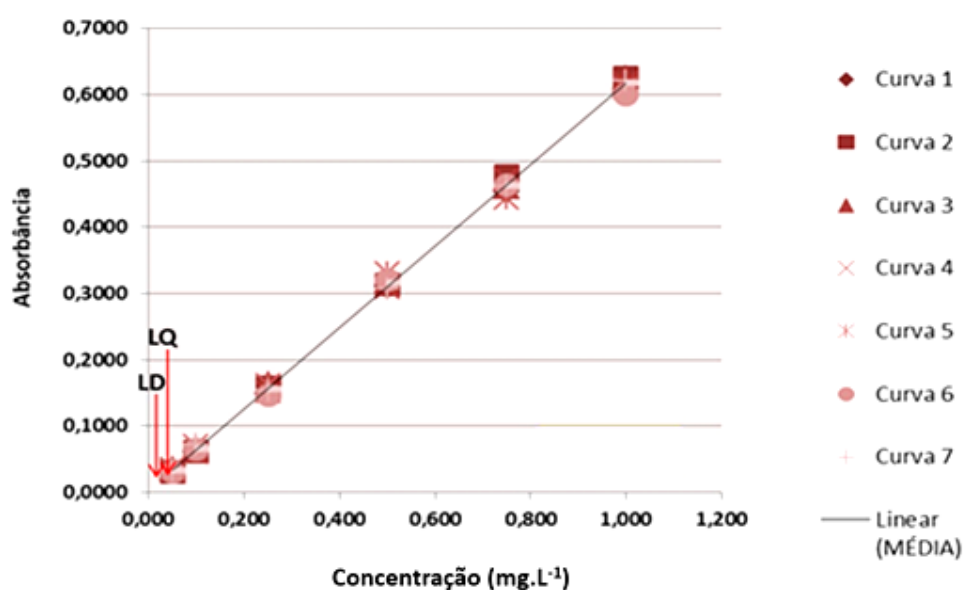


Figura 4 – Gráfico da regressão linear obtido a partir de sete curvas analíticas realizadas. Programa estatístico utilizado: Microsoft Excel 2016.

Pode-se perceber pelo valor do coeficiente de determinação, que as sete curvas plotadas apresentam correlação fortíssima ($0,91 < R < 0,99$) conforme dados de Brito et al (2003), sendo na opinião de Leite (2008) o coeficiente de determinação, o critério mínimo aceitável para os testes de linearidade e seletividade. Outros trabalhos (Moura et al., 2008; Rubim et al., 2012; Borba et al., 2013) consideraram valores aceitáveis o coeficiente de determinação dentro do intervalo ($0,91 < R < 0,99$) para os métodos avaliados por espectrofotometria de absorção molecular, sendo considerado, linear o método sob estudo.

3.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir da razão sinal/ruído (BRITO et al., 2003; INMETRO, 2018; RIBEIRO e FERREIRA, 2008; SOARES et al., 2012; SOUZA et al., 2016) foram estabelecidos a partir da média da determinação de sete alíquotas de 50 mL da matriz de menor concentração, calculados os limites de detecção (Equação 3) em $0,0060 \text{ m g l}^{-1}$, limites de quantificação (Equação 4) de $0,0118 \text{ m g l}^{-1}$ e desvio padrão (S) com dados reunidos na Tabela 2. O valor da sensibilidade de $0,6136$ foi obtido a partir do coeficiente angular da equação de linearidade $y = 0,6136x + 0,0033$. A faixa de tra-

balho estabelecida ficou no intervalo de 0,0118 a 1,0 mg L⁻¹.

Tabela 2 – Dados de replicatas obtidos para o cálculo dos limiares LD e LQ a partir da Matriz.

Repetições	Replicatas para LD
1	0,0750
2	0,0770
3	0,074
4	0,0760
5	0,0750
6	0,0760
7	0,0740
Média	0,0750
Desvio Padrão (S)	0,0011
Sensibilidade	0,6136
LD	0,0060
LQ	0,0118

Conforme Pinheiro (2010) que avaliou a distribuição espacial de ortofosfa-

tos na cidade de Manaus com limites estudados entre 0,04 e 5,31 mg L⁻¹ na bacia do São Raimundo, implica que os valores de LD e LQ obtidos neste estudo inferiores ao de Pinheiro (2010) tem capacidade de detectar este método e pode ser utilizado para quantificação das águas do Igarapé do Mindu, curso principal da bacia do São Raimundo.

