



Método espectrofotométrico na região UV a 205 nm para determinação de íon nitrato em água: validação

Spectrophotometric method in UV region at 205 nm for determination of nitrate ion in water: validation

RIALA6/1731

Maria Anita SCORSFAVA*, Arlete de SOUZA, Gisele Letícia ALVES

*Endereço para correspondência: Núcleo de Águas e Embalagens, Centro de Contaminante, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-000. Tel: 11 3068 2918. E-mail: mscorsaf@ial.sp.gov.br

Recebido: 08.03.2017 - Aceito para publicação: 16.10.2017

RESUMO

Este estudo teve por objetivo validar o método espectrofotométrico na região ultravioleta (205 nm) para determinação de nitrato em água para consumo humano e de diálise, bem como calcular sua incerteza associada. A linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram avaliados de acordo com o documento de orientação INMETRO DOQ-CGCRE-008. Os resultados obtidos utilizando água de abastecimento indicaram que a matriz não tem efeito significativo sobre a seletividade do método. A exatidão e a repetitividade foram avaliadas com três níveis de concentração do analito na água de abastecimento, na água de diálise e em material de referência certificado, apresentando resultados satisfatórios para todas as matrizes utilizadas. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,074 e 0,248 mg/L de nitrato, respectivamente. O método mostrou-se adequado para determinação de nitrato em água de abastecimento e em água de diálise.

Palavras-chave. nitrato, água para consumo humano, diálise, validação.

ABSTRACT

This study validated the spectrophotometric method in ultraviolet region (205 nm) for determining nitrate in water used for human consumption and dialysis procedure and to calculate its associated uncertainty. The linearity, selectivity, precision, accuracy, limit of detection (LD) and limit of quantification (LQ) were evaluated according to the INMETRO DOQ-CGCRE-008. The results obtained using water supply indicated that the matrix has no significant effect on the selectivity of the method. Accuracy and repeatability were evaluated using three different levels of analyte concentration in the supply water, in the dialysis water and in the certified reference material, showing satisfactory results at all matrices used. The limits of detection and of quantification were 0.074 and 0.248 mg/L of nitrate, respectively. The method proved to be adequate for determining nitrate in water supply and dialysis water.

Keywords. nitrate, water for human consumption, dialysis, validation.

INTRODUÇÃO

Entre os ânions mais comuns encontrados em águas, o nitrato (NO_3^-) tem importância devido a sua toxicidade; em conjunto com nitrito, o nitrato está associado à indução da metemoglobinemia e a formação potencial de nitrosaminas e nitrosamidas carcinogênicas¹. O nitrato pode estar presente tanto nas águas superficiais como nas subterrâneas, como consequência da atividade da agricultura, da eliminação de águas residuais e da oxidação de resíduos de produtos nitrogenados em fertilizantes agrícolas, excrementos humanos e animais, incluindo fossas².

Na água de diálise, o nitrato é um dos íons que devem ser monitorados para garantir sua qualidade, portanto o tratamento inadequado da água, pode colocar em risco a vida e a segurança de pacientes com insuficiência renal sob tratamento³. De acordo com a RDC nº 11/2014⁴ da ANVISA, o limite máximo permitido (LMP) de nitrato na água de diálise é 2 mg/L expresso na forma de N, que equivale a 8,8 mg/L de nitrato⁴.

O método recomendado para determinação de nitrato pelo *Standard Method for Examination of Water and Wastewater* (2012)⁵ é o espectrofotométrico, com detecção UV em 220 e 275 nm. Porém, na literatura há relatos de detecção espectrofotométrica do nitrato em outros comprimentos de onda.

Mazon et al⁶ avaliaram quatro métodos para determinação de nitrato em água natural envasada: método colorimétrico (I), espectrofotométrico UV a 205 nm (II), espectrofotométrico UV a 205 nm modificado (III) e espectrofotométrico UV a 220/275 nm (IV). Foi observado que os métodos espectrofotométricos UV a 220/275 nm (IV) e UV a 205 nm (II) apresentam características de desempenho estatisticamente adequadas para análise de rotina laboratorial, além de serem métodos de fácil execução, pois utilizam reagente único e apresentam resultados imediatos na determinação de nitratos em águas com baixo teor de matéria orgânica, pois embora sejam simples e de baixo custo, estão sujeitos à presença de interferentes, como cloreto e matéria orgânica⁵.

