

# Determinação de fluoreto em baixas concentrações: validação de método com eletrodo íon seletivo para análise da água utilizada na preparação de soluções de diálise

## Determination of fluoride at low concentrations: validation of method using ion selective electrode to analyze the water used in the preparation of dialysis solutions

RIALA6/1669

Sérgio DOVIDAUSKAS<sup>1\*</sup>, Isaura Akemi OKADA<sup>1</sup>, Marina Miyuki OKADA<sup>1</sup>, Rita de Cássia BRIGANTI<sup>1</sup>, Camila Cardoso de OLIVEIRA<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro de Laboratório Regional de Ribeirão Preto, Instituto Adolfo Lutz. Rua Minas nº 877, Ribeirão Preto, SP, Brasil, CEP: 14085-410. Tel: 16 3625-5046. E-mail: sergio2794@terra.com.br

<sup>2</sup>Núcleo de Análise e Tratamento de Dados, Centro de Materiais de Referência, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP

Recebido: 16.11.2014 - Aceito para publicação: 28.08.2015

### RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinar a concentração de fluoreto em água empregada para a preparação de soluções de diálise, por meio de potenciometria com eletrodo íon seletivo. Os parâmetros de validação investigados foram: seletividade, homoscedasticidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, veracidade de medição e precisão. As condições otimizadas de análise foram: tampão HOAc/-OAc/NaCl/CDTA (pH = 5,0 ± 0,1), na proporção 10:1 (amostra/tampão); concentrações das soluções-padrão da curva analítica: 0,05 a 0,80 mg/L. O método avaliado exibiu parâmetros de validação adequados com limites de detecção e de quantificação, respectivamente, de 0,020 e 0,050 mg/L. Ademais, foi também desenvolvida e validada uma planilha eletrônica para efetuar o monitoramento da qualidade da curva analítica do método que calcula o limite de decisão para 0,20 mg/L.

**Palavras-chave.** fluoreto, água, diálise, potenciometria, eletrodo íon seletivo, validação de método.

### ABSTRACT

This paper describes the development and validation of an analytical methodology for determining the concentration of fluoride in water used for the preparation of dialysis solutions, by means of potentiometry with ion selective electrode. The investigated validation parameters were: selectivity, homoscedasticity, linearity, limit of detection, limit of quantification, reliability of measurement and precision. The optimized conditions of analysis were: HOAc/-OAc/NaCl/CDTA buffer (pH = 5.0 ± 0.1), in ratio of 10:1 (sample/buffer); concentrations of the standard solutions in the analytical curve: 0.05-0.80 mg/L. The evaluated method exhibited suitable validation parameters with detection and quantification limits equal to 0.020 and 0.050 mg/L, respectively. Also, an electronic spreadsheet was developed and validated for monitoring the quality of analytical curve of the methodology that calculates the decision limit to 0.20 mg/L.

**Keywords.** fluoride, water, dialysis, potentiometry, ion selective electrode, method validation.

## INTRODUÇÃO

Em termos de Saúde Pública, é comum inicialmente associar o flúor (ou fluoreto, seu respectivo ânion) à sua ação benéfica no controle da progressão da cárie dentária, principalmente através do seu uso sistêmico em águas destinadas ao consumo humano (fluoretação) e do seu uso tópico em dentifrícios<sup>1</sup>. Em um segundo momento, passa-se a considerar a ocorrência da fluorose dentária e, em casos mais graves, da fluorose óssea, ambos em virtude da ingestão excessiva de fluoreto. Esta ingestão excessiva pode ocorrer pela exposição ao ar (como em certas províncias da China, nas quais o cozimento e a cura de alimentos são feitas através da queima de carvão rico em fluoretos), pelo consumo de alguns alimentos (como as folhas de chá comprimidas em blocos, o popular “bricktea” na Ásia), ou mesmo pela água (como no Quênia, onde a concentração de fluoreto em alguns lagos pode ser extremamente alta, chegando a atingir 2800 mg/L). Até o presente, não há nenhuma evidência consistente correlacionando o consumo de água fluoretada com morbidade ou mortalidade devido à ocorrência de câncer<sup>2</sup>.

Desta forma, além de se encontrar na literatura estudos lidando com a presença de fluoreto em águas<sup>3,4</sup>, também encontram-se trabalhos envolvendo a presença de fluoreto em alimentos<sup>5,6</sup> e fluoreto como contaminante no meio-ambiente, oriundo das indústrias de fertilizantes, cerâmicas, vidrarias e adesivos, além da indústria metalúrgica (aço, cobre e níquel)<sup>7</sup>. No papel de contaminante, é preciso considerar que, além dos impactos sobre a água e os alimentos, o fluoreto pode atuar dramaticamente no ecossistema, interferindo no ciclo de nutrientes ambientais através de reações com carbono orgânico, alumínio e ferro, por exemplo<sup>8</sup>. Com relação à fluorose, Fewtrell et al<sup>9</sup> procuraram inclusive estimar a Carga Global de Doença (a *Global Burden of Disease*, da Organização Mundial da Saúde) em virtude do fluoreto naturalmente presente em águas destinadas ao consumo humano em várias regiões do planeta.

Assim, torna-se evidente que a eficácia da

ação benéfica do flúor com relação à saúde bucal fica condicionada a uma quantidade ótima de ingestão: acima desta quantidade existe o risco de fluorose, abaixo ocorreria perda da eficácia na redução da cárie dentária – no Estado de São Paulo, por exemplo, 0,7 mg/L é considerada a concentração ideal em águas destinadas ao consumo humano, sendo consideradas dentro do padrão de potabilidade as que apresentarem concentração na faixa 0,6 a 0,8 mg/L<sup>10</sup>. Em termos ambientais, no entanto, o fluoreto é avaliado somente com relação aos seus efeitos toxicológicos.

A este quadro geral da relação entre fluoreto e Saúde Pública, pode-se ainda adicionar um outro aspecto que, embora específico, também é muito importante: a sua indesejável presença em águas destinadas ao preparo de soluções de diálise. No Brasil, por exemplo, a legislação em vigor estabelece um valor máximo permitido (VMP) igual a 0,2 mg/L para águas de Serviços de Diálise<sup>11</sup>. Este VMP relativamente baixo é justificado pela exposição acentuada a que estão sujeitos os pacientes com insuficiência renal crônica, quando são submetidos à hemodiálise (HD) – nesta situação, o volume de água em contato com o paciente pode variar entre 375 e 700 litros por semana<sup>12</sup>. Uma comparação entre dois casos de intoxicação descritos na literatura, um relacionado ao consumo comum de água (como bebida) e outro relacionado ao uso em HD, ressalta a importância do baixo VMP para Serviços de Diálise: (i) em 1980, uma intoxicação severa por fluoreto ocorreu numa feira agrícola realizada em uma escola no Estado de Vermont (EUA), provocada pela ingestão de água com teor de fluoreto em torno de 1000 mg/L – este elevado teor, provocado pela operação inadequada de um equipamento rudimentar de fluoretação, afetou 22 pessoas, causando náuseas e, em casos mais graves, vômitos<sup>13</sup>; (ii) em 1993 (Illinois, EUA), um teor de aproximadamente 20 mg/L na água para a preparação da solução de diálise induziu em vários pacientes sintomas como prurido, náusea, dores de cabeça, dores no peito e nas costas, ocorrendo ainda 3 mortes por ataque cardíaco – neste caso, a contaminação da

água foi devido à falhas na manutenção do sistema de purificação<sup>14</sup>. Outro caso notório em HD é o ocorrido em 1980 em Maryland (EUA): um excesso de flúor na água causou sérias complicações em 8 pacientes, resultando em um óbito<sup>12</sup>. Obviamente que a preocupação com a qualidade da água para diálise não se restringe somente ao controle da presença de fluoreto, mas também a uma variedade de contaminantes químicos e bacteriológicos que podem ser transferidos aos pacientes seja durante as sessões de HD<sup>12-15</sup>, seja no transcurso da diálise peritoneal – o “Programa de Monitoramento da Água Tratada para Hemodiálise do Estado de São Paulo” reflete esta preocupação<sup>16,17</sup>.

