Revista Eletrônica ACERVO CIENTÍFICO
ISSN 2595-7899

Otimização multivariada e validação de método espectrofotométrico para determinação de Cobalto (II) com 5-Br-PADAP

Multivariate optimization and validation of a spectrophotometric method for the determination of Cobalt (II) using 5-Br-PADAP

Optimización multivariante y validación de un método espectrofotométrico para la determinación de Cobalto (II) con 5-Br-PADAP

Frank Pereira de Andrade[1], Letícia França Rocha[1], Farah Maria Drumond Chequer[1].

RESUMO

Objetivo: Desenvolver, otimizar e validar um método espectrofotométrico para a determinação de Co^{2+} em matrizes aquosas utilizando 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol (5-Br-PADAP) como reagente cromogênico. **Métodos:** A otimização das condições experimentais foi realizada por delineamento composto central 2^2, avaliando os efeitos do pH e da razão molar metal:ligante sobre a formação do complexo. A validação analítica foi conduzida conforme as recomendações dos guias Eurachem e Inmetro, contemplando os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação. **Resultados:** O delineamento experimental permitiu estabelecer como condições ótimas pH 5,36 e razão molar Co^{2+}:5-Br-PADAP de 1:3,4, com máxima absorção em 590 nm. O método apresentou linearidade na faixa de 0,005 a 0,500 µg mL^{-1} (R^2 = 0,9996), coeficientes de variação inferiores a 13%, recuperações entre 88,8% e 115,1% e limites de detecção e quantificação de 0,004 e 0,005 µg mL^{-1}, respectivamente. A aplicação em amostras de águas superficiais demonstrou desempenho analítico satisfatório para a determinação de Co^{2+} em níveis-traço. **Conclusão:** O método desenvolvido apresentou sensibilidade, precisão e exatidão compatíveis com os requisitos de validação analítica, constituindo uma alternativa simples e de baixo custo para a determinação espectrofotométrica de cobalto(II) em matrizes aquosas, nas condições avaliadas. Contudo, estudos adicionais de seletividade frente a outros íons metálicos são necessários para ampliar a validação da metodologia em matrizes ambientais mais complexas.

Palavras-chave: Água, Análise química, Cobalto, Espectrofotometria, Validação de métodos.

ABSTRACT

Objective: To develop, optimize, and validate a spectrophotometric method for the determination of Co^{2+} in aqueous matrices using 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol (5-Br-PADAP) as a chromogenic reagent. **Methods:** Experimental conditions were optimized using a 2^2 central composite design to evaluate

[1] Universidade Federal de São João Del-Rei (UFSJ), Divinópolis – MG.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG proposta APQ-01220-22).

SUBMETIDO EM: 7/2026 | ACEITO EM: 8/2026 | PUBLICADO EM: 9/2026

the effects of pH and the metal-to-ligand molar ratio on complex formation. Analytical validation was performed according to the Eurachem and Inmetro guidelines, including the evaluation of linearity, precision, accuracy, and limits of detection and quantification. **Results:** The experimental design established the optimum conditions as pH 5.36 and a Co^{2+}:5-Br-PADAP molar ratio of 1:3.4, with maximum absorbance at 590 nm. The method showed linearity over the concentration range of 0.005–0.500 µg mL^{-1} (R^2 = 0.9996), coefficients of variation below 13%, recoveries ranging from 88.8% to 115.1%, and limits of detection and quantification of 0.004 and 0.005 µg mL^{-1}, respectively. Application to surface water samples demonstrated satisfactory analytical performance for the determination of trace levels of Co^{2+}. **Conclusion:** The proposed method exhibited sensitivity, precision, and accuracy consistent with analytical validation requirements, representing a simple and low-cost alternative for the spectrophotometric determination of cobalt(II) in aqueous matrices, under the evaluated conditions. However, additional selectivity studies involving other metal ions are required to further validate the methodology for more complex environmental matrices.

Keywords: Water, Chemical analysis, Cobalt, Spectrophotometry, Method validation.

RESUMEN

Objetivo: Desarrollar, optimizar y validar un método espectrofotométrico para la determinación de Co^{2+} en matrices acuosas utilizando 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol (5-Br-PADAP) como reactivo cromogénico. **Métodos:** La optimización de las condiciones experimentales se realizó mediante un diseño compuesto central 2^2, evaluando los efectos del pH y de la relación molar metal:ligando sobre la formación del complejo. La validación analítica se llevó a cabo de acuerdo con las recomendaciones de las guías Eurachem e Inmetro, incluyendo la evaluación de la linealidad, precisión, exactitud y los límites de detección y cuantificación. **Resultados:** El diseño experimental permitió establecer como condiciones óptimas un pH de 5,36 y una relación molar Co^{2+}:5-Br-PADAP de 1:3,4, con una absorbancia máxima a 590 nm. El método presentó linealidad en el intervalo de 0,005 a 0,500 µg mL^{-1} (R^2 = 0,9996), coeficientes de variación inferiores al 13 %, recuperaciones entre 88,8 % y 115,1 %, y límites de detección y cuantificación de 0,004 y 0,005 µg mL^{-1}, respectivamente. La aplicación del método en muestras de aguas superficiales demostró un desempeño analítico satisfactorio para la determinación de Co^{2+} en niveles traza. **Conclusión:** El método desarrollado presentó sensibilidad, precisión y exactitud compatibles con los requisitos de validación analítica, constituyendo una alternativa simple y de bajo costo para la determinación espectrofotométrica de cobalto(II) en matrices acuosas, bajo las condiciones evaluadas. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales de selectividad frente a otros iones metálicos para ampliar la validación de la metodología en matrices ambientales más complejas.

Palabras clave: Agua, Análisis químico, Cobalto, Espectrofotometría, Validación de métodos.