3.3 Resíduos

No gráfico da Figura 5 foram plotados os resíduos obtidos que se apresentaram sob forma aleatória de distribuição, onde também se pode considerar o método linear.

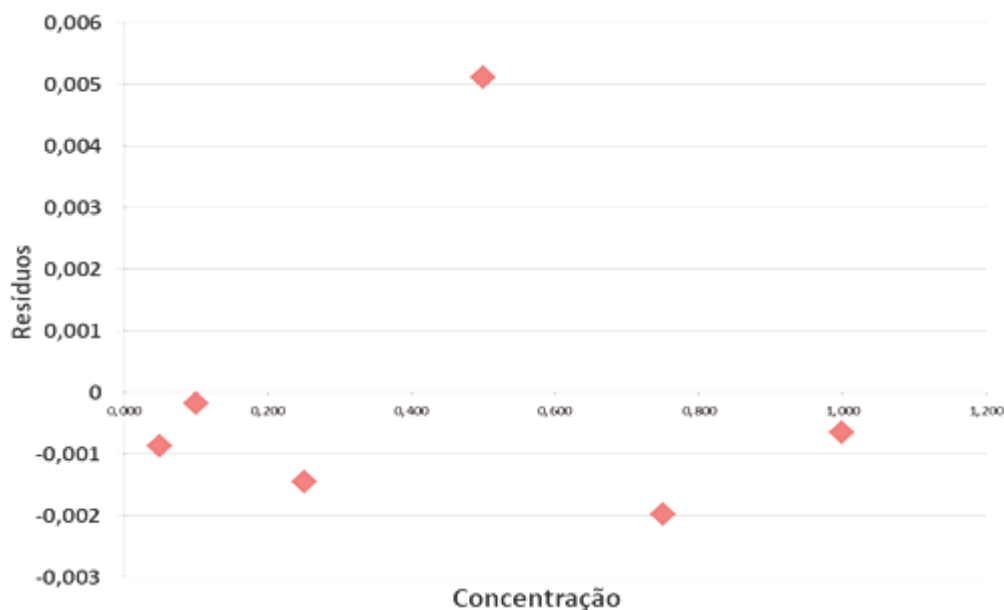


Figura 5 – Gráfico de plotagem de resíduos. Programa estatístico utilizado: Microsoft Excel 2016.

Para verificar se houve valores discrepantes em cada nível de concentração da curva analítica foi aplicado o teste de Grubbs a 95% de confiança. Os valores obtidos apresentaram-se abaixo do G_{tabela} , não havendo valores discrepantes para as réplicas. Aplicou-se o teste de Cochran (COCHRAN, 1934; TUKEY, 1962) a um nível de confiança de 95%

para determinar se o método é homocedástico, isto é, a homogeneidade da variância dos resíduos. Os valores de $C_{calculado}$ obtidos apresentaram-se todos abaixo do C_{tabela} para as concentrações determinadas, portanto, existe homogeneidade e homoscedasticidade em todas as concentrações testadas e comprova-se a linearidade do método.

Os dados de desvio padrão, variância, coeficiente de variação, e teste de Co-

chran a nível de 95% de significância foram reunidos na Tabela 3.

Tabela 3 – Dados calculados para comprovação da homoscedasticidade do método.

Concentração	Desvio Padrão (S)	Coefficiente de variação (CV %)	Variância	Teste de Cochran	C _{tab}
0,05	0,0019	5,7	0,00000348	0,0094	0,4194
0,10	0,0048	7,4	0,00002283	0,0616	0,4194
0,25	0,0064	4,10	0,00004033	0,1087	0,4194
0,50	0,0084	2,7	0,00006978	0,1881	0,4194
0,75	0,0113	2,5	0,00012824	0,3458	0,4194
1,00	0,0103	1,7	0,00010624	0,2864	0,4194

Os valores do coeficiente de variação (CV) enquadrados, inferiores a 10%, demonstram que há baixa dispersão dos resíduos obtidos tanto do método quanto da leitura do equipamento (CHAVES et al., 2018). Cardoso et al. (2010) utilizou metodologia semelhante para análise de resíduos empregando avaliação pelo teste de Cochran obtendo valores de $C_{calculado} < C_{tabelado}$.

