

Determinação de NO₃ e N-NO₃ com utilização de metodologia alternativa: um estudo para análise de águas e efluentes industriais

Determination of NO₃ and N-NO₃ using alternative methodology: a study for the analysis of water and industrial effluents

Josiane A. M. Brilhante¹, Rosiene R. P. Meneghetti¹

¹ Laboratório de Ensaios de Meio Ambiente, ArcelorMittal Tubarão, Serra, 29163-970, Brasil

josiane.martins@arcelormittal.com.br; rosiene.meneghetti@arcelormittal.com.br

Resumo. Este trabalho reúne dados de um estudo de validação de metodologia alternativa para determinação de NO₃ e N-NO₃ em águas e efluentes industriais, os dados foram obtidos pela equipe que atua na verificação e validação de metodologias no Laboratório de Ensaios de Meio Ambiente, no período de janeiro de 2020 e março de 2021. O trabalho foi desenvolvido utilizando o método colorimétrico por Kit Hach Método 10206 TNT 835 e teve como objetivo demonstrar sua eficiência em amostras de águas e efluentes industriais, assegurando o mesmo desempenho apresentado em métodos normatizados.

Abstract. This work gathers data from a validation study of an alternative methodology for the determination of NO₃ and N-NO₃ in water and industrial effluents, the data were obtained by the team that works in the verification and validation of methodologies at the Environmental Testing Laboratory, from January 2020 to March 2021. The work was developed using the colorimetric method by Kit Hach Method 10206 TNT 835 and aimed to demonstrate its efficiency in samples of water and industrial effluents, ensuring the same performance presented in standardized methods.

1. Importância da análise de Nitrato (NO₃) e N-Nitrato (N-NO₃) em águas

A água é um recurso natural de grande relevância para a vitalidade de todos os seres vivos, monitorar e fazer a gestão do uso de modo responsável, requer um monitoramento contínuo e a utilização de técnicas analíticas que sejam reprodutíveis no âmbito geral de águas, contemplando a aplicação nas mais diversas matrizes de águas e sua complexidade, com abrangência dos diversos usos pretendidos, seja uso de abastecimento e potabilidade, tratamento de água residual ou reutilização no processo industrial.

Um dos maiores desafios para o laboratório, é assegurar a reprodutibilidade do ensaio analítico do método de referência, com tempo de resposta acessível para tomada de decisão.

O laboratório, LEMA, no âmbito de análises químicas tem realizado ao longo dos anos a implementação de métodos analíticos de kit's, comparando o seu desempenho com os métodos tradicionais de referência, como os métodos previstos no Standard Methods, que possui uma diversidade de metodologias de trabalho e técnicas que podem ser executadas com tempo de 1 hora ou até 8 horas, dependendo da complexidade da matriz.

A utilização de kit's vem como uma alternativa para a redução de tempo de análise, em contrapartida a implementação da metodologia, por possuir níveis de interferências que podem afetar seu desempenho na rotina de amostras de processo, se faz necessário que haja uma avaliação completa não só de confirmação de método, mas sim que haja avaliação comparativa com metodologia que já é referenciada de forma que possa assegurar a operacionalização do uso kit com eficiência de recuperação na matriz aplicada.

Em face dessa importância para operacionalização de métodos eficazes com otimização de tempo, o laboratório realizou no presente a confirmação de desempenho do método de nitrato colorimétrico nas matrizes ambientais de água bruta, água tratada, água para consumo humano e água residual. [1]

2. Metodologia

O laboratório selecionou o método colorimétrico – KIT TNT835, marca HACH para a determinação de Nitrato (NO_3) e N-Nitrato (N-NO_3). [2]

3. Parte Experimental

A validação analítica é um processo demorado, porém necessário que requer muitos ensaios e cálculos estatísticos. A validação analítica deve garantir a confiabilidade do método e seus resultados.

O laboratório realizou a validação do método com a avaliação dos parâmetros de linearidade, limite de detecção e quantificação, exatidão, repetibilidade, reprodutibilidade, precisão intermediária, estudo interlaboratorial e avaliação da contribuição da amostragem na incerteza de medição. Os critérios de aceitação, de acordo com INMETRO, são previstos no DOQ-CGCRE-008: Orientação geral sobre validação de métodos analíticos. [3]

3.1 Materiais e reagentes

Material de Referência Certificado: Solução de Nitrato (NO_3) concentração 1000mg/L CPA chem; Padrão Multielementos – Merck e espectrofotômetro, modelo UV/VIS HACH DR6000.