INTRODUÇÃO

O cobalto é um elemento traço naturalmente presente na crosta terrestre e amplamente distribuído em sistemas ambientais. Embora desempenhe funções biológicas importantes, especialmente por integrar a estrutura da vitamina B12, concentrações elevadas desse metal podem provocar efeitos tóxicos em organismos aquáticos e seres humanos. A exposição excessiva ao cobalto tem sido associada a alterações cardiovasculares, respiratórias, neurológicas e endócrinas, além de efeitos ecotoxicológicos decorrentes de sua persistência e potencial de bioacumulação em ecossistemas aquáticos (GENCHI G, et al., 2023).

A presença de cobalto em águas superficiais pode resultar tanto de processos geológicos naturais quanto de atividades antrópicas, incluindo mineração, metalurgia, descarte inadequado de resíduos sólidos e lançamento de efluentes industriais. Em ambientes aquáticos, o metal pode ser transportado, redistribuído e incorporado aos compartimentos bióticos e abióticos, tornando sua determinação uma etapa importante para estudos de qualidade ambiental, monitoramento de elementos potencialmente tóxicos e avaliação de

riscos ecológicos e à saúde humana (IKEM A, et al., 2003; MAHEY S, et al., 2020; GANGULY A, et al., 2026). Em razão de seus potenciais impactos ambientais, a legislação brasileira estabelece limites máximos para sua presença em recursos hídricos destinados a diferentes usos (CONAMA, 2005).

A determinação de metais em níveis-traço é amplamente realizada por técnicas instrumentais como espectrometria de absorção atômica (AAS), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (ABDELMONEM BH, et al., 2025; VESKOVIĆ J e ONJIA A, 2025). Embora essas técnicas apresentem elevada sensibilidade, seletividade e confiabilidade analítica, sua aplicação frequentemente requer equipamentos de alto custo de aquisição e manutenção, além de infraestrutura laboratorial especializada. Nesse contexto, o desenvolvimento de metodologias alternativas que conciliem sensibilidade analítica, simplicidade operacional e baixo custo permanece relevante em química analítica instrumental.

Nesse contexto, a espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) destaca-se como uma alternativa amplamente empregada na determinação de espécies metálicas devido à sua simplicidade, rapidez e acessibilidade instrumental. A utilização de reagentes cromogênicos capazes de formar complexos intensamente coloridos com íons metálicos possibilita ampliar a sensibilidade da técnica e deslocar a absorção para a região visível do espectro eletromagnético, reduzindo interferências provenientes da matriz. Entre esses reagentes, o 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol (5-Br-PADAP) tem recebido destaque devido à sua elevada capacidade complexante e à formação de quelatos estáveis com diversos metais de transição, produzindo intensos efeitos batocrômicos e elevados coeficientes de absortividade molar (MARCZENKO Z e BALCERZAK M, 2000).

O reagente 5-Br-PADAP tem sido empregado com sucesso na determinação espectrofotométrica de diversos íons metálicos, incluindo urânio, chumbo, níquel, ferro e cobalto (JONES EA, 1985; ABU ZUHRI AZ, et al., 1986; FERREIRA SL, et al., 1996; SÖZGEN K e TÜTEM E, 2004).

Estudos clássicos demonstram que a coordenação do ligante com metais de transição promove modificações significativas na distribuição eletrônica do sistema aromático conjugado, resultando em deslocamentos espectrais para maiores comprimentos de onda e aumento da intensidade de absorção, características que favorecem aplicações analíticas em níveis-traço (SOMMER L e ŠAMLOTOVA E, 1988).

Apesar dos diversos estudos envolvendo o reagente 5-Br-PADAP, a obtenção de metodologias analíticas robustas depende da adequada otimização das variáveis experimentais que governam a formação do complexo metal-ligante. A utilização de ferramentas quimiométricas, como os delineamentos experimentais, permite avaliar simultaneamente múltiplos fatores e suas interações, resultando em métodos mais robustos e eficientes.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver, otimizar e validar um método espectrofotométrico baseado no reagente 5-Br-PADAP para determinação de cobalto(II) em matrizes aquosas, empregando um delineamento composto central para a definição das condições experimentais mais adequadas e avaliando seu desempenho por meio dos principais parâmetros de validação analítica.

MÉTODOS

Reagentes, soluções e instrumentação

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada obtida em sistema Elga Purelab Classic. As soluções padrão de Co^{2+} nas concentrações de 100 e 10 µg mL^{-1} foram obtidas por diluição apropriada de uma solução estoque de 1000 µg mL^{-1}.

O reagente cromogênico 5-Br-PADAP (5-bromo-2-piridilazo-5-dietilaminofenol) foi preparado na concentração de 0,025% m/v ($7,22 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}). Para seu preparo, 0,025 g do reagente foram dissolvidos em 4 mL de etanol e o volume completado para 100 mL com solução de Triton X-114 a 8% m/v. A solução foi armazenada sob refrigeração (4–8 °C), apresentando estabilidade por até 30 dias.

As soluções tampão foram preparadas a partir de biftalato ácido de potássio, cloreto de potássio e hidróxido de sódio, abrangendo a faixa de pH de 3,17 a 8,82. Os valores de pH foram verificados imediatamente antes do uso utilizando pHmetro previamente calibrado.

As medidas espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis, empregando cubetas de caminho óptico de 1 cm.

Otimização multivariada

As condições de formação do complexo Co^{2+}–5-Br-PADAP foram otimizadas por meio de um delineamento composto central (CCD) para dois fatores, permitindo a avaliação simultânea dos efeitos principais, das interações e da curvatura do sistema.