3.4 Testes de Repetibilidade e Precisão intermediária (Reprodutibilidade Interna)

A Repetibilidade e a precisão intermediária (reprodutibilidade interna do laboratório) foram avaliadas a partir de três níveis de concentração diferentes e

com analistas diferentes. Os resultados organizados na Tabela 4 para a repetibilidade demonstraram que o método testado apresentou boa precisão, pois o valor de Horrat apresentou-se inferior a 2,0. Lessa et al. (2017) analisou a precisão por estudos de repetibilidade por espectrofotometria de absorção molecular. Os resultados obtidos da repetibilidade revelaram coeficientes de variância menores do que o valor máximo exigido.

Os resultados obtidos para a precisão intermediária estão apresentados na Tabela 5. O valor de Horrat apresentou-se inferior a 2,0; o que comprova que o método testado apresentou boa precisão (INMETRO, 2018; ALBANO e RAYARODRIGUEZ, 2015).

Tabela 4 - Resultados de repetibilidade obtido por meio de medidas espectrofotométrica de absorção molecular no visível em três níveis de concentrações diferentes (0,05;0,25 e 0,75 mg L⁻¹).

Analista	Concentração (mg L ⁻¹)	DPR % calculado	DPR valor de Horwitz	Valor de Horrat
1	0,05	1,41	22	0,064
	0,25	1,54	19	0,081
	0,75	0,722	17	0,044
2	0,05	4,13	22	0,191
	0,25	0,948	19	0,050
	0,75	0,363	17	0,022

Tabela 5 - Resultados de precisão intermediária obtido por meio de medidas espectrofotométrica de absorção molecular no visível em três níveis de concentrações diferentes (0,05;0,25 e 0,75 mg L⁻¹).

Analista	Concentração (mg L ⁻¹)	DPR % calculado	DPR valor de Horwitz	Valor de Horrat
1 e 2	0,05	6,16	22	0,28
	0,25	3,46	19	0,18
	0,75	0,983	17	0,059



Bomfim et al. (2010) em validação de método cromatográfico gasoso para determinação de monômetros plásticos de embalagens utilizou a equação de Horwitz utilizando do valor de Horrat como critérios de aceitabilidade, indicando que o método apresenta precisão adequada quando as medidas de uma única amostra são obtidas em dias diferentes.

Aguiar et al. (2013) em validação por cromatografia líquida em análise de aspirina e ácido acetilsalicílico em teste de validação da utilizou da equação de Horwitz na análise da precisão intermediária confirmando pelos valores dos desvios padrão relativos de reprodutibilidade (DPR%). O teste foi realizado com três analistas e alteração de três fabricantes dos analitos estudados. Todos os resultados obtidos ficaram abaixo dos limites estabelecidos de DPR% em função da concentração do analito.

Costa et al. (2018) em análise de nitratos e nitrogênio amoniacal por espectrofotometria de absorção molecular de amostras de lixiviado de solo, com varredura de comprimento de onda entre 550 a 630 nm, adotando-se 590 nm para quantificação. Em análise de validação do método realizou o teste de precisão intermediária a partir da equação de Horwitz utilizando dos valores de Horrat, utilizando três níveis de concentração, leituras no mesmo dia e no dia seguinte para quantificação. As três amostras avaliadas por Costa et al. (2018) foram consideradas validadas no critério de aceitação de valores de Horrat, apresentando-se inferiores a 2,0 para o método avaliado.

3.5 Teste de Robustez

Verificou-se o comportamento dos resultados em relação a duas variáveis: reagentes e tempo. Os dois parâmetros foram realizados de forma independente

com variação dos reagentes nas concentrações de 0,25 e 0,75; e com variação do tempo de 45 min e 60 min em cada uma das concentrações estudadas; 0,25 e 0,75.

Para os reagentes foram alterados os fabricantes do ácido sulfúrico e ácido ascórbico, utilizados no preparo do reagente combinado (RC) necessário para a redução do P inorgânico a partir do molibdato em meio ácido. No teste, o reagente A (ácido sulfúrico) é da fabricante Synth® e o ácido ascórbico é da fabricante Biotec®, o reagente B é do fabricante Nuclear® para ácido sulfúrico, e o ácido ascórbico do fabricante Chemicals®. Os resultados experimentais obtidos para a robustez estão apresentados nas Tabela 6 para os conjuntos analisados.