Do exposto até aqui, pode-se inicialmente prever duas abordagens na determinação da concentração de fluoreto em amostras de águas: uma voltada para concentrações mais altas, como aquelas esperadas em águas de abastecimento público no Estado de São Paulo, e outra voltada para concentrações mais baixas, como aquelas esperadas em águas para preparação de soluções de diálise.

Entre os métodos disponíveis para a determinação de fluoreto em concentrações mais altas, o método colorimétrico (denominado SPADNS devido ao uso do ácido 4,5-di-hidróxi-3-parasulfofenilazo-2,7-naftaleno-di-sulfônico), e o método potenciométrico com eletrodo íon seletivo (método ISE) são os mais utilizados<sup>18,19</sup>. Algumas características deste segundo método, quando comparadas ao primeiro, tornaram a sua aplicação bastante geral, seja em amostras de águas, de alimentos ou em estudos ambientais: (i) a simples adição de uma solução-tampão adequada (o tampão TISAB, acrônimo de *Total Ionic Strength Adjustment Buffer*) a uma alíquota da amostra, torna o método ISE livre da maioria dos interferentes, ponto crítico no método SPADNS; (ii) amostras coloridas ou turvas devem ser destiladas antes de serem analisadas por SPADNS – esta operação é desnecessária no método ISE; (iii) O método SPADNS, para ser aplicado, exige a ausência de cloro residual livre (CRL) na amostra de água, o que não é necessário no método ISE. Este fato é muito importante se considerarmos que a água para consumo humano

deve conter, no mínimo, 0,2 mg/L de CRL em toda extensão do sistema de distribuição (reservatório e rede), de acordo com a Portaria 2914 do Ministério da Saúde<sup>20</sup>; em adição, se a água tratada utilizada na preparação de solução para diálise originar-se de fonte alternativa, a concentração de CRL deverá ser maior que 0,5 mg/L, conforme especifica a Resolução RDC 11, de 13/03/2014<sup>11</sup>. Para eliminar a interferência do CRL, o método SPADNS utiliza o tóxico arsenito de sódio.

A princípio, esta comparação poderia sugerir que a escolha natural entre os dois métodos para analisar água a ser usada em diálise deveria ser pelo método ISE. Porém, há que se considerar a capacidade de cada método em determinar fluoreto em baixas concentrações. Por exemplo: o *Standards Methods for Examination of Water and Wastewater* informa que uma curva linear de calibração no método SPADNS pode ser construída no intervalo entre 0 (zero) e 1,4 mg/L, enquanto curvas lineares de calibração no método ISE podem ser construídas somente a partir de 0,1 mg/L<sup>19</sup>. Este comportamento não linear (ou “não nernstiano”) do eletrodo íon seletivo para fluoreto a baixas concentrações já tinha sido constatado em 1966, quando Frant e Ross publicaram o primeiro artigo descrevendo a sua construção, funcionamento e aplicação<sup>21</sup>. Esta perda de linearidade tem sido atribuída à contaminação dos reagentes das soluções-tampão utilizadas e à variação na solubilidade (baixa) do cristal de LaF<sub>3</sub> dopado com Eu<sup>3+</sup> (a membrana sólida que constitui o sensor do eletrodo íon seletivo): o citrato, por exemplo, poderia complexar com a membrana cristalina, aumentando a solubilidade do LaF<sub>3</sub>; o acetato, por sua vez, não somente complexaria como também poderia participar de uma reação de troca iônica não reversível com a membrana, o que resultaria na associação definitiva acetato-membrana, caracterizando um envenenamento gradual e progressivo do eletrodo, comprometendo sua veracidade de medição e precisão<sup>22,23</sup>.

No intuito de se melhorar as características da membrana e a performance do método ISE para determinação de fluoreto, o que inclui

estender a faixa de linearidade da curva de calibração a concentrações mais baixas, muitos estudos podem ser encontrados na literatura, dentre os quais pode-se citar algumas abordagens: (i) em 1971, Baumann<sup>24</sup> mostrou que a presença de agentes complexantes de F<sup>-</sup> (como Zr<sup>4+</sup>, Th<sup>4+</sup> e La<sup>3+</sup>) poderia estender a resposta nernstiana até 10<sup>-9</sup> mol/L (aproximadamente 0,02 µg/L); contudo, esta capacidade do eletrodo em reconhecer fluoreto em baixíssimas concentrações não foi utilizada na determinação de fluoreto em amostras; (ii) a importância da solução-tampão na determinação de fluoreto é reconhecida desde a década de 1970: em 1977, Kauranen<sup>25</sup> estudou a influência da composição em 17 tampões e, em 1981, Nicholson e Duff<sup>22</sup> fizeram estudo semelhante, envolvendo outros 11 tampões; posteriormente, foram investigadas composições soluções-tampão específicas para a análise de fluoreto em baixas concentrações<sup>23,26</sup>, incluindo a análise em águas para diálise<sup>27</sup>; (iii) em 2011, pesquisadores da área de Odontologia, preocupados com a padronização de métodos para a análise de fluoreto em amostras biológicas e não-biológicas, publicaram um artigo sugerindo protocolos padronizados para minimizar as diferenças observadas em um estudo interlaboratorial<sup>28</sup>, recomendando que acima de 0,0105 µmol/g (aproximadamente 0,2 mg/g de amostra) a regressão linear da curva de calibração fosse utilizada, enquanto que abaixo deste valor a correção de branco ou a regressão polinomial seriam os procedimentos mais adequados.

Neste contexto, este artigo descreve o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a determinação da concentração de fluoreto em água usada para a preparação de soluções de diálise, através do estudo do comportamento eletroquímico deste ânion em soluções aquosas (baixas concentrações), por potenciometria com eletrodo íon seletivo utilizando calibração externa de modo a produzir a melhor precisão no valor do VMP (0,2 mg/L). Em adição, é brevemente descrita uma planilha eletrônica construída em software *Excel 2010*<sup>®</sup> para o controle da qualidade da curva analítica do método.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Materiais e reagentes

A água usada nas preparações foi previamente destilada e desionizada. Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico (marcas Merck<sup>®</sup>, Synth<sup>®</sup> e Vetec<sup>®</sup>). Solução-padrão de fluoreto foi preparada em água destilada e desionizada a partir de NaF anidro, marca Merck<sup>®</sup> com pureza 99 % (mínimo), previamente seco em estufa a 105 °C por 2 horas. Para o estudo da interferência de íons hidroxila, três soluções tampão de acetato (TISAB II) de pHs diferentes foram preparadas segundo o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*<sup>19</sup>, com o pH final sendo ajustado para os valores 4,50, 5,00 e 5,50, e três soluções tampão de citrato (TISAB III) de pHs diferentes foram preparadas segundo normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz<sup>18</sup>, com o pH final sendo ajustado para os valores 5,00, 5,50 e 6,00. Para o estudo da interferência dos íons Al<sup>3+</sup> e Fe<sup>3+</sup>, foram utilizadas soluções padrão 1002 ± 5 mg/L (Inorganic Ventures) de cada um dos íons e, para efeito de comparação, uma solução tampão semelhante ao TISAB II foi preparada, mas sem a presença do ácido 1,2-ciclohexileno-dinitrilo-tetracético (CDTA), sendo designada como TISAB II SEM CDTA. Na avaliação da veracidade da medição e da precisão, foram usados dois materiais de referência certificados (MRC) da Environment Canada: (i) ONTARIO-99, lote 1109, amostra de água de lago, valor declarado igual a 0,63 mg/L com limite para medida individual (2σ) igual a 0,09 mg/L; e (ii) MISSISSIPPI-03, lote 1010, amostra de água de rio, valor declarado igual a 0,15 mg/L e 2σ igual a 0,04 mg/L.