Souto et al⁷ avaliaram as interferências espectrais na determinação de nitrato em água por métodos espectrofotométricos nas regiões 220 nm (com correção para a presença da matéria orgânica em 275 nm) e

205 nm; observaram a interferência do íon cloreto em concentrações acima de 50 mg/L no segundo método.

Tanto Mazon et al⁶ como Souto et al⁷ utilizaram leitura direta da absorbância em amostra de água, com adição de ácido clorídrico 1,0 M, em espectrofotômetro a 205 nm, porém não avaliaram a seletividade nas matrizes de interesse e precisão/exatidão em água de diálise.

Por definição, validar um método analítico é confirmar - por exame e fornecimento de evidência objetiva - que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos⁹. Na validação, o parâmetro seletividade é o grau que o método pode quantificar o analito de interesse na presença de outros analitos, matrizes ou outro material potencialmente interferente; os experimentos que avaliam esse parâmetro envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem o analito, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes.

Ainda, para um ensaio ser acreditado na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005¹⁰, deve utilizar método validado e com incerteza envolvida na medição estimada, a qual caracteriza a dispersão dos valores¹¹, sendo um indicativo quantitativo da qualidade do resultado analítico e influencia a tomada de decisão para verificar a conformidade do mesmo frente a um limite ou a uma especificação¹².

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi validar um método espectrofotométrico na região do UV (205 nm) para determinação de íon nitrato e calcular a incerteza associada contribuindo assim, para o aprimoramento da técnica analítica já utilizada por Laboratório de Saúde Pública na avaliação da qualidade da água quanto ao íon nitrato.

MATERIAL E MÉTODO

Amostras

As matrizes utilizadas na validação consistiram de:

- Água ultrapura (18 Ω m)
- Água para consumo humano, coletada da rede de abastecimento público diretamente da torneira do laboratório, em frascos de vidro previamente lavados com água clorada (0,5%), enxaguados com água ultrapura e secos;

- c) Água tratada para diálise, coletada em serviços de diálise no âmbito do Programa Estadual de Hemodiálise e,
- d) Material de referencia certificado (MRC) ERM – CA016a (lote a), que consistiu de amostra de água potável com valor declarado igual a 48 mg/L de nitrato e incerteza expandida de 3,0 mg/L.

Solução padrão

Solução padrão de nitrato (grau cromatográfico) $1,002 \pm 4 \mu\text{g mL}^{-1}$, da marca *Inorganic Venture*, certificada de acordo com a Norma ABNT ISO Guia 34:2016¹³: utilizada para preparar a solução estoque de 100 mg/L, a partir da qual foram preparadas soluções de teste com as seguintes concentrações: 0,10; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00; 6,00 mg/L, em água ultrapura (18 Ωm).

Reagentes

Foram utilizados ácido clorídrico, cloreto e sódio e ácido húmico, todos apresentando grau analítico.

Equipamentos e vidrarias

Todos os equipamentos e vidrarias utilizados no estudo estavam adequadamente calibrados pela Rede Brasileira de Calibração (RBC).

MÉTODO

Foram transferidos 25 mL da amostra para balão volumétrico de 25 mL, sendo adicionado 0,25 mL de ácido clorídrico 1,0 M, com posterior homogeneização. O mesmo procedimento foi realizado para as soluções padrão e o branco da análise (utilizada água ultrapura (18 Ωm)). As leituras de absorbância foram realizadas em 205 nm, em espectrofotômetro UV/Vis modelo Orion Aquamate 8000 marca Thermo Scientific.

Parâmetros de Validação

Os parâmetros de validação foram avaliados de acordo com documento orientativo INMETRO DOQ-CGCRE-008⁹, AOAC¹⁴ e *Codex Alimentarius*¹⁵, sendo os dados analisados por meio da “Planilha de Validação versão 1”, desenvolvida pelo Núcleo de Análise e Tratamento e Dados do Centro de Materiais de Referência do Instituto Adolfo Lutz.

Linearidade e faixa de trabalho

Para a construção da curva de calibração, foram preparadas três replicatas independentes de solução teste contendo sete níveis de concentração de nitrato (n=27): 0,10; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00 e 6,00 mg/L, em água ultrapura.

Inicialmente, foram verificadas a ausência de valores discrepantes pelo teste de Grubbs e a homocedasticidade (igualdade das variâncias) pelo teste de Cochran (99% de confiança)⁹.

