

**Estimativa do cálculo da incerteza otimizada utilizando curva de adição cumulativa de padrão na determinação espectrofotométrica de nitratos em água mineral envasada**

**Estimation of optimized uncertainty calculation using standard cumulative addition curve in the spectrophotometric determination of nitrates in bottled water**

DOI:10.34117/bjdv9n4-130

Recebimento dos originais: 17/03/2023

Aceitação para publicação: 20/04/2023

**Alex de Lima**

Licenciado em Química Ambiental

Instituição: ETEC Prof. Armando José Farinazzo, Fernandópolis

Endereço: Av. Geraldo Roquete, 135, Jardim Paulista, Fernandópolis - SP, Brasil,

CEP: 15606-020

E-mail: alexlima810@gmail.com

**Tony Rogério de Lima Dadamos**

Doutor em Química

Instituição: SPR Soluções Metrológicas Ltda

Endereço: Av. João Batista Vetorasso, 805 - Box 04 - Distrito Industrial Waldemar de Oliveira Verdi, São José do Rio Preto, SP, Brasil, CEP 15035-470

E-mail: tony@sprqualidade.com.br

**Cecilia Cristina Marques dos Santos**

Doutora em Biofísica Molecular

Instituição: Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratório Regional de São José do Rio Preto, SP,

Endereço: R. Alberto Sufredine, 2325, Maceno, São José do Rio Preto, SP, Brasil,

CEP: 15060-020

E-mail: cecilia.santos@ial.sp.gov.br

**Fernando Luis Fertoni**

Doutor em Química Analítica

Instituição: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista (IBILCE -UNESP)

Endereço: R. Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto - SP,

CEP: 15054-000

E-mail: fernando.luis@unesp.br

**Filipe Corrêa Guizellini**

Doutor em Química Analítica

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)

Endereço: R. Itapeva, 26, Bela Vista, São Paulo - SP, CEP: 01312-000

E-mail: filipe@sprqualidade.com.br

**Bruno Trevizan Franzin**

Doutor em Química Analítica

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)

Endereço: R. Itapeva, 26, Bela Vista, São Paulo - SP, CEP: 01312-000

E-mail: bruno@sprqualidade.com.br

**Ossamu Hojo**

Doutor em Engenharia Química

Instituição: Instituto de Química (IQ), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) - Câmpus de Araraquara

Endereço: Av. Prof. Francisco Degni, 55, Jardim Quitandinha, Araraquara - SP, CEP: 14800-900

E-mail: ossamu.hojo@unesp.br

**Ricardo Jorge Neves Bettencourt da Silva**

Doutor em Química

Instituição: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Endereço: R. Ernesto de Vasconcelos, C8, Lisboa, Portugal, CEP: 1749-016

E-mail: rjsilva@fc.ul.pt

**RESUMO**

Nos últimos anos observou-se um interesse crescente na determinação dos níveis de nitrato em produtos alimentícios, essencialmente devido ao potencial de redução de nitrato em nitrito, que é conhecido por ter efeitos adversos na saúde humana e animal. O nitrato é intermediário no ciclo do nitrogênio e sua alta concentração na água é indicador de baixa qualidade (Wang et al.). A determinação direta em águas é realizada na região do ultravioleta em meio ácido e no comprimento de onda específico (205 nm) (APHA, 2012). Esse procedimento é muito útil em águas potáveis, mas suscetível a efeito de matriz em águas com pH alcalino ou com elevada força iônica (APHA, 2012). Assim, propôs-se no presente trabalho utilizar o método de adição de padrão (MAP) em comparação com o procedimento de calibração convencional (MC) descrito no livro de normas “Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos” (técnica 195/IV) (IAL, 2008) e executado no Laboratório de Análises Físico-químicas do Instituto Adolfo Lutz - Centro de Laboratório Regional de São José do Rio Preto X, em contraponto, ao procedimento de adições cumulativas do padrão (MAP-C). Diante disso, foi realizada uma comparação entre os métodos MC, MAP e MAP-C, objetivando viabilizar e validar um tratamento de dados diferente do original para a estimativa do cálculo da incerteza, destacando para esse fim a abordagem bottom-up. Além, de identificar as limitações dos métodos que podem ser empregados para a vigilância da qualidade da água mineral e de abastecimento. De acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025:20175, foram determinados os parâmetros de desempenho para os três procedimentos: limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão intermediária e a incerteza. Para a execução dos ensaios as condições ambientais foram monitoradas e estabelecidas as curvas de calibração (absorbância x concentração da solução padrão de nitrato de sódio, 9,98 mg L<sup>-1</sup>, calculado em N, para MC, MAP e para o MAP-C uma solução de 2,00 mg L<sup>-1</sup>), com o objetivo de determinar a concentração de nitrato de sódio. Assim, foram ensaiados 100 mL provenientes de 4L das amostras de água mineral de três marcas com diferentes pH (8,44; 6,96; e 5,77). Os parâmetros de desempenho dos procedimentos foram determinados a partir de diluições das soluções padrão e os resultados obtidos.