As variáveis independentes avaliadas foram o pH do meio reacional (X_1) e a razão molar metal (X_2). Os níveis experimentais foram definidos a partir de estudos preliminares, adotando-se como ponto central pH 6,00 e razão molar Co^{2+}:5-Br-PADAP de 1:2,5. Os níveis fatoriais corresponderam aos valores de pH 4,00 e 8,00 e às razões molares 1:2 e 1:3. Os pontos axiais foram estabelecidos utilizando $\alpha = 1{,}414$, resultando nos valores de pH 3,17 e 8,82 e razões molares 1:1,79 e 1:3,21.

O delineamento experimental foi composto por 11 ensaios, distribuídos em quatro pontos fatoriais (pH 4,00 e 8,00; razões molares 1:2 e 1:3), quatro pontos axiais (pH 3,17 e 8,82; razão molar 1:2,5, e pH 6,00; razões molares 1:1,79 e 1:3,21) e três replicatas no ponto central (pH 6,00 e razão molar Co^{2+}:5-Br-PADAP de 1:2,5).

Durante os experimentos, a concentração de Co^{2+} foi mantida constante em 1,0 μg mL^{-1}, enquanto a concentração de 5-Br-PADAP foi ajustada para obtenção das razões molares estabelecidas pelo planejamento experimental. Os espectros de absorção foram registrados na faixa de 310 a 700 nm. As respostas avaliadas foram a absorbância máxima do complexo ($ABS_{máx}$) e a variação de absorbância (Δ_{ABS}).

Condições analíticas obtidas por otimização

A otimização multivariada resultou em duas condições experimentais, apresentadas de forma padronizada para facilitar sua comparação: Condição 1 — pH 5,86, adição de 700 μL de solução de 5-Br-PADAP 0,025% m/v e leitura em 589 nm; Condição 2 — pH 5,36, adição de 800 μL de solução de 5-Br-PADAP 0,025% m/v e leitura em 590 nm.

Em ambas as condições, as soluções foram preparadas em balões volumétricos de 10 mL, contendo as quantidades apropriadas de solução padrão de Co^{2+}, solução tampão e reagente cromogênico, sendo o volume completado com água deionizada. Os respectivos brancos analíticos foram preparados nas mesmas condições experimentais, contendo apenas solução tampão e 5-Br-PADAP, sem adição do analito. Os brancos foram utilizados para o ajuste da linha de base e correção das medidas espectrofotométricas.

Validação analítica

As duas condições experimentais obtidas a partir da etapa de otimização multivariada foram inicialmente avaliadas quanto à linearidade da resposta analítica. Posteriormente, a condição que apresentou maior sensibilidade foi selecionada para a determinação dos demais parâmetros de mérito analítico, de acordo com as recomendações dos guias da Eurachem (2014) e do Inmetro (2020).

Linearidade

A linearidade foi avaliada para as duas condições experimentais obtidas na etapa de otimização. Na Condição 1, as soluções foram preparadas com adição de 700 μL da solução de 5-Br-PADAP 0,025% m/v em meio tamponado a pH 5,86, com volume final ajustado para 10 mL, sendo as medidas realizadas em 589 nm. Na Condição 2, as soluções foram preparadas com adição de 800 μL da solução de 5-Br-PADAP 0,025% m/v em meio tamponado a pH 5,36, com volume final ajustado para 10 mL, sendo as medidas realizadas em 590 nm.

Para ambas as condições, foram preparadas soluções contendo 0,005; 0,010; 0,050; 0,100; 0,200 e 0,500 μg mL^{-1} de Co^{2+}, em triplicata. As medidas foram realizadas de forma aleatória e os parâmetros de regressão foram obtidos pelo método dos mínimos quadrados ordinários.

A adequação do modelo linear foi avaliada por meio da análise dos resíduos, considerando a presença de valores extremos (outliers), normalidade, independência e homocedasticidade dos resíduos. A significância estatística da regressão e do modelo foi avaliada por análise de variância (ANOVA).

A condição experimental que apresentou maior sensibilidade analítica foi selecionada para a continuidade do processo de validação.

Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados experimentalmente utilizando a condição analítica selecionada.

Foram preparadas dez replicatas independentes contendo 0,003; 0,004 e 0,005 μg mL^{-1} de Co^{2+}. As soluções continham 800 μL da solução de 5-Br-PADAP 0,025% m/v e 1000 μL de tampão pH 5,36, com volume final ajustado para 10 mL. As medidas de ABS foram realizadas em 590 nm.

O LD foi definido como a menor concentração capaz de produzir resposta analítica detectável, enquanto o LQ foi definido como a menor concentração capaz de fornecer resultados com precisão e exatidão adequadas.

Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão foram avaliadas utilizando a condição analítica selecionada após o estudo de linearidade.

Foram preparados dois níveis de concentração de Co^{2+} (0,100 e 0,200 μg mL^{-1}), em sete replicatas independentes. As soluções foram preparadas com 800 μL da solução de 5-Br-PADAP 0,025% m/v e tampão pH 5,36, com volume final ajustado para 10 mL.

Os experimentos foram realizados em três dias distintos para avaliação da repetibilidade (precisão intra-dia) e da precisão intermediária (precisão inter-dia). A precisão foi expressa por meio do coeficiente de variação (CV), enquanto a exatidão foi avaliada em termos de recuperação percentual.

Aplicação em amostras reais

A aplicabilidade do método foi avaliada em amostras de águas superficiais coletadas nos rios Itapecerica e Paraopeba. As amostras do Rio Itapecerica foram coletadas nos anos de 2022 e 2023, enquanto as amostras do Rio Paraopeba foram coletadas em 2024.

