

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**

**Coordenação de Engenharia Química/CCET**

Trabalho de Conclusão de Curso - TCC



**CAMILA DOS SANTOS COSTA**

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA  
DETERMINAÇÃO DE NITRATO EM ÁGUAS E EFLUENTES**

São Luís

2021

**CAMILA DOS SANTOS COSTA**

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA  
DETERMINAÇÃO DE NITRATO EM ÁGUAS E EFLUENTES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado de Curso da Engenharia Química do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do diploma de Graduação em Engenharia Química.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Annamaria D. S. Vidotti

São Luís

2021

Costa, Camila.

Validação de Metodologia Analítica para Determinação de Nitrato em Águas e Efluentes / Camila Costa. - 2022.

82 p.

Orientador(a): Annamaria Vidotti.

Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2022.

1. Metahemoglobinemia. 2. Nitrato. 3. Validação analítica. I. Vidotti, Annamaria. II. Título.

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> ANNAMARIA D. S. VIDOTTI  
Orientadora – DEEQ/CCET/UFMA

Prof. Dr. ANTÔNIO CARLOS DALTRO DE FREITAS  
DEEQ/CCET/UFMA

Prof. Dr. VALTER NUNES TRINDADE JÚNIOR  
DEEQ/CCET/UFMA

**10 de janeiro de 2022**

**DADOS CURRICULARES****Camila dos Santos Costa**

**NASCIMENTO** 01/11/1995 – SÃO LUÍS / MA

**FILIAÇÃO** Laura Rosa Mesquita Dos Santos  
Luzanero Martins Costa

**2014/2021** Curso de Graduação  
Engenharia Química - Universidade Federal do Maranhão

*Dedico este trabalho com amor e gratidão ao meu bom Deus e aos meus queridos pais.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, em sua Santíssima Trindade, por me conceder tudo o que foi necessário para completar mais essa etapa da minha vida. Obrigada por me abençoar todos os dias com Seu amor infinito!

À Nossa Senhora, por me ouvir e colocar fé e esperança no meu coração nos momentos mais difíceis. Obrigada por sempre me conduzir ao Teu filho!

Aos meus pais, Laura e Luzaniro, e meus irmãos, Raul e Victor, pelo que sou, por acreditarem em mim e por todo sacrifício feito para que esse e muitos outros sonhos fossem realizados. Eu não conseguiria sem vocês!

À minha família, pelo apoio incondicional e participação ativa para que eu continuasse determinada a alcançar mais essa meta. Nunca vou esquecer tudo que vocês fizeram por mim!

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Annamaria D. S. Vidotti, por sua orientação, dedicação, paciência e confiança em mais um projeto desenvolvido. Seus valiosos direcionamentos foram essenciais durante todos esses anos!

Aos meus amigos e parceiros de pesquisa, Laís e Gabriel, por serem bons ouvintes das minhas lamentações, pelo acolhimento nos momentos alegres e tristes e por serem fonte contínua de apoio, incentivo e alegria. Vocês tornaram a caminhada mais leve e divertida!

Aos meus amigos de graduação Júlio César, Dandara, Lucas, Luís Germano (*In memoriam*), Anne, Ana Letícia, Simara e Roberta, por todas as vezes que estiveram ao meu lado. Poder contar com vocês fez toda a diferença!

Aos professores participantes dessa banca, Antônio Freitas e Valter Trindade, e a todos os professores que encontrei durante a graduação, por transmitirem não só o conhecimento, mas tudo que puderam para tornar possível esse sonho tão especial. Vocês me fizeram acreditar que era possível!

À toda equipe do Laboratório Acqua, em especial ao Alex e à Byanca, por me receberem tão bem durante o estágio e por concederem toda a estrutura e conhecimento necessário para realização deste trabalho. Obrigada por não medirem esforços nesse momento tão importante!

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

*Madre Tereza de Calcutá*



COSTA, C. S. **Validação de metodologia analítica para determinação de nitrato em águas e efluentes**. 2021. 77f. Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia Química do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2021.

## RESUMO

Estudos sobre métodos de determinação de nitrato tornam-se cada vez mais relevantes em decorrência das elevadas concentrações desse elemento que tem sido encontradas nos corpos hídricos e sua associação a indução de doenças como a metahemoglobinemia (síndrome do bebê azul). Um dos requisitos fundamentais para a escolha de um método viável e eficiente para essa determinação é garantir que o mesmo forneça resultados confiáveis e interpretáveis, o que pode ser feito por uma avaliação denominada Validação de Metodologia Analítica. A partir disso, o objetivo do presente trabalho foi submeter o método espectrofotométrico 8171 da HACH ao processo de validação analítica para verificar sua aplicabilidade para determinação de nitrato. Para isso, Materiais de Referência Certificados bem como amostras de diferentes matrizes (água potável, água superficial e efluente) foram analisados para estabelecer os parâmetros de validação: linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão, seletividade, robustez, efeito matriz e incerteza. O método apresentou linearidade na faixa de 0,20 a 10,00 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L com coeficiente de correlação e determinação de 0,999 e 0,998, respectivamente. O valor do limite de quantificação foi 0,22 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. Na avaliação da precisão, os coeficientes de variação foram de 3,36 e 3,71%. Para a exatidão, obtiveram-se taxas de recuperação de 92,00; 99,70; 99,45% para as respectivas concentrações: 0,50; 5,00; 10,00 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. Nos ensaios para averiguação da seletividade, robustez e avaliação do efeito matriz foram atingidas taxas de recuperação de 90,50 e 90,25% para água potável e efluente, nessa ordem. Já para água superficial obtiveram-se taxas de recuperação entre -24,00 e 47,40%. Por fim, o grau de incerteza resultante foi de 0,066 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. Através do estudo de validação, realizado conforme preconizado por agências reguladoras como a ANVISA e o INMETRO, foi possível comprovar a adequabilidade do método espectrofotométrico para quantificação de nitrato principalmente para água potável e efluente.

**Palavras-chave:** validação analítica, nitrato, metahemoglobinemia.

COSTA, C. S. **Validation of analytical methodology for determination of nitrate in water and effluents**. 2021. 77f. Graduate Work (Graduate in Chemical Engineering) – Curso de Engenharia do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2021.

### ABSTRACT

Studies about nitrate determination methods become increasingly relevant due to the high concentrations of this element that has been found in water bodies and its association with induction of diseases such as methemoglobinemia (blue baby syndrome). One of the fundamental requirements for choosing an efficient method for this determination is to ensure that it provides reliable and interpretable results, which can be done by an evaluation called Validation of Analytical Methodology. From that, the objective of the present work was to submit the HACH 8171 spectrophotometric method to the process of analytical validation to verify its applicability to nitrate determination. For this, Certified Reference Materials diluted as well as samples from different matrices (drinking water, surface water and effluent) were analyzed to establish the validation parameters: linearity, quantification limit, precision, accuracy, selectivity, robustness, matrix effect and uncertainty. The method presented linearity in the range of 0.20 to 10.00 mgN NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L as a correlation and determination coefficient of 0.999 and 0.998, respectively. The limit of quantification value was 0.22 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. In the evaluation of precision, the coefficients of variation of 3.36 and 3.71%. For accuracy, recovery rates of 92.0; 99.7; 99.4.0% were obtained for the respective concentrations: 0.50; 5.00; 10.00 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. In the tests to verify the selectivity, robustness and evaluation of the matrix effect, recovery rates of 90.50 and 90.25% were obtained for drinking water and effluent, in that order. For surface water, recovery rates between -24.00 and 47.40% were obtained. Finally, the degree of uncertainty obtained was 0.066 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. Through the validation study, carried out as recommended by regulatory agencies such as ANVISA and INMETRO, it was possible to prove the suitability of the spectrophotometric method for nitrate quantification, mainly for drinking water and effluent.

**Keywords:** analytical validation, nitrate, methemoglobinemia

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Representação esquemática do íon nitrato .....	7
Figura 2 - Esquema representativo da absorção da radiação eletromagnética $I_0$ ao atravessar a célula de percurso óptico $l$ .....	9
Figura 3 - Esquema representativo dos componentes básicos de um espectrofotômetro.....	11
Figura 4 – Desenvolvimento da coloração âmbar em amostra com nitrato .....	12
Figura 5 – Sachê do reagente NitraVer5® (frente e verso) .....	30
Figura 6 - Espectrofotômetro HACH DR 3900.....	31
Figura 7 – Fluxograma de execução do método HACH .....	32
Figura 8 - Curva de calibração .....	37
Figura 9 - Gráfico de resíduos da curva de calibração .....	38

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Valores Máximos Permitidos para N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> segundo a legislação vigente .....	8
Tabela 2 - Dados da preparação dos padrões de calibração .....	33
Tabela 3 - Dados utilizados para construção da curva de calibração .....	36
Tabela 4 - Dados do cálculo de resíduos da curva de calibração .....	38
Tabela 5 - Desvio padrão residual das funções de calibração linear e não linear .....	39
Tabela 6 - Resultados obtidos no teste de Mandel .....	39
Tabela 7 - Resultados da estimativa do limite quantificação .....	40
Tabela 8 - Dados da determinação da precisão do método .....	42
Tabela 9 - Resultados do Teste F e T para precisão .....	43
Tabela 10 - Dados dos ensaios de exatidão para 3 níveis de concentração de nitrato.....	44
Tabela 11 - Resultados do teste T para exatidão .....	45
Tabela 12 - Dados do ensaio de recuperação para avaliação da Seletividade e Robustez .....	46
Tabela 13 - Dados da repetição do ensaio de recuperação para água superficial.....	47
Tabela 14 - Resultados do teste T para Seletividade e Robustez .....	48
Tabela 15 - Dados da estimativa da incerteza padrão associada a precisão do método .....	50
Tabela 16 - Dados da incerteza padrão associada a diluição das soluções utilizadas nos ensaios de recuperação .....	50
Tabela 17 - Dados da estimativa da incerteza padrão associada a exatidão do método.....	51
Tabela 18 – Dados da estimativa da incerteza combinada e expandida da medição.....	51

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APHA	American Public Health Association
AWWA	American Water Works Association
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CGCRE	Coordenação Geral de Acreditação
CODEX	Alimentarius Commission on Methods of Analysis and Sampling
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CV	Coeficiente de Variação
GL	Graus de liberdade
IEC	International Electrotechnical Commission
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IPAC	Instituto Português de Acreditação
ISSO	Internacional Organization for Standardization
LQ	Limite de Quantificação
MRC	Material de Referência Certificado
MR	Material de Referência
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
VPM	Valores Máximos Permitidos
WEF	Water Environment Federation
WHO	World Health Organization

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\text{NO}_3^-$	Nitrato
$\text{N-NO}_3^-$	Nitrato expresso como nitrogênio
$A$	Absorbância
$\lambda$	Comprimento de onda
$I_0$	Intensidade da radiação monocromática que incide na amostra
$I$	Intensidade da radiação transmitida pela amostra
$\varepsilon$	Absortividade molar
$c$	Concentração da espécie absorvente
$l$	Distância percorrida pela radiação eletromagnética através da amostra
$x_F$	Concentração da amostra fortificada com padrão
$x_{SF}$	Concentração da amostra sem fortificação do padrão
$x_p$	Incremento de concentração esperado pela adição do padrão
$VT_{T1}$	Valor teste do teste T de Student para médias das taxas recuperação
$\bar{R}$	Média das taxas de recuperação
$\mu_{100}$	Recuperação percentual desejada (100%)
$s_R$	Desvio padrão das recuperações
$n$	Número de amostras ensaiadas
Tcrítico	Valor crítico da distribuição de Student
GL	Graus de liberdade
$\gamma$	Nível de confiança
$y$	Resposta instrumental (absorbância)
$x$	Concentração
$a$	Coefficiente linear
$b$	Coefficiente angular
$r$	Coefficiente de correlação
$r^2$	Coefficiente de determinação
$DS^2$	Diferença entre variâncias
$s_{i1}$	Desvio padrão residual da função de calibração linear

$s_{i2}$	Desvio padrão residual da função de calibração não linear
$y_i$	Valores individuais de sinal instrumental (absorbância)
$\bar{y}_{i1}$	Sinal estimado pela função de calibração linear (absorbância)
$\bar{y}_{i2}$	Sinal estimado pela função de calibração não linear (absorbância)
$N_L$	Número de níveis de concentração
$VT_M$	Valor teste do teste de Mandel
LQ	Limite de quantificação
S	Desvio padrão
$\bar{x}_B$	Média dos valores de concentração do branco
$x_i$	Concentração individual por ensaio
$\bar{x}$	Concentração média determinada
CV	Coefficiente de variação
$VT_F$	Valor teste do Teste F para variância
$s_i^2$	Maior variância obtida dos ensaios para precisão
$s_j^2$	Menor variância obtida dos ensaios para precisão
Fcrítico	Valor crítico da distribuição de Fisher
$VT_{T2}$	Valor teste do Teste T para precisão
$\bar{\mu}_i$	Média para grupo i dos ensaios de precisão
$\bar{\mu}_j$	Média para grupo j dos ensaios de precisão
$s_i^2$	Variância padrão do grupo i dos ensaios de precisão
$s_j^2$	Variância padrão do grupo j dos ensaios de precisão
$n_i$	Número de amostras ensaiadas para do grupo i dos ensaios de precisão
$n_j$	Número de amostras ensaiadas para do grupo j dos ensaios de precisão
$s_T$	Desvio padrão total para os grupos dos ensaios de precisão
$s_i^2$	Variância padrão do grupo i dos ensaios de precisão
$s_j^2$	Variância padrão do grupo j dos ensaios de precisão
$n_i$	Número de amostras ensaiadas para do grupo i dos ensaios de precisão
$n_j$	Número de amostras ensaiadas para do grupo j dos ensaios de precisão
ER	Erro relativo
$E_n$	Erro normalizado

$x_{lab}$	Valor ou média dos valores de concentração obtidos experimentalmente
$x_v$	Valor admitido como verdadeiro (valor certificado do MRC)
$U_{lab}$	Incerteza associada ao resultado obtido experimentalmente
$U_{ref}$	Incerteza associada ao MRC
$u_{precisão}$	Incerteza padrão associada a precisão
$s_{padrão}$	Desvio padrão de uma série de ensaios do padrão de controle
$u_{exatidão}$	Incerteza padrão associada à exatidão
$u(\bar{R}_m)$	Incerteza padrão associada à recuperação média do analito
$\bar{R}_m$	Taxa de recuperação média dos ensaios de recuperação
$s_{obs}$	Desvio padrão associado às concentrações das amostras fortificadas
$s_{nativa}$	Desvio padrão associado às concentrações das amostras não fortificadas
$\bar{C}_{obs}$	Concentração média das amostras fortificadas
$\bar{C}_{nativa}$	Concentração média das amostras não fortificadas
$n_R$	Número de ensaios de recuperação;
$u_{fortificação}$	Incerteza padrão associada à concentração da fortificação
$C_{fortificação}$	Concentração da fortificação
$u_{dil}$	Incerteza padrão associada a concentração da solução diluída
$C_{dil}$	Concentração de solução diluída
$u_{conc}$	Incerteza padrão associada a solução concentrada
$C_{conc}$	Concentração de solução concentrada
$u_{V_i}$	Incerteza padrão associada ao volume inicial
$V_i$	Volume inicial, isto é, volume da solução concentrada
$u_{V_f}$	Incerteza padrão associada ao volume final
$V_f$	Volume final, isto é, volume da solução diluída
$u_c$	Incerteza combinada
$u_{precisão}$	Incerteza padrão associada a precisão
$u_{exatidão}$	Incerteza padrão associada a exatidão
$x_{padrão}$	Concentração do padrão
$U$	Incerteza expandida



$k$	Fator de expansão
$u_c$	Incerteza combinada
$\mathcal{V}_{eff}$	Graus de liberdade efetivos
$u_i$	componentes individuais da incerteza combinada

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS .....</b>	<b>XII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Objetivos específicos.....</b>	<b>3</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
<b>3.1 Água.....</b>	<b>4</b>
<b>3.2 Controle de Qualidade da Água .....</b>	<b>5</b>
3.2.1 LEGISLAÇÕES VIGENTES.....	5
3.2.1.1 Resoluções CONAMA .....	5
3.2.1.2 Portaria de Consolidação nº 5 .....	6
<b>3.3 Contaminação da água por nitrato .....</b>	<b>7</b>
<b>3.4 Determinação de nitrato .....</b>	<b>9</b>
3.4.1 ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL.....	9
3.4.2 COLORIMETRIA .....	11
3.4.3 MÉTODO REDUÇÃO DE CÁDMIO .....	11
3.4.3.1 Método HACH .....	11
<b>3.5 Validação de Metodologia Analítica .....</b>	<b>13</b>
3.5.1 SELETIVIDADE .....	15
3.5.2 LINEARIDADE/FAIXA DE TRABALHO.....	16
3.5.3 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO .....	19
3.5.4 PRECISÃO.....	20
3.5.5 EXATIDÃO .....	23
3.5.6 ROBUSTEZ .....	24
3.5.7 INCERTEZA.....	25
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>

<b>4.1 Local da pesquisa.....</b>	<b>30</b>
<b>4.2 Materiais.....</b>	<b>30</b>
<b>4.3 Instrumentos/equipamentos/softwarees .....</b>	<b>31</b>
<b>4.4 Análises, métodos e procedimentos experimentais.....</b>	<b>32</b>
4.4.1 QUANTIFICAÇÃO DE NITRATO PELO MÉTODO HACH .....	32
4.4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO .....	32
4.4.2.1 Linearidade .....	32
4.4.2.2 Limite de Quantificação .....	32
4.4.2.3 Precisão.....	32
4.4.2.4 Exatidão .....	32
4.4.2.5 Efeito Matriz (seletividade/robustez) .....	32
4.4.2.6 Incerteza de medição .....	32
<b>4.5 Análise estatística.....</b>	<b>35</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>5.1 Validação do método .....</b>	<b>36</b>
5.1.1 LINEARIDADE .....	36
5.1.2 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO .....	40
5.1.3 DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO .....	41
5.1.4 DETERMINAÇÃO DA EXATIDÃO DO MÉTODO.....	44
5.1.5 ESTUDO DO EFEITO MATRIZ (SELETIVIDADE E ROBUSTEZ).....	46
5.1.6 DETERMINAÇÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO .....	49
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A água é um recurso natural indispensável à vida humana, animal e vegetal. No entanto, apesar de estar presente de forma abundante nos oceanos, rios e mares, sua distribuição ocorre de forma desigual. Estima-se que, do total de água do planeta, há apenas 2,5% de água doce disponível. Além disso, essa água doce própria para o consumo está se tornando mais escassa devido à problemas de desperdício e contaminação cada vez mais frequentes nas bacias hidrográficas (CETESB, 2018; COSTA, 2016; DERISIO, 2012; SIQUEIRA, 2016; SPERLING, 2014).