**Palavras-chave:** água potável, estudos de validação, incerteza, nitratos.

## ABSTRACT

In recent years, there has been increasing interest in determining nitrate levels in food products, mainly due to the potential for nitrate to nitrite reduction, which is known to have adverse effects on human and animal health. Nitrate is intermediate in the nitrogen cycle and its high concentration in water is poor quality indicative (Wang et al.). The direct determination in water is carried out in the ultraviolet region in acidic medium and at specific wavelength (205 nm) (APHA, 2012). This procedure is very useful in drinking water, but susceptible to matrix effect of matrix in water with alkaline pH or high ionic strength (APHA, 2012). Thus, the present work proposes the use of the standard addition method (SAM) in comparison with the conventional calibration procedure (CM) described in the standard book "Physicochemical methods for food analysis" (technique 195 / IV) (IAL, 2008) and performed in the Laboratory of Physical and Chemical Analysis of the Adolfo Lutz Institute - São José do Rio Preto X Regional Laboratory Center, in contrast to the standard cumulative additions procedure (SAM-C). Therefore, a comparison between the CM, SAM and SAM-C methods was made in order to enable and validate a data treatment different from the conventional one to estimate the uncertainty calculation, highlighting for this purpose the bottom-up approach. In addition, to identify the methods limitations that can be employed to monitor the quality of bottled water and drinking water. According to ISO / IEC 17025: 2017, we determine the performance parameters for the three procedures such as: limit of the detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision, intermediate precision and uncertainty. To perform the tests, environmental conditions and calibration curves were monitored (absorbance x concentration of standard sodium nitrate solution, 9.98 mg L<sup>-1</sup>, calculated in N, for MC, MAP and MAP-C, a 2.00 mg L<sup>-1</sup> solution) to determine the sodium nitrate concentration. Thus, 100 mL of 4L of table water samples from three brands with different pH (8.44, 6.96 and 5.77) were tested. We determined the performance parameters of the procedures from the dilutions of the standard solutions and the results obtained.

**Keywords:** drinking water, validation studies, uncertainty, nitrates

## 1 INTRODUÇÃO

A água cumpre funções importantes no organismo humano, como garantir o bom funcionamento do sistema fisiológico e bioquímico. Considerando, o crescimento significativo do consumo da água mineral envasada (ABINAM, 2019), as análises para verificar sua qualidade são julgadas como essenciais, de modo que a presença de determinados elementos químicos, dentre eles o nitrato, em concentrações acima da estabelecida pela Resolução 274/2005 do Ministério da Saúde (Brasil, 2005), acarreta consideráveis danos à saúde do indivíduo e requerem ações de saúde pública.

O nitrato é regularmente monitorado para fins de proteção, principalmente em águas para controle da potabilidade. Nos últimos anos observou-se um interesse crescente

na determinação dos níveis de nitrato em produtos alimentares, em decorrência da potencial possibilidade de ocorrer a redução de nitrato em nitrito, sendo esse último conhecido por ter efeitos adversos na saúde humana e animal. O nitrato é intermediário no ciclo do nitrogênio e sua alta concentração na água é indicador de baixa qualidade (Wang et al., 2017).

A quantificação de nitrato, atualmente é exercida em amostras de água, alimentos, plasma, soro e urina por vários métodos baseados em diferentes princípios analíticos, dentre eles tem-se o método espectrofotométrico, que por sua vez, apresenta as técnicas: leitura direta na região do UV-Vis e indireta com reagentes específicos e desenvolvimento de cor (Wang et al., 2017).

A determinação direta em águas ocorre na região do ultravioleta em meio ácido, no comprimento de onda específico (205 nm). Esse procedimento é útil para águas potáveis, mas suscetível a efeito de matriz em águas com pH alcalino ou com elevada força iônica. (APHA, 2012).

Em razão do considerável risco desse procedimento aos efeitos de matriz, propôs-se no presente trabalho utilizar o método de adição de padrão (MAP) em comparação com o procedimento de calibração padrão descrito na literatura e, executado na rotina de análises do Instituto Adolfo Lutz- Centro de laboratório Regional de São José do Rio Preto (MC).

Quando a composição da matriz da amostra é desconhecida ou complexa e afeta o sinal analítico, é apropriado o uso do método de adição de padrão (MAP). Logo, o MAP compensa uma série de interferências ao se adicionar quantidades conhecidas do objeto de análise à amostra desconhecida (Steliopoulos, 2015).

O MAP apresenta limitação quanto à quantidade de amostra necessária para proceder às adições de padrão, o que dificulta a sua aplicação. Desta forma, contrapondo, a realização de adições cumulativas do padrão (MAP-C) à mesma porção analítica de amostra, torna mais viável a implementação do MAP. Em que pese essa estratégia de adição ter como desvantagem a diluição progressiva da amostra, que pode causar erros nas análises, este risco é potencialmente corrigido ao se considerar o fator de diluição nos cálculos (Gonçalves et al., 2016). Diante disso, foi realizada uma comparação do procedimento convencional (MC), do MAP e do MAP-C, objetivando viabilizar e validar um tratamento de dados diferente do original.

Para todos os procedimentos propostos no presente trabalho foram realizadas as determinações dos parâmetros de desempenho (validação in house), de acordo com a

ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017, para a medição espectrofotométrica de nitratos em água mineral envasada, que possui menos interferentes e matriz simples. Conforme apresentada na literatura, há várias abordagens para a avaliação da incerteza da medição destacando-se a abordagem bottom-up, a qual permite uma avaliação precisa por meio do levantamento detalhado de todos os componentes contribuintes para o erro, proporcionando otimizar os custos a partir de intervenções ao nível das componentes de incerteza minoritárias e majoritárias, respectivamente (Burr et al., 2016).