### Procedimentos

Nas medidas de potencial utilizou-se um eletrodo íon-seletivo, marca Digimed<sup>®</sup> modelo DMI-FL2, acoplado a um potenciômetro marca Orion modelo 370. Em uma análise típica: a 50 mL da solução-teste (padrão ou amostra) são adicionados 5 mL de solução tampão (proporção 10:1); o eletrodo íon seletivo é inserido na solução mantida sob agitação, seguindo-se

a medida do potencial após a sua estabilização. A análise estatística dos dados foi realizada nos softwares *Excel 2010*<sup>®</sup> e *OriginPro 9.0*<sup>®</sup>.

### Validação do método

A validação foi conduzida seguindo documento orientativo da Coordenação Geral de Acreditação do Instituto Nacional Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO)<sup>29</sup>, normas ISO<sup>30-32</sup> e recomendações da *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*<sup>33</sup>. Os parâmetros de validação investigados foram: seletividade, homoscedasticidade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), veracidade de medição e precisão.

### Planilha eletrônica para controle da qualidade da curva analítica

A planilha foi construída em software *Microsoft Excel 2010*<sup>®</sup>, conforme descrito anteriormente<sup>34,35</sup>, com equações baseadas nas normas ISO 11095<sup>31</sup>, ISO 11843-2<sup>32</sup> e ISO 8466-1<sup>30</sup>, e em recomendações IUPAC<sup>36</sup>. Os cálculos efetuados pela planilha foram validados através da comparação dos resultados gerados com aqueles resultantes do processamento manual dos dados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Seletividade: efeito da solução tampão e do pH

Em concentrações mais altas de fluoreto, o desempenho do eletrodo íon seletivo geralmente não depende do pH na faixa entre 4 e 9, mas em concentrações mais baixas Moritz e Müller<sup>37</sup> mostraram que o LD pode ser fortemente influenciado quando o pH é variado de 4 a 8. Assim, tendo como objetivo a determinação da faixa linear para a construção da curva analítica, experimentos foram realizados de modo a avaliar o impacto de variações de pH nos potenciais do eletrodo em soluções de diferentes concentrações de fluoreto. Para tanto, usaram-se duas soluções tampão comumente utilizadas na análise de águas.

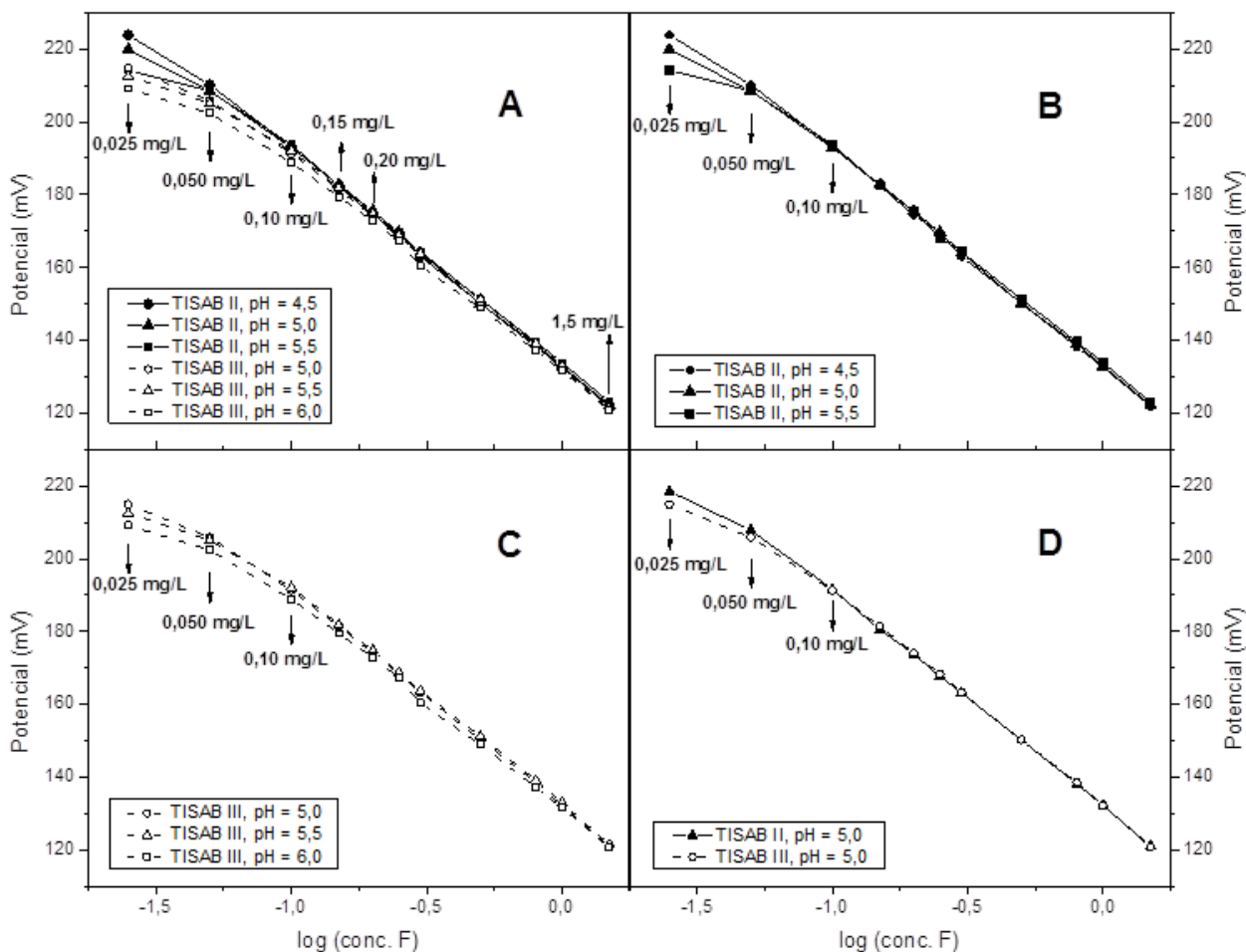
A Figura 1A exibe medidas de potencial obtidas em soluções aquosas de fluoreto no intervalo de concentrações entre 0,05 e 1,5 mg/L, usando-se duas soluções tampão (TISAB II e

TISAB III), cada solução tampão ajustada a três pHs diferentes (cada ponto no gráfico representa a média de ensaios realizados em triplicata). Dois fatos podem ser observados nesta figura: (i) os potenciais obtidos com o uso do tampão TISAB III são sistematicamente menores que os observados para o TISAB II na região de menores concentrações e (ii) o TISAB II mantém o comportamento nernstiano a concentrações menores quando comparado ao TISAB III. Este segundo fato é mais evidente quando se comparam as Figuras 1B e 1C: enquanto a Figura 1B sugere que, no caso do TISAB II, o comportamento nernstiano possa ser estendido até 0,050 mg/L independentemente do pH, a Figura 1C indica que, para o TISAB III, existe uma dependência maior em função do pH: o comportamento nernstiano pode ser assumido acima de 0,10 mg/L em pH = 5,0, e acima de 0,20 mg/L em pH = 6,0. A Figura 1D compara os potenciais obtidos com o uso das duas soluções tampão no mesmo pH (5,0) – neste caso, observa-se que a composição do tampão também influencia a faixa de trabalho: a Figura sugere que esta faixa pode se iniciar em 0,05 mg/L no caso do TISAB II, e em 0,10 mg/L no caso do TISAB III.