Após a análise das seis replicatas de todos os conjuntos estudados, calculou-se a média dos conjuntos e verificou-se o efeito dos fatores analisados como demonstrado no cálculo a seguir:

Para a concentração de 0,25:

$$\text{Fator Reagente (Fr)} = \frac{0,2272+0,2231}{2}$$

$$\frac{0,2225 - 0,2328}{2} = 0,2303$$

$$\text{Fator Tempo (Ft)} = \frac{0,2272+0,2225}{2}$$

$$\frac{0,2231 - 0,2328}{2} = 0,2297$$

Após a verificação dos fatores analisados elevaram-se ao quadrado os mesmos:

$$(Fr^2 \text{ e } Ft^2)$$

Por fim, somaram-se os desvios elevados ao quadrado (M) e fez-se a média. Para o cálculo do desvio da Robustez (S_{rob}) usou-se a Equação 10.

$$S_{rob} = \sqrt{2 \times (M)} = \sqrt{2 \times 0,0529} = 0,3252$$

Para a concentração de 0,75:

$$\text{Fator Reagente (Fr)} = \frac{0,7011+0,6988}{2}$$

$$\frac{0,7120 - 0,7110}{2} = 0,6995$$

$$\text{Fator Tempo (Ft)} = \frac{0,7011+0,7120}{2}$$

$$\frac{0,6988 - 0,7110}{2} = 0,7127$$

Após a verificação dos fatores analisados elevaram-se ao quadrado os mesmos (Fr^2 e Ft^2), por fim, somaram-se os

desvios elevados ao quadrado (M) e fez-se a média para a concentração de

Tabela 6 - Resultado relativo à robustez do método para a concentração de 0,25 e 0,75 no tempo de 45 min e de 60 min.

Replicatas	Tempo 45 min Concentração 0,25		Tempo 60 min Concentração 0,25	
	Reagente A (Ác. Sulf. Synth®)	Reagente B Ác. Ascórb. – Biotec®)	Reagente A (Ác. Sulf. Synth®)	Reagente B Ác. Ascórb. – Biotec®)
1	0,2213	0,2231	0,2231	0,2301
2	0,2231	0,2266	0,2231	0,2319
3	0,2284	0,2231	0,2249	0,2301
4	0,2319	0,2231	0,2213	0,2336
5	0,2319	0,2196	0,2231	0,2354
6	0,2266	0,2196	0,2231	0,2354
Média	0,2272	0,2225	0,2231	0,2328

Replicatas	Tempo 45 min Concentração 0,75		Tempo 60 min Concentração 0,75	
	Reagente A (Ác. Sulf. Synth®)	Reagente B Ác. Ascórb. – Biotec®)	Reagente A (Ác. Sulf. Synth®)	Reagente B Ác. Ascórb. – Biotec®)
1	0,7041	0,7093	0,6935	0,7146
2	0,7023	0,7093	0,6918	0,7058
3	0,6970	0,7128	0,6953	0,7128
4	0,7005	0,7163	0,7023	0,7163
5	0,7005	0,7128	0,7076	0,7057
6	0,7023	0,7111	0,7023	0,711
Média	0,7011	0,7120	0,6988	0,7110

A análise estatística dos dados obtidos, variando os fabricantes dos ácidos sulfúrico e ácido ascórbico, e alterações

0,75. Para o cálculo do desvio da Robustez (S_{rob});

$$S_{rob} = \sqrt{2 \times (M)} = \sqrt{2 \times 0,4986} = 0,9986$$

Como desvio padrão (S_{rob}) da robustez para as concentrações de 0,25 e 0,75 respectivamente de (0,3252 e 0,9986) foi maior do que o Desvio da Reprodutibilidade Interna de Horrat (S_{repro}) para as concentrações de 0,25 e 0,75 respectivamente de (0,018 e 0,059) o método não é considerado robusto, ou seja, é sensível as alterações de tempo (45 e 60 min) e reagentes (fabricantes diferentes).

no tempo de teste demonstrou que ocorre uma influência significativa nos resultados. No entanto, essa variação não

afeta nos resultados dos outros testes sobre validação de métodos analíticos (INMETRO, 2018) pois, a robustez é um parâmetro opcional dentro dos estudos de validação, no entanto, outras opções de mudanças poderiam ser realizadas para avaliar o parâmetro robustez no método. Lessa et al. (2017) utilizando espectrofotômetro de absorção molecular de feixe duplo da marca Shimadzu para quantificação de corantes em efluentes industriais na faixa de comprimento de onda de 500 a 520 nm realizou alterações na robustez do método ajustando o pH das soluções de corantes de concentrações distintas com soluções de HCl e NaOH para os valores de 3, 7 e 11, os autores observaram que o método apresenta sensibilidade a influência do pH do corante quantificado pelo método.