Justificou-se o desenvolvimento deste trabalho pela iniciativa da identificação das limitações do método utilizado no monitoramento do nitrato, contribuindo para melhor qualidade da água de consumo. A água mineral envasada é uma matriz mais simples e por isso foi utilizada para realização dos ensaios de validação para simultâneo controle do efeito matriz. Como consequência, avaliaremos os parâmetros de desempenho do método e as fontes de incerteza mediante pequenas variações dessa matriz, por meio da abordagem bottom-up.

Ao aperfeiçoar os ensaios laboratoriais atenderemos a diretriz de aprimorar as ações de vigilância de fatores ambientais de risco e agravos à saúde; aperfeiçoar a vigilância da qualidade da água para consumo humano e, atingir a meta de desenvolver referências técnicas para contribuir com gerenciamento de riscos sanitários associados à água para consumo humano.

O objetivo principal do presente trabalho foi desenvolver o método para estimativa do cálculo da incerteza utilizando o MAP-C. Em decorrência de tal desenvolvimento pode-se: implementar, otimizar e determinar os parâmetros de desempenho do método (itens para validar a medição espectrofotométrica de nitratos), realizar treinamento adicional de equipes técnicas nas principais ferramentas da qualidade a serem utilizadas no desenvolvimento de métodos, principalmente, na estimativa do cálculo da incerteza e assim, disseminar a cultura metrológica.

## **2 CONSIDERAÇÕES GERAIS**

### **2.1 NITRATO**

Nitrato consiste no composto químico formado naturalmente pela combinação do nitrogênio com oxigênio ou ozônio (Suzuki, 2013). Trata-se de um dos íons mais encontrados em águas naturais, inclusive na mineral, no entanto sua presença em elevada concentração indica a contaminação causada, principalmente pela falta de condições higiênico-sanitárias satisfatórias, ou ainda, por descargas de nitrogênio orgânico e

amoniaco de indústrias químicas, siderúrgicas, farmacêuticas, alimentícias, frigoríficos e matadouros, por exemplo (Nishihara, 1998).

Diante disso, importante ressaltar que sua presença em quantidades elevadas pode causar graves danos à saúde humana, podendo ser reduzido em nitrito, sendo ambas altamente perigosas a saúde pública que pode ocasionar a indução à metemoglobinemia, especialmente em crianças, e a formação potencial de nitrosaminas e nitrosamidas carcinogênicas (Nishihara, 1998).

Dentre os métodos para determinação do nitrato em água mineral, tem-se o espectrofotométrico na região do ultravioleta (205nm), que consiste na leitura direta da absorvância da amostra, com adição de ácido clorídrico 1,0 M (usado para prevenir as interferências espectrais) (IAL, 2018).

## 2.2 ÁGUA MINERAL NATURAL

Desde os primeiros anos de vida se aprende que a água é um bem precioso e necessário à vida. A água cumpre funções importantes no organismo humano, como regular a temperatura corporal, e ser responsável pelo bom funcionamento do sistema fisiológico e bioquímico do corpo humano (ABINAM, 2019).

Deste modo, demonstrando a conscientização da população em relação a importância da água, e refletindo a onda de hábitos saudáveis adotados pela sociedade atual, a Associação Brasileira de Industrias de Água Mineral registrou o crescimento próximo de 20% ao ano do consumo da água mineral natural envasada (ABINAM, 2019), o que enaltece a pesquisa para auferir a qualidade da água, garantido que esta cumpra com as funções regulamentadas por lei.

Como previsto no item 2.1 do anexo da Resolução n. 274 do Ministério da Saúde, “Água Mineral Natural trata-se da água obtida diretamente de fontes naturais ou por extração de águas subterrâneas, caracterizada pelo conteúdo definido e constante de determinados sais minerais, oligoelementos e outros componentes considerando as flutuações naturais” (Brasil, 2005).

A Resolução citada acima apresenta os parâmetros e requisitos essenciais da água mineral natural envasada, bem como o limite de substâncias químicas que podem causar riscos à saúde. O limite máximo do nitrato na água mineral natural, objeto desse trabalho é de 50 mg L<sup>-1</sup> calculado como nitrato

### 2.3 ADIÇÃO CUMULATIVA DE PADRÃO

Em grande parte das práticas instrumentais, a resposta do instrumento de medição depende da matriz em que se encontra o item analisado. Sendo a matriz todos integrantes da amostra, exceto aquele que se objetiva analisar. Tal objeto pode estar presente em grande quantidade ou em uma fração pequena.

Quando é possível a reprodução da matriz, pode-se utilizar calibradores com matriz ajustada, ou seja, com valores de grandeza conhecidos, para calibração do instrumento, além uma matriz correspondente aos elementos analisados. Porém, nem todas as circunstâncias são rentáveis e possível o preparo dos calibradores com matriz ajustada, em consequência da falta de compreensão da composição da matriz e aos diversos efeitos da matriz. (Viana et al., 2011).

Em casos como esse, o modo em que as calibrações devem ser realizadas é pelo método de adição de padrão, em que são adicionados o material analisado, níveis crescentes e conhecidos da grandeza estudada. Desse modo, é possível estimar a sensibilidade da resposta do instrumento de medição e consequentemente determinação do valor da grandeza medida estimado pela extrapolação da curva de calibração para uma resposta do instrumento igual a zero (Rodrigues et al., 2015).