Nesse cenário, o controle de qualidade da água tornou-se fundamental na tentativa de assegurar os padrões mínimos para o consumo e utilização desse recurso. Para isso, os poderes públicos buscaram implementar sistemas de gestão de qualidade que utilizam como principal ferramenta legislações e normas técnicas. No Brasil, as resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) e as Portarias do Ministério da Saúde definem, entre outros tópicos, parâmetros de avaliação da qualidade bem como seus respectivos Valores Máximos Permitidos (VPM) conforme a utilização da água (ALLEY, 2000; ALVES; MENDES, 2010; BRASIL, 2005; BRASIL, 2011a; BRASIL, 2008; BRASIL, 2017a).

Dentre os parâmetros presentes nas legislações, o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) é um dos principais alvos nos processos de monitoração devido às concentrações potencialmente nocivas em que tem sido encontrado em diversos corpos hídricos, principalmente águas subterrâneas. Essas elevadas concentrações decorrem principalmente de atividades antrópicas, como lançamento de efluentes, e representam risco para os ecossistemas aquáticos, ocasionando a eutrofização, bem como para saúde humana, uma vez que estão associadas a indução de doenças como a metahemoglobinemia (síndrome do bebê azul) (ALMEIDA, 2012; ESTEVES, 2011; QUEIROZ, 2015; VIEIRA, 2017).

Um dos grandes desafios no monitoramento do nitrato é que sua determinação pelos métodos convencionais requer processos relativamente complexos. Em meio às técnicas mais utilizadas, a espectrofotometria associada a análise colorimétrica é uma das mais viáveis por seu baixo custo e praticidade. Alguns métodos que fazem uso dessa técnica se baseiam no princípio de redução por cádmio, como é o caso do teste NitraVer5® (método 8171) da marca HACH aplicável às águas e efluentes. Esse método, no entanto, é suscetível a interferência de alguns elementos como os íons cloretos e nitritos, além dos fatores de desempenho na rotina de laboratório (ALMEIDA, 2012; VIEIRA, 2017; APHA; AWWA; WEF, 2012; HACH, 2021).

Haja vista as inferências às quais o método está suscetível, faz-se necessário demonstrar sua capacidade de fornecer resultados confiáveis nas condições em que é praticado através de uma avaliação de desempenho denominada Validação de Metodologia Analítica. Trata-se de um processo essencial que auxilia sobretudo na tomada de decisões seguras acerca de produtos e serviços oferecidos. Para orientar esse processo no Brasil, órgãos como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia elaboram diretrizes e definem parâmetros a serem avaliados conforme a área de aplicação do método (BRASIL, 2017c; BRASIL, 2017b; BRASIL, 2020; COELHO *et al.*, 2018; WHO, 1992).

Nesse contexto, o presente trabalho busca demonstrar o processo de validação analítica para o método espectrofotométrico HACH de quantificação de nitrato em águas e efluentes. Tal estudo permitirá a análise da implementação de um método mais simples e viável para determinação desse composto na rotina de laboratório.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Validar metodologia analítica para detecção e quantificação de nitrato em águas e efluentes por meio da espectrofotometria associada a análise colorimétrica.

### 2.1 Objetivos específicos

- Conhecer e demonstrar a aplicabilidade do método espectrofotométrico 8171 da HACH para detecção e quantificação de nitrato em Materiais de Referência Certificados (MRC), Materiais de Referência (MR) e amostras com matrizes do tipo água potável, água superficial e efluente;
- Calcular os parâmetros de validação analítica linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão, seletividade, robustez, efeito matriz e incerteza com base nos dados encontrados experimentalmente;
- Avaliar estatisticamente os parâmetros de validação analítica obtidos seguindo as principais orientações do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA);
- Comparar as concentrações determinadas para as amostras de diferentes matrizes com os Valores Máximos Permitidos (VPM) recomendados pelas Resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) e pela Portaria de Consolidação nº5 do Ministério da Saúde.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Água

A água é um recurso natural indispensável à vida humana, animal ou vegetal. Trata-se de um elemento químico muito abundante no planeta, estando presente nos rios, oceanos, mares e geleiras, e é o constituinte inorgânico mais encontrado na matéria viva (SIQUEIRA, 2016; SPERLING, 2014). Além do papel estruturante que tem no organismo humano, a água intervém em numerosos metabolismos e possui ainda sais e nutrientes dissolvidos que são essenciais à vida; como o cálcio, ferro, sódio, potássio, cloretos e nitrogênio (SMUSKIEWICZ, 2008 *apud* ALMEIDA, 2012).

A utilização desse recurso pelo homem visa, além de suas necessidades pessoais, o desenvolvimento da produção agrícola, industrial e do comércio e está associada inclusive a valores culturais e religiosos da sociedade. (DE SOUZA *et al.*, 2014 *apud* MELLO; OLIVO, 2016; PASCHOAL, 2012). No entanto, sua distribuição sobre o planeta ocorre de forma desigual. Estima-se que a água doce disponível seja de apenas 2,53% do total de água do planeta e, desse valor, 68,70% correspondem às geleiras e coberturas de neve, 31,01% são as águas subterrâneas (nascentes naturais e poços) e 0,29% correspondem às águas superficiais (rios e lagos) (CETESB, 2018).

Além da quantidade, a qualidade da água é outro aspecto de extrema importância quando se busca assegurar seu uso para as diversas finalidades existentes. Tendo em vista isso, é essencial compreender a necessidade de preservação desse recurso no planeta, principalmente a água doce própria para o consumo humano que está se tornando cada dia mais escassa devido a problemas de desperdício e sobretudo de contaminação que são encontrados com frequência nos mananciais (COSTA, 2016; DERISIO, 2012; SILVA, 2015).

A poluição das águas é realizada através da adição de substâncias que, direta ou indiretamente, alteram sua natureza prejudicando o seu uso e o seu consumo. Atualmente existem inúmeras fontes de poluição e, dentre elas, as principais são provenientes das descargas industriais, de águas residuais de origem urbana, de esgotos sanitários, do uso de pesticidas e fertilizantes na agricultura e do descarte incorreto do lixo (SILVA, 2015).

Nesse contexto, o controle da qualidade da água tornou-se fundamental. Trata-se de uma ferramenta que não se atém necessariamente a um estado de pureza, mas às características que a água apresenta, no intuito de assegurar os padrões mínimos de qualidade de acordo com os fins a que se destina (ALLEY, 2000; MERTEN; MINELLA, 2002).

## 3.2 Controle de Qualidade da Água

A qualidade da água é influenciada tanto pelas condições naturais, como escoamento superficial e infiltração, quanto pelas ações antrópicas. A análise da influência desses dois fatores leva em consideração as características físicas, microbiológicas e químicas que a mesma apresenta (YASUI, 2015).

As características físicas da água são aquelas que podem ser “percebidas” pelos sentidos humanos como cor, turbidez, temperatura, odor, sabor e sólidos totais dissolvidos. As características microbiológicas referem-se à composição dos organismos presentes como Bactérias Heterotróficas e Coliformes Totais. Já as características químicas referem-se aos teores quantitativos e qualitativos das substâncias que a compõe, como pH e alcalinidade, dureza, demanda bioquímica de oxigênio, oxigênio dissolvido, ferro, cloretos, cloro, fosfatos, série nitrogenada etc. (ROBERTO, 2018; SIQUEIRA, 2016; YASUI, 2015).

Utilizando essas características como parâmetros a serem observados para que o uso da água seja viável e seguro, os poderes públicos dos países buscaram implementar sistemas de gestão de qualidade da água no intuito de permitir a ocupação das bacias hidrográficas e o uso desse recurso natural com uma expectativa socialmente aceitável do risco de degradação (ALVES; MENDES, 2010; YASUI, 2015).

Para isso, esses sistemas de gestão utilizam, entre outras ferramentas, legislações que possam ser aplicadas de forma a assegurar os limites naturais para as características das bacias hidrográficas. No que diz respeito ao Brasil, o primeiro documento legal que faz referência aos recursos hídricos é o Código de Águas de 1934. A partir dele criou-se uma base legal consistente com documentos importantes relacionados a classificação, tratamento e a qualidade da água, como as Resoluções do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) e as Portarias do Ministério da Saúde (ASSEITUNO, 2016; SIQUEIRA, 2016).

### 3.2.1 LEGISLAÇÕES VIGENTES

#### 3.2.1.1 Resoluções CONAMA

A Resolução CONAMA nº 357 de 17 de março de 2005 classifica os corpos de águas superficiais em diferentes categorias e dispõe sobre as diretrizes ambientais para seu enquadramento, além de indicar para quais finalidades determinados corpos hídricos podem ser utilizados. De acordo com essa resolução, os corpos de água são classificados com base no grau



de salinidade em águas doces, salobras e salinas e, dentro dessa classificação, são divididas em 13 categorias de usos preponderantes (BRASIL, 2005).

Alterando parcialmente e complementando a Resolução CONAMA nº 357, a Resolução CONAMA nº 430 de 13 de maio de 2011 dispõe sobre condições e diretrizes para gestão do lançamento de efluentes em corpos de água receptores. De acordo com essa Resolução, os efluentes não poderão conferir ao corpo receptor características de qualidade em desacordo com as metas obrigatórias do seu enquadramento definido na CONAMA nº 357 (BRASIL, 2011a).

A Resolução CONAMA nº 396 de 3 de abril de 2008 dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento, prevenção e controle da poluição das águas subterrâneas. Nessa Resolução, o enquadramento dos corpos de água é baseado nas características hidrogeológicas, hidrogeoquímicas e nos usos preponderantes dos aquíferos, resultando em um total de 6 classes (BRASIL, 2008).

Para monitorar a qualidade da água e definir o enquadramento dos corpos hídricos, essas Resoluções estabelecem um conjunto de parâmetros associados às características da água e, para cada um deles, determina Valores Máximos Permitidos (VPM) em cada uma das classes de enquadramento, exceto para as classes especiais nas quais deverão ser mantidas as condições naturais do corpo de água. Esses parâmetros devem ser monitorados periodicamente pelo órgão competente, obedecendo a frequência de monitoramento estabelecida, e os resultados devem ser analisados estatisticamente com as incertezas de medição consideradas (BRASIL, 2005; BRASIL, 2008; BRASIL, 2011a).

#### 3.2.1.2 Portaria de Consolidação nº5

A Portaria de Consolidação nº 5 compõe um conjunto de seis Portarias de Consolidação dos Atos Normativos do Ministério da Saúde publicadas em 03 de outubro de 2017 e trata da consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Essa Portaria, no Anexo XX, dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, além de estabelecer os órgãos responsáveis por controlar as análises feitas de acordo com o tipo de abastecimento (BRASIL, 2017a).

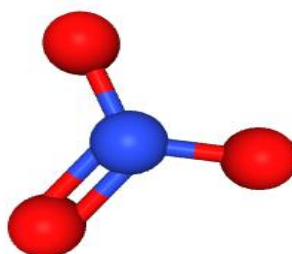
De maneira análoga às Resoluções CONAMA, a Portaria nº 5 estabelece também Valores Máximos Permitidos (VPM) para cada parâmetro a ser analisado para a conclusão de potabilidade da água (BRASIL, 2017a). Dentre os parâmetros estabelecidos pela Portaria do Ministério da Saúde e pelas Resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente, o nitrato

(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) tem sido alvo recorrente de estudos e processos de monitoração devido a sua presença em concentrações potencialmente nocivas em inúmeros corpos hídricos (SPERLIG, 2014).

### 3.3 Contaminação da água por nitrato

O nitrato é um ânion com 62,004 g/mol de massa molecular cuja estrutura é composta por um átomo de nitrogênio no centro cercado por três átomos de oxigênio idênticos, como ilustra a Figura 1 (MORAES, 2019; PUBCHEM, 2021).

Figura 1 – Representação esquemática do íon nitrato



Fonte: PUBCHEM (2021).

Além das fontes naturais de obtenção através do ciclo do nitrogênio, a presença do nitrato nas águas está associada também às atividades antrópicas como: lançamento de esgotos sanitários e efluentes industriais sem tratamento prévio nos corpos hídricos, escoamento pluvial pelos solos nos quais são utilizados fertilizantes agrícolas e criação rudimentar de animais. Devido a sua alta solubilidade em água e alta mobilidade no solo, geralmente ocorre em baixos teores nas águas superficiais, mas pode atingir altas concentrações em águas subterrâneas (BOUCHARD *et al.*, 1992 *apud* FREITAS; BRILHANTE; ALMEIDA, 2001; RESENDE, 2002; ESTEVES, 2011; MORAES, 2019; PUBCHEM, 2021; VIEIRA, 2017).

O excesso de nitrato em corpos d'água leva à eutrofização, fenômeno que provoca o crescimento desordenado de plantas aquáticas acarretando a diminuição de oxigênio e, com isso, a mortandade de peixes e outros organismos. Seu excesso na água também tem consequências a nível da saúde pública. O consumo excessivo desse elemento está associado a dois efeitos adversos à saúde: a formação potencial de nitrosaminas e nitrosamidas carcinogênicas e a indução à metahemoglobinemia, ambos associados à conversão de nitrato a nitrito no organismo humano (BOUCHARD *et al.*, 1992 *apud* FREITAS; BRILHANTE; ALMEIDA, 2001; LOGANATHAN; VIGNESWARAM; KANDASAMY, 2013).

A metahemoglobinemia, também conhecida como síndrome do bebê azul, é a principal doença associada à ingestão de nitrato e decorre da sua redução a nitrito por ação de bactérias que operam durante o processo digestivo na saliva ou no trato intestinal. O nitrito formado combina com o ferro presente na hemoglobina originando a meta-hemoglobina que não tem capacidade de fixar o oxigênio, o que impossibilita o transporte e a absorção do oxigênio necessário para as células. Tal doença é mais frequente em bebês devido ao menor teor de suco gástrico (QUEIROZ, 2015).

Nesse contexto, vê-se a importância do monitoramento do nitrato nos corpos hídricos. Para isso, faz-se necessária a avaliação conforme os critérios estabelecidos pelas agências reguladoras de cada país. No Brasil, o Ministério da Saúde e o Conselho Nacional do Meio Ambiente, entre outras especificações, determinam o Valor Máximo Permitido (VPM) de nitrato nas águas e efluentes de acordo com os mais diversos usos (BRASIL, 2005; BRASIL, 2008; BRASIL, 2011a; BRASIL, 2017a; VIEIRA, 2017). A Tabela 1 apresenta os Valores Máximos Permitidos para o nitrato, expresso como nitrogênio ( $N-NO_3^-$ ), conforme estabelecido pelas legislações vigentes.

Tabela 1 - Valores Máximos Permitidos para  $N-NO_3^-$  segundo a legislação vigente

Legislação	VPM (mg $N-NO_3^-/L$ ) <sup>(1)</sup>
<b>Portaria de Consolidação nº05</b>	Água potável: 10,00
<b>CONAMA nº357</b>	Águas Doces: 10,00 Salinas: 0,40 – 0,70 <sup>(2)</sup> Salobras: 0,40 – 0,70 <sup>(2)</sup>
<b>CONAMA nº396</b>	Consumo humano: 10,00 Consumo animal: 90,00 Recreação: 10,00
<b>CONAMA nº430</b>	Valor que consta na classe na qual o corpo receptor estiver enquadrado, conforme a CONAMA nº357

Em que: (1) Valor Máximo Permitido de nitrato em miligramas de nitrato expresso como nitrogênio por litros; (2) Corresponde a variação da concentração de nitrato de acordo com a classe de enquadramento. Fonte: BRASIL (2005); BRASIL (2008); BRASIL (2011); BRASIL (2017) (Modificado).

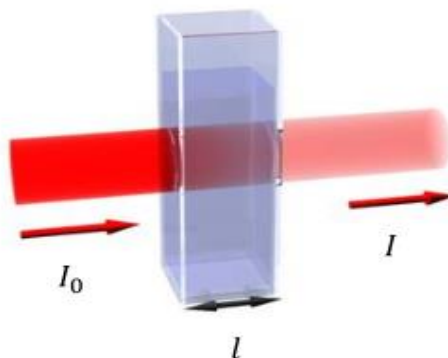
### 3.4 Determinação de nitrato

Um dos grandes desafios no monitoramento do nitrato é que a sua determinação requer processos relativamente complexos, pela alta probabilidade de conter interferentes, e os limites de concentração representarem uma limitação para várias técnicas. Dentre as técnicas existentes, a espectrofotometria se apresenta como a alternativa mais viável devido a sua praticidade e baixo custo. No entanto, por se tratar de um analito normalmente presente em misturas complexas e que não absorve significativamente a luz a nenhum comprimento de onda, além da espectrofotometria, recorre-se também a análise colorimétrica para a determinação de nitrato (ALMEIDA, 2012; KINDLEIN, 2010; VIEIRA, 2017).