Assim, as Figuras 1A-D sugerem que a melhor condição para tamponamento das soluções de fluoreto seria o uso de TISAB II em pH = 4,5. Contudo, deve ser considerado que à medida que o pH é abaixado, o valor se aproxima do pKa do ácido fluorídrico (igual a 3,2), aumentando a fração de fluoreto na forma não dissociada. Desta forma, para a continuidade do trabalho optou-se pelo uso de TISAB II em pH = 5,0 ± 0,1 na proporção 10:1 (amostra: tampão). Este tampão é comumente usado na faixa de pH entre 5,0 e 5,5 na proporção 1:1<sup>19</sup>.

### Seletividade: efeito de íons interferentes (Fe<sup>3+</sup> e Al<sup>3+</sup>)

Além da influência dos íons OH<sup>-</sup> sobre o potencial do eletrodo íon seletivo de fluoreto (mantida sob controle através do tamponamento da solução em pH adequado), os principais interferentes na determinação de fluoreto em amostras de águas são os íons Fe<sup>3+</sup> e Al<sup>3+</sup>. No caso de concentrações mais elevadas, como



**Figura 1.** Influência da solução tampão e do pH nos potenciais do eletrodo íon seletivo de fluoreto em soluções contendo diferentes concentrações de fluoreto

aquelas esperadas nas águas de abastecimento público do Estado de São Paulo, essas interferências já são bem estabelecidas: 200 mg/L de  $\text{Fe}^{3+}$  causam um erro negativo de 0,1 mg/L na concentração de fluoreto igual 1 mg/L, e 3,0 mg/L de  $\text{Al}^{3+}$  causam um erro de mesma magnitude e direção, com o uso do TISAB II na proporção 1:1<sup>19</sup>. Tendo em vista que o VMP para águas de Serviços de Diálise é igual a 0,2 mg/L, e que a proporção do TISAB II foi alterada assim como a faixa de pH foi restringida em relação ao comumente usado, estudou-se a influência dos dois íons (separadamente) sobre o potencial desenvolvido no eletrodo em uma solução tamponada com TISAB II em pH = 5,0 (proporção 10:1) contendo 0,20 mg/L, de modo a estimar

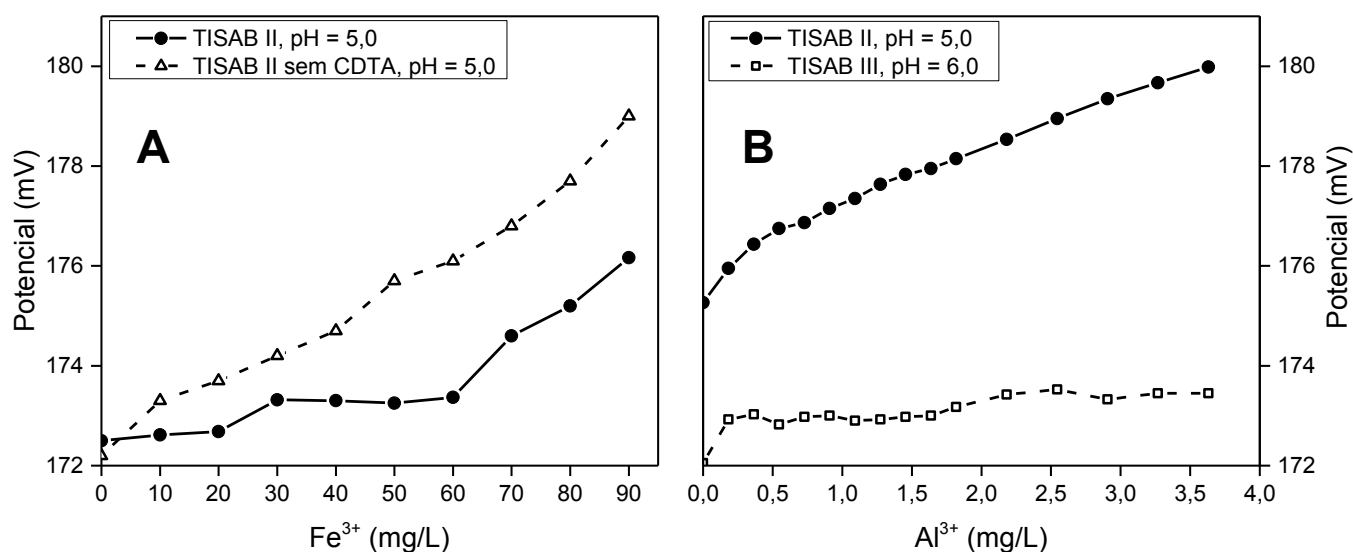
o impacto sobre uma possível tomada de decisão entre conforme e não conforme.

A Figura 2A apresenta a variação dos potenciais do eletrodo em função do aumento da concentração de  $\text{Fe}^{3+}$  em duas soluções contendo 0,20 mg/L. Cada uma dessas soluções foi tamponada com duas soluções diferentes (TISAB II e TISAB II SEM CDTA), ambas no mesmo pH ( $5,0 \pm 0,1$ ) e na mesma proporção (10:1). Pode ser observado que na ausência de CDTA, o potencial aumenta continuamente o seu valor, enquanto que em sua presença o potencial tem um discreto aumento até aproximadamente 60 mg/L de  $\text{Fe}^{3+}$ ; a partir desta concentração, o potencial aumenta a uma taxa similar à obtida com o TISAB II SEM CDTA. De fato, as

concentrações de fluoreto, estimadas através de curvas analíticas construídas no decorrer dos ensaios, diminuíram de  $0,203 \pm 0,014$  mg/L (0 mg/L de  $\text{Fe}^{3+}$ ) para  $0,176 \pm 0,012$  (90 mg/L de  $\text{Fe}^{3+}$ ), com um valor igual a  $0,195 \pm 0,014$  mg/L na presença de 60 mg/L de  $\text{Fe}^{3+}$ . Nas condições em que os ensaios foram realizados, a quantidade calculada de CDTA disponível permitiria a complexação de 56 mg/L de  $\text{Fe}^{3+}$ , o que é consistente com a mudança de taxa de aumento de potencial observada em torno de 60 mg/L. O teste *t* Student ( $\alpha = 0,05$ ) mostrou que as médias das concentrações na ausência de  $\text{Fe}^{3+}$  e na presença de 60 mg/L não apresentavam diferença significativa ( $P = 0,062$ ). Desta forma, conclui-se que o sistema TISAB II em  $\text{pH} = 5,0 \pm 0,1$  (proporção 10:1) é capaz de limitar interferência significativa de até 60 mg/L de  $\text{Fe}^{3+}$ ; a partir desta concentração, pode ser previsto um erro negativo de magnitude continuamente crescente em função do aumento da concentração de  $\text{Fe}^{3+}$ . Registre-se aqui que a Resolução RDC 11 de 13/03/2014<sup>11</sup> não especifica VMP para este íon.