Porém, o método convencional de adição de padrão (MAP) possui como desvantagem, a necessidade de uma grande quantidade de reagentes no preparo da curva de calibração, bem como do item analisado no preparo dos calibradores, além do tempo gasto. Ainda, para o preparo das amostras que serão analisadas há necessidade de um grande volume para preparar as várias diluições contendo a grandeza estudada em valores crescentes. (Dadamos et al., 2018).

Essa desvantagem pode ser superada através do procedimento de adições cumulativas dos valores da grandeza estudada para a mesma quantidade analítica da amostra, com o levantamento dos sinais antes e após as adições (Dadamos et al., 2018).

No presente trabalho, utilizou-se uma calibração por adição cumulativa de padrão dispondo-se de um procedimento instrumental de análise da qual o sinal varia proporcionalmente com a concentração, uma vez que o volume total do sistema aumenta ao longo das adições, considerando o aumento do volume do sistema e das diluições do objeto de análise.

## 2.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Na realização de procedimentos analíticos dentro de um laboratório, é necessária a certificação das operações executadas, por este motivo a validação de método almeja critérios para demonstrar a confiabilidade e adequação dos resultados, assegurando a qualidade. Segundo a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017, validação do método é a confirmação por exame ou evidência que dado método é adequado ao uso (ABNT, 2017). Para executar a validação no laboratório (“in house validation”), considera as etapas dentro de mesmo laboratório, seja para legalizar um novo método que esteja sendo desenvolvido ou para confirmar se um método adotado é efetuado corretamente (Ribani et al., 2004, Ramos et al., 2020).

A validação dos procedimentos é realizada em função do modelo metrológico desenvolvido para estimar a incerteza da medição. Para esse trabalho, foram definidos modelos de medições baseado na incerteza de interpolação e extrapolação, da curva de calibração, por meio do método dos mínimos quadrados (MMQ), com adição de padrão (MAP) e com adição de cumulativa de padrão (MAP-C).

A incerteza foi estimada utilizando a Lei da Propagação das Incertezas (Sega et al., 2016), método numérico de Kragten (Kragten, 1994) e Simulações de Monte Carlo (Sega et al., 2016). Na validação dos procedimentos, quando utilizado a extrapolação estimada pelo MMQ, avaliou-se os pressupostos do mesmo, seguido da definição e avaliação do modelo de medição a partir da análise das amostras caracterizadas pelo procedimento de referência (método executado na rotina de análises do Instituto Adolfo Lutz- Centro de laboratório Regional de São José do Rio Preto). Com o auxílio de folhas de cálculos do software MS-Excel foi efetuada avaliações bottom-up da incerteza, por esse se tratar de um aplicativo de grande disseminação de cálculos (Bettencourt da Silva, 2016; Dadamos et al., 2018).

## 3 MATERIAL E MÉTODO

### 3.1 COLETA E AMOSTRAGEM

Foram adquiridas no comércio varejista local, no período de novembro a dezembro de 2018, amostras de água mineral envasada, de três marcas, que se diferenciavam pela faixa de pH sendo uma ácida (5,67), outra neutra (7,07) e uma última alcalina (9,13), observando-se lote e prazo de validade. A unidade amostral contou com 4 litros de cada marca, analisada no Laboratório de Análises Físico-químicas do Instituto



Adolfo Lutz - Centro de Laboratório Regional (CLR) de São José do Rio Preto, SP (CLR-X)

### 3.2 PREPARO E TRATAMENTO DA AMOSTRA

Foram ensaiados 100 mL, provenientes de um “pool” de cada amostra de água. Para determinação do nitrato de sódio foi utilizada a técnica 195/IV, preconizada no livro de normas “Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos”, editado pelo Instituto Adolfo Lutz, a fim de serem utilizadas por toda rede de laboratórios de saúde pública (IAL, 2008). Também, foi comparado com o respectivo parâmetro da Resolução RDC nº 274/2005, que estabelece o padrão de potabilidade (Brasil, 2005).

### 3.3 SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA OS PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Solução de Ácido Clorídrico a  $1 \text{ mol.L}^{-1}$

Foram medidos 90 mL de ácido clorídrico HCl (P.A.) ( $D = 1,19$ ) e diluídos com água destilada para 1000 mL em um balão volumétrico.

### 3.4 SOLUÇÃO DE NITRATO DE SÓDIO

Preparou-se uma solução padrão estoque de nitrato de sódio de  $9,9812 \text{ mg L}^{-1}$  em N, pesando-se 0,0606 g de nitrato de sódio previamente seco por 1 hora a  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  e deixado no dessecador até atingir a temperatura ambiente. Posteriormente transferiu-se o sal quantitativamente para balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume com água deionizada.

Para as adições cumulativas foi preparado uma solução padrão de sódio de  $2,00 \text{ mg L}^{-1}$  em N, pesando-se 0,0121 g do sal anteriormente seco em 1000 mL.