#### 3.4.1 ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

De acordo com Skoog et al. (2006), na espectrofotometria na região ultravioleta-visível a amostra é estimulada aplicando-se energia na forma de radiação eletromagnética monocromática. Antes de se aplicar o estímulo, o analito se encontra em seu estado de energia mais baixo ou estado fundamental. Quando a radiação eletromagnética passa através do material transparente onde se encontra a amostra, uma parte dessa radiação pode ser absorvida e a outra parte transmitida. Esse processo resulta na atenuação da intensidade da radiação conforme ilustrado na Figura 2:

Figura 2 - Esquema representativo da absorção da radiação eletromagnética  $I_0$  ao atravessar a célula de percurso óptico  $l$



Fonte: ALMEIDA (2012)

O estímulo então resulta que algumas das espécies do analito sofram uma transição para um estado de maior energia ou estado excitado e, dessa forma, é possível obter informações sobre o analito medindo-se a radiação eletromagnética emitida quando este retorna ao estado fundamental ou a quantidade de radiação eletromagnética absorvida decorrente da excitação (SKOOG *et al.*, 2006).

Na espectrofotometria de absorção, mede-se a quantidade de luz absorvida pela amostra em função do comprimento de onda, isto é, a absorbância ( $A$ ). A relação linear entre a absorbância e a concentração de determinado parâmetro, em determinado comprimento de onda ( $\lambda$ ) é dada pela Lei de Beer-Lambert que é a base matemática para as medidas de absorção de radiação por amostras nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético e é representada conforme apresenta a Equação 1 (SKOOG *et al.*, 2006; PERKAMPUS, 1992; THOMAS; BURGESS, 2017).

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (1)$$

Onde:

$A$  : absorbância;

$I_0$  ( $\text{W}/\text{m}^2$ ): intensidade da radiação monocromática que incide na amostra;

$I$  ( $\text{W}/\text{m}^2$ ): intensidade da radiação transmitida pela amostra;

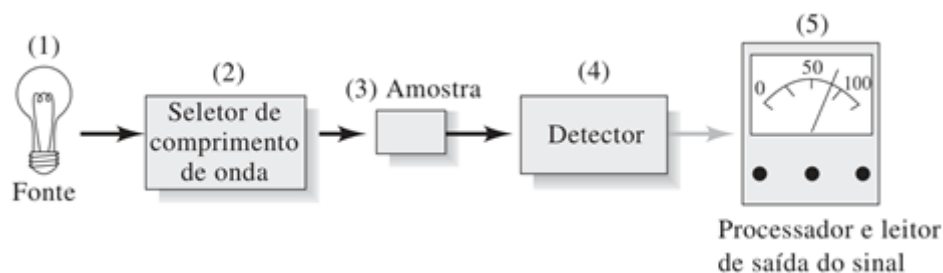
$\varepsilon$  ( $\text{L}/\text{mol}\cdot\text{cm}$ ): absorvidade molar, grandeza característica da espécie absorvente cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente;

$c$  ( $\text{mol}/\text{L}$ ): concentração da espécie absorvente;

$l$  ( $\text{cm}$ ): distância percorrida pela radiação eletromagnética através da amostra.

Segundo Skoog *et al.* (2006), a análise espectrofotométrica é realizada por meio de um dispositivo eletrônico denominado espectrofotômetro. Os espectrofotômetros para uso nas regiões do ultravioleta-visível apresentam em geral cinco componentes (Figura 3): (1) uma fonte estável de energia radiante; (2) um seletor de comprimento de onda que isola uma região limitada do espectro para a medida (monocromador); (3) um ou mais recipientes para a amostra; (4) um detector de radiação, o qual converte a energia radiante para um sinal elétrico mensurável; e (5) uma unidade de processamento e de leitura do sinal, geralmente constituída por um circuito eletrônico e, nos instrumentos modernos, por um computador.

Figura 3 - Esquema representativo dos componentes básicos de um espectrofotômetro



Fonte: SKOOG *et al.* (2006)

### 3.4.2 COLORIMETRIA

A colorimetria tem como objetivo determinar a concentração de uma substância pela medida de absorção relativa de luz, tomando como referência a absorção da substância numa concentração conhecida (KINDLEIN, 2010).

A chamada análise colorimétrica é uma das técnicas usadas quando é necessário quantificar substâncias em misturas complexas ou que não absorvem significativamente a luz a nenhum comprimento de onda. Deste modo, o composto a quantificar é posto em contato com um reagente específico de modo a desenvolver uma cor cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração da mistura na amostra original (ALMEIDA, 2012).

### 3.4.3 MÉTODO REDUÇÃO DE CÁDMIO

Um dos principais métodos que faz uso das técnicas de espectrofotometria e colorimetria para determinação de nitrato se baseia no princípio da redução de cádmio. Nele uma coluna redutora de cádmio é utilizada para reduzir nitrato a nitrito por passagem da amostra numa coluna empacotada com grãos de cádmio tratado com sulfato de cobre. Como o método é indireto, o nitrito produzido é determinado pela diazotização da sulfanilamida com N-naftil-etilenodiamina para formar um azo composto altamente colorido (púrpura) que é mensurado colorimetricamente. Este é lido no espectrofotômetro no comprimento de onda de 543 nanômetros. A correção do valor de nitrato é feita com a obtenção do nitrito presente na amostra sem a redução pela coluna de cádmio (APHA; AWWA; WEF, 2012).

Por ser relativamente complexa e trabalhosa, a determinação de nitrato por meio da coluna de cádmio tratada com sulfato de cobre muitas vezes é substituída por métodos mais simples baseados em espectrofotometria na região ultravioleta-visível. Esses métodos são

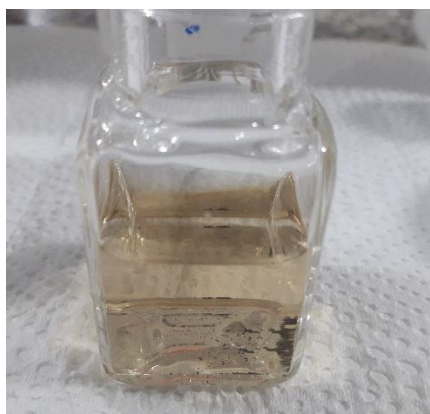
extremamente atraentes devido não somente à simplicidade, mas também ao baixo custo e a vantagem de promoverem resultados rápidos por análises relativamente simples, como é o caso do teste NitraVer5® (método 8171) da HACH, empresa que atua no ramo de fabricação de equipamentos e produção de insumos e reagente para análises laboratoriais (MOREIRA, 2018; SOUTO *et al.*, 2006).

#### 3.4.3.1 Método HACH

O método 8171 proposto pela HACH faz uso do reagente NitraVer5®, desenvolvido pela própria marca, que consiste no material sólido em pó padronizado, pré-dosado e embalado em sachês de alumínio (powder pillow). Esse reagente é utilizado para análises de nitrato, expresso como nitrogênio ( $\text{N-NO}_3^-$ ), na faixa de 0,1 a 10,0 mg/L em espectrofotômetros ou 0,2 a 5,0 mg/L em colorímetros, tendo aplicabilidade em águas, efluentes e água do mar (HEXIS, 2021).

Nesse método, os reagentes são adicionados em cubetas com a amostra bruta que em seguida passam por um período de agitação e reação antes de serem lidos no espectrofotômetro no comprimento de onda de 400 nm. Na reação, inicialmente o cádmio metálico reduz os nitratos na amostra para nitrito e o íon de nitrito reage em meio ácido com o ácido sulfanílico para formar um sal de diazônio intermediário. Por fim, o sal acopla com o ácido gentísico para formar uma solução de coloração âmbar (Figura 4). O desenvolvimento dessa coloração é estritamente influenciado pela técnica e tempo de agitação (HACH, 2021).

Figura 4 – Desenvolvimento da coloração âmbar em amostra com nitrato



Fonte: Próprio autor (2021).

Segundo a HACH (2021) faz-se necessário avaliar os possíveis interferentes no método. O íon cloreto é interferente na análise quando em concentrações maiores que 100,0 mg/L, reduzindo os resultados. No caso de amostras como água do mar, é necessário fazer a calibração

com padrões com concentrações de cloreto semelhantes à da amostra. Altos níveis de ferro, assim como de substâncias fortemente oxidantes ou redutoras e o íon nitrito também são interferentes. Além disso, amostras tamponadas ou com pH extremo necessitam de pré-tratamento antes da análise.

Devido aos potenciais interferentes citados, bem como outros fatores a serem observados na rotina de laboratório, é essencial demonstrar que o método, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida. Para isso, é importante a contínua verificação da adequabilidade do método e dos procedimentos empregados em laboratório de forma a compreender possíveis flutuações nos resultados. A análise dessas alterações de desempenho é uma das propostas de uma Validação de Metodologia Analítica (MOREIRA, 2018; SIQUEIRA, 2013).

### **3.5 Validação de Metodologia Analítica**

A necessidade de mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Segundo a ISO/IEC 17025, norma de referência para desempenho e competência de laboratórios, é necessário utilizar métodos e procedimentos adequados com o objetivo de promover a confiança na operação e resultados de laboratórios. Nesse contexto, para garantir que um método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve passar por uma avaliação denominada Validação de Metodologia Analítica (BRASIL, 2017c; CODEX, 1995; WHO, 1992).

Validação de Metodologia Analítica é a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que o método analítico produz resultados confiáveis e adequados à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos. Devem passar por essa avaliação métodos não normalizados, normalizados utilizados fora de seu escopo pretendido e métodos criados ou modificados de outra forma, o que inclui variação da quantidade de amostra utilizada, mudança de componentes da matriz, mudança de equipamentos ou de reagentes (BRASIL, 2017b; BRASIL, 2017c).

Um método normalizado é aquele elaborado por uma entidade de normalização aceita e reconhecida pela comunidade laboratorial nacional e internacional, por exemplo ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) e APHA (*American Public Health Association*). Embora esses métodos já estejam validados, o laboratório tem a responsabilidade de averiguar



se suas características principais permanecem com a mesma qualidade, isto é, deve demonstrar que tem condições de operá-los de maneira adequada, dentro das condições específicas existentes nas suas instalações (BRASIL, 2020; QUEIROZ, 2015).

Já um método não normalizado é aquele desenvolvido pelo próprio laboratório ou outras partes, ou adaptado a partir de métodos normalizados e validados. Por exemplo: métodos publicados em revistas técnicas, métodos de fabricantes de equipamentos, métodos utilizando *kits* de ensaio e instrumentos portáteis. Antes de implantar esses métodos, o laboratório deve se assegurar de que as características do seu desempenho atendam aos requisitos para as operações analíticas pretendidas (BRASIL, 2020; SIQUEIRA, 2013).

Existem razões legais, técnicas e comerciais que justificam a implantação da validação de métodos, visto que dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para orientar a validação, os órgãos ou agências responsáveis elaboram diretrizes que devem ser seguidas pelos laboratórios e analistas na execução de metodologias próprias de uso analítico. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (CODEX, 1995; COELHO *et al.*, 2018; WHO, 1992).

No Brasil, os principais órgãos reguladores responsáveis pela validação de metodologias analíticas são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), mais voltada para o ramo alimentício e farmacêutico, e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). Pela ANVISA, a diretriz de validação de métodos analíticos é dada pela Resolução da Diretoria Colegiada, RDC nº 166 de 24 de julho de 2017, enquanto para o INMETRO a orientação fica a cargo do documento DOQ-CGCRE-008 atualizado em junho de 2020 (BRASIL, 2017b; BRASIL, 2020).

A Resolução RDC nº 166 e o documento DOQ-CGCRE-008, além de indicarem ferramentas de controle de qualidade para monitorar o desempenho do método e seus resultados durante o tempo de aplicação, especificam também uma série de parâmetros para o processo de validação, dentre os quais os laboratórios devem definir os que melhor evidenciam a adequação do método ao uso pretendido e seus respectivos critérios de aceitação, definidos de acordo com as características do analito e natureza do método. (BRASIL, 2017b; BRASIL, 2020).

### 3.5.1 SELETIVIDADE

Seletividade é o grau em que o método pode identificar ou quantificar o analito na presença de outros analitos, matrizes ou de outro material potencialmente interferente. Assim, o método que fornece várias respostas de diversos analitos em uma matriz, porém é possível distinguir a resposta de um componente com relação a outro, é seletivo (AOAC, 2002; RIBANI *et al.*, 2004).

A seletividade deve ser reavaliada continuamente, uma vez que se não for assegurada a linearidade, tendência e precisão do método estarão seriamente comprometidas. Em sua análise é fundamental considerar a possibilidade de haver mais de uma forma do componente de interesse. Além disso, é necessário também ter atenção ao efeito matriz, isto é, à possibilidade da amostra conter interferentes que aumentem ou reduzam o sinal instrumental, comprometendo o resultado e o desempenho do método. A magnitude desse efeito pode depender da concentração do analito (BRASIL, 2020; QUEIROZ, 2015).

A seletividade pode ser obtida utilizando os métodos com adição e recuperação de padrão, os quais permitem comparar a amostra com e sem a presença do analito. Nos ensaios com adição e recuperação de padrão, uma quantidade conhecida de um analito é adicionada a uma amostra para avaliar a capacidade que o método tem de recuperar o analito adicionado. Os valores aceitáveis de recuperação para que o método possa ser considerado seletivo podem, normalmente, variar de 80% a 120%. A taxa recuperação pode ser averiguada através da Equação (2) (BRASIL, 2011b; DIAS, 2019; SKOOG *et al.*, 2006).

$$\%Recuperação = \frac{|x_F| - |x_{SF}|}{x_P} \cdot 100 \quad (2)$$

Onde:

$x_F$ : concentração da amostra fortificada com padrão (mg/L);

$x_{SF}$ : concentração da amostra sem fortificação do padrão (mg/L);

$x_P$ : incremento de concentração esperado pela adição do padrão (mg/L).

Para avaliar estatisticamente as taxas obtidas nos ensaios de recuperação, podem ser também utilizados testes estatísticos de significância como o teste T de Student para média de uma população. Esse teste estatístico permite avaliar se os valores obtidos são estatisticamente diferentes do valor esperado (100%). Para isso, calcula-se o valor teste ( $VT_{T1}$ ) referente ao teste

T de Student para média de uma população, nesse caso taxas de recuperação, por meio da Equação 3 (ASSIS; SOUSA; LINHARES, 2020; BRITO *et al.*, 2003; POIRIER, 1995 *apud* SANTOS, 2016; SANTOS, 2016).

$$VT_{T1} = \frac{|\bar{R} - \mu_{100}|}{s_R / \sqrt{n}} \quad (3)$$

Sendo:

$VT_{T1}$ : valor teste do teste T de Student para médias das taxas recuperação;

$\bar{R}$ : médias das recuperações;

$\mu_{100}$ : recuperação percentual desejada (100%);

$s_R$ : desvio padrão das recuperações obtidas;

n: número de amostras ensaiadas.

Em seguida, compara-se o valor teste com o valor crítico tabelado na distribuição de Student ( $T_{crítico}$ ) para n-1 graus de liberdade (GL) e nível de confiança ( $\gamma$ ) previamente adotado. Os valores em comparação não apresentam desvios estatisticamente significativos se  $|VT_{T1}| \leq T_{crítico}$  (ASSIS; SOUSA; LINHARES, 2020; BRITO *et al.*, 2003; SANTOS, 2016).

### 3.5.2 LINEARIDADE/FAIXA DE TRABALHO

Linearidade de um procedimento analítico é a sua habilidade (dentro de uma dada faixa) de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. Diferente dos demais parâmetros, não é estudada de maneira independente, sendo, todavia, condição imprescindível para o estabelecimento da faixa de trabalho do método, como condição prévia a sua determinação ou sendo determinado simultaneamente a esta (BRITO *et al.*, 2003; EURACHEM GUIDE, 2014; ICH, 2005).

A faixa de trabalho de um procedimento analítico é o intervalo entre a menor e a maior concentração de analito na amostra para o qual se demonstrou que o procedimento analítico tem um nível aceitável de precisão, exatidão e linearidade. Dentro desse intervalo, a faixa de concentração em que os resultados do método são diretamente proporcionais à concentração do analito é denominada faixa linear de trabalho, que deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado. A concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro dessa faixa (EURACHEM GUIDE, 2014; ICH, 2005).

Esses parâmetros de quantificação estão associados ao conhecimento da relação matemática entre a resposta/sinal do equipamento e a concentração da espécie a ser quantificada. Uma alternativa bastante utilizada para obter empiricamente essa relação é o método da padronização externa. Nele são obtidos sinais correspondentes à diferentes concentrações conhecidas resultantes de diluições sucessivas de um padrão concentrado, o que permite a construção de uma curva de calibração analítica que os relaciona graficamente (AUGUSTO; ANDRADE; CUSTÓDIO, 2000; BARROS NETO; PIMENTEL, ARAÚJO, 2002; RIBANI *et al.*, 2004).