A linearidade foi avaliada por análise de regressão linear, com ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados (MMQ), sendo a significância da regressão e o desvio da linearidade (falta de ajuste) verificados por análise de variância (ANOVA) univariada e os critérios de aceitação utilizados foram: coeficiente de correlação ($R^2 \geq 0,995$); regressão linear significativa ($p \leq 0,05$) e falta de ajuste não significativa ($p > 0,05$).

Seletividade

a) Efeito da matriz

Foram comparadas as inclinações das curvas de calibração obtidas para o branco do ensaio (Grupo 1: água ultrapura) e para a matriz água de abastecimento (Grupo 2). Para os dois grupos, foram preparadas triplicatas independentes, adicionadas de concentrações idênticas da solução padrão de nitrato e incluíram ponto de análise não adicionado de solução padrão, conforme descrito a seguir;

Grupo 1: Água ultrapura + adição de padrão de analito, para obter seis níveis de concentração (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg/L de nitrato);

Grupo 2: Água de abastecimento + adição de padrão de analito, para obter seis níveis de concentração (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg/L de nitrato).

Foram realizados teste F para avaliar a homogeneidade das variâncias dos resíduos da regressão (equação 1) e o teste *t Student* para avaliar a equivalência da inclinação das curvas (equação 2) com 95 % de confiança. Se as inclinações dessas duas curvas de regressão linear não diferirem significativamente, não há efeito de matriz.

$$F_{\text{calculado}} = s^2_{\text{res1}} / s^2_{\text{res2}} \quad (\text{equação 1})$$

Onde s^2_{res1} e s^2_{res2} são as variâncias dos resíduos a regressão de cada grupo, com maior variância, respectivamente.

$$t_{\text{ calculado}} = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{(s^2 \text{ res}_1 / Sxx_1) + (s^2 \text{ res}_2 / Sxx_2)}}$$

(equação 2)

Onde:

b_1 = coeficiente de inclinação da reta de regressão do grupo 1

b_2 = coeficiente de inclinação da reta de regressão do grupo 2

Sxx_1 = somatória das diferenças quadráticas entre as concentrações das soluções padrão e a concentração média (grupo 1)

Sxx_2 = somatória das diferenças quadráticas entre as concentrações das soluções padrão e a concentração média (grupo 2)

b) Presença de interferentes

Também foi realizada a avaliação da amostra na presença de interferentes, considerando que nessa faixa espectral a matéria orgânica dissolvida e alguns íons normalmente encontrados em água natural, como cloretos, podem interferir na detecção de nitrato. Para o estudo da seletividade foram analisados, separadamente, o interferente cloreto (Cl^-) e o ácido húmico que foram adicionados em água de abastecimento público em sete replicatas independentes para cada nível de concentração: fortificação de 50, 100, 150 e 200 mg/L de cloreto; fortificação de 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg/L de ácido húmico. Os resultados (absorbância) da matriz sem (grupo 1) e com adição de interferentes (grupo 2) foram analisados, para cada nível de concentração. Utilizou-se o teste F para avaliar a homogeneidade, sendo que se $p \geq 0,05$, as variâncias dos grupos são estatisticamente iguais. Utilizou-se então o teste t para avaliar a equivalência das médias dos grupos com 95% de confiança. Se $t_{\text{ calculado}} < t_{\text{ crítico}}$ (bicaudal com 12 graus de liberdade), a média das duas populações são estatisticamente iguais e, portanto, o interferente adicionado não tem efeito significativo sobre o resultado do ensaio, ou seja, o método é seletivo. A análise estatística dos dados foi realizada no software *Excel 2010*[®].

Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Foram avaliadas seis replicatas independentes de água ultrapura (branco) fortificada com 0,5 mg/L

de nitrato. Os limites foram calculados de acordo com as equações 3 e 4:

Limite de detecção: $LD = 0 + 3s$ (equação 3)

Limite de quantificação: $LQ = 0 + f.s$ (equação 4)

Onde:

s = desvio das amostras-branco fortificadas;

f = fator adotado de acordo com avaliação crítica do analista (5, 6 ou 10).