Para as determinações, uma alíquota de 5,0 mL da amostra foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, sendo adicionados 800 μL da solução de 5-Br-PADAP 0,025% m/v e 1000 μL de tampão pH 5,36. O volume foi completado com água deionizada. Quando necessário, foram realizadas diluições adicionais das amostras para que as respostas analíticas permanecessem dentro da faixa linear do método, sendo os resultados corrigidos pelos respectivos fatores de diluição. Cada amostra foi preparada em triplicata e as medidas espectrofotométricas foram realizadas em 590 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Otimização multivariada da complexação Co^{2+}–5-Br-PADAP

O delineamento composto central (CCD) foi empregado por permitir a estimação de efeitos lineares, quadráticos e de interação entre as variáveis estudadas, possibilitando a construção de superfícies de resposta e a determinação das condições experimentais ótimas (FERREIRA SLC, et al., 2007; MONTGOMERY DC, 2013). A matriz do planejamento experimental, em níveis codificados, bem como as respostas analíticas obtidas para variação de absorbância (Δ_{ABS}) e absorbância máxima do complexo

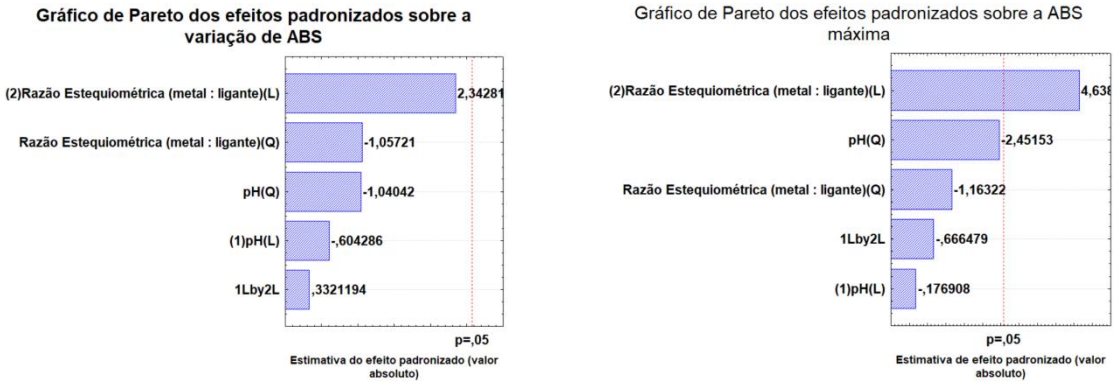
($ABS_{máx}$), são apresentadas na **Tabela 1**. A interpretação do Gráfico de Pareto (**Figura 1**) permite identificar os efeitos estatisticamente significativos ao nível de confiança de 95%, sendo considerados significativos aqueles cujos efeitos padronizados ultrapassam a linha crítica correspondente ($p < 0,05$). Observa-se na **Figura 1A** que, quando a variação de absorbância (Δ_{ABS}) foi utilizada como resposta analítica, nenhum dos efeitos avaliados apresentou significância estatística. Por outro lado, ao utilizar a absorbância máxima do complexo ($ABS_{máx}$) como variável dependente (**Figura 1B**), a razão estequiométrica ligante destacou-se como o fator de maior influência sobre o sistema, apresentando efeito padronizado positivo de 4,6381.

Tabela 1 - Matriz de Planejamento Fatorial 2^2 em níveis codificados e respectivas respostas analíticas de absorbância.

Experimento	pH	Razão Co^{2+}:5-Br-PADAP	Δ_{ABS}	$ABS_{máx}$
1	-1	-1	1,018	1,031
2	-1	+1	1,343	1,358
3	+1	-1	0,814	1,058
4	+1	+1	1,233	1,251
5	-1,41421	0	0,961	1,236
6	1,41421	0	1,012	1,257
7	0	-1,41421	0,916	1,073
8	0	1,41421	1,053	1,638
9	0	0	1,064	1,323
10	0	0	1,227	1,439
11	0	0	1,215	1,410

Fonte: Andrade FP, et al., 2026.

Figura 1 - Gráficos de Pareto dos efeitos padronizados para as respostas Δ_{ABS} (A) e $ABS_{máx}$ (B).



(A) (B)

Fonte: Andrade FP, et al., 2026.

Esse valor ultrapassa expressivamente o limite de significância estatística, evidenciando que a proporção entre o íon Co^{2+} e o reagente 5-Br-PADAP influencia significativamente a formação do complexo e a intensidade do sinal analítico (ABS).

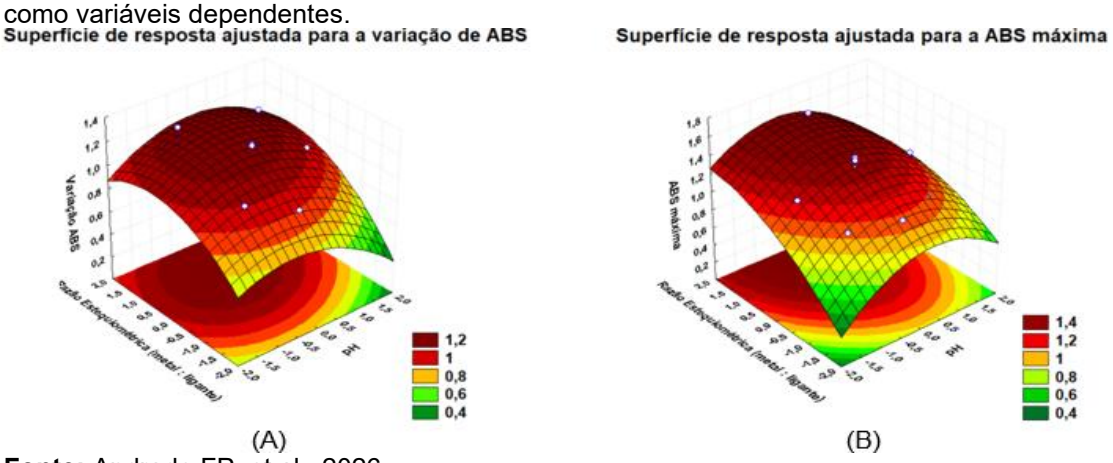
O efeito positivo observado indica que o aumento da concentração do ligante favorece o deslocamento do equilíbrio químico em direção à formação do complexo Co^{2+}–5-Br-PADAP, aumentando a concentração da espécie absorvente em solução e, consequentemente, a absorbância medida em 590 nm.