São necessários no mínimo cinco níveis de concentração uniformemente distribuídos na faixa de trabalho pretendida para construção da curva e a parte linear pode ser expressa por meio de uma equação de reta, obtida através de uma regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, como demonstra a Equação 4 (AUGUSTO; ANDRADE; CUSTÓDIO, 2000; BARROS NETO; PIMENTEL, ARAÚJO, 2002; BRASIL, 2020; THOMPSON, 2002).

$$y = a + b \cdot x \quad (4)$$

Em que:

$y$ : resposta instrumental (absorbância);

$x$ : concentração (mg/L);

$a$ : coeficiente linear (interseção com o eixo  $y$ , quando  $x = 0$ );

$b$ : coeficiente angular (inclinação da curva analítica).

A partir da regressão linear dos dados é possível obter, além dos coeficientes de regressão, o coeficiente de correlação  $r$ , parâmetro que permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. O parâmetro  $r$  é um bom indicativo do quanto a reta pode ser considerada adequada como modelo matemático, porém não é conclusivo (BRASIL, 2017b; ISO 8466-1, 1990; QUEIROZ, 2015).

Como forma alternativa de verificar essa adequação, podem ser avaliados também os resíduos da curva de calibração, isto é, a diferença entre o valor observado e o valor calculado pela equação da reta de regressão para cada valor de  $y$ . Os resíduos devem ser representados graficamente e observado se há comportamento aleatório, indício de que o modelo linear é adequado. Além disso, pode-se também avaliar numericamente a linearidade por meio do teste

de Mandel, teste estatístico recomendado na ISO 8466-1 (BRASIL, 2020; ISO 8466-1, 1990; SANTOS, 2016).

O teste de Mandel usa os dados obtidos da calibração para calcular uma função de calibração linear, bem como uma função de calibração não linear. A partir deles, determina-se a diferença entre as variâncias (DS- Equação 5) das duas funções com base no desvio-padrão residual da função de calibração linear ( $s_{i1}$  - Equação 6), no desvio-padrão residual da função de calibração não-linear ( $s_{i2}$  - Equação 7) e no número de níveis de concentração ( $N_L$ ) (HENRIQUES, 2008; ISO 8466-1, 1990; ISO 8466-2, 1990; SANTOS, 2016).

$$DS = (N_L - 2) \cdot s_{i1}^2 - (N_L - 3) \cdot s_{i2}^2 \quad (5)$$

$$s_{i1} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_L} [y_i - \bar{y}_{i1}]^2}{N_L - 2}} \quad (6)$$

$$s_{i2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_L} [y_i - \bar{y}_{i2}]^2}{N_L - 3}} \quad (7)$$

Onde:

$DS$ : diferença entre variâncias;

$s_{i1}$ : desvio padrão residual da função de calibração linear;

$s_{i2}$ : desvio padrão residual da função de calibração não linear;

$y_i$ : valores individuais de sinal instrumental (absorbância);

$\bar{y}_{i1}$ : sinal estimado pela função de calibração linear (absorbância);

$\bar{y}_{i2}$ : sinal estimado pela função de calibração não linear (absorbância);

$N_L$ : número de níveis de concentração.

Em seguida calcula-se o valor de teste ( $VT_M$  – Equação 8) e compara-se este com o valor correspondente da distribuição F de Snedecor/Fisher ( $F_{crítico}$ ) para  $N_L - 3$  graus de liberdade (GL) e nível de confiança ( $\gamma$ ) adotado. Essa comparação permite avaliar se a exclusão de um parâmetro afeta significativamente a variância da população. Dessa forma, se  $VT_M \leq F_{crítico}$ , a função de calibração é linear; se  $VT_M > F_{crítico}$ , a função de calibração não é linear. No segundo caso deve ser estudada a hipótese de ajustar a faixa de trabalho para uma função de calibração linear (SANTOS, 2016; RIBEIRO, 2015).

$$VT_M = \frac{DS^2}{s_{i2}^2} \quad (8)$$

Onde:

$VT_M$  : valor teste do teste de Mandel;

$DS^2$  : diferença entre variâncias;

$s_{i2}$  : desvio padrão residual da função de calibração não linear.

### 3.5.3 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2017b). Na prática, quando a curva de calibração já se encontra bem definida ou verificada, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco) (ALMEIDA, 2012).

Para determinar o limite de quantificação de um método, devem ser realizadas análises em amostras incluindo todas as etapas do procedimento analítico. Esse processo pode ser feito por avaliação visual, através da razão sinal-ruído, baseado na determinação do branco ou em parâmetros da curva de calibração, considerando-se as particularidades do método analítico utilizado (BRASIL, 2017b). Dentre os métodos citados, a estimativa do LQ por meio do desvio padrão do branco da amostra com a menor concentração aceitável do analito também é bastante utilizada e pode ser realizada com auxílio da Equações 9 e 10.

$$LQ = 0 + 5. s \quad (9)$$

$$LQ = 0 + 10. s \quad (10)$$

Em que:

$\bar{x}_B$  : média dos valores de concentração do branco (mg/L);

$s$  : desvio padrão (mg/L).

A “menor concentração aceitável” é a concentração mais baixa para um grau aceitável de incerteza. Além disso, a IUPAC propõe o valor “10” como valor padrão da Equação 10. No

entanto, pode-se adotar também o valor “5” em função do rigor analítico exigido, como exposto na equação 9 (BRASIL, 2020; MASSART *et al.*, 1997).

### 3.5.4 PRECISÃO

A precisão deve avaliar o grau de concordância entre os resultados obtidos por meio de ensaios repetidos com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. Trata-se de um parâmetro que reflete os erros aleatórios de uma medição, é geralmente avaliado sob condições de medições específicas como precisão intermediária e demonstrado numericamente por características como o desvio padrão (Equação 11) e o coeficiente de variação, também conhecido como desvio padrão relativo (Equação 12) (BRASIL, 2017b; BRASIL, 2012a; EURACHEM/CITAC, 2015).

$$s = \sqrt{\sum_{t=1}^n \frac{(x_t - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (11)$$

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (12)$$

Onde:

*CV*: coeficiente de variação (%);

*s*: desvio padrão (mg/L);

$\bar{x}$ : concentração média determinada (mg/L);

*n*: número de amostra ensaiadas;

$x_i$ : concentração individual por ensaio (mg/L).

A precisão intermediária é a condição que evidencia a concordância entre os resultados obtidos para o mesmo procedimento de medição, mesmo local e medições repetidas no mesmo objeto ou objeto similares em um longo período de tempo. Essa condição pode envolver outras mudanças como diferentes analistas, padrões, calibrações e sistema de medições, desde que sejam bem definidas. Por verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados, a precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2012a).

Dependendo do ensaio e do tipo de aplicação do estudo da precisão intermediária, existem vários métodos para determinação e controle desse parâmetro, como por exemplo o gráfico de controle do desvio padrão e por meio do desvio padrão de precisão intermediária. Um método simplificado utilizado na determinação baseia-se na execução de  $n$  medições ( $n \geq 15$ ), em condições predefinidas, sobre uma mesma amostra, amostras supostamente idênticas ou padrões. Dessa forma, a precisão pode ser avaliada comparando os resultados obtidos em diferentes grupos nos quais as condições foram variadas (BRASIL, 2020; RIBANI *et al.*, 2004).

Para avaliar se alguma das condições testadas influencia significativamente o desvio padrão de precisão intermediária do método, os resultados obtidos nos diferentes grupos podem ser comparados por testes estatísticos como o teste F de Fisher e o teste T de Student. Esses testes permitem avaliar a possível existência de diferenças estatisticamente significativas entre as variâncias e médias obtidas para ensaios realizados agrupados em diferentes condições operacionais (BRASIL, 2020; LOPES *et al.*, 2012).

Para o teste F, calcula-se o valor teste ( $VT_F$ ) por meio da Equação 13. Em seguida, compara-se este com o valor crítico tabelado na distribuição de Fisher ( $F_{crítico}$ ) para  $n-1$  graus de liberdade (GL) e nível de confiança ( $\gamma$ ) previamente adotado. Caso o valor teste seja inferior ao valor crítico, ao nível de confiança e graus de liberdade em questão, conclui-se que as estimativas de dispersão são iguais, não havendo diferenças significativas entre elas (ALMEIDA, 2012; RIBEIRO, 2015).

$$VT_F = \frac{s_i^2}{s_j^2} \quad (13)$$

Em que:

$VT_F$ : valor teste do Teste F para variância;

$s_i^2$ : maior variância obtida dos ensaios para precisão;

$s_j^2$ : menor variância obtida dos ensaios para precisão.

Já no teste T para diferença entre médias, após se obterem os resultados para os ensaios efetuados em grupos, determinam-se as médias ( $\bar{\mu}_i$  e  $\bar{\mu}_j$ ) e desvios-padrão ( $s_i$  e  $s_j$ ) para os dois grupos em comparação. Em seguida, efetua-se uma análise das variâncias através do teste F de Fisher. Caso o teste F demonstre não haver diferença significativa entre as variâncias dos grupos, o valor teste referente ao teste T de Student deve ser calculado através da Equação 14, caso contrário, por meio da Equação 16. (ASSIS; SOUSA; LINHARES, 2020; POIRIER, 1995 *apud* SANTOS, 2016; SANTOS, 2016).



$$VT_{T2} = \frac{\bar{\mu}_i - \bar{\mu}_j}{s_T \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j}\right)}} \quad (14)$$

Com:

$$s_T^2 = \frac{(n-1) \cdot s_i^2 + (n_2-1) \cdot s_j^2}{n_i + n_j - 2} \quad (15)$$

$$VT_2 = \frac{\bar{\mu}_i - \bar{\mu}_j}{\sqrt{\left(\frac{s_i^2}{n_i} + \frac{s_j^2}{n_j}\right)}} \quad (16)$$

Em que:

$VT_{T2}$ : valor teste do Teste T para precisão;

$\bar{\mu}_i$ : média para grupo i dos ensaios de precisão (mg/L);

$\bar{\mu}_j$ : média para grupo j dos ensaios de precisão (mg/L);

$s_i^2$ : variância padrão do grupo i dos ensaios de precisão (mg/L);

$s_j^2$ : variância padrão do grupo j dos ensaios de precisão (mg/L);

$n_i$ : número de amostras ensaiadas para do grupo i dos ensaios de precisão;

$n_j$ : número de amostras ensaiadas para do grupo j dos ensaios de precisão;

$s_T$ : desvios-padrão total para os grupos dos ensaios de precisão (mg/L).

Calculado o valor teste, compara-se o mesmo com o valor crítico tabelado na distribuição de Student ( $T_{crítico}$ ) ao nível de confiança previamente adotado e graus de liberdade definido por meio da Equação 17, caso as variâncias sejam estatisticamente equivalentes, ou pela Equação 18, caso sejam estatisticamente diferentes. Os resultados em comparação não apresentam desvios estatisticamente significativos se  $|VT_{T2}| \leq T_{crítico}$  (ASSIS; SOUSA; LINHARES, 2020; SANTOS, 2016).

$$GL = n_1 - n_2 - 2 \quad (17)$$

$$GL = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1+1}\right) + \left(\frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2+1}\right)} - 2 \quad (18)$$

Em que:

$GL$ : graus de liberdade;

$s_i^2$ : variância padrão do grupo  $i$  (mg/L) dos ensaios de precisão;

$s_j^2$ : variância padrão do grupo  $j$  (mg/L) dos ensaios de precisão;

$n_i$ : número de amostras ensaiadas para do grupo  $i$  dos ensaios de precisão;

$n_j$ : número de amostras ensaiadas para do grupo  $j$  dos ensaios de precisão.

### 3.5.5 EXATIDÃO

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método com relação a um valor aceito como verdadeiro. É um parâmetro que reflete os erros sistemáticos de uma medição. Dentre os processos normalmente mais utilizados para essa avaliação destacam-se: análise de materiais de referência certificados (MRC) e ensaios de adição e recuperação de padrão (BRASIL, 2017b; EURACHEM/CITAC, 2015; RIBANI *et al.*, 2004).

Os materiais de referência certificados são preparados por entidades oficiais, nos quais é atribuído a cada parâmetro um valor certificado e a sua incerteza. Este material é certificado através da execução de ensaios interlaboratoriais e/ou com diversas técnicas de análise, que atestam sua estabilidade e rastreabilidade. Ao utilizar esse material para avaliar a exatidão, os valores obtidos pelo laboratório (a média e a estimativa do desvio padrão de uma série de replicatas) podem ser comparados com os valores certificados do material de referência. Para essa comparação podem ser utilizados como critérios de decisão o erro relativo (Equação 19) ou normalizado (Equação 20) (BRASIL, 2020; QUEIROZ, 2015).

$$ER = \frac{(x_{lab} - x_v)}{x_v} \cdot 100 \quad (19)$$

$$E_n = \frac{(x_{lab} - x_v)}{\sqrt{(U_{lab}^2 + U_{ref}^2)}} \quad (20)$$

Sendo:

$ER$ : erro relativo;

$E_n$ : erro normalizado;

$x_{lab}$ : Valor ou média dos valores de concentração obtidos experimentalmente (mg/L).;

$x_v$ : valor admitido como verdadeiro (valor certificado do MRC) (mg/L).;

$U_{lab}$ : incerteza associada ao resultado obtido experimentalmente (mg/L).;

$U_{ref}$ : incerteza associada ao MRC (mg/L).

Já os ensaios com adição e recuperação de padrão, já introduzidos no item “3.5.1 SELETIVIDADE “, consistem na "fortificação" da amostra, isto é, na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse à amostra seguida pela determinação da concentração do analito adicionado. A partir desses ensaios, a exatidão pode ser expressa pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra, utilizando a Equação 2 (BRASIL, 2017b; BRITO *et al.*, 2003; DIAS, 2019).

A limitação do procedimento de recuperação é que, além do efeito matriz, a substância adicionada não está, necessariamente, na mesma forma na amostra, podendo implicar, por exemplo, em avaliações otimistas da recuperação. É necessário considerar também como a eficiência do método varia em função da concentração da substância. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações (GARP, 1999; RIBANI *et al.*, 2004).

É importante que os laboratórios estabeleçam critérios de aceitação para a recuperação seguindo as orientações normativas da legislação cabível à área de aplicação do método. Esses critérios estão normalmente atrelados ao nível de concentração do analito, como os que são sugeridos pela a AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) e situam-se entre 80 e 120%. Para definir a aceitação das taxas obtidas nos ensaios de recuperação podem ser utilizados também testes estatísticos de significância como o teste T de Student para média de uma população pormenorizado no item seletividade. (AOAC, 2016; BRASIL, 2020; BRITO *et al.*, 2003).

### 3.5.6 ROBUSTEZ

A robustez de um método analítico é a capacidade do método em não ser afetado por pequenas variações nos parâmetros de execução do método. Dessa forma, esse parâmetro fornece uma indicação da confiança do método durante uma aplicação rotineira pois permite

avaliar sua sensibilidade perante pequenas variações e o tipo e grau de influência de cada uma delas nos resultados finais. Pode ser determinada através da variação das condições de operação (precisão intermediária), como em ensaios de recuperação em diferentes matrizes, ou através do teste de Youden. A validação desta característica normalmente é realizada na etapa final de um processo de validação (EURACHEM, 2014; QUEIROZ, 2015).

### 3.5.7 INCERTEZA

A incerteza permite caracterizar a dispersão dos valores que podem ser atribuídos a uma grandeza que se pretende medir. É um parâmetro que os laboratórios de ensaio devem ter e aplicar procedimentos para estimá-lo por conferir às análises a credibilidade e a qualidade exigidas tanto pelo cliente, uma vez que se atribuída aos ensaios requisitados permite verificar o cumprimento de limites legais ou regulamentares; como pelo próprio laboratório, pois permite avaliar a qualidade dos resultados das metodologias aplicadas. Dessa forma, torna-se possível tomar decisões seguras a partir de resultados interpretáveis e confiáveis de acordo com a finalidade a que se destina (BRASIL, 2017c; BRASIL, 2012b; EURACHEM/CITAC, 2012).

Há uma ampla gama de fontes de incertezas que provêm tanto de erros aleatórios, resultantes de variações imprevisíveis, como de sistemáticos, derivados de variações previsíveis e constantes. A exemplo dessas fontes, tem-se o processo de amostragem, a matriz da amostra e as condições ambientais e de controle de ensaios. Dessa forma, é necessário conhecer previamente a dimensão destas variações, considerando cada método de ensaio e os níveis de analito mais usuais, para que os erros identificados possam ser corrigidos nos resultados e o analista possa definir se o método e os resultados são adequados a uma dada utilização (FERREIRA, 2012).

A estimativa da incerteza pode ser realizada através da quantificação de cada fonte individualmente ou através dos dados provenientes do desempenho do método. A norma ISO/IEC 17025 não especifica nenhuma metodologia em particular, no entanto os laboratórios devem utilizar abordagens estatisticamente válidas. Na escolha da abordagem mais apropriada para cada situação é necessário ter em conta a sua finalidade e os resultados disponíveis. Dentre as metodologias mais utilizadas destaca-se nesse trabalho a abordagem supra analítica (BRASIL, 2017c; FERREIRA, 2012).

A abordagem supra analítica baseia-se em dados intralaboratoriais de validação e controle de qualidade obtidos em condições de precisão intermediária. Esta abordagem consiste na

combinação das incertezas padrão relativas associadas aos parâmetros globais de desempenho da medição: precisão e exatidão. Ambas são consideradas componentes independentes, onde a determinação do mensurando envolve somente uma multiplicação ou uma adição, consoante a gama de concentrações em estudo (EURACHEM/CITAC, 2012; NORDTEST, 2017).