Exatidão

Para a avaliação da exatidão do método, foram analisadas seis replicatas do material de referência certificado (MRC) de água potável. Os dados obtidos foram avaliados calculando-se o *Z score* (equação 5) e o erro relativo normalizado (equação 6), sendo os resultados considerados exatos quando *Z score* ≥ 2 e o erro normalizado $\leq 1\%$.

$$|Z| = \frac{|X_{lab} - X_v|}{u_{MRC}} \quad (\text{equação 5})$$

Onde:

$|Z|$ = valor de z score; X_{lab} = valor médio das replicatas; X_v = valor aceito como verdadeiro = valor certificado no material do MRC;

u_{MRC} = incerteza padrão do valor certificado do material de referência.

$$E_n = \frac{|X_{lab} - X_v|}{\sqrt{U_{lab}^2 - U_{ref}^2}} \quad (\text{equação 6})$$

Onde:

E_n = erro normalizado;

U_{lab} = incerteza expandida dos resultados do processo de medição do laboratório;

U_{ref} = incerteza expandida associada ao MRC.

A exatidão também foi determinada pela recuperação das concentrações de nitrato adicionadas nas amostras, em três níveis de concentração correspondendo a 1; 1,5 e 2 vezes o limite mínimo de desempenho do método (0,5 mg/L de nitrato), em triplicatas independentes ($n=9$) para água de abastecimento e diálise; sendo utilizado como critério de

aceitação a porcentagem de recuperação (equação 7) entre 80-110%, de acordo com AOAC¹⁴.

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

Onde:

C_1 = concentração do analito na amostra fortificada;
 C_2 = concentração do analito na amostra sem fortificação;
 C_3 = concentração do analito adicionada na fortificação.

Repetibilidade

A repetibilidade foi determinada pela porcentagem do coeficiente de variação em amostras fortificadas com nitrato, em três níveis de concentração correspondendo a 1; 1,5 e 2 vezes o limite mínimo de desempenho do método (0,5 mg/L de nitrato), em triplicatas independentes (n=9) para água de abastecimento e diálise. Utilizou-se como critério de aceitação a porcentagem do coeficiente de variação (equação 8) menor que 8% de acordo com AOAC¹⁴.

$$CV\% = RSD = s/\bar{x} \text{ (equação 8)}$$

Onde:

CV% = RSD = porcentagem do coeficiente de variação = desvio padrão relativo;

s = desvio padrão; \bar{x} = média

Incerteza da Medição

O cálculo da incerteza da medição foi realizado de acordo com Eurachem/Citac¹⁶, utilizando-se a abordagem subanalítica que permite estimar a contribuição de cada fonte de incerteza identificada para a incerteza da medição calculada, o que pode ser usada para otimizar o método analítico do ponto de vista metrológico¹⁷. Foram consideradas fontes de incerteza: volume da amostra, volume do branco, padrões de calibração, regressão da curva analítica com ajuste linear, equipamento (espectrofotômetro) e repetibilidade. A equação da incerteza da concentração de nitrato é descrita na equação 9.

$$u_{NO_3^-} = \sqrt{u_{va}^2 + u_{vb}^2 + u_{pad}^2 + u_{reg}^2 + u_{equi}^2 + u_{repet}^2}$$

(equação 9)

Onde:

u = incerteza-padrão; u_{va} = incerteza do volume da amostra; u_{vb} = incerteza do volume do padrão;
 pad = padrão; reg = regressão; $equi$ = equipamento;
 $repet$ = repetibilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

As concentrações 0,10 e 0,25 mg/L de nitrato não apresentaram boa reprodutibilidade, portanto, foi avaliada a linearidade a partir de 0,50 mg/L de NO_3^- . Os dados da curva analítica, resultante da média de três curvas padrão, foram ajustados por análise de regressão linear e o teste unilateral de variância (ANOVA) avaliou a qualidade do ajuste do modelo linear (**Tabela 1**). A análise dos dados da linearidade demonstrou ser a regressão altamente significativa ($p = 4,12 \times 10^{-26}$), bem como não foi evidenciada a falta de ajuste do modelo (0,633) no nível de 95% de confiança de acordo com os critérios adotados. Portanto, o método analítico possui faixa de linearidade entre as concentrações de 0,50 e 6,00 mg/L de nitrato.

Tabela 1. Dados referentes a linearidade do método

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	0,5 - 6,0 mg NO_3^- /L,
Equação: $y = ax + b$	$y = 0,1481x - 0,0198$
Intercepto (b) \pm desvio padrão	$-0,0198 \pm 0,0017$
Inclinação (a) \pm desvio padrão	$0,1481 \pm 0,0005$
Coefficiente de correlação (R^2)	0,9987
Valor p regressão	$4,12 \times 10^{-26}$
Valor p falta de ajuste	0,633

Na **Figura 1** encontram-se os resultados do teste de seletividade. Os resultados do teste F indicaram que as variâncias dos grupos são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) e o teste t indicou que as inclinações da regressão dos dois grupos são estatisticamente iguais, isto é, a matriz (água de abastecimento) não tem um efeito significativo sobre o resultado do ensaio.