Por outro lado, o termo quadrático associado ao pH apresentou efeito negativo de –2,45153, situando-se próximo ao limite de significância estatística. Esse comportamento indica que o pH contribui para a curvatura da superfície experimental, embora sua influência seja menos pronunciada que a observada para a razão estequiométrica ligante. O sinal negativo do coeficiente quadrático sugere a formação de uma superfície com concavidade voltada para baixo, característica associada à existência de uma região de máxima resposta analítica.

As superfícies de resposta obtidas para as variáveis dependentes Δ_{ABS} (**Figura 2A**) e $ABS_{máx}$ (**Figura 2B**) apresentaram comportamento côncavo, com concavidade voltada para baixo, corroborando a adequação do modelo quadrático para descrever o sistema estudado. Para a variável $ABS_{máx}$, os pontos críticos calculados em escala codificada foram pH = –0,3184 e razão estequiométrica = 1,7837. A conversão desses valores para a escala real, considerando como ponto central pH 6,00 e razão molar metal de 1:2,5, permitiu determinar as condições otimizadas em pH 5,36 e razão molar de 1:3,4. O ponto crítico estimado para a razão estequiométrica situou-se ligeiramente além do nível axial superior do delineamento, de modo que a condição correspondente à razão 1:3,4 foi posteriormente avaliada experimentalmente durante as etapas de linearidade e validação analítica.

Esses resultados indicam que a máxima resposta analítica é obtida em uma faixa de pH levemente ácida e com excesso de ligante em relação ao íon metálico, condições que favorecem a formação do complexo Co^{2+}–5-Br-PADAP e resultam em maior intensidade de absorção.

Figura 2 - Superfícies de respostas considerando, respectivamente, Δ_{ABS} (A) e $ABS_{máx}$ (B), como variáveis dependentes.



Fonte: Andrade FP, et al., 2026.

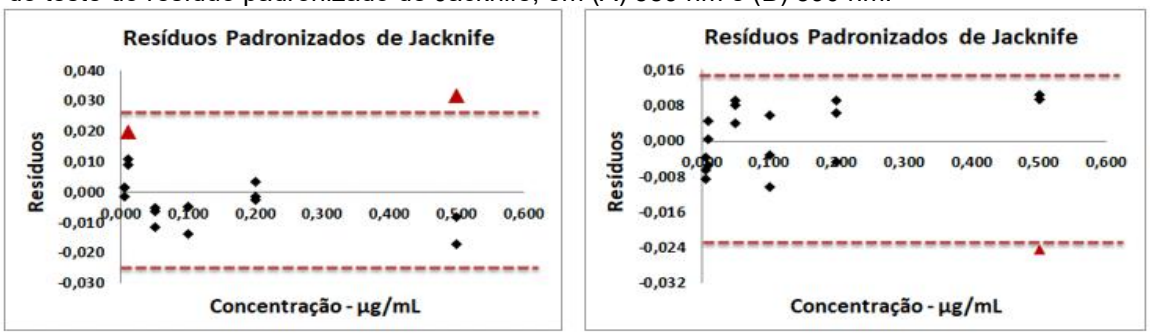
Validação analítica

Linearidade

Após a definição das condições otimizadas de complexação, procedeu-se à avaliação da linearidade do método para verificar a proporcionalidade entre a concentração de Co^{2+} e a resposta espectrofotométrica. Esta etapa é fundamental para garantir que o modelo matemático obtido seja capaz de prever com exatidão a concentração do analito em amostras desconhecidas, respeitando as premissas de validação analítica. A linearidade foi avaliada nos seguintes níveis de concentração de Co^{2+}: 0,005; 0,010; 0,050; 0,100; 0,200 e 0,500 μg mL^{-1}. As medidas de absorbância foram conduzidas em um espectrofotômetro em 589 nm e 590 nm, de maneira aleatória. Os parâmetros de regressão foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Nesse sentido fez-se necessária a avaliação das seguintes premissas: (i) Resíduo padronizado Jacknife para verificação de outliers; (ii) Ryan-Joiner para normalidade; (iii) estatística de Durbin-Watson para independência dos resíduos; (iv) Levene modificado para homocedasticidade dos resíduos.

Uma vez que o método se mostrou sensível a valores extremos (*outliers*), esses valores foram avaliados por meio dos resíduos padronizados de Jacknife e pela análise visual dos gráficos de resíduos da regressão versus níveis de concentração, demonstrados na **Figura 3**. Os resíduos fora do intervalo $\pm t_{(1-\alpha/2;n-2)}S_{re}$ são considerados outliers e devem ser removidos, respeitando um limite de 22,2% do conjunto original de dados (SOUZA SVC e JUNQUEIRA RG, 2005). Pode-se observar na **Figura 3A** a presença de dois outliers: o primeiro em 0,500 μg mL^{-1} e o segundo em 0,010 μg mL^{-1}. Já na **Figura 3B**, observa-se a presença de apenas um outlier em 0,500 μg mL^{-1}. Esses valores foram removidos do conjunto de dados para tornar o modelo de regressão mais representativo.

Figura 3 - Gráficos de resíduos da regressão *versus* níveis de concentração obtidos por meio do teste do resíduo padronizado de Jacknife, em (A) 589 nm e (B) 590 nm.



(A) (B)

Fonte: Andrade FP, et al., 2026.