A estimativa da incerteza padrão relativa associada à precisão pode ser efetuada a partir da determinação do desvio padrão dos resultados de uma amostra ou um padrão de controle obtidos em condições de precisão intermediária. Através dessa determinação é possível assumir que varia aleatoriamente grande parte dos parâmetros experimentais não controlados que afetam o desempenho do método. Para que seja realizada com confiança, é recomendado que se efetuem pelo menos 15 medições utilizando padrões de controle, e a incerteza padrão associada à precisão do método ( $u_{\text{precisão}}$ ) é determinada através da Equação 21 (FERNANDES, 2015; IPAC, 2007; RIBEIRO, 2015).

$$u_{\text{precisão}} = s_{\text{padrão}} \quad (21)$$

Em que:

$u_{\text{precisão}}$ : incerteza padrão associada a precisão (mg/L).;

$s_{\text{padrão}}$ : desvio padrão de uma série de ensaios do padrão de controle (mg/L).;

A estimativa da incerteza padrão associada à exatidão pode ser quantificada através de ensaios em condições de precisão intermediária, ensaios de recuperação, materiais de referência e padrões de controle. Através dos ensaios de recuperação, a incerteza padrão relativa associada a exatidão ( $u_{\text{exatidão}}$ ) pode ser calculada por meio da Equação 22 (EURACHEM/CITAC, 2012; IPAC, 2007).

$$u_{\text{exatidão}} = u(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \cdot \sqrt{\left(\frac{s_{\text{obs}}^2 + s_{\text{nativa}}}{(C_{\text{obs}} - C_{\text{nativa}})^2}\right) + \left(\frac{u_{\text{fortificação}}}{C_{\text{fortificação}}}\right)^2} \quad (22)$$

Em que:

$u_{\text{exatidão}}$ : incerteza padrão associada à exatidão (mg/L);

$u(\bar{R}_m)$ : incerteza padrão associada à recuperação média do analito (mg/L);

$\bar{R}_m$ : taxa de recuperação média dos ensaios de recuperação (mg/L);

$s_{\text{obs}}$ : desvio padrão associado às concentrações das amostras fortificadas (mg/L);

$s_{nativa}$ : desvio padrão associado às concentrações das amostras não fortificadas (mg/L);

$\bar{C}_{obs}$ : concentração média das amostras fortificadas (mg/L);

$\bar{C}_{nativa}$ : concentração média das amostras não fortificadas (mg/L);

$n_R$ : número de ensaios de recuperação;

$u_{fortificação}$ : incerteza padrão associada à concentração da fortificação (mg/L);

$C_{fortificação}$ : concentração da fortificação (mg/L).

Normalmente as soluções de fortificação são obtidas a partir de diluições sucessivas de soluções concentradas, como materiais de referência ou padrões de controle. Nesse caso faz-se necessário determinar a incerteza padrão associada a essas diluições. Dessa forma, considerando a diluição de uma solução concentrada diluída de um volume inicial para um volume final, a incerteza padrão associada à concentração da solução diluída,  $u_{cdil}$ , pode ser calculada pela Equação 23 (BRASIL, 2012b; FERNANDES; 2015).

$$u_{dil} = C_{dil} \cdot \sqrt{\left(\frac{u_{C_{conc}}}{C_{conc}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_i}}{V_i}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_f}}{V_f}\right)^2} \quad (23)$$

Em que:

$u_{cdil}$ : incerteza padrão associada a concentração da solução diluída (mg/L);

$C_{dil}$ : concentração de solução diluída (mg/L);

$u_{conc}$ : incerteza padrão associada a solução concentrada (mg/L);

$C_{conc}$ : concentração de solução concentrada (mg/L);

$u_{V_i}$ : incerteza padrão associada ao volume inicial (mg/L) (determinada pela Equação 24);

$V_i$ : volume inicial, isto é, volume da solução concentrada (mL);

$u_{V_f}$ : incerteza padrão associada ao volume final (mg/L) (determinada pela Equação 24);

$V_f$ : volume final, isto é, volume da solução diluída (mL).

$$u_{PV} = \frac{\text{Tolerância do material}}{\sqrt{3}} \quad (24)$$

Após a determinação das componentes da incerteza, para expressá-las no resultado das análises de uma amostra, é necessário determinar a incerteza combinada e posteriormente a incerteza expandida. A incerteza combinada ( $u_c$ ) é baseada na Lei da Propagação das Incertezas

na qual, para métodos aplicados a uma gama restrita de concentrações, as componentes da incerteza podem ser contabilizadas de maneira independente em uma expressão aditiva, como apresentado na Equação 25 (FERNANDES, 2015; FERREIRA, 2012; IPAC, 2007; MORGADO, 2017).

$$u_c = \sqrt{u_{precisão}^2 + (u_{exatidão} \cdot x_{padrão})^2} \quad (25)$$

Em que:

$u_c$ : incerteza combinada (mg/L);

$u_{precisão}$  : incerteza padrão associada a precisão (mg/L);

$u_{exatidão}$  : incerteza padrão associada a exatidão (mg/L);

$x_{padrão}$  : concentração do padrão (mg/L).

Já a incerteza expandida ( $U$ ) é calculada através da multiplicação da incerteza combinada ( $u_c$ ) pelo fator de expansão desejado ( $k$ ), como apresenta a Equação 26. Através do fator de expansão é possível ampliar a incerteza combinada ( $u_c$ ) de modo a definir um intervalo de confiança ao qual está associada uma dada probabilidade. Para um nível de confiança aproximadamente igual a 95%, se o número de graus de liberdade for baixo (<15), deve ser utilizada a distribuição bilateral do teste T de Student como fator de expansão, caso contrário, assume-se  $k=2$ . No primeiro caso o número de graus de liberdade pode ser calculado através da equação de Welch-Satterthwaite (Equação 27) (RIBEIRO, 2015; SANTOS 2016).

$$U = k \cdot u_c \quad (26)$$

$$\mathcal{V}_{eff} = \frac{u_c^4}{\sum_{i=1}^n \frac{u_i^4}{\mathcal{V}_i}} \quad (27)$$

Sendo:

$U$ : incerteza expandida (mg/L);

$k$ : fator de expansão;

$u_c$ : incerteza combinada (mg/L);

$\mathcal{V}_{eff}$  : graus de liberdade efetivos;

$u_i$ : componentes individuais da incerteza combinada (mg/L);

$\mathcal{V}_i$ : graus de liberdade dos componentes da incerteza combinada.

O último passo na expressão da incerteza de medição é a apresentação dos resultados que, após ter sido calculado normalmente para um nível mínimo de confiança de 95%, deve ser informado em forma de intervalo apresentando o valor do mensurando e a incerteza expandida, como demonstra a Equação 28. Na expressão do resultado é importante incluir também uma declaração com informações como o tipo de incerteza reportada (combinada ou expandida), o valor do fator de expansão e nível aproximado de confiança adotado na estimativa (BRASIL, 2012b; LIMA, 1999).

$$\text{Resultado}_{\text{medição}} = \text{Valor}_{\text{mensurando}} \pm U \quad (28)$$

O critério de aceitação do nível de incerteza obtida para o método pode ser definido em função de alguns fatores como a área de aplicação do método, legislações vigentes e normas técnicas que se deseja atender. Quando houver um limite máximo e/ou mínimo definido para o mensurando em legislação ou especificação técnica, por exemplo, tal documento deve ser verificado para se obter orientação sobre a magnitude aceitável da incerteza (EURACHEM/CITAC, 2015).



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local da pesquisa

Todos os ensaios da presente pesquisa foram realizados no laboratório de análises físico-químicas da empresa ACQUA Laboratório, unidade de São Luís. A ACQUA atua na área de análises físico-químicas e microbiológicas de águas, alimentos e efluentes com o objetivo de oferecer, com qualidade, análises de parâmetros que atendam aos padrões estabelecidos pelas legislações vigentes e resultados confiáveis que atendam às necessidades e expectativas dos clientes.

### 4.2 Materiais

Para a construção da curva de calibração e análise dos demais parâmetros de validação, foram utilizados dois materiais de referência certificados de nitrato, expresso como nitrogênio ( $\text{N-NO}_3^-$ ), da marca INORGANIC com concentração e incerteza associada de  $1005 \pm 3$  mg/L e  $1003 \pm 4$  mg/L, lotes P2-NOX675324 e P2-NOX675947, ambos rastreados ao NIST (*National Institute of Standards and Technology*). Para checagem da curva de calibração e do equipamento, foi utilizado o material de referência da HACH com concentração 100 mgN- $\text{NO}_3^-$ /L e lote A9156.

Para a aplicação do método 8171 da HACH, deve ser utilizado o reagente NitraVer5® (Figura 5) desenvolvido pela HACH que consiste no material sólido em pó, padronizado, pré-dosado e embalado em sachês de alumínio para análises de nitrato expresso como nitrogênio ( $\text{N-NO}_3^-$ ) na faixa de 0,1 a 10,0 mg/L em espectrofotômetros (HEXIS, 2021).

Figura 5 – Sachê do reagente NitraVer5® (frente e verso)



Fonte: Próprio autor (2021)

Para os ensaios referentes a análise do efeito matriz, foram utilizadas amostras de água superficial, potável e efluente provenientes de uma lagoa, um poço e uma estação de tratamento de resíduos, respectivamente. As amostras foram coletadas em frascos de plástico de 1 litro e acondicionadas com gelo em caixa de isopor para transporte até o laboratório, onde foram conservadas com temperatura na faixa de 2 a 4° C. Conforme recomendado no *Standard methods for the examination of water and wastewater* (APHA; AWWA; WEF, 2012), as análises foram realizadas no prazo de 2 dias após a amostragem.

### 4.3 Instrumentos/equipamentos/software

Para realização dos ensaios, o principal equipamento utilizado foi o espectrofotômetro de bancada DR 3900 da empresa HACH (Figura 6), equipado basicamente com uma célula de fluxo portacubeta, um detector, um monocromador e uma fonte de radiação de tungstênio. O sistema espectrofotométrico da HACH opera com comprimento de onda visível na faixa de 320 a 1100 nm, permite leituras em unidades de absorbância, transmitância e concentração, e, além dos 220 programas inseridos pela fabricante, permite o armazenamento de 100 curvas de usuário (HEXIS, 2021).

Figura 6 - Espectrofotômetro HACH DR 3900



Fonte: HEXIS (2021).

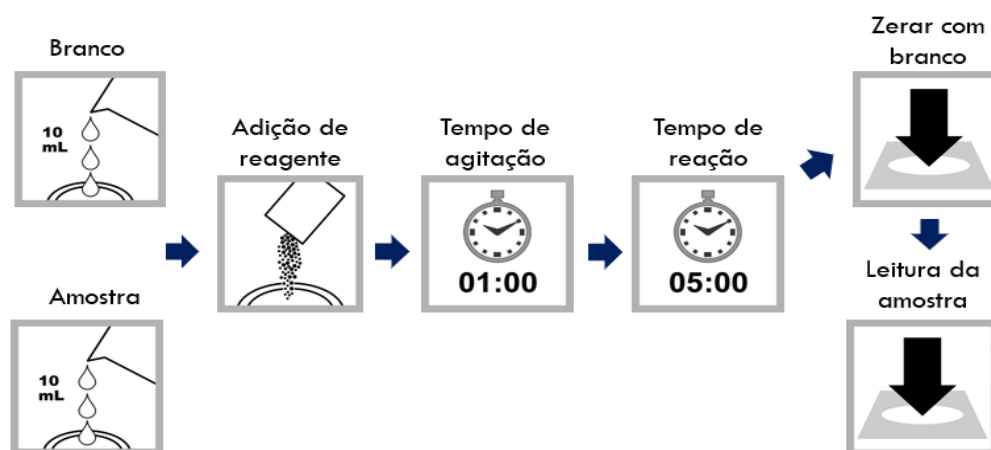
O software utilizado para o tratamento dos dados obtidos experimentalmente foi o Microsoft Office Excel 2019.

## 4.4 Análises, métodos e procedimentos experimentais

### 4.4.1 QUANTIFICAÇÃO DE NITRATO PELO MÉTODO HACH

Na quantificação do nitrato pelo método HACH, 10 mL da amostra são transferidos para a cubeta. Em seguida, adiciona-se o reagente NitraVer5® e a amostra é agitada durante 1 minuto e deixada em repouso por 5 min, tempo necessário para que a reação ocorra. Esse mesmo procedimento é repetido para o branco da amostra. Ao final do tempo de reação, o espectrofotômetro, operando no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 500 nm, é “zerado” com o branco e procede-se com as leituras das amostras, conforme ilustra o fluxograma contido na Figura 7.

Figura 7 – Fluxograma de execução do método HACH



Fonte: HACH (2021) (modificado).

### 4.4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

#### 4.4.2.1 Linearidade

Para determinar a linearidade do método, uma curva de calibração foi construída através do método de padronização externa, conforme proposto pelo INMETRO (BRASIL, 2020), em sete níveis diferentes de concentrações.

Na determinação da curva utilizou-se um MRC (Material de Referência Certificado) de

nitrito com concentração de 1000 mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L para preparar uma solução intermediária (solução estoque) com concentração de 10 mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L. Para isso, 0,5 mL foram diluídos em água destilada para o volume final de 50 mL. A partir dessa solução intermediária foram realizadas diluições sucessivas em água destilada a fim de se obter os 7 padrões de calibração, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Dados da preparação dos padrões de calibração

<b>Concentração de nitrato (mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ L)</b>	<b>Volume da solução estoque para diluição a 100 mL (mL)</b>
0,2	2,0
0,4	4,0
0,5	5,0
1,0	10,0
2,0	20,0
5,0	50,0
10,0	100,0

Fonte: Próprio autor (2021).

A análise dos padrões foi realizada conforme o método apresentado no item “4.4.1 Quantificação de nitrato pelo método HACH” e o procedimento de calibração foi conduzido conforme consta no manual de funcionamento do espectrofotômetro HACH DR 3900. Os valores de absorvância obtidos foram relacionados graficamente com as correspondentes concentrações possibilitando a determinação da curva analítica de calibração e a quantificação do analito. Para checagem do equipamento e garantir a eficiência da linearidade da curva de calibração, utilizou-se o MR de nitrato (100 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ L) diluído à concentração de 0,5 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ L.

#### 4.4.2.2 Limite de Quantificação

A estimativa do limite de quantificação foi realizada através do método de determinação do desvio padrão do branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito, conforme proposto pelo INMETRO (BRASIL, 2020). Para essa estimativa, foram preparados e analisados 11 padrões de controle independentes com concentração de 0,5 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ L em

condições de precisão intermediária (diferentes dias). A preparação dos padrões consistiu na diluição de 5 ml da solução estoque de 10 mg/L (preparada conforme descrito no item 4.4.2.1 Linearidade) em água destilada para um volume total de 100 mL.

#### 4.4.2.3 Precisão

A precisão do método foi determinada em nível de precisão intermediária através das análises de padrões de controle, conforme proposto pelo INMETRO (BRASIL, 2020). Para isso foram preparados 15 padrões de controle na concentração de 0,5 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ L seguindo o mesmo procedimento descrito no item “4.4.2.2 Limite de Quantificação”. Os padrões preparados foram analisados por diferentes analistas (2) em diferentes intervalos de tempo (15 dias para cada analista).

#### 4.4.2.4 Exatidão

Seguindo a orientação do INMETRO (BRASIL, 2020), a exatidão do método foi avaliada através de ensaios de adição e recuperação de padrão. Para isso foram preparadas três amostras em duplicata contendo diferentes concentrações do analito (0,5; 5 e 10 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ L), utilizando como matriz água destilada que teve sua concentração previamente determinada.

A adição dos incrementos de 0,5 e 5 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ L consistiu em diluir, respectivamente, 5 e 50 mL da solução estoque de 10 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L (preparada conforme descrito no item “4.4.2.1 Linearidade”) em alíquotas individuais das amostras para o volume final de 100 mL. Para o incremento de 10 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ L, utilizou-se a própria solução.

#### 4.4.2.5 Efeito Matriz (Seletividade/Robustez)

Para estudo do efeito matriz, bem como para a validação dos parâmetros seletividade e robustez, foram realizados ensaios de adição e recuperação de padrão nas amostras de água potável, superficial e efluente, conforme propõe o INMETRO (BRASIL, 2020). Inicialmente, as amostras foram submetidas em duplicata ao método de determinação de nitrato para obter a concentração inicial do analito nas mesmas. Tendo a concentração inicial determinada, as mesmas amostras foram fortificadas com incrementos de 1 e 5 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L e submetidas novamente ao método.

A adição do incremento de 1 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L consistiu em diluir 10 mL da solução estoque

de 10 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L (preparada conforme descrito no item “4.4.2.1 Linearidade” em alíquotas individuais das amostras para o volume final de 100 mL. O mesmo procedimento foi utilizado para a fortificação de 5 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, utilizando, no entanto, 50 mL da solução estoque.

#### 4.4.2.6 Incerteza da Medição

A incerteza da medição foi determinada com base na precisão e exatidão do método conforme propõe a abordagem supra analítica, referenciada nos Guias Eurachem/Citac, e Nordtest, (EURACHEM/CITAC, 2012; NORDTEST, 2017).

Para determinação da componente da incerteza associada a exatidão do método, ensaios de recuperação foram conduzidos em condições de precisão intermediária (5 diferentes dias). Neles, duplicatas de amostras de água destilada foram fortificadas com a concentração de 0,5 mgN-NO<sub>3</sub>/L e submetidas ao mesmo procedimento descrito no item “4.4.2.4 Exatidão”.