Junior et al. (2017) em validação por método espectrofotométrico de absorção molecular realizou a análise de robustez variando-se a marca do solvente etanol (Vetec, Reagen e Dinâmica) e a temperatura da sala de análise (27 e 24 °C), demonstrando que o método avaliado foi sensível a estas alterações, não sendo considerado robusto.

Chaves et al. (2018) em teste de validação por cromatografia gasosa mostrou que o método foi robusto para determinar herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) em águas superficiais realizando mudanças de reagentes, temperatura, para diferentes analistas e variação de temperatura da coluna.

3.6 Teste de Exatidão (Recuperação)

As recuperações médias para três níveis diferente de concentrações foram reunidas na Tabela 7. Os valores da recuperação média obtido para o método testado apresentou-se enquadrado na faixa de aceitação para recuperação (80-110), (INMETRO, 2018; ALBANO e RODRIGUEZ, 2015).

Vários autores têm utilizado o limiar de Recuperação para avaliar a exatidão

de métodos de validação em testes espectrofotometria de absorção molecular em uv/vis, absorção atômica, plasma induzido (ICP/OES), cromatografia e etc. Brito et al. (2003) destacou que o teste de recuperação está relacionado com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. Os valores apresentados por Brito et al (2003), em análise de resíduos de pesticidas apresentaram recuperações médias enquadradas na legislação com valores entre 83 a 109%.

Tabela 7 - Recuperação obtidos do teste de adição de padrão em três níveis de concentração diferentes.

Concentração (mgL ⁻¹)	Recuperação média +/-DP (%)
0,05	99,9958 +/- 0,0038
0,25	100,0001 +/- 0,0096
0,75	100,001 +/- 0,0020
Média +/- DP	99,9990 +/- 0,0051

Chaves et al. (2018) em validação de ensaio de herbicida por cromatografia gasosa verificou que a recuperação média avaliada apresentou regressão conforme aumentou o volume de amostra de 100 a 1000 mL obtendo faixas de recuperação média de 105,93±2,2% para volumes de 100 mL e 51,8±2,4% para volumes de 1000 mL de amostra.

Lessa et al. (2017) em análise de corantes por espectrofotometria de absorção molecular na faixa de comprimento de onda de 500 a 520 nm avaliou o teste de exatidão pelo método de recuperação do analito em três concentrações diferentes (5, 40 e 60 mg.mL⁻¹) obtendo valores aceitáveis para os testes realizados.

3.7 Teste de determinação de P inorgânico (Fosfatos) com amostra do igarapé do Mindu

Na Tabela 8 foram reunidos os resultados de cada ponto amostral

do igarapé após a execução do ensaio. A equação utilizada foi à média da curva de regressão linear $y = 0,5779x + 0,0033$, com leituras no es-

pectrofotômetro de absorção molecular no visível com comprimento de onda de 880 nm.

Tabela 8 – Apresentação dos resultados obtidos para amostras de P1 a P5 do igarapé do Mindu.

Pontos Amostrais	Leitura Média em Absorbância	P inorgânico (m g l^{-1})
P1 (Saída Nascentes)	0,0560	0,09
P2 (Novo Aleixo)	0,5400	0,37
P3 (Conjunto Petros)	0,3860	0,28
P4 (Parque do Mindu)	0,2580	0,20
P5 (Pq. Dos Bilhares)	0,2840	0,22
Limite Resolução Conama 357/2005 (m g l^{-1})		0,10

O ponto de proximidade das nascentes do igarapé do Mindu foi o único que apresentou limites inferiores a $0,10 \text{ mg L}^{-1}$ de P inorgânico e enquadrados à legislação vigente, sendo os demais pontos com concentração de P inorgânico fora de especificação. Souza Filho et al. (2019) destacaram que as principais suspeitas de contaminação das águas por fosfatos no igarapé do Mindu e em outros igarapés de Manaus tem sido o despejo de efluentes industriais, resíduos sólidos e a baixa coleta e tratamento de esgoto que colabora para a entrada de efluentes com alta concentração de P e nitrogênio nas águas (SANTOS et al., 2006; ARCOS et al., 2018; SOUZA FILHO et al., 2018; SOUZA FILHO et al., 2019; SERRÃO e CHAVES, 2019).