3.2 Linearidade

A Linearidade foi avaliada com a construção da curva analítica em 8 níveis de concentração uniformemente distribuídos na faixa de trabalho pretendida com 5 preparos independentes para cada ponto.

3.2.1 Critério de Aceitação

O coeficiente de determinação (R^2) é frequentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático. Notemos que o $0 \leq R^2 \leq 1$. Neste estudo, foi adotado como limite de $R^2 \leq 0,995$.

A verificação da ausência de valores aberrantes foi avaliada pelo teste de Grubbs. Critério de avaliação - Teste G (G crítico ($n=5$) = 1,715) e o coeficiente de variação CV(%) de cada ponto <10%.

Os resíduos foram avaliados graficamente com a observação da presença de comportamento aleatório. A homoscedasticidade (homogeneidade da variância dos resíduos) foi avaliada pelos testes de Cochran. O Critério de aceitação da Homogeneidade de variâncias é observado através dos valores obtidos para o C calculado em comparação com o C tabelado, ou seja, é considerado HOMOCEDÁSTICO quando o C calculado < C tabelado.

3.3 Limite de Detecção e Quantificação

Nesse estudo utilizou-se o método colorimétrico - KIT TNT835 (Hach) para a Determinação de Nitrato (NO₃) e N-Nitrato (N-NO₃) KIT TNT835, foram analisadas 10 replicatas de amostra de branco com adição do analito. Após, foi calculada a média e o desvio padrão dos dados.

O percentual de recuperação foi determinado conforme equação abaixo:

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

Onde:

C1 = concentração determinada na amostra adicionada,

C2 = concentração determinada na amostra não adicionada,

C3 = concentração adicionada.

Após, foi calculado a média e o desvio padrão dos dados.

O Limite de detecção foi calculado, conforme fórmula abaixo:

$$LD = 0 + t_{(n-1;1-\alpha)} \cdot S$$

$$LD = 0 + 2,821 \cdot S$$

Onde: S = desvio padrão dos brancos com adição de menor concentração aceitável do analito.

Limite de quantificação foi calculado, conforme fórmula abaixo:

$$LQ = 0 + 10 \cdot S$$

Onde: S = desvio padrão dos brancos com adição de menor concentração aceitável do analito.

3.3.1 Critério de Aceitação

O Limite de quantificação foi baseado na leitura da menor concentração (0,25 mg/L), de acordo com a curva proposta no método).

Recuperação

Analito (%)	Fração Mássica (C)	Unidade	Recuperação média (%)
100	1	100%	98 – 102
10	10-1	10%	98 – 102
1	10-2	1%	97 – 103
0,1	10-3	0,1%	95 – 105
0,01	10-4	100 ppm (mg/kg)	90 – 107
0,001	10-5	10 ppm (mg/kg)	80 – 110
0,0001	10-6	1 ppm (mg/kg)	80 – 110
0,00001	10-7	100 ppb (µg/kg)	80 – 110
0,000001	10-8	10 ppb (µg/kg)	60 – 115
0,0000001	10-9	1 ppb (µg/kg)	40 – 120

Fonte: AOAC, 2016

3.4 Exatidão/Tendência

Para avaliação da Exatidão, as amostras foram fortificadas com o analito em 3 diferentes concentrações (0,5 mg/L; 5,00 mg/L e 10,00 mg/L) com 10 replicatas independentes em cada faixa de concentração. Para avaliação do desempenho, foi avaliado o cálculo do Erro Relativo e a Recuperação das amostras. Erro Relativo (ER) – As amostras foram fortificadas com adição do analito nas concentrações: 0,50 mg/L; 5,00 mg/L e 10,00 mg/L.

$$ER = \frac{X_{\text{lab}} - X_v}{X_v} \cdot 100$$

Onde:

X_{lab} = valor obtido experimentalmente ou média aritmética de valores obtidos

X_v = valor aceito como verdadeiro (valor certificado do MRC)

Recuperação de Padrão (Spike) – As amostras foram fortificadas com adição do analito nas concentrações: 0,5 mg/L, 5,0 mg/L e 10,0 mg/L.