Para determinação da componente da incerteza associada a precisão do método, foram analisados 15 padrões de controle independentes com concentração de 0,5 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L em condições de precisão intermediária (15 diferentes dias). Os padrões foram preparados e analisados seguindo o mesmo procedimento descrito no item “4.4.2.3 Precisão”.

### 4.5 Análise estatística

Com intuito de garantir que as análises realizadas possuem a credibilidade e a qualidade exigidas, os dados obtidos dos ensaios foram submetidos a um tratamento estatístico. Para isso foram utilizados o software Microsoft Excel 2019 e ferramentas da estatística descritiva, comparativa e associativa, pormenorizadas nos tópicos da revisão bibliográfica. Além disso, os testes estatísticos foram realizados com nível de confiança de 95% ( $\alpha = 5\%$ ;  $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Validação do método

#### 5.1.1 LINEARIDADE

A linearidade foi estabelecida mediante a construção de uma curva analítica de calibração pelo método de padronização externa. Para a construção da curva, conforme proposto pelo INMETRO (BRASIL, 2020), sete diferentes níveis de concentração do MRC (Material de Referência Certificado) contendo o analito foram submetidos ao método espectrofotométrico HACH, o que permitiu a obtenção da resposta do equipamento (absorbância) associada a cada nível de concentração utilizado, conforme apresenta a Tabela 3.

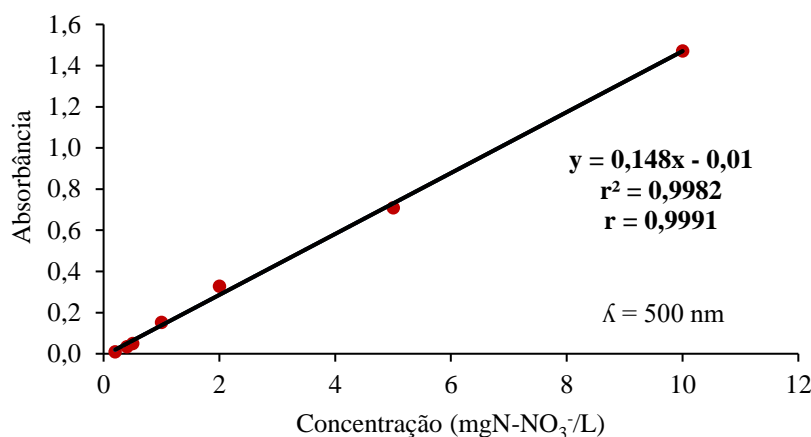
Tabela 3 - Dados utilizados para construção da curva de calibração

<b>Concentração do padrão (mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ L)</b>	<b>Absorbância</b>
0,200	0,010
0,400	0,034
0,500	0,050
1,000	0,153
2,000	0,329
5,000	0,709
10,000	1,472

Fonte: Próprio autor, 2021.

Utilizando o software Microsoft Excel, os pontos da curva foram plotados em um gráfico relacionando as medidas de absorbância (eixo y) com os valores de concentração correspondentes (eixo x) (Figura 8). Através de uma regressão linear, utilizando o ajuste de dados pelo método dos mínimos quadrados, obteve-se a equação da reta (Equação 29) que correlaciona as variáveis citadas, bem como os respectivos coeficientes de determinação ( $r^2$ ) e de correlação linear ( $r$ ).

Figura 8 - Curva de calibração



Fonte: Próprio autor, 2021.

$$y = 0,148 \cdot x - 0,01 \quad (29)$$

Como observado na Figura 8, o ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados resultou em um coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,9991. O valor do coeficiente de correlação obtido indica que 99,91% dos dados de concentração de nitrato são preditos pelo equacionamento decorrente da regressão linear representada pela Equação 29, o que evidencia um bom ajuste dos dados segundo Pagan *et al.* (2019).

Além disso, de acordo a ANVISA (BRASIL, 2017b) e o INMETRO (BRASIL, 2020), um coeficiente de correlação na faixa de 0,90 a 0,99 é um bom indicativo do quanto a reta pode ser considerada adequada como modelo matemático, porém não é conclusivo. Dessa forma, como um valor de coeficiente de correlação muito próximo da unidade não é necessariamente resultado de uma relação linear (AMC, 1994; GONZÁLEZ, 2006), os resíduos da curva de calibração também foram calculados (Tabela 4) e representados graficamente (Figura 9) com o objetivo de avaliar a adequação dos dados ao modelo.

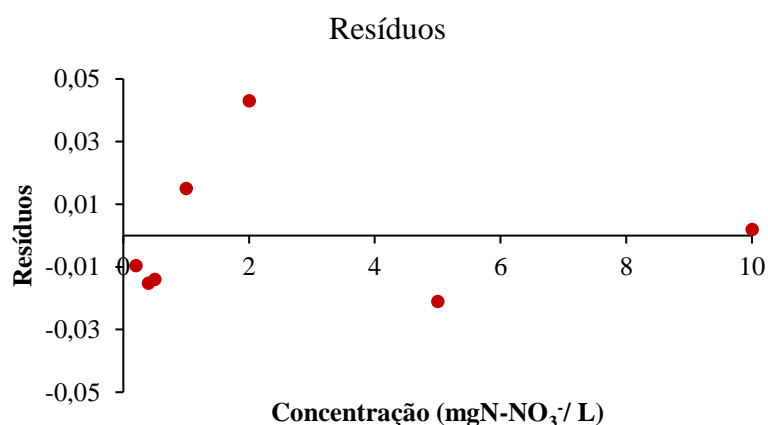


Tabela 4 - Dados do cálculo de resíduos da curva de calibração

Concentração (mgN-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / L)	Absorbância observada	Absorbância prevista	Resíduos
0,2	0,010	0,020	-0,010
0,4	0,034	0,049	-0,015
0,5	0,050	0,064	-0,014
1	0,153	0,138	0,015
2	0,329	0,286	0,043
5	0,709	0,730	-0,021
10	1,472	1,470	0,002

Fonte: Próprio autor, 2021.

Figura 9 - Gráfico de resíduos da curva de calibração



Fonte: Próprio autor, 2021.

Observando a Figura 9, é possível perceber que os resíduos apresentam uma distribuição aleatória. Esse comportamento, segundo o INMETRO (BRASIL, 2020), indica de que o modelo linear é satisfatoriamente adequado para explicar a relação entre as variáveis estudadas.

Para verificar numericamente a qualidade desse ajuste, utilizou-se também o teste estatístico de Mandel (ISO 8466-1, 1990; ISO 8466-2, 1990). Conforme propõe o mesmo, inicialmente determinou-se as funções de calibração linear e não linear, representadas pelas Equações 30 e 31, nessa ordem. Em seguida foram calculados os resíduos e os desvios-padrão

residuais das funções de calibração linear e não linear com auxílio das Equações 6 e 7, respectivamente, cujos valores estão apresentados na Tabela 5.

$$y_{i1} = 0,148x - 0,01 \quad (30)$$

$$y_{i2} = -0,0003x^2 + 0,1512x - 0,0127 \quad (31)$$

Tabela 5 - Desvio padrão residual das funções de calibração linear e não linear

Função de calibração linear ( $y_{i1}$ )				Função de calibração não linear ( $y_{i2}$ )			
yexp	yprev	r	s	yexp	yprev	r	s
0,0100	0,0196	-0,0096		0,0100	0,0175	-0,0075	
0,0340	0,0492	-0,0152		0,0340	0,0477	-0,0137	
0,0500	0,0640	-0,0140		0,0500	0,0628	-0,0128	
0,1530	0,1380	0,0150	0,0247	0,1530	0,1382	0,0148	0,0274
0,3290	0,2860	0,0430		0,3290	0,2885	0,0405	
0,7090	0,7300	-0,0210		0,7090	0,7358	-0,0268	
1,4720	1,4700	0,0020		1,4720	1,4693	0,0027	

Em que:  $y_{exp}$  = absorvância obtida experimentalmente;  $y_{prev}$  = absorvância estimada pelas funções de calibração; r = resíduo; s = desvio padrão dos resíduos. Fonte: Próprio autor (2021).

Por fim, concluiu-se o teste comparando o valor teste ( $VT_M$ ), calculado por meio da Equação 8 em função da diferença entre variâncias (DS) das duas funções, determinada pela Equação 5, com o  $F_{crítico}$  da distribuição de Fisher a um nível de confiança de 95% e 4 graus de liberdade. A Tabela 6 mostra os resultados obtidos no teste.

Tabela 6 - Resultados obtidos no teste de Mandel

Parâmetros	Resultados
$DS^2$	4,3E-05
$VT_M$	0,0016
<b><math>F_{crítico} (\gamma = 95\%; GL = 4)</math></b>	<b>7,7100</b>

Em que:  $DS^2$  = diferença entre variâncias;  $VT_M$  = valor teste do teste de Mandel;  $F_{crítico}$  = valor tabelado da distribuição de Fisher/ Snedecor. Fonte: Próprio autor (2021)

Os dados da Tabela 5 evidenciam a proximidade dos valores de desvio padrão residual para as funções de calibração linear e não linear. Essa proximidade é ratificada pelo resultado do Teste de Mandel apresentado na Tabela 6, uma vez que, a 95% de nível de confiança e 4 graus de liberdade, se obteve um valor teste menor que o  $F_{crítico}$ , o que demonstra que a curva de calibração se ajustou satisfatoriamente a uma função linear já que a exclusão de um parâmetro da função da curva não afetou significativamente a variância da população. Esse comportamento confirma a linearidade do método (ISO 8466-1, 1990; ISO 8466-2, 1990).

### 5.1.2 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Conforme proposto pelo INMETRO (BRASIL, 2020), o limite de quantificação foi estimado por meio do desvio padrão de brancos da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito, definida nesse trabalho como 0,5 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L após análise da precisão e exatidão. Para avaliar a concentração utilizada, bem como para estimar o LQ, 11 amostras independentes foram submetidas ao método em condições de precisão intermediária (diferentes dias). A Tabela 7 expõe os dados resultantes dessas análises.

Tabela 7 - Resultados da estimativa do limite quantificação

Amostra	C (mgN-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L)	s (mgN-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L)	CV (%)	ER (%)	LQ (mgN-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L)
1	0,54				
2	0,51				
3	0,52				
4	0,56				
5	0,55				
6	0,52	0,02	4,11	7,27	0,22
7	0,50				
8	0,53				
9	0,57				
10	0,55				
11	0,55				

Em que: C = concentração; s = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; ER = erro relativo; LQ = limite de quantificação. Fonte: Próprio autor (2021).

A partir das leituras das amostras, apresentadas na Tabela 7, foi possível calcular o coeficiente de variação e o erro relativo (por meio das Equações 12 e 19, nessa ordem) no intuito de avaliar, respectivamente, a precisão e exatidão da concentração empregada na determinação do Limite de quantificação. Os valores obtidos para esses parâmetros demonstram que a concentração padrão utilizada possui precisão e exatidão estatisticamente aceitáveis, uma vez que foram menores que 10 % como propõe a AOAC (AOAC, 2016).

A Tabela 7 apresenta também o limite de quantificação de 0,22 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L calculado com auxílio da Equação 10. O valor encontrado é semelhante ao obtido por Oliveira (2007) na determinação de nitrato em água por espectrofotometria ultravioleta-visível com segunda-derivada, o qual atingiu 0,21 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L para uma faixa de trabalho de 0,5 a 4 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. Essa similaridade permite observar a boa capacidade de detecção e quantificação do método de espectrofotometria direta da HACH, uma vez que leituras com segunda-derivada proporcionam melhores detecções do analito pois o distingue melhor dos potenciais interferentes que absorvem na mesma região do espectro (OLIVEIRA, 2007; SILVA, 2013).

Além disso, o valor estimado encontra-se abaixo dos Valores Máximos Permitidos das principais resoluções que regulamentam a concentração do nitrato em água, demonstrando a capacidade do método de detectar e quantificar baixas concentrações de nitrato com segurança sobretudo para o seu propósito, tornando-o satisfatório. Em casos em que o analito ocorra em concentrações abaixo desse limite, o resultado pode ser considerado como abaixo dos limites mínimos ou traços (BRASIL, 2005; BRASIL, 2008; BRASIL, 2011; BRASIL, 2017b; GOES-JUNIOR *et al.*, 2017).

### 5.1.3 DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO

A precisão do método foi determinada em nível de precisão intermediária. Para isso, 15 padrões de controle foram preparados na concentração de 0,5 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L e analisados por diferentes analistas (2) em diferentes intervalos de tempo (15 dias para cada analista). A partir dos dados obtidos foi possível calcular o desvio padrão de precisão intermediária por meio da Equação 11 e o coeficiente de variação através Equação 12, cujos valores estão contidos na Tabela 8.

Tabela 8 - Dados da determinação da precisão do método

Tempo	Analista	Concentração por ensaio	Concentração média	s	CV
1	1	0,54			
1	1	0,51			
1	1	0,52			
1	1	0,54			
1	1	0,50			
1	1	0,52			
1	1	0,50			
1	1	0,53	0,5240	0,018	3,368
1	1	0,54			
1	1	0,55			
1	1	0,53			
1	1	0,52			
1	1	0,55			
1	1	0,51			
1	1	0,50			
2	2	0,50			
2	2	0,53			
2	2	0,52			
2	2	0,55			
2	2	0,54			
2	2	0,52			
2	2	0,51			
2	2	0,52	0,519	0,019	3,706
2	2	0,50			
2	2	0,52			
2	2	0,55			
2	2	0,51			
2	2	0,49			
2	2	0,53			
2	2	0,49			

Em que: Tempo 1 e 2 = 15 dias; Concentração e desvio padrão (s) em mgN-NO<sub>3</sub>/L; CV: coeficiente de variação (%). Fonte: Próprio autor (2021)

Como é possível observar na Tabela 8, as análises realizadas pelos analistas 1 e 2 nos correspondentes intervalos de tempo resultaram em coeficientes de variação de 3,368 % e 3,706 %, respectivamente. Os valores obtidos evidenciam que o método estudado possui precisão estatisticamente aceitável pois são inferiores a 10%, limite máximo reportado na literatura como ideal para aceitação do coeficiente de variação (AOAC, 2016).

Para avaliar se alguma das condições testadas influenciou significativamente a precisão do método, os desvios-padrão de precisão intermediária e as concentrações médias referentes a cada grupo foram comparados, respectivamente, pelo teste F de Fisher e pelo teste T de Student, conforme recomendado pelo INMETRO (BRASIL, 2020). A Tabela 9 mostra os resultados obtidos para os testes.

Tabela 9 - Resultados do Teste F e T para precisão

<b>Parâmetros</b>	<b>Valor</b>
$VT_F$	0,8428
Fcrítico ( $\gamma=95\%$ ; GL=14)	2,484
$VT_{T2}$	0,7916
Tcrítico ( $\gamma=95\%$ ; GL=28)	2,048

Em que:  $VT_F$ = valor teste do teste F;  $VT_{T2}$ = valor teste do teste T para médias de duas populações; Fcrítico = valor crítico da distribuição de Fisher; Tcrítico = valor crítico da distribuição de Student;  $\gamma$  = nível de confiança; GL = graus de liberdade. Fonte: Próprio autor (2021).

Os dados apresentados na Tabela 9 mostram que para o teste F, a 95% de nível de confiança e 14 graus de liberdade, obteve-se um valor teste, calculado através da Equação 13, menor que o Fcrítico tabelado na distribuição de Fisher. Um comportamento semelhante foi observado no teste T, uma vez que, a 95% de nível de confiança e 28 graus de liberdade, obteve-se um valor teste, calculado através da Equação 14, também menor que o Tcrítico tabelado na distribuição de Student.

Esse resultado demonstra que não existe diferença estatisticamente significativa entre as variâncias e entre as médias obtidas para os ensaios realizados em diferentes dias com analistas distintos. A partir disso, é possível perceber que as diferentes condições operacionais adotadas não interferiram de maneira significativa na performance do método, comprovando a validade dos parâmetros de precisão intermediária do mesmo com um índice de confiabilidade de 95% (ALMEIDA, 2012; BRASIL, 2020).

Além da precisão intermediária, os resultados obtidos para os ensaios evidenciaram também a robustez do método durante aplicações rotineiras, uma vez que a mesma pode ser determinada através da variação das condições de operação, nomeadamente condições de precisão intermédia (QUEIROZ, 2015).

#### 5.1.4 DETERMINAÇÃO DA EXATIDÃO DO MÉTODO

A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de adição e recuperação de padrão. Para isso, utilizando como matriz água destilada, foram preparadas três amostras contendo diferentes concentrações do analito: 0,5; 5 e 10 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. As amostras preparadas foram analisadas em duplicata e a porcentagem de recuperação, coeficiente de variação e erro relativo foram determinados por meio das Equações 2, 12 e 19, respectivamente. Os dados obtidos nos ensaios estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Dados dos ensaios de exatidão para 3 níveis de concentração de nitrato

Fortificação	Concentração de nitrato		Parâmetros estatísticos		
	Amostra Bruta $\pm$ s	Amostra Fortificada $\pm$ s	Recuperação	CV	ER
0,500	0,070 $\pm$ 0,000	0,530 $\pm$ 0,014	92,000 $\pm$ 2,828	3,074	6,000
5,000	0,070 $\pm$ 0,000	5,055 $\pm$ 0,092	99,700 $\pm$ 1,697	1,844	1,100
10,000	0,070 $\pm$ 0,000	0,530 $\pm$ 0,014	99,450 $\pm$ 0,924	0,924	0,150

Em que: s = desvio padrão (mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L); CV = coeficiente de recuperação (%); ER = erro relativo (%); concentração em mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L; recuperação em %. Fonte: Próprio autor (2021).