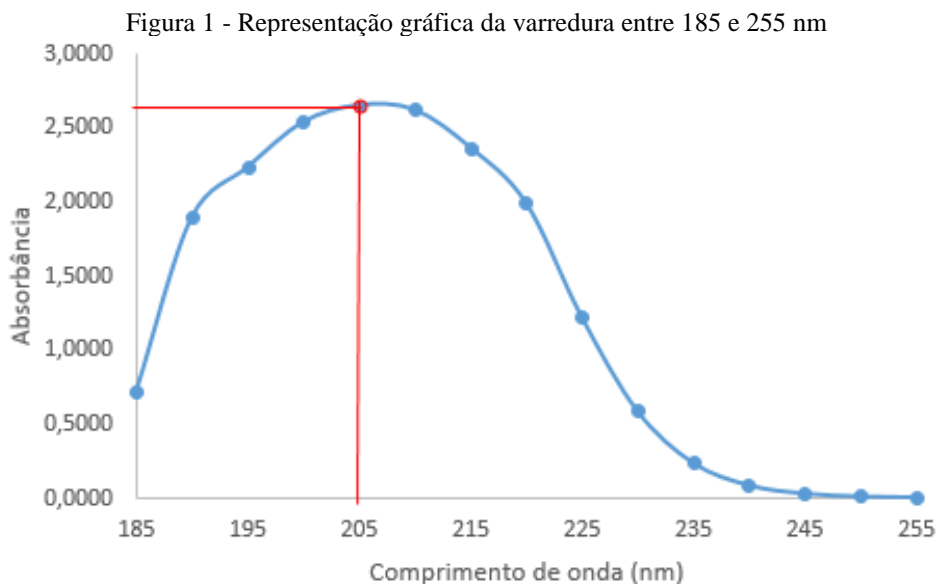
### 3.5 SOLVENTES UTILIZADOS

Água Deionizada: foi utilizada água oriunda do Sistema Mili-Q®, Modelo: Direct, Marca: Milli-Q®, com pH: 5,5 a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  e Condutividade:  $31.6 \text{ }\mu\text{Scm}^{-1}$ .

### 3.6 TÉCNICA PARA DETERMINAÇÃO DO NITRATO

O método espectrofotométrico validado baseou-se nas leituras diretas das absorbâncias das amostras em diferentes comprimentos de onda. Tais leituras foram efetuadas na região ultravioleta (UV) em 205 nm para determinação do nitrato de sódio (Espectrofotômetro UV-Visível, Marca: Analytik Jena, Modelo: SPECORD® S 600

Series) Comprimento de onda este, de maior absorção confirmado na prática de varredura, conforme Figura 1.



Fonte: Próprio autor

Para os ensaios mencionados foram estabelecidas previamente as curvas de calibração com o objetivo de determinar a concentração de nitrato de sódio, e a realização foi de acordo com o descrito no documento de caráter orientativo DOQ-CGCRE-008 do Inmetro, onde define como branco a água e o branco da amostra a matriz da amostra sem o mensurando de interesse. Assim, para determinação do nitrato de sódio, foi considerado como branco da amostra 1 mL da solução de ácido clorídrico a  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  em 100 mL de água deionizada. As análises foram realizadas contra esse branco da amostra. Para a execução dos ensaios as condições ambientais foram monitoradas.

### 3.7 DETERMINAÇÃO DO NITRATO EM ÁGUA

Para a determinação de nitratos em águas de abastecimento e minerais, o método utilizado baseia-se na leitura direta da absorvância da amostra, em espectrofotômetro a 205 nm, com anterior adição de ácido clorídrico  $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ , afim de minimizar as interferências espectrais, tais como hidróxidos e carbonatos (IAL, 2008). Porém, como na amostra ainda é suscetível à ocorrência de interferências a efeitos de matriz, analisou-se diferentes amostras de água minerais engarrafadas para consumo com o procedimento convencional (MC), com adição de padrão e adição cumulativa de padrão (MAP-C) e estimada as incertezas de tais procedimentos.

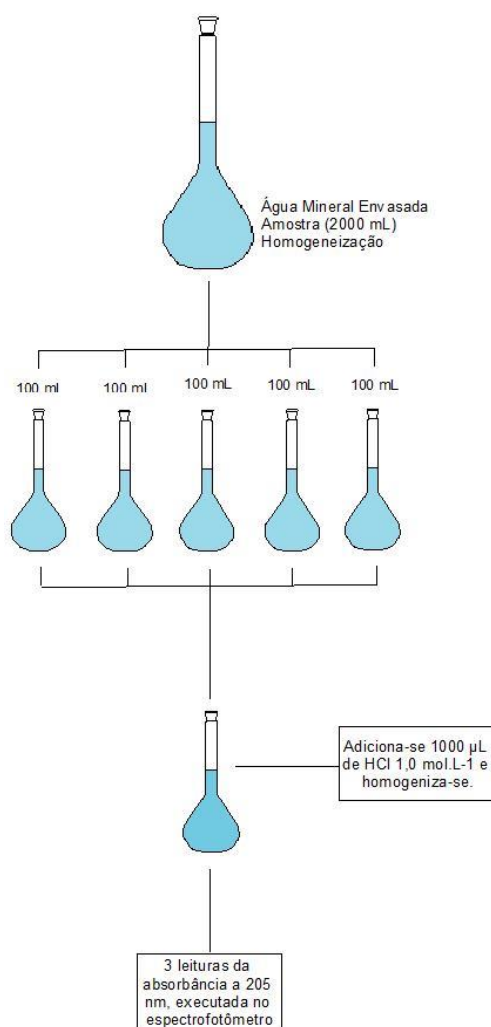
A concentração do nitrato na amostra foi determinada por meio de curvas de calibração construídas com soluções padrão e medida em 205 nm. A concentração de nitrato é expressa em mg L<sup>-1</sup> em N.