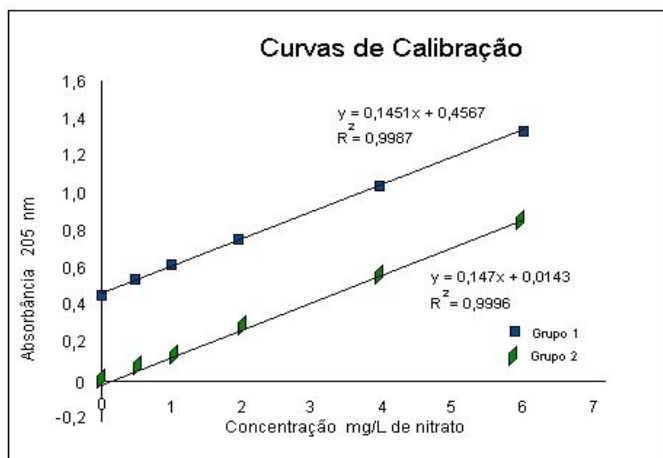


Figura 1. Concentração de nitrato (mg/L) versus leitura de absorvância para os grupos 1 (água ultrapura) e grupo 2 (água de abastecimento)

A avaliação da amostra na presença de interferentes, realizada de acordo com documento INMETRO DOQ-CGCRE-008⁹, demonstrou que nas amostras fortificadas com cloreto a partir da adição de 50 mg/L de cloreto, há diferença significativa na leitura de absorvância, para o nível de significância de 95%. A partir dessa concentração, pode ser previsto um erro relativo negativo crescente em função do aumento da concentração do cloreto. Observou-se um erro relativo médio de -3,78 % e -9,64% em amostras fortificadas com 50 e 100 mg/L, respectivamente (Figura 2), ou seja, o erro é mais pronunciado a partir da presença de 100 mg/L do interferente.

Como foi observada a interferência do cloreto no método de determinação de nitrato por leitura direta em 205 nm da amostra acidificada, foram realizadas análises para determinação de cloreto por cromatografia de íons no período de julho de 2015 a março de 2016 em 303 amostras do Programa de Vigilância da Qualidade da Água para consumo Humano (PROÁGUA) e 145 amostras de hemodíalise do Programa Estadual de Monitoramento da Água Tratada para Diálise. Verificou-se que o teor médio de cloreto (e seus desvios padrões) foi de $8,06 \pm 3,59$ e $0,971 \pm 1,068$ mg/L em água de abastecimento e água de diálise, respectivamente. Portanto, a concentração de cloreto média obtida nas análises para água de abastecimento foi aproximadamente 6,25 vezes menor que a concentração que poderia interferir na resposta da análise do método proposto.

A interferência da presença de até 1,0 mg/L de ácido húmico foi considerada não significativa ($\alpha = 5\%$)³; entretanto, a partir da adição de 2,0 mg/L pode ser previsto um erro relativo positivo crescente com aumento da concentração de ácido húmico (Figura 2).

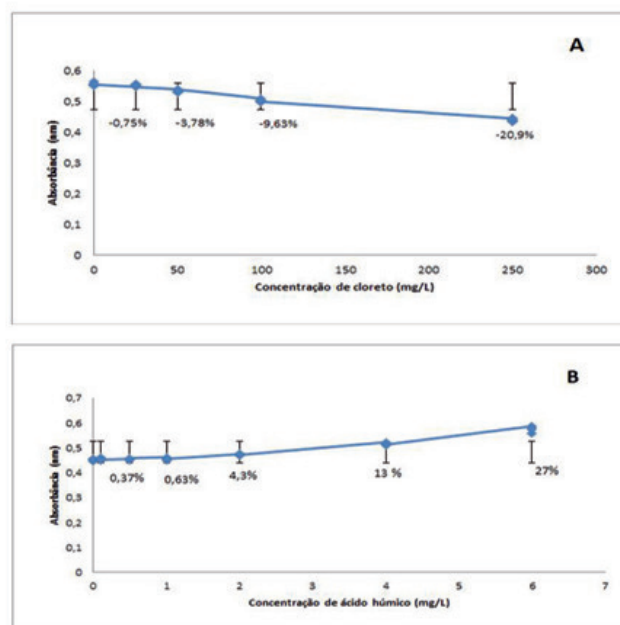


Figura 2. Influência da presença do íon cloreto (A) e ácido húmico (B) na determinação de nitrato pelo método espectrofotométrico (205 nm) em água de abastecimento. Cada ponto no gráfico representa os valores de absorvância das replicatas, e apresenta a barra de erro do desvio-padrão e a porcentagem de erro relativo de cada concentração avaliada