No caso do  $\text{Al}^{3+}$ , a solução TISAB II ( $\text{pH} = 5,0 \pm 0,1$ , proporção 10:1) não é capaz de limitar a sua interferência, como pode ser observado pela curva crescente de potencial

em função do aumento da concentração de  $\text{Al}^{3+}$  (Figura 2B, linha contínua). Para comparação, os ensaios foram repetidos com o uso da solução TISAB III ( $\text{pH} = 6,0$ , proporção 10:1) e os resultados mostraram uma alta tolerância à presença de  $\text{Al}^{3+}$  sem mudança significativa de potencial (Figura 2B, linha tracejada). A partir de curvas analíticas construídas no decorrer dos ensaios, estimou-se que a presença de 1,6 mg/L de  $\text{Al}^{3+}$  causa um erro de -10% na concentração 0,20 mg/L de  $\text{F}^-$ . Este valor (1,6 mg/L) é 160 vezes maior que o VMP estabelecido pela Resolução RDC 11<sup>11</sup>. Da mesma forma, foram estimadas as concentrações de  $\text{F}^-$  antes e após a primeira adição (ausência de  $\text{Al}^{3+}$  e presença de 0,18 mg/L de  $\text{Al}^{3+}$ , respectivamente) – neste caso, o teste *t* Student entre as médias ( $\alpha = 0,05$ ), não indicou diferença significativa ( $P = 0,058$ ). Desta forma, embora o TISAB II ( $\text{pH} = 5,0 \pm 0,1$  proporção 10:1) não tenha se revelado capaz de limitar a interferência do  $\text{Al}^{3+}$ , resolveu-se continuar o desenvolvimento do método com este tampão em vista de seu potencial em produzir curvas de calibração lineares a concentrações mais baixas – a interferência da presença de até 0,18 mg/L de  $\text{Al}^{3+}$  foi considerada não significativa.

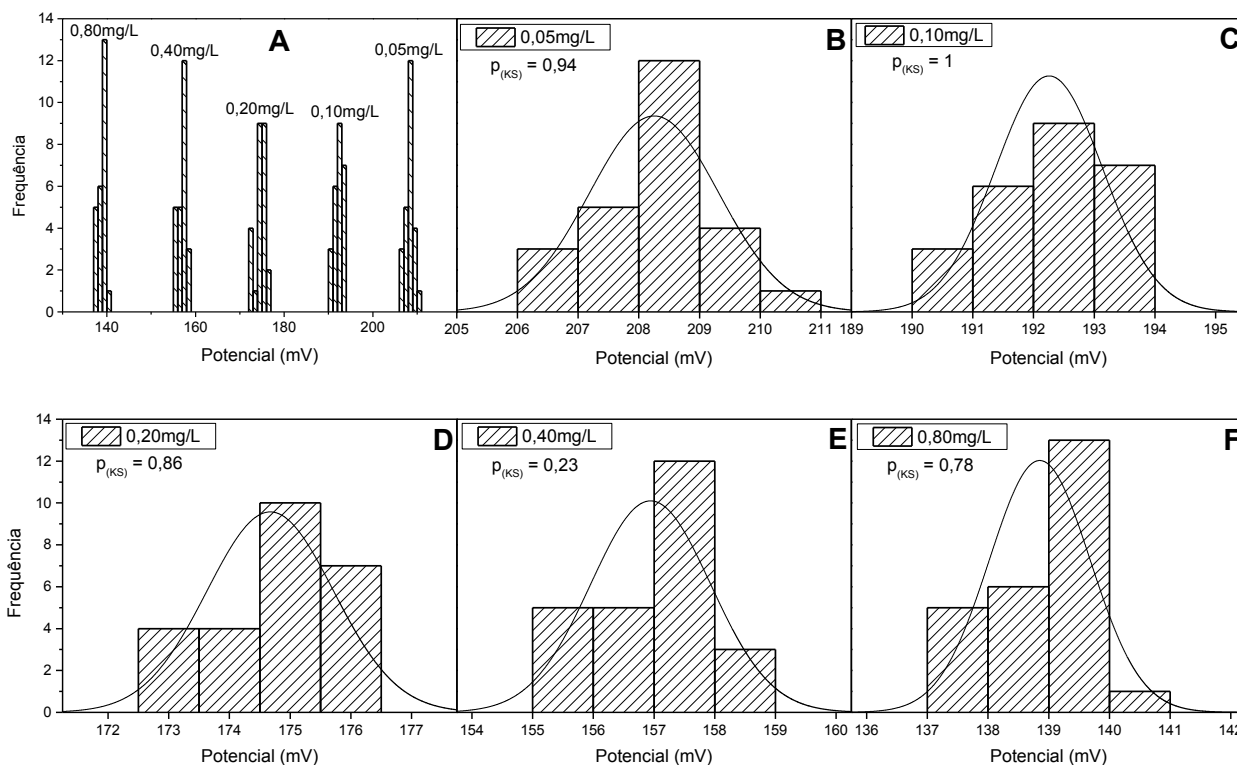


**Figura 2.** Influência da presença de  $\text{Fe}^{3+}$  (A) e  $\text{Al}^{3+}$  (B) no potencial do eletrodo íon seletivo de fluoreto em uma solução contendo 0,20 mg<sup>F</sup>-/L. Cada ponto nos gráficos representa a média de potenciais obtidos de ensaios realizados em triplicata

### Homoscedasticidade dos sinais analíticos das soluções padrão da curva analítica

Considerando que a curva analítica adequada para a determinação de fluoreto em águas para diálise deve promover a melhor precisão na concentração correspondente ao VMP, e que os potenciais são grafados em função do logaritmo da concentração, planejou-se inicialmente uma curva analítica cuja posição central em termos logarítmicos correspondesse a 0,20 mg/L. Assim, as concentrações escolhidas foram 0,05, 0,10, 0,20, 0,40, e 0,80 mg/L. A Figura 3A exibe os histogramas dos potenciais obtidos para 25 soluções de cada uma dessas concentrações, enquanto as Figuras 3B-F apresentam cada um desses histogramas em particular. Nesses histogramas podemos observar que os valores  $p$  calculados pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov são maiores que um nível de significância igual a 0,05 – isso

implica que, nesse nível de significância, os sinais analíticos das 5 soluções padrão podem ser consideradas com distribuição normal. Para testar a homoscedasticidade, realizou-se o teste de homogeneidade das variâncias segundo a ISO 8466-1<sup>30</sup> (nível de significância = 0,01), que consiste em se fazer um teste F entre as variâncias da solução de menor concentração com a de maior concentração (no nosso caso, 0,05 e 0,80 mg/L, respectivamente). O valor de F calculado (denominado de “valor PG” na norma ISO) resultou em 1,65, um valor menor que o de F tabelado (igual a 2,66). Desta forma, considerou-se que as variâncias eram homogêneas, ou seja, que uma regressão linear por mínimos quadrados ordinários (ISO 11095<sup>31</sup> e ISO 8466-1<sup>30</sup>) ou uma regressão polinomial de segunda ordem (ISO 8466-2<sup>38</sup>) poderiam ser empregadas no ajuste de uma função matemática aos dados.



**Figura 3.** Histogramas de 25 sinais analíticos das soluções padrão de fluoreto de concentrações 0,05 a 0,80 mg/L (A). As Figuras B-F são os histogramas individuais do conjunto exibido na Figura A, com respectivas curvas normais ( $p_{(KS)}$  é a probabilidade calculada pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov)



### Linearidade

Para testar a linearidade dos dados da curva analítica, seguiu-se o procedimento indicado na ISO 8466-1<sup>30</sup>. O teste estatístico para linearidade consiste no cálculo do valor da estatística PG pela equação 1:

$$PG = \frac{DS^2}{s_{y2}^2} \quad (1)$$

onde

- $s_{y2}^2$  = variância da função de calibração não-linear
- $DS^2$  = diferença de variâncias, calculada pela equação 2