Após a identificação e exclusão dos valores extremos, foram avaliadas as demais premissas do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). O teste de Ryan-Joiner indicou atendimento ao pressuposto de normalidade dos resíduos, com R_{eq} = 0,9889 > $R_{crít}$ = 0,9528 para a Condição 1 e R_{eq} = 0,9893 > $R_{crít}$ = 0,9549 para a Condição 2 (α = 0,10). A estatística de Durbin-Watson não evidenciou autocorrelação dos resíduos em nenhuma das condições avaliadas (p > 0,10), confirmando a independência dos erros. A homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Levene, cujos resultados (t_L = 0,383 < $t_{0,05}$ = 2,14 em 589 nm e t_L = 0,282 < $t_{0,05}$ = 2,13 em 590 nm) indicaram homocedasticidade dos resíduos (SOUZA SVC e JUNQUEIRA RG, 2005; GOMES MLPC e SOUZA SVC, 2010).

Após a verificação das premissas do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), procedeu-se à análise de variância (ANOVA) dos modelos de regressão. Para 589 nm, a regressão mostrou-se significativa (F_{calc} = 24371 > F_{crit} = 4,6), porém foi observado desvio significativo da linearidade (F_{calc} = 10,792 > F_{crit} = 3,7; p < 0,05). Em contrapartida, para 590 nm, a regressão também foi significativa (F_{calc} = 33327 > F_{crit} = 4,5), sem evidência de desvio da linearidade (F_{calc} = 2,68 < F_{crit} = 3,6; p > 0,05). Assim, a condição correspondente a 590 nm (Condição 2) foi considerada a mais adequada para a continuidade da validação do método, sendo descrita pela equação ABS = 1,8088 [Co^{2+}] + 0,0133, com coeficiente de determinação R^2 = 0,9996, evidenciando excelente ajuste do modelo aos dados experimentais.

A avaliação da linearidade demonstrou comportamentos distintos para as duas condições experimentais estudadas. Embora ambas tenham apresentado regressões estatisticamente significativas, a Condição 1 apresentou desvio significativo da linearidade, indicando inadequação do modelo linear para descrever a relação entre concentração e resposta analítica em toda a faixa investigada. Em contrapartida, a Condição 2 não apresentou desvio significativo da linearidade, atendendo às premissas estatísticas para a quantificação do analito. Além disso, apresentou maior sensibilidade analítica, evidenciada pelo maior coeficiente angular da curva de calibração. Dessa forma, a comparação entre as duas condições experimentais evidenciou que apenas a Condição 2 atendeu simultaneamente aos critérios de ausência de desvio da linearidade e de maior sensibilidade analítica, motivo pelo qual foi selecionada para a determinação dos demais parâmetros de validação.

Na Condição 2, observa-se que a formação do complexo Co^{2+}–5-Br-PADAP promove um acentuado efeito batocrômico, com deslocamento do comprimento de onda de máxima absorção de 446 nm, característico do ligante livre, para 590 nm após a complexação. Esse deslocamento para maiores comprimentos de onda constitui uma evidência da interação coordenativa entre o íon metálico e o ligante. Conforme discutido por Coia A, et al. (2024), íons de metais de transição 3d, como o Co^{2+}, atuam como centros cromóforos cujo comportamento espectroscópico é influenciado pelo ambiente de coordenação. A formação do complexo altera o campo ligante ao redor do metal, promovendo o desdobramento dos orbitais d do íon metálico em níveis de energia distintos. Como consequência, ocorre uma redistribuição eletrônica que reduz a energia necessária para determinadas transições eletrônicas, resultando no aparecimento de bandas de absorção em regiões de menor energia do espectro visível.

Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão foram avaliadas por meio da verificação de dois níveis de concentrações de Co^{2+}: 0,100 e 0,200 µg mL^{-1}, replicados em 3 dias diferentes, sendo 7 replicatas de cada nível (intra-dia). Cada nível foi avaliado em 3 dias diferentes (inter-dia). Os resultados são apresentados na **Tabela 2**.

Para as concentrações de 0,100 e 0,200 µg mL^{-1}, o método apresentou coeficientes de variação entre 2,4% e 5,1% nos ensaios intra-dia e recuperações entre 88,8% e 115,1%, demonstrando adequada repetibilidade e exatidão. Nos ensaios inter-dia, observaram-se coeficientes de variação mais elevados, conforme esperado para avaliações realizadas em diferentes dias, porém os valores de recuperação permaneceram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos, evidenciando a manutenção da exatidão do método (INMETRO, 2020; EURACHEM, 2014).

Tabela 2 - Precisão e exatidão expressas em termos de repetitividade e precisão intermediária (média ± desvio padrão, n = 7 para cada nível de concentração).

Conc. / Dia	0,100 µg mL^{-1} de Co^{2+}	0,200 µg mL^{-1} de Co^{2+}
Dia 1	0,093 ± 0,003 (CV = 3,6%) Recuperação: 92,6%	0,178 ± 0,009 (CV = 5,1%) Recuperação: 88,8%
Dia 2	0,109 ± 0,003 (CV = 2,9%) Recuperação: 109,5%	0,230 ± 0,008 (CV = 3,4%) Recuperação: 115,1%
Dia 3	0,103 ± 0,004 (CV = 4,0 %) Recuperação: 102,9%	0,183 ± 0,004 (CV = 2,4%) Recuperação: 91,5%
Média	0,102 ± 0,008 (CV = 7,9 %) Recuperação: 101,7%	0,197 ± 0,025 (CV = 12,9 %) Recuperação: 98,4%

Fonte: Andrade FP, et al., 2026.

Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados experimentalmente a partir da análise de dez replicatas de soluções contendo 0,003, 0,004 e 0,005 µg mL^{-1} de Co^{2+}. Não foi obtida resposta analítica mensurável para a concentração de 0,003 µg mL^{-1}. Para a concentração de 0,004 µg mL^{-1}, embora tenha sido observado sinal analítico, a elevada imprecisão (CV = 3377%) e a baixa recuperação (10%) inviabilizaram sua quantificação confiável. Em contrapartida, a concentração de 0,005 µg mL^{-1} apresentou recuperação de 94,8%, coeficiente de variação de 8,9% e concentração determinada de 0,0047 ± 0,0004 µg mL^{-1}, atendendo aos critérios de precisão e exatidão estabelecidos para a quantificação. Dessa forma, o LD e o LQ experimentais foram estabelecidos em 0,004 e 0,005 µg mL^{-1}, respectivamente. Esses resultados evidenciam a elevada sensibilidade da metodologia desenvolvida, uma vez que o LQ obtido é dez vezes inferior ao valor máximo de 0,05 µg mL^{-1} estabelecido pela Resolução CONAMA nº 357/2005 para águas doces, demonstrando que o método apresenta sensibilidade compatível com a determinação de Co^{2+} em amostras aquosas, nas condições avaliadas.

A **Tabela 3** reúne os principais parâmetros de validação do método desenvolvido.

Tabela 3 - Resumo dos parâmetros de validação do método espectrofotométrico para determinação de Co^{2+} utilizando 5-Br-PADAP.

Parâmetro	Resultado
Condição analítica selecionada	pH 5,36; razão molar Co^{2+}:5-Br-PADAP = 1:3,4; λ = 590 nm
Faixa linear	0,005 – 0,500 µg mL^{-1}
Equação da reta	ABS = 1,8088 [Co^{2+}] + 0,0133
Coeficiente de determinação (R^2)	0,9996
Limite de detecção	0,004 µg mL^{-1}
Limite de quantificação	0,005 µg mL^{-1}
Repetitividade (CV)	2,4 – 5,1%
Precisão intermediária (CV)	7,9 – 12,9%
Recuperação	88,8 – 115,1%

Fonte: Andrade FP, et al., 2026.

Análises em amostras reais

O método desenvolvido e validado foi aplicado à determinação de Co^{2+} em amostras de águas superficiais coletadas nos rios Itapecerica e Paraopeba, com o objetivo de avaliar sua aplicabilidade em matrizes ambientais reais. Os resultados são descritos a seguir e apresentados na **Tabela 4**.

Nas amostras do Rio Itapecerica coletadas em 2022, as concentrações de Co^{2+} permaneceram abaixo do limite de quantificação do método (< 0,005 μg mL^{-1}) em todos os pontos avaliados. Em contrapartida, nas amostras coletadas em 2023 foram observadas concentrações quantificáveis de Co^{2+} em todos os pontos amostrais, variando entre 0,32 ± 0,04 e 0,73 ± 0,07 μg mL^{-1}.

Para as amostras do Rio Paraopeba coletadas em 2024, foram determinadas concentrações de Co^{2+} entre 0,23 ± 0,01 e 1,03 ± 0,07 μg mL^{-1}, sendo o maior valor observado no Ponto 2. De modo geral, os resultados apresentaram boa concordância entre as replicatas, com coeficientes de variação inferiores a 10% para a maioria das amostras. O Ponto 3 apresentou maior dispersão (CV = 21,9%), possivelmente associada à heterogeneidade da matriz amostral.

Tabela 4 - Resultados das análises de águas do Rio Itapecerica e Paraopeba, no período de 2022 a 2024. Média ± desvio padrão, n = 3 para cada amostra.

Rio	Amostras (pontos de coleta)	Concentração (μg mL^{-1}) ± desvio (CV)
Itapecerica (ano de 2022)	Ponto 1	< LQ = 0,005
	Ponto 2	< LQ = 0,005
	Ponto 3	< LQ = 0,005
	Ponto 4	< LQ = 0,005
	Ponto 5	< LQ = 0,005
Itapecerica (ano de 2023)	Ponto 1	0,51 ± 0,04 (CV = 8,7%)
	Ponto 2	0,51 ± 0,03 (CV = 5,0%)
	Ponto 3	0,73 ± 0,07 (CV = 9,0%)
	Ponto 4	0,52 ± 0,02 (CV = 3,8%)
	Ponto 5	0,32 ± 0,04 (CV = 12,1%)
Paraopeba (ano de 2024)	Ponto 1	0,23 ± 0,01 (CV = 3,1%)
	Ponto 2	1,03 ± 0,07 (CV = 6,4%)
	Ponto 3	0,25 ± 0,05 (CV = 21,9%)
	Ponto 4	0,39 ± 0,01 (CV = 2,8%)
	Ponto 5	0,29 ± 0,03 (CV = 9,6%)

Fonte: Andrade FP, et al., 2026.

Considerando o valor máximo de 0,05 μg mL^{-1} de cobalto dissolvido estabelecido pela Resolução CONAMA nº 357/2005 para águas doces, observa-se que todas as concentrações quantificadas nas amostras de 2023 e 2024 foram superiores a esse limite. Entretanto, essa comparação deve ser interpretada com cautela, uma vez que o método desenvolvido não foi submetido a ensaios específicos de seletividade frente a outros íons metálicos potencialmente presentes nas amostras. Assim, os resultados obtidos constituem uma indicação da presença de espécies reativas ao sistema Co^{2+}–5-Br-PADAP, não sendo possível atribuir, nas condições avaliadas, toda a resposta analítica exclusivamente ao Co^{2+} dissolvido.