Os resultados obtidos foram semelhantes aos de Souto et. al⁷, que indicaram interferência do cloreto em concentrações acima de 50 mg/L e de compostos orgânicos na determinação de nitrato pelo método espectrofotométrico a 205 nm, em água deionizada; apesar deste estudo ter sido realizado em amostras de água de abastecimento, os resultados obtidos indicaram que a matriz não tem um efeito significativo nas medidas de absorvância, além do fato que os dados obtidos de programas indicaram que a concentração de cloreto encontrada, tanto em água de abastecimento como de diálise, não levaria a um erro na quantificação de nitrato pelo método proposto.

A sensibilidade do método foi analisada através da determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), tendo sido verificados valores de 0,0744 e 0,248 mg/L, respectivamente, sendo que foi adotado o fator 10 para o cálculo do LQ (equação 4). Como os limites calculados encontraram-se abaixo da faixa de trabalho, o LQ correspondeu ao padrão de calibração de menor concentração (0,5 mg/L NO_3^-).

De acordo com *Codex Alimentarius*¹⁵, o limite de quantificação deverá ser 1/5 do valor do limite máximo permitido (VMP) quando esse valor for $\geq 0,1$ mg/kg (1/5 x VMP). Considerando-se o valor máximo permitido (VMP) para nitrato de acordo com a Portaria nº 2914/2011 é de 10 mg/L expresso em N (equivalente a 44,4 mg/L de NO_3^-) e da Resolução RDC nº11/2014 é de 2 mg/L expresso em N (equivalente a 8,8 mg/L de NO_3^-), o limite de quantificação atende as necessidades de aplicação do método^{18,4}.

Os valores obtidos das porcentagens de recuperação e coeficiente de variação (CV) das amostras fortificadas (**Tabela 2**), nas três faixas de concentração analisadas e nas duas matrizes, foram satisfatórios de acordo com os critérios de aceitação: 80 a 110% de recuperação e $\text{CV}(\%) < 8\%$ (AOAC)¹⁴.

Para o material de referência certificado com valor declarado igual a 48 mg/L e incerteza expandida de 3,0 mg/L (ERM –CA016a,- água potável), observou-se que a porcentagem de recuperação e o coeficiente de variação foram, respectivamente, 103% e 1,30%, portanto adequados, considerando-se os critérios de aceitação em relação a concentração do analito estabelecidos pela AOAC¹⁴ e acima citados. Ainda, os resultados do índice Z (1,13) e do erro relativo (normalizado) 0,401 para intervalo de confiança de 95%, indicaram que a média

das replicatas é estatisticamente equivalente ao valor de propriedade certificado e consequentemente, o método é considerado suficientemente exato.

Comparando-se os resultados obtidos no presente trabalho (**Tabelas 1 e 2**) com os do método analítico espectrofotométrico recomendado pelo APHA⁵ para leitura em 220 e 275 nm, em águas naturais, com faixa de linearidade entre 0-7 mg/L, porcentagem de recuperação entre 96-102% e $\text{CV}(\%)$ médio de 2%, foi observado que o método proposto apresentou capacidade similar de determinar o analito em questão⁶.

O nitrato pode ser determinado em água para consumo humano por método espectrofotométrico na região do visível através das reações com desenvolvimento de cor, como o método baseado na formação de íons nitrônio (NO_2^-) em meio ácido e posterior reação com salicilato de sódio em meio básico para formar um composto nitrobenzóico de cor amarela, que é aplicado em águas minerais e que apresenta linearidade de 0,096 a 3,86 mg/L de nitrato e porcentagem de recuperação entre 88 e 106% e $\text{CV}(\%)$ inferior a 4%¹⁹ – ou métodos que envolvem a redução do nitrato em nitrito e posterior reação para obtenção de compostos coloridos, como a redução na presença de Zn/NaCl e posterior reação com ácido sulfanílico para formar composto colorido com absorção máxima em 493 nm – este método, aplicado a amostras de água de abastecimento público, apresentou porcentagem de recuperação entre 98-99%²⁰. Os resultados obtidos neste estudo demonstram capacidade similar entre o método proposto e os métodos colorimétricos, porém, estes últimos demandam maior tempo de análise, necessitam maior quantidade de reagentes e produzem maior quantidade de resíduos.