$$DS^2 = (N - 2)s_{y1}^2 - (N - 3)s_{y2}^2 \quad (2)$$

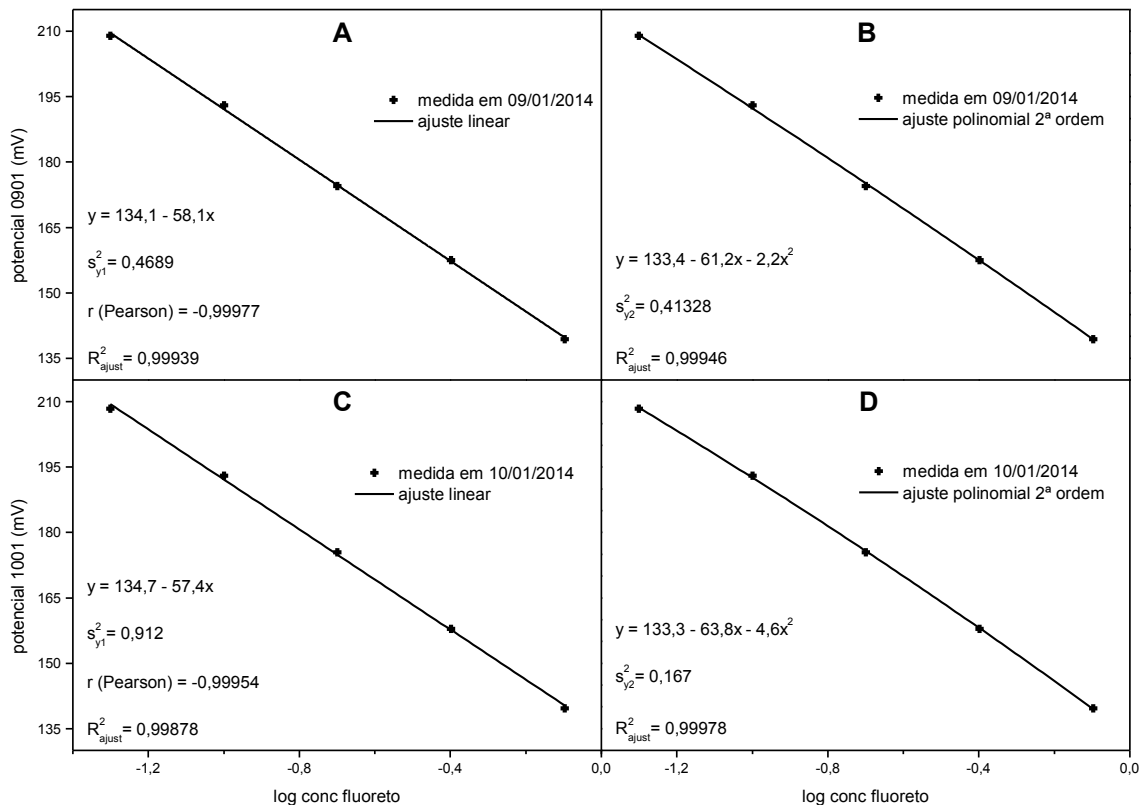
onde

- $N$  = número de soluções-padrão
- $s_{y1}^2$  = variância da função de calibração

linear

O valor calculado de PG é então comparado com o valor de F tabelado, conduzindo a duas decisões possíveis: a) se  $PG \leq F$ : a função de calibração não-linear não promove um ajuste significativamente melhor – a função de calibração é considerada linear; b) se  $PG > F$ : os dados devem ser avaliados usando uma função de calibração não-linear.

As dados obtidos em um experimento de medidas (em duplicata) de potencial de soluções padrão 0,05, 0,10, 0,20, 0,40, e 0,80 mg/L procedeu-se a um ajuste linear e a um ajuste não-linear (polinômio de 2ª ordem). As Figuras 4A e 4B apresentam esses dois ajustes. O valor de PG calculado (1,40) é muito menor que o valor de F tabelado ( $F = 18,51$ ) para um nível de significância  $\alpha = 0,05$ . De fato, este resultado era esperado uma vez que a simples inspeção visual do gráfico potencial *versus* log (concentração) sugeriu a regressão linear como aplicável aos dados, enquanto os coeficientes de correlação ( $r$ , Pearson)



**Figura 4.** Curvas analíticas construídas por meio de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários (A e C) e de regressão polinomial de 2ª ordem (B e D). Os pares de curvas A-B e C-D foram construídas a partir dos dados obtidos em dois experimentos diferentes

e de determinação ajustado ( $R^2_{ajust}$ ) obtidos prenunciaram o resultado do teste da estatística PG, assim como os valores relativamente próximos das variâncias  $s^2_{y1}$  e  $s^2_{y2}$ . Contudo, observou-se que uma pequena variação nos dados experimentais pode ocasionar uma grande variação na estatística PG. Tal fato é ilustrado nas Figuras 4C e 4D, em que os mesmos ajustes (linear e polinomial de 2ª ordem) foram aplicados a dados obtidos posteriormente. Neste caso, tanto a inspeção visual como os valores de  $r$  e  $R^2_{ajust}$  apresentam características similares aos exibidos nas Figuras 4A e 4B, mas as variâncias  $s^2_{y1}$  e  $s^2_{y2}$  apresentam valores bastante diferentes entre si (0,912 e 0,167, respectivamente) o que conduziu a uma  $PG = 14,4$ , um valor ainda menor que o valor crítico de  $F(18,51)$ . Assim, apesar dessa diferença entre as estatísticas PG nos dois experimentos, ambos produziram dados aos quais a regressão linear por mínimos quadrados ordinários pôde ser aplicada para o ajuste matemático da função de calibração. Ressalte-se que em todas as curvas analíticas construídas posteriormente o valor de  $R^2_{ajust}$  para o ajuste de uma função linear foi maior que 0,999.

### Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Como discutido anteriormente, a curva analítica foi considerada linear acima de 0,05 mg/L. Portanto, considerou-se essa concentração como o LQ do método.

No caso do LD, não se pôde calculá-lo como o faz a ISO 11843-2<sup>32</sup>, ou seja, a partir de dados da curva analítica, uma vez que a função matemática ajustada não está definida para valores menores que 0,05 mg/L. Por outro lado, também não se pôde calculá-lo a partir de medidas de soluções isentas de fluoreto (brancos), como sugerido pelo documento orientativo DOQ-CGCRE-008 (INMETRO)<sup>29</sup>, uma vez que o potencial do eletrodo íon seletivo não se estabiliza nessa condição (fluoreto ausente)<sup>37</sup>. A alternativa que se seguiu para o cálculo do LD é baseada em recomendações da IUPAC<sup>39</sup>: o LD corresponde ao ponto de intersecção entre a extrapolação do segmento linear da curva analítica na direção de concentrações mais

baixas e a extrapolação dos pontos de mais baixa concentração do segmento não-linear na direção de concentrações mais altas. Seguindo este procedimento gráfico, o LD foi estimado em 0,020 mg/L.

### Veracidade de medição e precisão

A veracidade de medição e a precisão (condições de repetitividade) foram avaliadas com o uso de dois MRCs:

- para o MRC1, com teor de fluoreto declarado igual a  $0,15 \pm 0,04$  mg/L (limite de  $\pm 2\sigma$ ), a concentração determinada em triplicata com o uso da curva analítica linear na faixa 0,05 – 0,80 mg/L resultou em  $0,16 \pm 0,01$  mg/L (intervalo de 95 % de confiança,  $n = 3$ ), indicando uma recuperação de + 106,7 % e coeficiente de variação igual a 3,1 %. Observe-se que a faixa de valores compreendendo a média das concentrações determinadas, acompanhada do respectivo intervalo de confiança 95 %, está inserida na faixa de valores compreendendo o valor declarado do MRC1 acompanhado do seu limite  $2\sigma$ .
- para o MRC2, com teor de fluoreto declarado igual a  $0,63 \pm 0,09$  mg/L (limite de  $\pm 2\sigma$ ), a concentração determinada em triplicata com o uso da curva analítica linear na faixa 0,05 – 0,80 mg/L resultou em  $0,66 \pm 0,02$  mg/L (intervalo de 95 % de confiança,  $n = 3$ ), indicando uma recuperação de +104,8 % com coeficiente de variação igual a 1,2 %. Observe-se que a faixa de valores compreendendo a média das concentrações determinadas, acompanhada do respectivo intervalo de confiança 95 %, está inserida na faixa de valores compreendendo o valor declarado do MRC2 acompanhado do seu limite  $2\sigma$ .