### 3.8 PREPARO DA AMOSTRA

Para esta análise foram medidos 100 mL da amostra do “pool”, que foi homogeneizado em um balão volumétrico (2000 mL). Logo após adicionou-se com uma micropipeta 1000 µL de HCl 1,0 mol.L<sup>-1</sup> e homogeneizou. Em seguida, procedeu a leitura da absorbância a 205 nm contra o “branco” do reagente (espectrofotômetro Analytik Jena SPECORD® S 600 Series).

O mesmo procedimento foi executado 5 vezes para cada amostra de água mineral envasada, com três leituras consecutivas, como demonstrado na Figura 2.

Figura 2 - Esquema utilizado no preparo da amostra para leitura das absorbâncias a 205 nm



Fonte: Próprio autor

Posteriormente, sucedeu quantificações de 100 mL de alíquotas de amostras de água mineral envasada, sujeitas a adições de padrão (1000  $\mu\text{L}$  da solução padrão estoque de nitrato de sódio de 9,9812  $\text{mg L}^{-1}$  em N), e adições de padrão cumulativas (1000  $\mu\text{L}$  da solução padrão estoque de nitrato de sódio de 2  $\text{mg L}^{-1}$  em N), por meio do mesmo método de leitura direta em espectrofotômetro a 205 nm.

### 3.9 CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Foram pipetadas alíquotas de 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 20,0 e 24,0 mL da solução padrão de nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) (9,9812  $\text{mg.L}^{-1}$  N) para balões volumétricos de 100 mL. Os volumes foram completados com água deionizada. Em cada um dos balões foram adicionados 1 mL de solução de ácido clorídrico a 1  $\text{mol.L}^{-1}$  e homogeneizados. Após, foi determinada a absorbância a 205 nm contra o “branco” de reagentes, utilizando cubeta de quartzo (1cm de caminho ótico). A construção da curva de calibração foi realizada com os valores de absorbância e de concentração de nitrato de sódio conforme a Tabela 1 A aplicação do ajuste linear possibilitou o cálculo dos coeficientes linear e angular da reta. Deste modo, as absorbâncias obtidas foram analisadas graficamente em função das concentrações.

Tabela 1 - Concentrações de nitrato de sódio utilizadas na construção da curva de calibração e os volumes correspondentes utilizados da solução de trabalho (n=7)

Volume da solução padrão de trabalho (9,9812 $\text{mg L}^{-1}$ N) (mL)	Concentração de nitrato de sódio ( $\text{mg L}^{-1}$ de N)
1	0,0997
2	0,1964
4	0,3970
8	0,7990
16	1,5867
20	1,9886
24	2,3875

Fonte: Próprio autor

Em uma segunda etapa elaborou-se padrões por meio da pesagem das massas de nitrato de sódio previamente seco, conforme informado na Tabela 2, seguido da adição de água deionizada até o volume de 1000 mL. Transferiu-se dessas soluções, alíquotas de 100 mL para balões volumétricos, finalizando com a adição 1 mL de solução de ácido clorídrico (1  $\text{mol.L}^{-1}$ ) e homogeneizados. Assim, aferiu-se a absorbância a 205 nm. A elaboração da curva e cálculo dos coeficientes linear e angular da reta foi realizada de modo análogo à curva de calibração construída anteriormente.

Tabela 2 - Padrões produzidos a partir das massas para obtenção dos padrões de 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 2,0; 2,4 e 3,3 mg L<sup>-1</sup> de N

Massa (g)	Padrão obtido (mg L <sup>-1</sup> N)
0,0006	0,1351
0,0012	0,2569
0,0024	0,5271
0,0049	0,8762
0,0097	1,6998
0,0121	2,0193
0,0146	2,5134
0,0200	3,3106

Fonte: Próprio autor

Preparou-se, posteriormente, soluções padrões em balões volumétricos de 100 mL, mediante a pipetagem de 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 20,0 e 24,0 mL da solução padrão estoque (9,9812 mg L<sup>-1</sup> de N) expostas ao método de adições de padrão de 1000 µL da mesma solução utilizada para confecção dos padrões e a adições cumulativas de 100 µL de uma solução padrão 2,0000 mg L<sup>-1</sup> de N. Subsequente analisou-se todas amostras conforme procedimento já descrito.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO DE ABSORÇÃO

Foi realizada a varredura de 185 e 255 nm para verificar se as condições de operação afetariam o comprimento de onda recomendado (205 nm) pela técnica empregada (IAL, 2008). O perfil do espectro de varredura Figura 1 mostrou-se compatível com a literatura.