Como pode ser observado na Tabela 10, a porcentagem média das taxas de recuperação foi de 92,000% a 99,450%. Os valores alcançados estão situados dentro da faixa de 80% a 120% normalmente estabelecida como critério de aceitação para porcentagens de taxa de recuperação em métodos que utilizam a espectrofotometria de absorção molecular na região Ultravioleta-Visível (AOAC, 2016; DIAS, 2019; FERNANDES, 2015).

De maneira análoga, os coeficientes de variação e os erros relativos também contidos na Tabela 10 apresentam valores inferiores ao limite de 10% normalmente recomendado como aceitável para esses parâmetros estatísticos das análises (AOAC, 2016). Esses resultados evidenciam o quão próximo os valores experimentais estão dos valores teóricos.

Da Tabela 10 é possível perceber também que os valores obtidos para os parâmetros estatísticos coeficiente de variação e erro relativo diminuíram à medida que foi elevada a

concentração do analito nas amostras. Esse comportamento é esperado pois, na maioria dos casos, a precisão e exatidão do método diminui com a diminuição da concentração, uma vez que concentrações muito próximas dos limites mínimos de detecção e quantificação do equipamento contribuem para a dificuldade no equilíbrio químico e na detecção. Diante disso a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações, devendo, por esse motivo, ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse (GARP 1999; HINCHEE *et al*, 1994 *apud* LIMA *et al.*, 2017).

Para avaliar estatisticamente as taxas de recuperação obtidas utilizou-se o teste de significância T de Student para média de uma população. Por meio dele foi possível avaliar se os valores obtidos são estatisticamente diferentes do valor esperado (100%). Para isso, calculou-se o valor teste ( $VT_{T1}$ ) por meio da Equação 3 e este foi comparado com o  $T_{crítico}$  tabelado na distribuição de Student. Os resultados do teste estão contidos na Tabela 11.

Tabela 11 - Resultados do teste T para exatidão

Concentração de fortificação	Parâmetros	Valor
0,500	$VT_{T1}$	4,000
	$T_{crítico}$ ( $\gamma=95\%$ , $GL=1$ )	12,706
5,000	$VT_{T1}$	0,231
	$T_{crítico}$ ( $\gamma=95\%$ , $GL=1$ )	12,706
10,000	$VT_{T1}$	0,826
	$T_{crítico}$ ( $\gamma=95\%$ , $GL=1$ )	12,706

Em que: Concentração em mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L;  $VT_{T1}$ = valor teste do teste T para média de uma população;  $T_{crítico}$  = valor crítico da distribuição de Student;  $\gamma$  = nível de confiança;  $GL$  = grau de liberdade. Fonte: Próprio autor (2021).

Como é possível verificar na Tabela 11, para os 3 níveis de fortificação utilizados nos ensaios de recuperação, o valor teste, determinado a 95% de confiança e 1 grau de liberdade, é inferior ao valor crítico tabelado na distribuição de Student. Segundo Assis, Sousa e Linhares (2020), esse comportamento permite concluir que não existe diferença estatisticamente significativa entre a estimativa central dos resultados experimentais e o valor de referência (100%).

De maneira geral, os resultados obtidos demonstraram que as variações da concentração de nitrato em soluções podem ser prontamente quantificadas pelo método analítico pois houve conformidade entre as quantidades teóricas adicionadas e as determinadas experimentalmente.



Sendo assim, o método pode ser considerado suficientemente exato ao longo da faixa de trabalho independentemente da concentração utilizada (ARAÚJO, 2019; MOURA; LIRA; MAGALHÃES, 2008).

No entanto, apesar dos resultados satisfatórios, é importante considerar que o parâmetro exatidão pode ser influenciado pelo efeito matriz. Segundo Ribani *et al.* (2004), se o analito adicionado não está, necessariamente, na mesma forma que a presente na amostra isso pode implicar em avaliações excessivamente otimistas ou pessimistas da recuperação, precisão e exatidão, uma vez que a matriz utilizada pode conter componentes que interfiram na separação, detecção ou quantificação da substância de interesse. Por isso esse efeito deve ser investigado.

#### 5.1.5 ESTUDO DO EFEITO MATRIZ (SELETIVIDADE E ROBUSTEZ)

Para avaliar o efeito matriz da amostra, bem como validar a seletividade e robustez do método, foram realizados ensaios de recuperação em amostras de água potável, água superficial e efluente. Nesses ensaios realizados em duplicatas, as amostras tiveram suas concentrações determinadas com e sem a fortificação de 1 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. A partir dos resultados das análises, calcularam-se as taxas de recuperação e coeficientes de variação por meio da Equação 2 e 12, respectivamente. Os valores obtidos encontram-se expostos na Tabela 12.

Tabela 12 - Dados do ensaio de recuperação para avaliação da Seletividade e Robustez

Matriz	Fortificação	Concentração média ± s		Dados Estatísticos	
		Amostra Bruta	Amostra fortificada	Recuperação ± s	CV
Potável	1,000	0,020 ± 0,000	0,925 ± 0,021	90,500 ± 2,121	2,344
Superficial	1,000	2,785 ± 0,021	2,545 ± 0,007	- 24,00 ± 1,414	-5,893
Efluente	1,000	2,520 ± 0,000	3,423 ± 0,025	92,250 ± 2,475	2,742

Em que: Concentração e fortificação em mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L; s = desvio padrão (mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L); CV = coeficiente de variação (%). Fonte: Próprio autor (2021).

Da análise da Tabela 12 é possível verificar que as taxas de recuperação obtidas para água potável e efluente se encontram acima de 90%, isto é, dentro da faixa de aceitação de 80% a 120% normalmente estabelecida como critério de aceitação para porcentagens de taxa de recuperação (AOAC, 2016). Para a água superficial, no entanto, não se obteve taxas de recuperação coerentes. Diante disso, outros ensaios foram realizados para essa matriz com

amostras e concentração de fortificação diferentes. Os resultados obtidos para os novos testes encontram-se expostos na Tabela 13.

Tabela 13 - Dados da repetição do ensaio de recuperação para água superficial

Matriz Superficial	Fortificação	Concentração média $\pm$ s		Dados Estatísticos	
		Amostra Bruta	Amostra fortificada	Recuperação $\pm$ s	CV
Amostra 1	5,000	2,825 $\pm$ 0,035	4,655 $\pm$ 0,021	36,600 $\pm$ 1,131	3,091
Amostra 2	5,000	1,950 $\pm$ 0,071	4,345 $\pm$ 0,035	47,900 $\pm$ 0,707	1,476

Em que: Concentração em mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L; s = desvio padrão; CV = coeficiente de variação. Fonte: Próprio autor (2021).

Como mostrado na Tabela 13, ao repetir os ensaios para água superficial testando uma concentração de fortificação mais elevada ainda não foi possível obter taxas de recuperação dentro dos limites de 120 a 80% de aceitação adotados. Esse resultado pode ser considerado uma evidência de que o método possui baixa precisão e exatidão para amostras do tipo água superficial com concentrações abaixo de 5 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L.

Esse comportamento normalmente decorre de fatores como a presença de interferentes que também absorvem na mesma região do espectro ultravioleta-visível dos nitratos, dificultando sua detecção e conseqüentemente afetando a recuperação analítica pelo método (ALMEIDA, 2012; KINDLEIN, 2010; VIEIRA, 2017).

Para avaliar estatisticamente as taxas de recuperação obtidas, utilizou-se o teste de significância T de Student para média de uma população. Por meio dele foi possível avaliar se os valores obtidos são estatisticamente diferentes do valor esperado (100%). Para isso, calculou-se o valor teste (VT<sub>T1</sub>) por meio da Equação 3 e este foi comparado com o T<sub>crítico</sub> tabelado na distribuição de Student. Os resultados do teste estão contidos na Tabela 14.

Tabela 14 - Resultados do teste T para Seletividade e Robustez

<b>Matriz</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>Valor</b>
Potável	$VT_{T1}$	6,333
	Tcrítico ( $\gamma=95\%$ , $GL=1$ )	12,706
Efluente	$VT_{T1}$	5,571
	Tcrítico ( $\gamma=95\%$ , $GL=1$ )	12,706
Superficial - amostra 1	$VT_{T1}$	79,250
	Tcrítico ( $\gamma=95\%$ , $GL=1$ )	12,706
Superficial - amostra 2	$VT_{T1}$	104,200
	Tcrítico ( $\gamma=95\%$ , $GL=1$ )	12,706

Em que:  $VT_{T1}$  = valor teste do teste T para média de uma população; Tcrítico = valor crítico da distribuição de Student;  $\gamma$  = nível de confiança; GL = graus de liberdade. Fonte: Próprio autor (2021).

Como é possível verificar na Tabela 14, para as matrizes água potável e efluente, o valor teste, determinado a 95% de confiança e 1 grau de liberdade, é inferior ao valor crítico tabelado na distribuição de Student. Segundo Assis, Souza e Linhares (2020), isso permite concluir que não existe diferença estatisticamente significativa entre a estimativa central dos resultados experimentais e o valor de referência (100%). Para a matriz água superficial, no entanto, o valor teste, referente às duas amostras ensaiadas com a concentração de fortificação de 5 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, é superior ao valor crítico da distribuição, o que indica que as taxas de recuperação obtidas são estatisticamente diferentes do valor esperado.

Em suma, as taxas de recuperação obtidas para os ensaios com fortificação de 1 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L nas amostras permitiram constatar a seletividade e robustez do método para água potável e efluente pois, segundo Gonçalves *et al.* (2006), qualquer valor entre 80 e 120% indica que tanto o procedimento como a matriz não influenciam de modo significativo a detecção do analito, comportamento também ratificado pelo teste estatístico de significância.

Já para a matriz de água superficial, as taxas de recuperação fora dos limites de aceitação e o teste estatístico de significância demonstram que os parâmetros seletividade e robustez sofreram influência significativa do efeito matriz que, de acordo com o INMETRO (BRASIL, 2020), pode aumentar ou reduzir o sinal do método dependendo da concentração do analito na amostra. Segundo Lima *et al.* (2017), esse comportamento indica que para esse tipo de matriz, na faixa linear aplicada nesse trabalho, o método deve ser empregado de forma qualitativa, utilizando a quantificação por meio da adição de padrão ou através criação de um fator de correção para a curva de calibração.

Das Tabelas 12 e 13 é possível perceber também que as amostras utilizadas nos ensaios de recuperação possuem concentração abaixo de 10 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ L, indicado como Valor Máximo Permitido pela Portaria de consolidação n° 05 para água de consumo e Resoluções do CONAMA para águas subterrâneas, superficiais e efluentes, de acordo com o enquadramento. Sendo assim, os resultados obtidos apontam adequação da qualidade da água das amostras utilizadas perante as legislações vigentes, uma vez que concentrações acima do VPM inviabilizam a utilização das mesmas pois pode trazer altos riscos à saúde (BOUCHARD *et al.*, 1992 *apud* FREITAS; ALMEIDA; BRILHANTE, 2001).

#### 5.1.6 DETERMINAÇÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO

Conforme propõe a Abordagem Supra Analítica, as fontes consideradas para a estimativa da incerteza global da medição foram a precisão e exatidão. A determinação dessas componentes foi realizada por meio de dados de validação e controle de qualidade interno obtidos em condições de precisão intermediária que serão apresentados a seguir.

A incerteza associada a precisão do método foi avaliada a partir dos dados de replicados de padrões de controle. Para isso, 15 amostras com concentração 0,5 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L foram analisadas em condições de precisão intermediária (diferentes dias) o que permitiu calcular a incerteza padrão associada a precisão com auxílio da Equação 21. Na Tabela 15 encontram-se os dados obtidos nessa determinação.

Já incerteza associada a exatidão do método foi avaliada a partir dos dados de taxas de recuperação do analito. Para isso, 5 ensaios de recuperação foram realizados em condições de precisão intermediária (diferentes dias) nos quais amostras de água destilada foram fortificadas com a concentração de 0,5 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. Como a concentração de fortificação utilizada foi obtida por meio de diluições sucessivas do MRC (Material de Referência Certificado), inicialmente determinou-se as incertezas associadas a essas diluições por meio da Equação 23, cujos valores estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 15 - Dados da estimativa da incerteza padrão associada a precisão do método

<b>Dia</b>	<b>Concentração experimental</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Incerteza padrão</b>
1	0,54			
2	0,51			
3	0,52			
4	0,54			
5	0,50			
6	0,52			
7	0,50			
8	0,53	0,524	0,018	0,018
9	0,54			
10	0,55			
11	0,53			
12	0,52			
13	0,55			
14	0,51			
15	0,50			

Em que: Concentração, média, desvio padrão e incerteza padrão em mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. Fonte: Próprio autor (2021).

Tabela 16 - Dados da incerteza padrão associada a diluição das soluções utilizadas

<b>Parâmetros</b>	<b>Solução de 10 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L</b>	<b>Solução de 0,5 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L</b>
C <sub>dil</sub> (mgN-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L)	10,000	0,500
up <sub>con</sub> (mgN-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L)	3,000	0,120
C <sub>con</sub> (mgN-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L)	1000,000	10,000
V <sub>i</sub> (mL)	0,500	5,000
up <sub>vi</sub> (mgN-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L)	0,006	0,009
V <sub>f</sub> (mL)	50,000	100,000
up <sub>vf</sub> (mgN-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L)	0,035	0,058
up <sub>dil</sub> (mgN-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L)	0,120	0,006

Em que: C<sub>dil</sub> = concentração da solução diluída; up<sub>con</sub> = incerteza padrão da solução concentrada; C<sub>con</sub> = concentração da solução concentrada; V<sub>i</sub> = volume inicial (volume necessário da solução concentrada); up<sub>vi</sub> = incerteza padrão do volume inicial; V<sub>f</sub> = volume final (volume total da solução diluída); up<sub>vf</sub> = incerteza padrão do volume final; up<sub>dil</sub> = incerteza padrão da solução diluída. Fonte: Próprio autor (2021).

A partir dos valores da incerteza padrão das soluções utilizadas (Tabela 16) e das taxas de recuperação obtidas nos ensaios foi possível calcular a incerteza padrão associada a exatidão com auxílio da Equação 22. A Tabela 17 expõe os resultados decorrentes dessa determinação.

Tabela 17 - Dados da estimativa da incerteza padrão associada a exatidão do método

<b>Dia</b>	<b>Concentração da amostra bruta</b>	<b>Concentração da amostra fortificada</b>	<b>Taxas de recuperação</b>	<b>Incerteza padrão</b>
1	0,070	0,540	0,940	
2	0,070	0,510	0,880	
3	0,070	0,520	0,900	0,021
4	0,080	0,540	0,920	
5	0,070	0,500	0,860	

Em que: Concentração e incerteza padrão em mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. Fonte: Próprio autor (2021).

Para expressão final da incerteza da medição, os valores obtidos para as componentes precisão e exatidão foram combinados conforme proposto pela Lei de Propagação das Incertezas (Equação 25) afim de se obter a incerteza combinada. Dessa forma foi possível calcular a incerteza expandida, utilizando a Equação 26, com um fator de expansão definido para 95% de nível de confiança e 3 graus de liberdade efetivos, calculados pela Equação 27. A Tabela 18 apresenta os resultados decorrentes dessa estimativa.

Tabela 18 – Dados da estimativa da incerteza combinada e expandida da medição

<b>Incerteza combinada</b>	<b>Fator de expansão (<math>\gamma=95\%</math>, <math>GL=3</math>)</b>	<b>Incerteza expandida</b>
0,021	3,182	0,066

Em que:  $\gamma$  = nível de confiança; GL = graus de liberdade. Incerteza em mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. Fonte: Próprio autor (2021).

A partir dos resultados apresentados na Tabela 18 é possível expressar a incerteza associada a determinação da concentração das amostras analisada pelo método. Segundo o guia para expressão da incerteza de medição (BRASIL, 2012b), para as amostras utilizadas nos ensaios de recuperação, por exemplo, pode-se expressar o resultado médio de concentração como: 0,522 ± 0,07 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, no qual a incerteza reportada é uma incerteza expandida calculada usando um fator de expansão  $k$  igual a 3,182 a um nível de confiança de aproximadamente de 95%.

Conforme o guia EURACHEM/CITAC para utilização de incerteza alvo (EURACHEM/CITAC, 2015), o critério de aceitação do nível de incerteza obtida para o método poderá ser avaliado através da comparação com uma incerteza alvo definida pelos órgãos reguladores da área de aplicação do método, através de resoluções e normas técnicas. A resoluções do CONAMA e a Portaria de consolidação nº05 consideradas nesse trabalho, no entanto, não atribuem uma incerteza alvo para métodos de determinação do nitrato, assim como para os demais parâmetros de controle de qualidade.

Tendo definido a incerteza do método, é importante ressaltar que a adequabilidade do procedimento de medição para o fim a que se destina não depende somente da incerteza, mas também dos outros parâmetros de desempenho do método, como aqueles considerados nos processos de validação (EURACHEM/CITAC, 2015).

## 6 CONCLUSÃO

Ao realizar os experimentos de validação analítica foi possível verificar a aplicabilidade do método 8171 da HACH para determinação de nitrato em amostras de matrizes do tipo água potável, superficial e efluente e Materiais de Referência Certificados. No decorrer das análises, percebeu-se que a validação é fundamental para conhecer as limitações do método, definir se o mesmo se adequa ao propósito para o qual está sendo utilizado e checar se produz resultados credíveis para seu uso.