Tanto a veracidade de medição como a precisão foram consideradas satisfatórias.

### Desenvolvimento de planilha eletrônica para o controle da qualidade da curva analítica

Uma vez definida as características básicas da curva de calibração que conduzem ao LD e LQ indicados, bem como à veracidade de medição e à precisão das concentrações

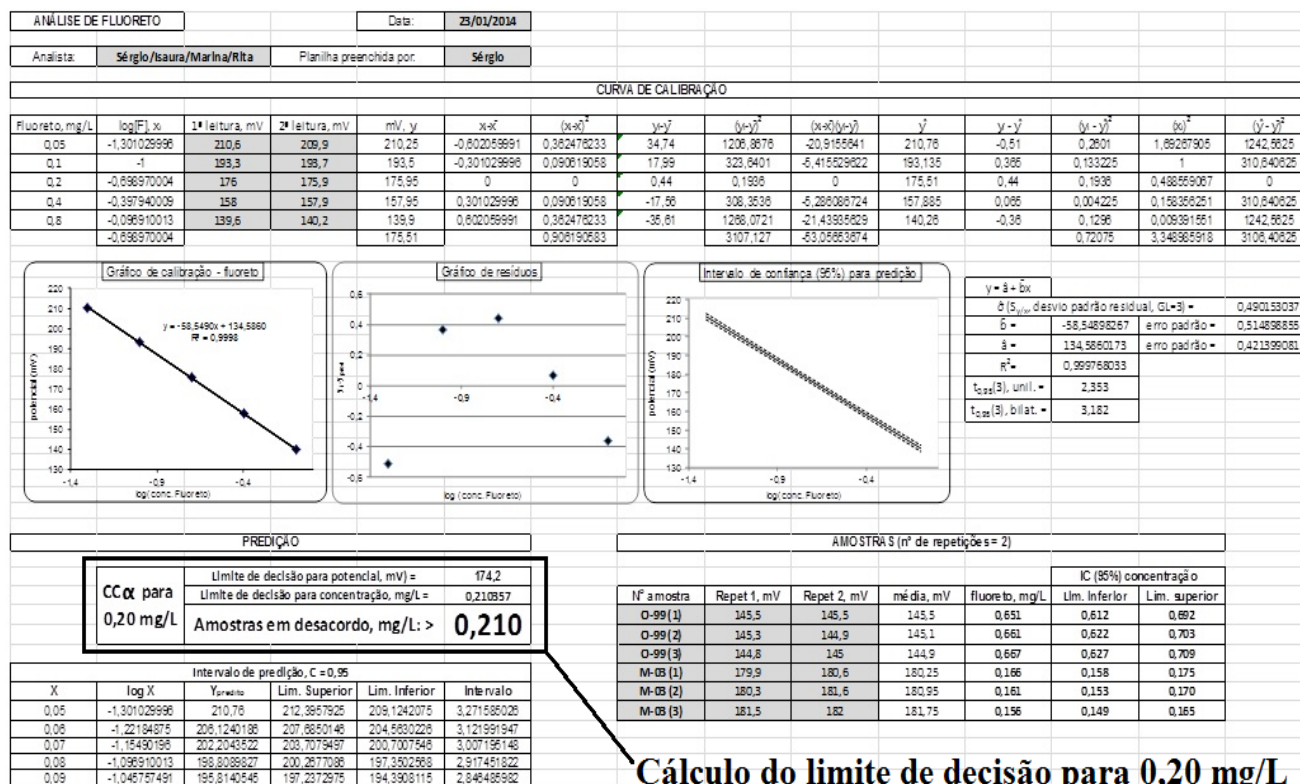
determinadas através do método, desenvolveu-se uma planilha eletrônica capaz de controlar a qualidade da curva analítica ao longo do tempo, ou seja, uma planilha capaz de verificar se aquelas características permanecem válidas após a validação. Esse tipo de planilha já foi descrita em trabalhos anteriores<sup>34, 35</sup>, e aqui descrevemos a principal mudança com relação às planilhas anteriores: o cálculo do limite de decisão (CC $\alpha$ ) para o VMP do fluoreto em águas utilizadas na preparação de soluções de diálise.

A Figura 5 exibe uma visão geral da planilha desenvolvida para o método descrito nesse trabalho. No destaque desta Figura, pode ser observado o cálculo do CC $\alpha$  para 0,20 mg/L baseado nas equações 3 e 4<sup>35</sup>. Os valores de CC $\alpha$  obtidos nas curvas analíticas construídas ( $R^2_{ajust} > 0,999$ ) situaram-se no intervalo entre 0,208 e 0,216 mg/L.

$$y_{c(0,20mg/L)} = \hat{y}_{(0,20mg/L)} - t_{1-\alpha(v)} \cdot \hat{\sigma} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (3)$$

$$CC\alpha'_{(0,20mg/L)} = 10 \frac{y_{c(0,20mg/L)} - \hat{a}}{b} \quad (4)$$

Em adição, pode ser observado na Figura 5 que o gráfico de resíduos sugere uma função polinomial de 2ª ordem para o ajuste mais adequado aos dados. Contudo, no caso do eletrodo íon seletivo de fluoreto, deve ser considerada também a sua perda de eficiência em produzir curvas analíticas lineares a concentrações mais baixas em função do tempo de utilização, como já discutido por Okada et al<sup>40</sup>: os autores sugerem a estatística PG como a mais indicada para o monitoramento dessa perda de eficiência – no momento em que  $PG > F_{tabelado}$ , o eletrodo deverá ser substituído.



**Cálculo do limite de decisão para 0,20 mg/L**

Figura 5. Visualização da planilha desenvolvida para o controle da qualidade da curva analítica da análise de fluoreto em água para diálise. No destaque, as células destinadas ao cálculo do limite de decisão para o VMP (0,20 mg/L)

## CONCLUSÃO

O método aqui descrito exibiu parâmetros de validação adequados à determinação da concentração de fluoreto em águas para a preparação de soluções de diálise na presença de até 60 mg/L de  $Fe^{3+}$  e de até 0,18 mg/L de  $Al^{3+}$ . Desse estudo, pode-se destacar que o uso de uma solução tampão comum (TISAB II) promoveu a obtenção de uma curva analítica linear em torno do VMP através do controle rigoroso do pH e da mudança da proporção amostra: tampão geralmente utilizada (de 1:1 para 10:1). Essas mudanças permitiram o uso da calibração externa com a precisão sendo otimizada na região do VMP, evitando assim a extrapolação, intrinsecamente menos precisa, do método de adição de padrão, como sugerido por Freitas et al<sup>27</sup>.

## AGRADECIMENTOS

Aos Pesquisadores Científicos do Instituto Adolfo Lutz Central, Paulo Tiglea (pelo fornecimento dos padrões de  $Fe^{3+}$  e  $Al^{3+}$ ) e Maria Anita Scorsafava (pelo fornecimento dos Materiais de Referência Certificados).