4. Conclusão

Para a Linearidade o método apresentou-se com homogeneidade e resíduos homocedásticos, apesar dos incrementos de alguns pontos necessitarem de aproximação conforme teste de Cochran. Os limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) foram de 0,0060 e 0,0118. A precisão (Repetibilidade e Reprodutibilidade) foram avaliados conforme os valores de HORRAT que se apresentaram inferiores a 2, atestando a precisão do método para esse parâmetro.

O teste de exatidão foi realizado conforme teste de Recuperação que se

apresentou dentro da faixa de aceitação. No teste de Robustez o método não se apresentou robusto com valores superiores aos valores do desvio padrão da Reprodutibilidade $S_{rob} > S_{repro}$. A mudança foi realizada no tempo e fabricante de reagentes do qual o método se mostrou sensível a estas alterações.

O método foi testado com a aplicação de uma amostra real de um igarapé da cidade de Manaus-AM. Os valores para os pontos amostrais foram enquadrados dentro da faixa de trabalho, mas valores de concentração superiores ($>1,0 \text{ m g l}^{-1}$) poderiam ter aceitação na faixa de trabalho com a diluição das amostras e posterior cálculo da concentração pelo fator de diluição.

O teste foi realizado em relação ao igarapé do Mindu, obedecendo a suas características e propriedades físicas e químicas encontradas. Em relação a resolução CONAMA 357/2005, quatro pontos amostrais coletados apresentaram críticos em relação a legislação e apenas um ponto (P1 – Saída Nascentes) possui concentração de fosfatos a legislação vigente para águas de classe II para corpos receptores lóticos, objeto de estudo deste trabalho, o que pode ainda carecer de informações precisas sobre os principais contribuintes e diluentes de fosfatos nas águas.



Sob o ponto de vista de aplicabilidade, o teste foi validado a partir de uma metodologia consagrada como Standard Methods (SM-4500-P) pelo método do ácido ascórbico (E), com limites analíticas mantidas dentro dos limites pré-estabelecidos (DOQ-CGCRE-008 IN-METRO) e estudos estatísticos dentro da faixa de aceitação conforme resultados obtidos nos testes de linearidade, repetibilidade, reprodutibilidade e exatidão, testados nas condições de trabalho do laboratório (reagentes, temperatura, amostras, equipamentos, operadores), com resultados satisfatórios na validação o método apresentou-se apropriado para a finalidade pretendida, a de realização de análises de fosfatos na rotina do laboratório em águas naturais.

Agradecimentos

Os autores agradecem a A Universidade Federal do Amazonas (UFAM) pelo incentivo a pesquisa. Ao CNPq e a FAPEAM pelo auxílio da bolsa.

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências

AGUIAR, J.L.N.; LEANDRO, K.C.; ABRANTES, S.M.P.; ALBERT, A.L.M. Validação intralaboratorial de um novo método analítico por cromatografia líquida em fase reversa do ácido acetilsalicílico e do ácido salicílico em comprimidos. *Revista Analytica*, nº6, p.66-72, 2013.
ALBANO, F.M.; RODRIGUES, T.R. Validação e Garantia da Qualidade de Ensaios Laboratoriais. Porto Alegre: Rede Metrológica RS, 130p, 2015.
ARCOS, A.N.; AMARAL, A.C.L.; SANTOS, M.A.; SILVA, C.M.A.; KOCHHANN, D.; TADEU, W.P. Water Quality of Urban Lakes in the Central-Southern

Region of Manaus, Amazon. *Revista Scientia Amazonia*, v.7, nº2, p.1-11, 2018.

BARRETO, L. V.; BARROS, F. M.; BONOMO, P.; ROCHA, F. A.; AMORIM, J. S. Eutrofização em rios brasileiros. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia*, v.9, n.16, p.2167, 2013.

BOMFIM, M.V.J.; ABRANTES, S.M.P.; ZAMITH, H.P.S. Validação de método analítico para determinar a migração de ϵ -caprolactama das embalagens para alimentos gordurosos. *Revista Química Nova*, nº33, p.1114-1118, 2010.