Foram fortificadas 10 amostras independentes com valores conhecidos do analito. O percentual de recuperação é determinado conforme equação abaixo:

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

Onde:

C1 = concentração determinada na amostra adicionada,

C2 = concentração determinada na amostra não adicionada,

C3 = concentração adicionada.

3.4,1 Critério de Aceitação

Erro Relativo

Critérios de aceitabilidade: < 5%

Recuperação

Analito (%)	Fração Mássica (C)	Unidade	Recuperação média (%)
100	1	100%	98 – 102
10	10-1	10%	98 – 102
1	10-2	1%	97 – 103
0,1	10-3	0,1%	95 – 105
0,01	10-4	100 ppm (mg/kg)	90 – 107
0,001	10-5	10 ppm (mg/kg)	80 – 110
0,0001	10-6	1 ppm (mg/kg)	80 – 110
0,00001	10-7	100 ppb (µg/kg)	80 – 110
0,000001	10-8	10 ppb (µg/kg)	60 – 115
0,0000001	10-9	1 ppb (µg/kg)	40 – 120

Fonte: AOAC, 2016

3.5 Repetibilidade

Considerando que o laboratório selecionou o método colorimétrico - KIT TNT835 (Hach) para a Determinação de Nitrato (NO₃) e N-Nitrato (N-NO₃) KIT TNT835, a repetibilidade foi calculada nas faixas 0,50 mg/L; 5,00 mg/L e 10,00 mg/L.

Para avaliação da Repetibilidade foram fortificadas 10 amostras independentes com branco reagente em 3 diferentes concentrações: 0,50 mg/L; 5,00 mg/L e 10,00 mg/L e analisadas individualmente por dois analistas em dias diferentes no total de 20 amostras por faixa, no mesmo instrumento de medição e nas mesmas condições em um curto período.

3.5,1 Critério de Aceitação

A repetibilidade é avaliada por meio do coeficiente de variação (CV%), conforme cálculo abaixo:

$$CV (\%) = (\text{desvio padrão} / \text{média}) \times 100$$

Os critérios de aceitação da repetibilidade encontram-se na tabela abaixo, levando em consideração os níveis de concentração, de acordo com as orientações da AOAC.

Analito %	Fração Mássica (C)	Unidade	DPR, %
100	1	100%	1,3
10	10-1	10%	1,9
1	10-2	1%	2,7
0,1	10-3	0,1%	3,7
0,01	10-4	100 ppm (mg/kg)	5,3
0,001	10-5	10 ppm (mg/kg)	7,3
0,0001	10-6	1 ppm (mg/kg)	11
0,00001	10-7	100 ppb (µg/kg)	15
0,000001	10-8	10 ppb (µg/kg)	21
0,0000001	10-9	1 ppb (µg/kg)	30

Fonte: AOAC, 2016

3.6 Reprodutibilidade

As amostras foram fortificadas com o analito em 3 diferentes concentrações (0,50 mg/L; 5,00 mg/L e 10,00 mg/L).

Para teste da Reprodutibilidade, foram analisadas 10 amostras por 2 analistas diferentes em dias diferentes. O cálculo para determinação da Reprodutibilidade levou em consideração a média das médias das determinações dos dois analistas e o desvio padrão médio para calcular o coeficiente de variação.

3.6.1 Critério de Aceitação

Os critérios de aceitação da Reprodutibilidade encontram-se na tabela abaixo, de acordo com as orientações da AOAC.

Analito, %	Fração Mássica (C)	Unidade	DPR predito, %
100	1	100%	2
10	10-1	10%	3
1	10-2	1%	4
0,1	10-3	0,1%	6
0,01	10-4	100 ppm (mg/kg)	8
0,001	10-5	10 ppm (mg/kg)	11
0,0001	10-6	1 ppm (mg/kg)	16
0,00001	10-7	100 ppb (µg/kg)	22
0,000001	10-8	10 ppb (µg/kg)	32
0,0000001	10-9	1 ppb (µg/kg)	45

Fonte: AOAC, 2016

3.7 Precisão Intermediária

Para teste da Precisão intermediária, foram analisadas 15 amostras por 2 analistas diferentes em dias diferentes. O cálculo para determinação da Precisão intermediária é indicado abaixo, onde devem ser calculados a média e o desvio padrão.

A estimativa da precisão intermediária $S_{i(j,k)}$, neste caso, é dada pela equação:

$$S_{i(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2}$$

Sendo:

n = nº de ensaios efetuados por amostra ou padrão;

y_k = cada resultado obtido;

\bar{y} = representa a média aritmética de cada resultado obtido.