### 4.2 PARÂMETROS DA VALIDAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

#### Linearidade e Homocedasticidade

Foram construídas as curvas de calibração dos métodos MC, MAP, MAP-C e seus parâmetros de regressão linear e de correlação linear, estimados para avaliar a homocedasticidade e linearidade do sinal instrumental, conforme na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros de regressão e correlação linear usado para avaliar a homocedasticidade e linearidade do sinal instrumental nas calibrações pelos MC, MAP e MAP-C

Métodos	Parâmetros*						
	a	b	r	F <sub>LOF</sub>	F <sub>Crítico LOF</sub>	W	F <sub>crítico</sub>
MC (volume)	0,052	0,640	0,99964	2,547	3,890	1,950	3,574
MC (massa)	0,056	0,624	0,99877	1,552	4,218	3,746	3,895
MAP	0,542	0,692	0,99405	3,096	9,330	1,354	6,927

---

MAP-C	2,638	664,412	0,99995	1,271	3,737	0,604	3,425
-------	-------	---------	---------	-------	-------	-------	-------

---

a: coeficiente linear da reta de regressão  
b: coeficiente angular da reta de regressão  
r: coeficiente de correlação linear de Pearson

$F_{LOF}$  (valor máximo:  $F_{Crítico LOF}$ ): parâmetros considerados nos testes de ANOVA-LOF

W (valor máximo:  $F_{Crítico}$ ): parâmetros considerados nos testes de Levene

---

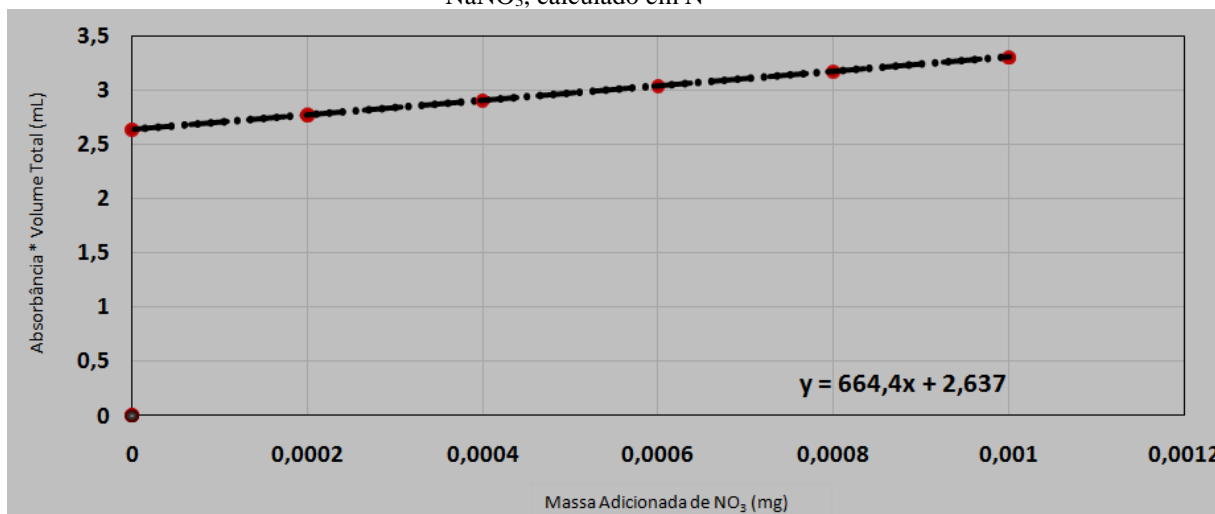
Fonte: Próprio autor

A avaliação da homogeneidade de variâncias dos sinais instrumentais foi realizada por meio do teste de Levene (Bettencourt da Silva, 2016) para comprovação da homocedasticidade. Já a linearidade pôde ser provada pelo teste de falta de ajuste ANOVA-LOF (Bettencourt da Silva, 2016). Os testes foram efetuados para um nível de confiança de 99 %, para que tenham uma probabilidade menor de ter resultado não verdadeiro. Considerando as conclusões do teste de homocedasticidade de Levene, todas as calibrações possuem sinais homocedásticos.

A partir dos valores de coeficiente de correlação linear (r) (Tabela 4), que expressa a porcentagem de variação total do sinal analítico, em decorrência da variação da concentração do mensurando, notou-se uma boa correlação, para os padrões preparados para todos os métodos, indicando ótima qualidade da curva de calibração (ou analítica), com base no Guia EURACHEM (EURACHEM, 1998).

Os coeficientes linear e angular da curva de calibração do MAP-C (a) têm uma peculiaridade na forma de calcular, pois leva em conta a diluição progressiva da amostra pelas sucessivas adições do padrão. Como o volume total do sistema aumenta ao longo das adições, considerou-se a multiplicação do sinal pelo volume total da solução em função da massa do item analisado. Tendo em conta que o sinal, é proporcional à concentração do item analisado, a multiplicação do sinal pelo o volume total será proporcional à multiplicação da concentração adicionada pelo volume total que corresponde à massa do item analisado adicionada, como esboçados na Figura 3.