Apesar dessas limitações interpretativas, os resultados demonstraram que o método desenvolvido possui sensibilidade adequada para a determinação de espécies reativas ao sistema Co^{2+}–5-Br-PADAP em matrizes aquosas de origem ambiental, permitindo a obtenção de respostas analíticas em diferentes níveis de concentração e em diferentes tipos de amostras. Entretanto, como o presente estudo não contemplou ensaios específicos de seletividade frente a outros íons metálicos potencialmente presentes nessas matrizes, as concentrações determinadas não podem ser atribuídas exclusivamente à espécie Co^{2+}, devendo ser interpretadas como respostas analíticas do sistema Co^{2+}–5-Br-PADAP nas condições avaliadas, potencialmente influenciadas por outros íons metálicos capazes de reagir com o ligante. Ainda assim, os resultados obtidos evidenciam o potencial da metodologia como uma alternativa simples, sensível,

de baixo custo e operacionalmente acessível para a determinação espectrofotométrica de cobalto em amostras aquosas, podendo servir como base para o desenvolvimento de procedimentos analíticos voltados ao monitoramento ambiental e ao controle da qualidade de águas superficiais.

Estudos futuros poderão contemplar a avaliação de interferentes, do efeito de matriz, da robustez do método e da estabilidade do complexo Co^{2+}–5-Br-PADAP, bem como ensaios de recuperação por adição de padrão diretamente nas amostras. A comparação com técnicas instrumentais de referência, como ICP-OES, ICP-MS ou espectrometria de absorção atômica (AAS), também poderá fornecer evidências complementares da exatidão do método. Ressalta-se, contudo, que o delineamento composto central permitiu estabelecer condições experimentais otimizadas para a formação do complexo, resultando em desempenho analítico satisfatório nas condições investigadas.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o método espectrofotométrico desenvolvido utilizando 5-Br-PADAP apresentou desempenho analítico satisfatório para a determinação de Co^{2+} em matrizes aquosas, com adequada linearidade, sensibilidade, precisão e exatidão nas condições experimentais otimizadas. A condição selecionada (pH 5,36, razão molar Co^{2+}:5-Br-PADAP de 1:3,4 e leitura em 590 nm) mostrou-se adequada para a quantificação de Co^{2+} em níveis-traço. A aplicação em amostras de águas superficiais demonstrou o potencial da metodologia para análises ambientais. Entretanto, a aplicabilidade do método em matrizes mais complexas deve ser interpretada com cautela, uma vez que não foram realizados estudos específicos de seletividade frente a outros íons metálicos. Dessa forma, recomenda-se que trabalhos futuros incluam a avaliação de interferentes, estudos de robustez e a comparação com métodos instrumentais de referência, visando ampliar a validação da metodologia.

AGRADECIMENTOS E FINANCIAMENTO

Os autores agradecem à Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Centro-Oeste Dona Lindu (UFSJ/CCO) pelo apoio e suporte. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG proposta APQ-01220-22).

REFERÊNCIAS

1. ABDELMONEM BH, et al. From contamination to detection: The growing threat of heavy metals. Heliyon, 2025; 11(1): e41713.
2. ABU ZUHRI AZ, SHRAYDEH BF, SHALABI J. Selective spectrophotometric determination of palladium(II) with 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-(diethylamino)-phenol. Analytical Letters, 1986; 19(1–2): 99–112.
3. COIA A, et al. Exploring the role and variability of 3d transition metal complexes in artistic coloration through a bottom-up scientific approach. Colorants, 2024; 3(2): 152–174.
4. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (Brasil). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Diário Oficial da União, 2005; Seção 1: 58–63.
5. EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. 2. ed. Cambridge: Eurachem, 2014.
6. FERREIRA SL, et al. Derivative spectrophotometric determination of nickel using Br-PADAP. Talanta, 1996; 43(10): 1649–1656.
7. FERREIRA SLC, et al. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. Analytica Chimica Acta, 2007; 597(2): 179–186.
8. GANGULY A, et al. Pollution characteristics, receptor model-based source apportionment, and health risk of potentially toxic elements in the Godavari River, India. Frontiers in Environmental Science, 2026; 14: 1745773.

9. GENCHI G, et al. Prevalence of cobalt in the environment and its role in biological processes. Biology, 2023; 12(10): 1335.
10. GOMES MLPC, SOUZA SVC. Validação de método para determinação de resíduos de amoxicilina aplicado à validação de limpeza em indústria farmacêutica de penicilânicos. Química Nova, 2010; 33(4): 972–977.
11. IKEM A, EGIEBOR NO, NYAVOR K. Trace elements in water, fish and sediment from Tuskegee Lake, southeastern USA. Water, Air, and Soil Pollution, 2003; 149: 51–75.
12. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). DOQ-CGCRE-008: orientação sobre validação de métodos analíticos. 2020.
13. JONES EA. Spectrophotometric determination of uranium(VI) with 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol in a flow-injection system. Analytica Chimica Acta, 1985; 169: 109–115.
14. MAHEY S, et al. A critical review on toxicity of cobalt and its bioremediation strategies. SN Applied Sciences, 2020; 2(7): 1279.
15. MARCZENKO Z, BALCERZAK M. Separation, preconcentration and spectrophotometry in inorganic analysis. Amsterdam: Elsevier, 2000.
16. MONTGOMERY DC. Design and analysis of experiments. 8. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2013.
17. SOMMER L, ŠAMLOTOVÁ E. On the spectrophotometric determination of UO_2^{2+} with 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol. Canadian Journal of Chemistry, 1988; 66(3): 401–405.
18. SOUZA SVC, JUNQUEIRA RG. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. Analytica Chimica Acta, 2005; 552: 25–35.
19. SÖZGEN K, TÜTEM E. Second derivative spectrophotometric method for simultaneous determination of cobalt, nickel and iron using 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol. Talanta, 2004; 62(5): 971–976.
20. VESKOVIĆ J, ONJIA A. Analytical techniques and source apportionment for heavy metal(loid)s in groundwater: A comprehensive review. Talanta Open, 2025; 12: 100572.