Para avaliação da Precisão Intermediária, as amostras foram fortificadas com o analito em 3 diferentes concentrações (0,5 mg/L, 5,0 mg/L e 10,0 mg/L).

3.7.1 Critério de Aceitação

Os critérios de aceitação da Reprodutibilidade encontram-se na abaixo, de acordo com as orientações da AOAC. A variação entre os quinze dados, foi avaliada de acordo com a tabela abaixo:

Analito, %	Fração Mássica (C)	Unidade	DPR predito, %
100	1	100%	2
10	10-1	10%	3
1	10-2	1%	4
0,1	10-3	0,1%	6
0,01	10-4	100 ppm (mg/kg)	8
0,001	10-5	10 ppm (mg/kg)	11
0,0001	10-6	1 ppm (mg/kg)	16
0,00001	10-7	100 ppb (µg/kg)	22
0,000001	10-8	10 ppb (µg/kg)	32
0,0000001	10-9	1 ppb (µg/kg)	45

Fonte: AOAC, 2016

3.8 Estudo Interlaboratorial

Foi realizado ensaio de proficiência para a determinação do desempenho do laboratório através do AbsoluteGrade PT Program.

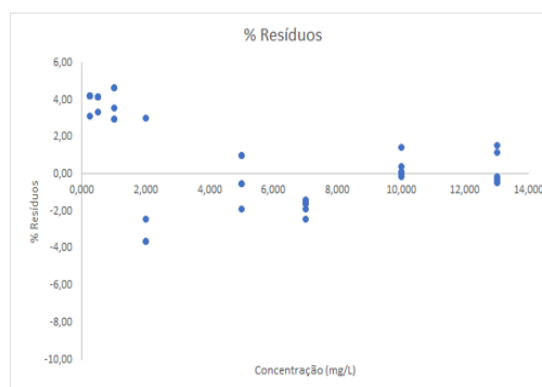
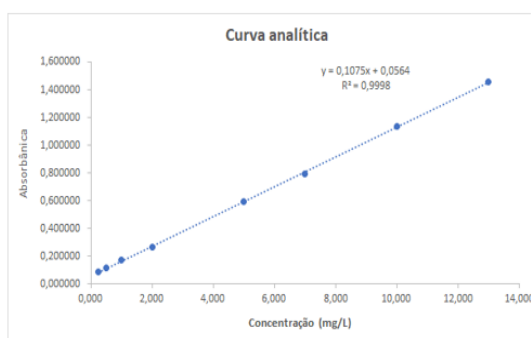
3.8.1 Critério de Aceitação

O desempenho do Ensaio de Proficiência é avaliado a partir da análise estatística dos resultados enviados, sendo definida a estimativa do valor de consenso (Low Limit e High Limit).

4. Resultados

4.1 Avaliação da linearidade

Pontos	Concentração	Abs	Desvio padrão da resposta analítica	Teste G (G _{crítico(n=5)} =1,715)	Valor Previsto (Teórico)	Resíduos	CV (%) das Abs	Teste Cochran	%Resíduos
1	0,25	0,0868	0	0,7154	0,08332	0,08332	0,005	0	4,00
2	0,5	0,1148	0	1,789	0,1102	0,0038	0,004	0	3,33
3	1	0,1704	0,002	0,923	0,16396	0,00504	0,009	0	2,98
4	2	0,2624	0,013	0,03	0,27147	-0,00947	0,05	0	-3,61
5	5	0,593	0,007	1,393	0,594	-0,011	0,012	0	-1,89
6	7	0,795	0,003	0,632	0,80902	-0,01202	0,004	0	-1,51
7	10	1,1358	0,007	1,705	1,13155	0,01645	0,006	0	1,43
8	13	1,4594	0,014	1,293	1,45408	0,02292	0,009	0	1,55
C calculado								0,413793	0,390928
C tabelado								0,431	0,391
HOMOCEDESTICO								Ccal<Ctab	0,391



RESULTADOS da análise da variância da regressão ANOVA

Avaliação da Significância da regressão (MQ Regressão/MQ Resíduos), utilizando os dados abaixo:

ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação	Significância da regressão
Regressão	1	9,28243822	9,28243822	90440,09006	8,92979E-66	SIGNIFICATIVO

Resíduo 38 0,00390018 0,000102636
Total 39 9,2863384

Foram realizados, para a avaliação da homogeneidade da variância dos resíduos, os Testes de Cochran (apresentado acima). Considerando que a curva foi planejada em oito níveis de concentração do analito e com cinco réplicas para cada nível, os testes demonstraram que as variâncias são homogêneas (homocedástico).