A construção da curva de calibração permitiu constatar a linearidade do método para a faixa de concentração de 0,2 a 10 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, uma vez que se obteve coeficientes de correlação e determinação de respectivamente 0,999 e 0,998 que evidenciaram o bom ajuste dos dados. Já o limite de quantificação de 0,22 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L obtido foi inferior ao Valor Máximo Permitido das principais legislações salientando que o método possui boa sensibilidade para aplicação a que se destina.

Além disso, o método também demonstrou precisão satisfatória uma vez que os coeficientes de variação, obtidos em condição de precisão intermediária para dois grupos (3,368% e 3,706%), não foram superiores ao limite de aceitação de 10%. Da mesma forma, também apresentou exatidão satisfatória, pois as taxas de recuperação média obtidas para 3 diferentes níveis concentrações de nitrato ao longo da faixa de trabalho (92,0%, 99,7%, 99,5%) estiveram situadas entre 80 a 120%, faixa adotada como critério de aceitação para esse parâmetro.

A avaliação dos parâmetros de seletividade e robustez demonstraram que o efeito matriz teve influência significativa na determinação de nitrato em amostras do tipo água superficial, uma vez que a taxa de recuperação encontrada estava fora dos limites de aceitação (-24,0%, 36,6%, 47,9%), indício do comprometimento da exatidão do método. Esse comportamento evidencia a necessidade de se fazer um estudo mais aprofundado da aplicabilidade do método para amostras desse tipo de matriz.

O valor obtido da incerteza de (0,066 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L) possibilitou a expressão do resultado final das medições com o intervalo de dispersão dos valores em torno do resultado obtido, conferindo às análises a credibilidade e a qualidade exigidas pelos padrões de qualidade dos principais órgãos de fiscalização e de padronização.

A partir dos resultados obtidos o método pode ser considerado validado desde que seja criteriosamente definida sua aplicação, uma vez que os valores obtidos para alguns parâmetros não se enquadraram claramente nos requisitos estabelecidos, como no caso da água superficial.



## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se, para trabalhos futuros, o estudo da aplicação do método 8171 da HACH para água água superficial nas seguintes condições:

- Utilizando uma faixa de trabalho com concentrações acima de 5 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L;
- Utilizando a quantificação por meio da adição de padrão;
- Utilizando um fator de correção para a curva de calibração.

## REFERÊNCIAS

ALLEY, E., R., **Water Quality Control Handbook**. McGraw-Hill Professional, 2000.

ALMEIDA, M. R. S. **Validação de um Método Analítico: Determinação de fósforo total**. 2012. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2012.

ALVES, E. I. S.; MENDES, M. A. Avaliação de Parâmetros de Qualidade da Água com Base no Uso Pretendido. **Programa de Apoio à Iniciação Científica (PAIC 2010 – 2011)**. Curitiba, 2010.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA), AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA), WATER ENVIRONMENT FEDERATION (WEF). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22<sup>a</sup> Ed. Washington, 2012.

ANALYTICAL METHODS COMMITTEE (AMC) *et al.* Is my calibration linear?. **Analyst**. v. 119, n. 11, 1994.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **AOAC Official methods of analysis**. Appendix D: guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Washington: AOAC, 2002.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **AOAC Official methods of analysis**. Appendix F: guidelines for Standard Method Performance Requirements. Gaithersburg: AOAC, 2016

ARAÚJO, E. R. **Validação de método espectrofotométrico UV-VIS e epectrofluorimétrico para determinação de corante vermelho de origem biotecnológica associado a nanocarreadores**. 2019. Dissertação (Mestrado profissional em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara-SP, 2019.

ASSEITUNO, A. P. F. **Avaliação da legislação do Estado de São Paulo quanto ao reuso de efluentes líquidos Industriais e sua viabilidade legal**. 2016. Monografia (Bacharelado em Gestão Ambiental) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicabas-SP, 2016.

ASSIS, J. P.; SOUSA, R. P.; LINHARES, P. C. F. **Testes de Hipóteses Estatísticas**. 1<sup>a</sup> Ed. Mossoró: EdUFERSA, 2020.

AUGUSTO, F.; ANDRADE, J. C.; CUSTÓDIO, R. Faixa linear de uma curva de calibração. **Revista Chemkeys**. nº3, 2000.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica- Parte I. Fundamentos e Calibração com um componente (Calibração Univariada). **Quim. Nova**. Vol. 25, nº 5, 2002.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. **Resolução nº 357/05**, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água do território nacional e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e dá outras providências. Diário Oficial da União: República Federativa do Brasil, Brasília-DF, 17 de março de 2005. 2005.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. **Resolução nº 430/11**, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre condições, parâmetros, padrões e diretrizes para gestão do lançamento de efluentes em corpos de água receptores, alterando parcialmente e complementando a Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. Diário Oficial da União: República Federativa do Brasil, Brasília-DF, 13 de maio de 2011. 2011a.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. **Resolução nº 396/08**, de 3 de abril de 2008. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. Diário Oficial da União: República Federativa do Brasil, Brasília-DF, 3 de abril de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria de Consolidação nº 5**, de 28 de setembro de 2017. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Diário Oficial da União: República Federativa do Brasil, Brasília-DF, 28 de setembro de 2017, 2017a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada – **RDC nº 166**, de 24 de julho de 2017. Estabelece critérios para a validação de métodos analíticos. Diário Oficial da União: República Federativa do Brasil, Brasília-DF, 28 de setembro de 2017, 2017b.

BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO. **DOQ-CGCRE-008 Rev.09 – Orientação sobre validação de métodos analítico**. Rio de Janeiro, Jun/2020.

BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO. **DOQ-CGCRE-008 Rev.04 – Orientação sobre validação de métodos analítico**. Rio de Janeiro, Jun/2011b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2011c.

BRASIL. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. **NBR ISO/IEC 17025**. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaios e calibração. 3ª Ed. Rio de Janeiro, 2017c.

BRASIL. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. **NBR ISO 3534-1**. Estatística – Vocabulário e símbolos Parte1: Termos estatísticos gerais e termos usados em probabilidade. 1ª Edição. Rio de Janeiro, 2010.

BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO. **Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM): Conceitos fundamentais e gerais e termos associados**. Primeira edição Luso-Brasileira. Duque de Caxias – RJ, 2012a.

BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO. **Avaliação de dados de medição: guia para a expressão de incerteza de medição (GUM 2008)** – Primeira Edição brasileira da 1ª Edição do BIPM de 2008: Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement, Duque de Caxias - RJ, 2012b.

BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**. Curitiba, v. 13, jan/dez, 2003.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Fundamentos do controle de poluição de águas**. Apostila da Pós-graduação “Conformidade Ambiental com Requisitos Técnicos e Legais” da Escola Superior da CETESB. São Paulo, 2018.

CODEX - Alimentarius Commission on Methods of Analysis and Sampling. **Criteria for Evaluating Acceptable Methods of Analysis for Codex Purposes**. CX/MAS 95/3, 1995.

COELHO, E.R.C.; LEAL, W.P.; SOUZA, K.B.D.; ROZÁRIO, A.D.; ANTUNES, P.W.P. Development and validation of analytical method for analysis of 2, 4-D, 2, 4-DCP and 2, 4, 5 T for monitoring of public water supply. **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v. 23, 2018.

COSTA, H. F. **Monitoramento da qualidade da água e do uso e cobertura da terra na bacia de contribuição da represa de São Pedro, Juiz de Fora (MG) no período de 2005 a 2015**. 2016. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental e Sanitária) – Faculdade de Engenharia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, 2016.

DERISIO, J. C. **Introdução ao controle de poluição ambiental**. 4ª Ed. São Paulo: Oficina de textos, 2012.

DIAS, F. R. S. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos**. 2019. Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

ESTEVES, A. F.; **Fundamentos de Limnologia**. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.

EURACHEM Guide: **The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. Magnusson, B. and U. Örnemark (Ed.), 2014.

EURACHEM/CITAC. **Quantifying uncertainty in analytical measurement**, 3ed. UK, 2012.

EURACHEM/CITAC Guide: **Setting and Using Target Uncertainty in Chemical Measurement**, 1st ed. UK, 2015.

FERNANDES, P. C. L. **Validação e controle de qualidade do fósforo total em águas residuais – Análise da qualidade da água**. 2015. Dissertação (Mestrado em Química Industrial). Universidade da Beira Interior. Covilhã, 2015.

FERREIRA, K. S. T. **Validação de métodos de análises cromatográficas: determinação de HCl**. 2012. Relatório de estágio (Mestre em Química Analítica e Qualidade) – Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2012.

FREITAS, M. B.; BRILHANTE, O. M.; ALMEIDA, L. M. Importância da análise de águas para a saúde pública em duas regiões do estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. **Cadernos de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v. 17, n.3, 2001.

GARP. Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas. **Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos** (apostila), 1999.

GOES JUNIOR, E. J. A.; ROEDER, J. S.; OLIVEIRA, K. B. L.; FERREIRA, M. P.; SILVA, J. G. Validação de método analítico para a quantificação de paracetamol em solução oral por espectrofotometria no UV. **Rev. Virtual de Química**. v.9, nº 4, 2017

GONÇALVES, M. E. P.; CAMÕES, M. F.; PAIVA, J. M.; BENOLIEL, M. J.; CARNEIRO, R. N. Validação do método de determinação simultânea dos íons brometo e bromato por cromatografia iônica em águas de consumo humano. **Química Nova**. Lisboa, v.7, n°3, 2004.  
GONZÁLEZ, A. G. *et al.* The correlation coefficient attacks again. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 11, n. 5, 2006.

HACH Company/HACH Lange. **Method 8071 – Nitrate, MR**. 9ª Edição. 2014. Disponível em: <http://www.hach.com>. Acesso em: 12 fev. 2021.

HEXIS. Produto. Disponível em: <<http://www.hexis.com.br/produto/nitrato-reagente-nitraver-5-pp-25ml-1000un>>. Acesso em: 14 fev. 2021.

HENRIQUES, M. L. G. S. **Hormonas naturais e de síntese, bisfenol A, octilfenol e nonilfenol em águas para consumo humano: otimização do método de análise por SPELC-ESI-MS/MS**. 2008. Dissertação (Mestrado em Controlo da qualidade e Toxicologia dos alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Portugal, 2008.

ICH: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, in Q2(R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline: London, 2005.

IPAC. **OGC007 - Guia para a quantificação de incerteza em ensaios químicos**. Portugal, 2007.

ISO 8466-1: Water quality – Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics - Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function. 1990.

ISO 8466-2: Water quality – Calibration and Evaluation of Analytical Methods and Estimation of Performance Characteristics. - Part 2: Calibration strategy for non-linear second-order calibration functions. 2001.

KINDLEIN, C. P. **Determinação do teor de nitratos e nitritos na água de abastecimento do município de Nova Santa Rita**. 2010. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em química) – Centro Universitário La Salle, Canoas, 2010.

LIMA, L. G. **As incertezas das medições: pontos críticos e simplificações para a metrologia dimensional na indústria**. 1999. Dissertação (Mestrado em Engenharia de produção) – Faculdade de Engenharia Mecânica e de Produção, Universidade Metodista de Piracicaba, Santa Barbara d'Oeste, 1999.

LIMA, M. F. B.; PATRÍCIO, L. S.; SILVA-FILHO, F. J. N.; CAVALCANTE, R. M. C. Experimento didático abordando a importância da validação metodológica no estudo da química do sulfato no meio ambiente. **Educación Química**. v. 28, 2017.

LOGANATHAN, P; VIGNESWARAN, S; KANDASAMY, J. Enhanced removal of nitrate from water using surface modification of adsorbents a review. **Journal of Environmental Management**, v.131, 2013.

LOPES, G.C.; SANTOS, P.V.P.; DICAULA, M.C.; BLAINSKI, A.; GUTIERRE, M.A.M.; MELLO, J.C.P. Validação de metodologia analítica para a determinação de derivados do ácido o-hidroxicinâmico de *Echinodorus grandiflorus*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.14, n.3, 2012.

MASSART, D. L. *et al.* **Handbook of Chemometrics and Qualimetrics – Part A**. Amsterdam: Elsevier, 1997.

MELLO, F. A.; OLIVO, A. M. Recursos hídricos: poluição, escassez, qualidade microbiológica e química da água. **Colloquium Vitae**. São Paulo, v. 8, n. Especial, Jul–Dez, 2016.

MERTEN, G. H.; MINELLA, J. P. Qualidade de água em bacias hidrográficas rurais: um desafio atual para a sobrevivência futura. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, Porto Alegre, v.3, n.4, out/dez. 2002.

MORAES, R. H. C. **Validação do método de determinação de nitrato e nitrito em produtos lácteos por cromatografia iônica**. 2019. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de ciências, Universidade do Porto, Porto, 2019.

MOREIRA, T. D. **Comparação entre métodos de determinação de nitrato: Coluna Redutora de Cádmio e Teste NITRAVER® 5**. 2018. Monografia (Bacharelado em Química Industrial) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

MORGADO, V. M. **Comparação de abordagens de avaliação da incerteza de medição de metais em sedimentos**. 2017. Dissertação (Mestrado em química) – Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2017.

MOURA, M. P. S.; LIRA, M. C. B.; MAGALHÃES, N. S. S. S. Validação de método analítico espectrofotométrico UV para determinação de ácido úsnico em lipossomas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas (Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences)**, v. 44, n° 4, 2008.

**NORDTEST. Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories.** Nordtest Report TR 537 (4 ed), 2017.

OLIVEIRA, F. M. Aplicação e testes do método APHA-4500-NO<sub>3</sub>-C para determinação de nitratos em águas por leitura em UV com segunda-derivada. **Analytica**, v. 27. 2007.

PAGAN, F. S.; LIMA, A. F.; JUNIOR, U. F. M.; FERREIRA, D. C. Validação de Método Analítico para Quantificação do Fipronil por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer – Goiânia, v. 16, n. 29, 2019.

PASCHOAL, R. S. **Usos da água e necessidades de tratamento para consumo humano.** 2012. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Engenharia Civil) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, 2012.

PERKAMPUS, H. H. **UV-VIS Spectroscopy and its Applications.** Berlin: Springer-Verlag, 1992.

PUBCHEM. Nitrate. Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/nitrate>>. Acesso em: 20 ago. 2021.

QUEIROZ, A. C. P. **Estágio num laboratório de análises de águas e efluentes.** 2015. Relatório de estágio (Mestre em processos químicos e biológicos) – Departamento de Engenharia Química e Biológica, Instituto Superior de Coimbra, Coimbra, 2015.

RESENDE, A. V. **Agricultura e qualidade da água: Contaminação da água por nitrato.** Planaltina – DF: Embrapa Cerrados, 2002.

RIBANI, M.; BOTTALI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, 2004.

RIBEIRO, V. C. M. **Controlo da qualidade e validação de métodos cromatográficos – da teoria a prática.** 2015. Dissertação (Mestrado em química) – Universidade de Coimbra, 2015.

ROBERTO, M. L. **Avaliação da qualidade da água bruta, tratada e distribuída de um estabelecimento produtor e comercializador de alimentos.** 2018. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, 2018.



SANTOS, F. E. O. **Validação de método de análise de 2,4,6 – Tricloroanisol**. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Cidade do Porto, Portugal, 2016.

SILVA, J. B. **Estudo da situação atual da qualidade da água do açude de São Gonçalo - PB**. 2015. Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura em Geografia) – Unidade Acadêmica de Ciências Sociais, Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, 2015.

SILVA, J. B. **Estudo sobre a aplicação da espectrofotometria derivativa na análise de nitrogênio em diversas matrizes de águas**. 2013. Dissertação (Mestrado em química) - Departamento de química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

SIQUEIRA, L. **Análise da Qualidade da Água para fins de Abastecimento Público no Rio Pardo, Município de Ourinhos-SP**. 2016. Trabalho de conclusão de curso (Pós-graduação em Planejamento Ambiental e Gerenciamento de Recursos), Universidade Estadual Paulista-Campus Ourinhos, São Paulo, 2016.

SIQUIERA, A. L. M. **Comparação de técnicas analíticas instrumentais: espectrofotometria versus HPLC em análise de nitrogênio amoniacal em efluentes industriais**. 2013. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em química) – Faculdade de Educação e Artes, Universidade do Vale do Paraíba, Jacareí-SP, 2013.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 8ª edição Norte-Americana. São Paulo: Thomson Learning, 2006.

SOUTO, M.A.M. *et al.* Determinação de nitrato em águas por espectrofotometria UV: usos e precauções. **Revista do Instituto Adolfo Luiz**, São Paulo, v. 65, nº 1, 2006.

SPERLING, M.V. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 4ª Edição. Belo Horizonte: Editora da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, 2014.

THOMAS, O.; BURGESS, C. **UV-Visible Spectrophotometry of Water and Wastewater**. 2ª Edição. Amsterdã: Elsevier, 2017.

THOMPSON, M., ELLISON S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis – (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry**. nº 74, v. 5, 2002.

VIEIRA, E. C. **Estudo comparativo de métodos analíticos utilizados na determinação de nitratos em águas subterrâneas**. 2017. Monografia (Bacharelado em química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2017.

WHO. World Health Organization Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations; Thirty-second report. **WHO Technical Report Series**. nº 823, Geneva, 1992.

YASUI, J. C. **Análise físico-química e microbiológica de água em residências localizadas no município de Pacaembu/SP**. 2015. Trabalho de conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná, 2015.