Tabela 2. Resultados da porcentagem de recuperação e coeficiente de variação das águas fortificadas com três níveis de concentração

Concentração do analito adicionado (mg/L)	Tipo de matriz	% de Recuperação	% Coeficiente de variação (CV)
0,50	aa	89,30	2,65
0,50	ah	103,0	3,92
0,75	aa	97,0	0,49
0,75	ah	96,7	2,85
1,00	aa	94,2	0,83
1,00	ah	99,7	4,67

aa: água de abastecimento; ah: água de hemodiálise; três replicatas

Tabela 3. Fontes de incerteza e respectivas porcentagens de contribuição para a incerteza total

Fonte de Incerteza	Incerteza padrão (u_{xi})	Unidade	Distribuição	Graus de liberdade	% Contribuição
Padrão 0,5	0,0014	mg/L	Normal	α	0,1
Padrão 1,0	0,0031	mg/L	Normal	α	0,7
Padrão 2,0	0,0062	mg/L	Normal	α	2,8
Padrão 4,0	0,0110	mg/L	Normal	α	8,8
Padrão 6,0	0,0160	mg/L	Normal	α	18,7
Regressão da curva analítica	0,0283	mg/L	Normal	13	58,2
Volume branco	0,0018	L	retangular	α	0,3
Volume amostra	0,0018	L	retangular	α	0,3
Equipamento (espectrofotômetro)	0,0006	uA	retangular	α	0,0
Repetibilidade	0,0118	mg/L	Normal	5	10,1
Total	0,0371			$(v_{eff})=36$	100%

A quantificação das incertezas padrão relativa de cada fonte, seus valores e sua porcentagem de contribuição para a incerteza total encontram-se na **Tabela 3**. Observa-se que a maior contribuição para a incerteza total da concentração de nitrato em água está associada à regressão da curva analítica. Considerando-se os graus de liberdade efetivo (v_{eff}), obtém-se um valor de abrangência (k) igual a aproximadamente 2,07 para um nível de confiança de 95%. A incerteza expandida associada a concentração de nitrato é obtida multiplicando-se a incerteza-padrão combinada pelo fator de abrangência, $k = 2,07$, considerando-se nível de significância de 95% (equação 10)

$$\mu c_{NO_3} = u c_{NO_3} \times k = 0,0371 \times 2,07 = 0,1 \text{ mg (equação 10)}$$

Para o cálculo da incerteza associada à regressão da curva analítica com ajuste linear para concentração de nitrato foi utilizada uma amostra de água de abastecimento (determinada em triplicata) com concentração média de 2,6 mg/L de NO_3^- . Portanto, o resultado da concentração de nitrato em água foi de $2,6 \pm 0,1$ mg/L, com um nível de confiança de 94,5%. Dessa forma, a porcentagem relativa da incerteza expandida é de 3,0%.

Lopez-Moreno et al²¹ determinaram a incerteza expandida de soluções de nitrato de

três concentrações distintas (em água ultrapura) utilizando o método de cromatografia de íons; para soluções de 1 e 20 mg/L de NO_3^- , foram obtidos valores de incerteza expandida de 0,7 e 0,9 mg/L, respectivamente. Ou seja, incertezas expandidas de 16,99% e 5,00%. Comparando-se os resultados obtidos neste estudo, observou-se incerteza inferior, porém, deve-se considerar no trabalho citado foi utilizada uma abordagem conservadora e incluídos a exatidão e a reprodutibilidade como fontes de incerteza para a cromatografia de íons. Como observado na **Tabela 3**, a maior fonte de incerteza é a regressão da curva, no caso da cromatografia de íons a curva analítica utilizada tinha maior extensão (0,50 a 100 mg NO_3^- /L) o que poderia explicar esse maior valor de incerteza.