BRASIL. Resolução CONAMA n.º 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. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, Seção 1*, p. 58-63. 2005.

BRITO, N.M.; JUNIOR, O.P.A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. *Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente, Curitiba-PR*, v. 13, 2003.

CARDOSO, M.H.W.M.; GOUVÊA, A.V.; NÓBREGA, A.W.; ABRANTES, S.M.P. Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: uma experiência laboratorial. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, nº30, p.63-72, 2010.

CHAVES, M. J. S.; VERBINNEN, R. T.; DINIZ, M. S.; VIANA, J. L. M.; MENDONÇA, C. J. S.; FRANCO, T. C. R. S. Eficiência e Robustez na Determinação do Herbicida 2,4-D em Águas Superficiais. *Revista Virtual de Química*, nº10, p.1474-1484, 2018.

COCHRAN, W. G. The distribution of quadratic forms in a normal system, with applications in the analysis of covariance *Cambridge Philosophical Society, Cambridge*, v. 30, n. 2, p. 179-191, 1934.

COLZANI, H.; RODRIGUES, Q.E.A.G.; FOGAÇA, C.; GELINSKIB, J.M.L.N.; FILHO, E.R.P.; BORGES, E.M. Determinação de fosfato em refrigerantes utilizando um scanner de mesa e análise automatizada de dados: um exemplo didático para ensino de química. *Revista Quim. Nova*, Vol. 40, nº 7, 833-839, 2017.

COSTA, C.L.; BRAZ, C.E.M.; KAMOGAWA, M.Y.; ALBERTO C. DE CAMPOS BERNARDI, A.C.C.; SOUZA, G.B.; NOGUEIRA, A.R.A. Determinação de nitrato e amônio por sistema de análise em fluxo em amos-



tras de lixiviado de solo. Circular Técnica EM-BRAPA, nº80, 2018.

EDWARDS, A.A.; ALEXANDER, B.D. UV-Visible Absorption Spectroscopy, Organic Applications. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry, nº3, p.511-519, 2017.

ESTEVEZ, F. A. Fundamentos de Limnologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 826 p, 2011.

FERREIRA, A.L.S. Comparação de diferentes técnicas para detecção e tratamento de outliers na determinação de fatores de medidores. Rio de Janeiro, Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Metrologia, 89p, 2017.

GRUBBS, F.E. Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. Technometrics 11: 1-21, 1969.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA-INMETRO. DOQ-CGCRE-008 – Orientação sobre validação de métodos analíticos. 5ª revisão, 2018.

JUNIOR, E.J.A.G; ROEDER, J.S; OLIVEIRA, K.B.L; FERREIRA, M.P; SILVA, J.G. Validação de Método Analítico para a Quantificação de Paracetamol em Solução Oral por Espectrofotometria no UV. Revista Virtual de Química, nº4, p.1747-1759, 2017.

LEITE, F. Validação em Análise Química. 5. ed., Campinas, São Paulo: Átomo, p. 20-45, 2008.

LESSA, R.S.F; BUARQUE, H.L.B; NORBERTO, J.N; MOTA, P.A.L; STEFANUTTI, R. Validação de método para determinação de corantes em efluentes. Revista DAE, nº66, p.67-77, 2018.

MAROTO, A.; RIU, J.; BOQUÉ, R.; RIUS, F. X. Estimating uncertainties of analytical results using informations from the validation process. Anal. Chim. Acta., v. 391, p. 173-185, 1999.

MONBET, P; I.D. MCKELVIE; WORSFOLD. Dissolved organic phosphorus speciation in the waters of the Tamar estuary (SW England), Geochim. Cosmochim. Acta 73, 1027-1038, 2009.

NIJHUIS, A.; KNAAP, H. C. M. Van der; JONG, S. de; VANDEGINSTE, B. G. M. Strategy for ruggedness tests in chromatographic method validation. Anal. Chim. Acta, v. 391, p. 187-202, 1999.

OLIVEIRA, B.O.S; TUCCI, C.A.F; NEVES, A.F.J; SANTOS, A.F. Avaliação dos solos e das águas nas áreas de influência de disposição de resíduos sólidos urbanos de Humaitá, Amazonas. Revista Engenharia Sanitária e Ambiental, v.21, nº3, p.593-601, 2016.