## REFERÊNCIAS

1. Cury JA. Uso do flúor e controle da cárie como doença. *In*: Baratieri L, editor. *Odontologia Restauradora - Fundamentos e Possibilidades*. São Paulo: Editora Santos; 2001. p. 33-68.
2. Fawell J, Bailey K, Chilton J, Dahi E, Fewtrell L, Magara Y. *Fluoride in Drinking-water*. 1st ed. Organization WWH, editor. London: IWA Publishing; 2006. 134 p.
3. Grec RHC, Moura PG, Pessan JP, Ramires I, Costa B, Buzalaf MAR. Concentração de flúor em águas engarrafadas comercializadas no município de São Paulo. *Rev Saúde Pública*. 2008;42(1):154-7. [DOI: 10.1590/S0034-89102008000100022].
4. Frazão P, Peres MA, Cury JA. Qualidade da água para consumo humano e concentração de fluoreto. *Rev Saúde Pública*. 2011;45(5):964-73. [DOI: 10.1590/S0034-89102011005000046].
5. Singer L, Ophaug RH. Determination of fluoride in foods. *J Agric Food Chem*. 1986;34:510-3. [DOI: 10.1021/jf00069a035].
6. Casarin RCV, Fernandes DRM, Lima-Arsati YBO, Cury JA. Concentração de fluoreto em arroz, feijão e alimentos infantis industrializados. *Rev Saúde Pública*. 2007;41(4):549-56. [DOI: 10.1590/S0034-89102006005000034].
7. World Health Organization - WHO. Preventing disease through healthy environments - Inadequate or excess fluoride: a major public health concern. 2010. [acesso 2014 Nov]. Disponível em: [http://www.who.int/ipcs/features/fluoride.pdf?ua=1].
8. DeMarco R, Clarke G, Pejčić B. Ion-selective electrode potentiometry in environmental analysis. *Electroanalysis*. 2007;19(19-20):1987-2001. [DOI:10.1002/elan.200703916].
9. Fewtrell L, Smith S, Kay D, Bartram J. An attempt to estimate the global burden of disease due to fluoride in drinking water. *J Water Health*. 2006;4(4):533-42.
10. Brasil. Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo. Resolução SS-250, de 15 de agosto de 1995. Define teores de concentração do íon fluoreto nas águas para consumo humano, fornecidas por sistemas públicos de abastecimento. *Diário Oficial do Estado de São Paulo, SP*, 16 ago. 1995. Seção 1 p. 11.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 11, de 13 de março de 2014. Dispõe sobre os requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os Serviços de Diálise e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 14 mar. 2014. Seção 1. p. 40-2.

12. Silva AMM, Martins CTB, Ferraboli R, Jorgetti V, Romão Jr JE. Revisão/Atualização em Diálise: Água para Hemodiálise. *J Bras Nefrol*. 1996;18(2):180-8.[DOI: 10.2166/wh.2006.045].
13. Vogt RL, Witherell L, LaRue D, Klaucke DN. Acute fluoride poisoning associated with an on-site fluoridator in a Vermont Elementary School. *Am J Public Health*. 1982;72(10):1168-9.
14. Arnow PM, Bland LA, Garcia-Houchins S, Fridkin S, Fellner SK. An outbreak of fatal fluoride intoxication in a long-term hemodialysis unit. *Ann Intern Med*. 1994;121(5):339-44. [DOI:10.7326/0003-4819-121-5-199409010-00005].
15. Montanari LB, Sartori FG, Cardoso MJO, Varo SD, Pires RH, Leite CQF, et al. Microbiological contamination of a hemodialysis center water distribution system. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2009;51(1):37-43. [DOI: 10.1590/S0036-46652009000100007].
16. Marcatto MISJ, Grau MAF, Müller NCds. Projeto de reativação e implantação do Programa de Monitoramento da Água Tratada para Hemodiálise do Estado de São Paulo, SP, agosto de 2009. *Bepa*. 2010;7:6-12.
17. Buzzo ML, Bugno A, Almodovar AAB, Kira CS, Carvalho MFH, Souza A, et al. A importância de programas de monitoramento da qualidade da água para diálise na segurança dos pacientes. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(1):1-6.
18. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2005. 1018 p.
19. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation - APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th ed. AD E, LS C, AE G, editors. Washington DC; 1995.
20. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 14 dez. 2011. p.39-46.
21. Frant MS, Ross JW. Electrode for sensing fluoride ion activity in solution. *Science*. 1966;154:1553-5. [DOI: 10.1126/science.154.3756.1553].
22. Nicholson K, Duff EJ. Fluoride determination in water: an optimum buffer system for use with the fluoride-selective electrode. *Anal Letters*. 1981;14(A12):887-912. [DOI: 10.1080/00032718108055488].
23. Fouskaki M, Sotiropoulou S, Koci M, Chaniotakis NA. Morpholinoethanesulfonic acid-based buffer system for improved detection limit and stability of the fluoride ion selective electrode. *Anal Chim Acta*. 2003;478:77-84. [DOI: 10.1016/S0003-2670(02)01481-2].
24. Baumann EW. Sensitivity of the fluoride-selective electrode below the micromolar range. *Anal Chim Acta*. 1971;54:189-97.[DOI: 10.1016/S0003-2670(01)82119-X].
25. Kauranen P. The use of buffers in the determination of fluoride by an ion-selective electrode at low concentrations and in the presence of aluminum. *Anal Letters*. 1977;10(6):451-65. [DOI: 10.1080/00032717708079390].
26. Hara H, Huang C-c. Buffer composition suitable for determining very low fluoride concentrations using a fluoride ion-selective electrode and its application to the continuous analysis of rain water. *Anal Chim Acta*. 1997;338:141-147. [DOI: 10.1016/S0003-2670(96)00432-1].
27. Freitas VPS, Brigido BM, Alge ME, Silva CL, Zenebon O, Antunes JLF. Fluoreto em água: estudo de metodologia analítica e níveis encontrados na região de Campinas. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1996;56(2):29-36.

28. Martínez-Mier EA, Cury JA, Heilman JR, Katz BP, Levy SM, Li Y, et al. Development of gold standard ion-selective electrode-based methods for fluoride analysis. *Caries Res*. 2011;45:3-12. [DOI: 10.1159/000321657].
29. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO. DOC-CGCRE-008: Orientação sobre validação de métodos analíticos - Revisão 04 - JUL/2011: Disponível em [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\_04.pdf]. 19 p.
30. International Organization for Standardization -ISO. ISO 8466-1:1990 Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function.
31. International Organization for Standardization - ISO. ISO 11095:1996 Linear calibration using reference materials.
32. International Organization for Standardization - ISO. ISO 11843-2:1997 Capability of detection. Part 1: Terms and definitions. Part 2: Methodology in the linear calibration case.
33. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem*. 2002;74(5):835-55. [DOI: http://dx.doi.org/10.1351/pac200274050835].
34. Dovidauskas S, Okada IA, Sakuma AM, Duran MC, Oliveira CC. Emprego de planilhas eletrônicas, baseado nas normas ISO e recomendações IUPAC, em curvas analíticas da análise de água. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2013;72(1):13-24.
35. Dovidauskas S, Okada IA, Okada MM, Briganti RC, Oliveira CC. Estimando limite de decisão ( $CC\alpha$ ) e capacidade de detecção ( $CC\beta$ ) a partir de curvas analíticas em análises de águas para substâncias com teores permitidos: uma planilha eletrônica para a interpretação de resultados em Laboratórios de Saúde Pública. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2014;73(2):9-18. [DOI: 10.18241/0073-9855201473160].
36. Danzer K, Currie LA. Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part 1. Fundamentals and single component calibration. *Pure Appl Chem*. 1998;70(4):993-1014. [DOI: http://dx.doi.org/10.1351/pac199870040993].
37. Moritz W, Müller L. Mechanistic study of fluoride ion sensors. *Analyst*. 1991;116:589-93. [DOI: 10.1039/AN9911600589].
38. International Organization for Standardization - ISO. ISO 8466-2:2001 Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 2: Calibration strategy for non-linear second-order calibration functions.
39. Buck RP, Lindner E. Recommendations for nomenclature of ion-selective electrodes. *Pure Appl Chem*. 1994;66(12):2527-36. [DOI:10.1351/pac199466122527].
40. Okada IA, Okada MM, Briganti RdC, Dovidauskas S. Monitoramento do desempenho do eletrodo íon seletivo de fluoreto através de métodos estatísticos. *Bol Inst Adolfo Lutz*. 2014;24(1):23-5.