4.2 Limite de Quantificação

Os resultados obtidos para Estimativa do Limite de Quantificação estão mostrados abaixo:

Amostras	Valor Adicionado (mg/L)	Valor Encontrado (mg/L)	Recuperação	Recuperação Média	Situação
1	0,250	0,243	97,2%	104,4%	APROVADO
2		0,243	97,2%		
3		0,259	103,6%		
4		0,277	110,8%		
5		0,269	107,6%		
6		0,272	108,8%		
7		0,261	104,4%		
8		0,266	106,4%		
9		0,260	104,0%		
10		0,259	103,6%		

O limite de Detecção adotado pelo laboratório foi 0,032 mg/L obtido a partir da confirmação do LQ de 0,25 mg/L. O limite de quantificação foi confirmado pelo laboratório de 0,112 mg/L. Com a confirmação do Limite de quantificação obtido a partir do primeiro ponto da curva, o laboratório adotou como LQ praticável de 0,250 mg/L para N-NO₃ e 1,1071 mg/L para NO₃.

4.3 Exatidão

Os resultados obtidos por cada analista nas faixas de 0,50 mg/L, 5,0 mg/L e 10,0 mg/L encontram-se abaixo:

4.3.1 Resultados da Exatidão faixa baixa.

Amostra sem fortificação (mg/L)	Adição	Valor médio recuperado (10 replicatas)	Recuperação média	SITUAÇÃO	Erro Relativo %	SITUAÇÃO
0 mg/L	0,5 mg/L	0,510 mg/L	101,9%	APROVADO	1,92%	APROVADO

4.3.2 Resultados da Exatidão faixa média.

Amostra sem fortificação (mg/L)	Adição	Valor médio recuperado (10 replicatas)	Recuperação média	SITUAÇÃO	Erro Relativo %	SITUAÇÃO
0 mg/L	5 mg/L	4,975 mg/L	99,50%	APROVADO	0,50%	APROVADO

4.3.3 Resultados da Exatidão faixa alta.

Amostra sem fortificação (mg/L)	Adição	Valor médio recuperado (10 replicatas)	Recuperação média	SITUAÇÃO	Erro Relativo %	SITUAÇÃO
0 mg/L	10 mg/L	9,904 mg/L	99,00%	APROVADO	0,96%	APROVADO

5 Repetibilidade

Os resultados obtidos por cada analista nas faixas de 0,5 mg/L 5,00 mg/L e 10,00 mg/L encontram-se abaixo.

4.4.1 Resultados da Repetibilidade faixa baixa

Valor Nominal	Analista1 média (mg/L) 14/07/2021	Desvio	CV	Analista2 média (mg/L) 13/07/2021	Desvio	CV	SITUAÇÃO
0,5 mg/L	0,559	0,011	1,97%	0,548	0,006	1,15%	APROVADO

4.4.2 Resultados da Repetibilidade faixa média

Valor Nominal	Analista1 média (mg/L) 14/07/2021	Desvio	CV	Analista2 média (mg/L) 13/07/2021	Desvio	CV	SITUAÇÃO
5,0 mg/L	5,22	0,034	0,66%	5,08	0,044	0,87%	APROVADO

4.4.3 Resultados da Repetibilidade faixa alta

Valor Nominal	Analista1 média (mg/L) 14/07/2021	Desvio	CV	Analista2 média (mg/L) 13/07/2021	Desvio	CV	SITUAÇÃO
10 mg/L	10,21	0,0920	0,90%	10,01	0,067	0,66%	APROVADO

6 Reprodutibilidade

Considerando o mesmo procedimento de medição, o mesmo instrumento de medição e nas mesmas condições, em dias diferentes e com analistas diferentes. Após estas medições terem sido realizadas, foi calculado o coeficiente de variação (CV%) entre dois analistas. Os resultados obtidos por cada analista nas faixas (0,5 mg/L, 5,0 mg/L e 10,0 mg/L) encontram-se abaixo:

4.5.1 Resultados da Reprodutibilidade faixa baixa.

Analista1 Média (mg/L) 14/07/2021	Desvio	CV	Analista2 Média (mg/L) 13/07/2021	Desvio	CV	Média das médias (mg/L)	Desvio entre analistas	CV entre analistas	SITUAÇÃO
0,559	0,011	1,97%	0,548	0,006	1,15%	0,5535	0,0078	1,42%	APROVADO

4.5.2 Resultados da Reprodutibilidade faixa média.

Analista 1 Média (mg/L) 14/07/2021	Desvio	CV	Analista2 Média (mg/L) 13/07/2021	Desvio	CV	Média das médias (mg/L)	Desvio entre analistas	CV entre analistas	SITUAÇÃO
5,219	0,034	0,66%	5,082	0,044	0,87%	5,1502	0,0966	1,88%	APROVADO

4.5.3 Resultados da Reprodutibilidade faixa alta.

Analista 1 Média (mg/L) 14/07/2021	Desvio	CV	Analista2 Média (mg/L) 13/07/2021	Desvio	CV	Média das médias (mg/L)	Desvio entre analistas	CV entre analistas	SITUAÇÃO
10,21	0,092	0,90%	10,013	0,067	0,66%	10,1125	0,1407	1,39%	APROVADO

7 Precisão Intermediária

Após estas medições terem sido realizadas, foi calculado o coeficiente de variação (CV%) e o desvio padrão de precisão intermediária. Os resultados obtidos para cada faixa (0,5 mg/L, 5,0 mg/L e 10,0 mg/L) encontram-se abaixo:

4.6.1 Resultados da Precisão Intermediária faixa baixa.

Fator 1 Tempo	Fator 2 Analista	Média (mg/L)	Desvio Padrão	CV	Spi	SITUAÇÃO
14/07/2021; 13/07/2021	Analista1/2	0,549	0,007	1,30%	0,007	APROVADO

4.6.2 Resultados da Precisão Intermediária faixa média.

Fator 1 Tempo	Fator 2 Analista	Média (mg/L)	Desvio Padrão	CV	Spi	SITUAÇÃO
14/07/2021; 13/07/2021	Analista1/2	5,118	0,064	1,30%	0,064	APROVADO

4.6.3 Resultados da Precisão Intermediária faixa alta.

Fator 1 Tempo	Fator 2 Analista	Média (mg/L)	Desvio Padrão	CV	Spi	SITUAÇÃO
14/07/2021; 13/07/2021	Analista1/2	10,055	0,084	0,80%	0,084	APROVADO

8 Estudo Interlaboratorial

Resultados do Programa de Ensaio de Proficiência:

Mês/ano de Realização	Provedor	Código do Laboratório	Ensaio	Método	Resultado do LEMA	Estimativa do valor real	Limite inferior	Limite superior	Desempenho
SET/2020	AbsoluteGrad e PT Program	1408	N-Nitrate	TNT 835	13,2 mg/L	13,4 mg/L	11,1 mg/L	15,6 mg/L	SATISFATÓRIO

5. Considerações Finais

A utilização do método colorimétrico – KIT TNT835, marca HACH para a determinação de Nitrato (NO_3) e N-Nitrato (N-NO_3) em águas foi validado de acordo com as orientações do INMETRO. O método apresentou linearidade satisfatória ao longo de uma ampla faixa linear de trabalho com alta sensibilidade e limites de detecção e quantificação baixas atendendo a legislação ambiental brasileira.

O método apresentou boa seletividade com boa precisão e exatidão demonstrando atendimento mesmo na presença de interferentes. O preparo da amostra e as condições laboratoriais foram provados controlados e sem contaminação ou perda do analito. O método de preparação das amostras foi muito eficiente, apresentando resultados exatos e precisos com baixo tempo de execução. Sendo assim, o método é válido e apresenta fácil implementação e aplicabilidade.

Referências

- [1] APHA. Standard Methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 24 ed. Washington. 2022.
- [2] ARMSTRONG, F.A.J. Determination of nitrate in water by ultraviolet spectrophotometry. Anal. Chem., 35: p 1292 -1294. 1963.
- [3] INMETRO. Coordenação Geral de Acreditação. DOQ-CGCRE-008: Orientação geral sobre validação de métodos analíticos. Rio de Janeiro, abr. 2020. 31p. Revisão n.09