PAULA, D.T; FILHO, M.M.V; FARIAS, V.L.S; SIQUEIRA, D.S. CLAY AND PHOSPHORUS LOSSES BY EROSION IN OXISOL WITH SUGARCANE RESIDUES. Engenharia Agrícola, 36(6), p.1063-1072, 2016.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. Química Nova, v. 31, n.1, p.164-171, 2008.

RODRIGUES, S.C.A. Modelo de Regressão Linear e suas Aplicações. Beira Interior-Portugal, Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-graduação em Ensino de Matemática, 94p, 2012.

SANTOS, I.N; HORBE, A.M.C; SILVA, M.S.R; MIRANDA, S.A.F. Influência de um aterro sanitário e de efluentes domésticos nas águas superficiais do rio Tarumã e afluentes – AM. Revista Acta Amazônica, v.36, nº2, p.229-235, 2006.

SANTOS, L.S; SILVA, L.S; GRIEBELER, G. Ácido ascórbico como agente redutor para determinação de fósforo por colorimetria. Revista Ciência Rural, Santa Maria-RS, v.44, n.6, p.1015-1018, 2014.

SANUDO, W. A phosphate alternative, Nature, nº 439, pp. 25-26, 2006.

SERRÃO, V.R; CHAVES, E.V. Monitoramento de Fosfato em águas contaminadas do Igarapé do Educandos. Revista Igapó, v.13, nº1, p.62-68, 2019.

SOARES, R.; ESCALEIRA, V.; CAMPOS, D.V.B.; MONTEIRO, M.I.C.; CARNEIRO, M.C.; SANTELLI, R.E. & BERNARDI, A.C.C. Comparação de métodos convencional e alternativo para determinação de sódio, potássio e fósforo em extratos de solos obtidos com solução de Mehlich-1. R. Bras. Ci. Solo, 36:105-112, 2012.

SOUZA FILHO, E.A. Caracterização Físico-química das Águas do Igarapé do Mindu nos bairros Jorge Teixeira, Conjunto Petros e Parque Dez em Manaus-Amazonas. Revista Geofronter, v.6, p.01-20, 2020.

SOUZA FILHO, E.A. Diagnóstico da qualidade das águas do Igarapé do Mindu e criação de protótipo de aplicativo para disponibilização de dados em Manaus-AM. Dissertação (Mestrado em Gestão e Regulação de Recursos Hídricos) - UEA, 2018.

SOUZA FILHO, E.A; ALVES, S.B.S.M; NEVES, R.K.R.N; BATISTA, I.H; ALBUQUERQUE, C.C; DAMASCENO, S.B; NASCIMENTO, D.A. Estudo com-



parativo de aspectos físico-químicos entre águas da microbacia do Mindu e igarapés sob influência antrópica na cidade de Manaus-AM. *Revista Brazilian Journal of Development*, nº6, p.2419-2433, 2020.

SOUZA FILHO, E.A; BATISTA, I.H; ALBUQUERQUE, C.C. Levantamento de aspectos físico-químicos das águas da microbacia do Mindu em Manaus-Amazonas. *Revista Geográfica de América Central*, 63 (2), p.341-367, 2019.

SOUZA, G.B; SOBRINHO, M.R; BOZA, Y. Validação de métodos para análise de alimentos: enfoque em análise centesimal. 1. ed. – São Paulo : REMESP, 123 p, 2016.

STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. American Public Health Association, American Water Works Association, Water, 20 th Edition, método 4500-P, 1998.

STRICKLAND, J.D.H.; PARSONS, T.R. A manual of sea water analysis. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada, Bulletin nº 125, 2 ed. p.203, 1965.

TUKEY, J. W. The future of data analysis. *Annals of Mathematical Statistics*, Baltimore, MD, v. 33, p. 1-67, 1962.

VAN DER HEYDEN, Y.; JIMIDAR, M.; HUND, E.; NIEMEIJER, N.; PEETERS, R.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D. 9). Determination of system suitability limits with a robustness test. *J. Chromatogr. A* 845(1-2), pp. 145-154, 1999.

VOLLENWEIDER, R., RAST, W., KEREKES, J. Phosphorus loading concept and Great Lakes eutrophication. *Annual Cornell University Conference*, vol. 11, pp. 207–234, 1980.

WORSFOLD, I; MCKELVIE; MONBET, P Determination of phosphorus in natural waters: a historical review *Anal. Chim. Acta*, nº 918, pp. 8-20, 2016.