CONCLUSÃO

O método analítico espectrofotométrico proposto foi validado e demonstrou ser simples, rápido, seletivo, preciso e exato para determinação de nitrato em água de abastecimento e em água de diálise, em atendimento às respectivas legislações, Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde¹⁸ e Resolução RDC nº 11/2014 da Anvisa⁴, desde que a concentração de íons cloreto na água sejam inferiores a 50 mg/L e apresenta limites de detecção e quantificação de

0,07 e 0,50 mg/L de nitrato, respectivamente. Os dados indicam que esse método é eficaz e pode auxiliar na avaliação da qualidade da água em programas como o PROAGUA e Programa Estadual de Monitoramento de Água Tratada para Diálise.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao Prof. Dr. Jaim Lichtig pelo incentivo no desenvolvimento desta metodologia.

REFERÊNCIAS

1. Bruning-Fann CS, Kaneene JB. The effects of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds on human health: a review. *Vet Hum Toxicol*.1993;35(6):521-38.
2. World Health Organization – WHO. Guidelines for drinking water quality. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 2011.
3. Simões M, Brígido BM, Mazon EMA, Pires MFC. Água de diálise: parâmetros físico-químicos na avaliação do desempenho das membranas de osmose reversa. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2005;64(2):173-8.
4. Brasil. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 11 de 13 de março de 2014. Dispõe sobre os requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os serviços de Diálise. *Diário Oficial [da] União*. Brasília, DF, 14 mar. 2014. Seção 1, nº 50. p.40-2.
5. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22th ed. Washington, DC: APHA; 2012.
6. Mazon EMA, Oliveira ACG, Brígido BM, Freitas VPS. Estudo comparativo de métodos para determinação de nitrato em águas para consumo humano. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2005;64(1):110-6.
7. Souto MAM, Okada MM, Okada IA, Dovidauskas S. A determinação de nitrato em águas por espectrofotometria UV: usos e precauções. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2006;65(1):66-69.
8. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo – Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4^a ed. [1^a ed. digital]. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008.
9. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO. DOQ-CGCRE-008 - Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos. Rio de Janeiro (RJ): Coordenação Geral de Acreditação; 2016.
10. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. NBR ISO/IEC 17025:2005. Requisitos gerais para a competência para laboratórios de ensaio e de calibração. Rio de Janeiro: ABNT; 2005.
11. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO. Vocabulário Internacional de Metrologia. Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados - VIM. 1^a ed. Luso Brasileira. Rio de Janeiro: Inmetro, 2012. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/inovacao/publicacoes/vim_2012.pdf].
12. Oliveira CC, Kira CS, Trujillo LM, Carvalho MFH, Caruso MSF, Silva AS et al. Incerteza de medição em ensaios físico-químicos: uma abordagem prática. 1^aed. São Paulo: SES-SP; 2015. 140p.
13. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. NBR ISO/IEC17034:2016. Requisitos Gerais para a competência de produtores de material de referência. Rio de Janeiro: ABNT; 2016.
14. Association of Official Analytical Chemists – AOAC. Official Methods of Analysis. Apêndix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. 19th ed. Washington: AOAC International; 2016. p.1-18. Disponível em: [http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf].
15. Codex Alimentarius Commission. Procedural Manual. 21th ed. Rome: World Health Organization-FAO-Food and Agriculture Organization of United Nation; 2013. Disponível em: [<http://www.fao.org/3/a-i3243e.pdf>].
16. Ellison, SLR, Williams A, editors. Eurachem/Citac Guide. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 3th ed. CITAC; 2012. Disponível em [https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf].
17. Rodrigues JFP. Otimização da incerteza da determinação, por cromatografia iônica, da composição maioritária e vestigial de soluções salinas [dissertação de mestrado]. Lisboa: Universidade de Lisboa; 2012. Disponível em: [http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/9226/1/ulfc104693_tm_Joana_Rodrigues.pdf].

18. Brasil. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 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] União. Brasília, DF, 14 dez 2011. Seção 1, nº 239. p.39-46.
19. Monteiro MIC, Ferreira FN, De Oliveira NMM, Ávila AK. Simplified version of the sodium salicylate method for analysis of nitrate in drinking waters. *Anal Chim Acta*. 2003;477:125-9.
20. Narayana B, Sunil K. A spectrophotometric method for the determination of nitrite and nitrate. *Eurasian J Anal Chem*. 2009;4(2):204-14.
21. Lopez-Moreno CP, Vieira I, Urbano AM. Validation of an ion chromatographic method for the quantification of anions in water. *Desalination*. 2010;261:111-6. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2010.05.022>].