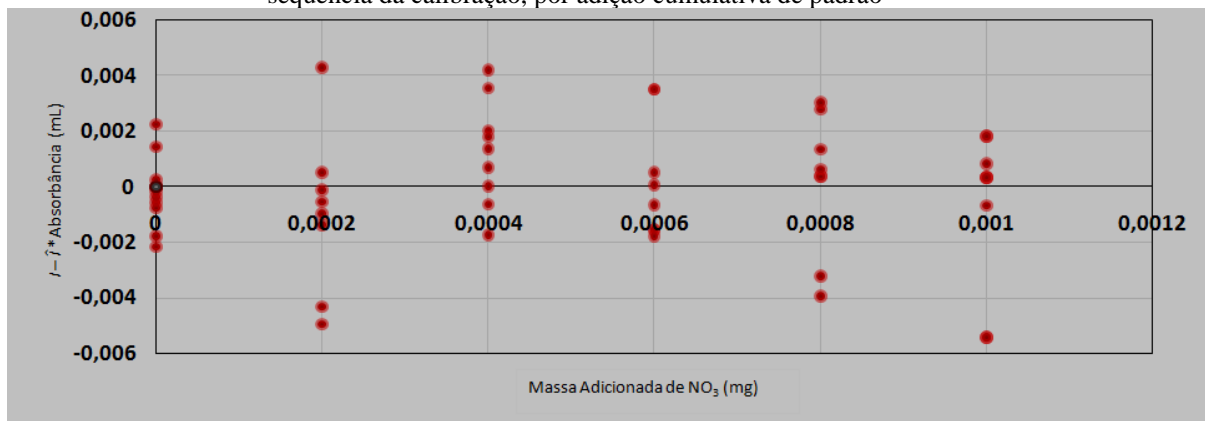
Figura 3 - Representação gráfica da Curva de calibração obtida do Método de Adição Cumulativa (MAP-C); Adições cumulativas de padrão: cinco adições de 100 µL de solução estoque de 2,00 mg L<sup>-1</sup> de NaNO<sub>3</sub>, calculado em N



Fonte: Próprio autor

Por meio de um modelo de regressão linear com distribuição aleatória dos seus resíduos, como na Figura 4, que foram avaliados pelo tratamento I –  $\hat{I}$  (significando: sinal analítico obtido – sinal analítico estimado), indicando que o comportamento aleatório manteve a linearidade na faixa de trabalho estudada para todos os métodos. A análise dos resíduos permitiu ainda, a confirmação que os sinais são homocedásticos, quais dos valores obtidos experimentalmente que estavam mais distantes da linha de maior ajuste.

Figura 3 - Representação gráfica dos Resíduos de regressão em função da massa de NaNO<sub>3</sub> adicionada na sequência da calibração, por adição cumulativa de padrão



Fonte: Próprio autor

#### 4.3 LIMITE DE DETECÇÃO (LOD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)

Com o intuito de caracterizar a capacidade analítica dos métodos, estimou-se o limite de detecção (LOD), os dados de desempenho das calibrações. Possibilitando então, a comparação o desempenho de cada método.

Os valores estimados para os LOD e LOQ com base em cada calibração estão representados na Tabela 4.

Tabela 4 - Limiares analíticos realizados para a cada método de análise

Métodos	Limiares	
	LOD	LOQ
MC (volume)	0,052	0,640
MC (massa)	0,056	0,624
MAP	0,542	0,692
MAP-C	2,638	664,412

Fonte: Próprio autor

Com base nos valores de LOD e LOQ verifica-se que estão em acordo com os limites desejados para quantificação em amostras de água mineral.

Os cálculos realizados para as determinações de LOD e LOQ por meio das Equações (1) e (2) (Bettencourt da Silva, 2016).

$$(1) \text{ LOD}_{l/q} = 3,3 \frac{S_{l/q}}{b} \sqrt{1 + \frac{q^2}{\sum_{e=1}^p \sum_{f=1}^{o_e} (q_{ef} - q)^2}} + \frac{1}{\sum_{e=1}^p o_e}$$

$$(2) \text{ LOQ}_{l/q} = 10 \frac{S_{l/q}}{b} \sqrt{1 + \frac{q^2}{\sum_{e=1}^p \sum_{f=1}^{o_e} (q_{ef} - q)^2}} + \frac{1}{\sum_{e=1}^p o_e}$$

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA PRECISÃO E EXATIDÃO

A verificação da exatidão foi estudada através de testes de recuperação aparente de amostras independentes de forma aleatória. Para os cálculos de recuperação das amostras, utilizou-se a Equação 3 e os resultados foram em expressos na Tabela 5.

$$(3) \quad R (\%) = \frac{C_{\text{experimental}}}{C_{\text{teórica}}} * 100$$

Tabela 5 - Parâmetros de Avaliação da precisão e exatidão dos métodos utilizados

Métodos	Avaliações	
	R (%)	%CV
MC (volume)	98,9267	1,53%
MC (massa)	97,2618	2,45%
MAP	97,8843	1,23%
MAP-C	N/T	N/T

Fonte: Próprio autor



Para avaliar a precisão dos métodos calculou-se os coeficientes de variação dos desvios padrão precisão intermediária (CV%), conforme a Equação 4 e apresentadas em forma de dados relativos na Tabela 5.

$$(4) \quad \%CV = \frac{DP}{X \cdot 100}$$

Onde: DP: desvio padrão das medidas experimentais

X: média dos valores obtidos nas medidas experimentais

O preparo das curvas de calibração mostrou-se eficiente demonstrando bons resultados de recuperação, pois estão no intervalo de aceitação (de 80 a 110%) (AOAC, 1993). Além do mais, os estudos evidenciaram por meio dos ensaios de recuperação, que os métodos são adequados para a avaliação de nitrato dessa matriz, destacando o MAP-C que obteve um valor maior.

Assim, os resultados obtidos indicam que o método MACP-C é preciso. Observou-se também, que os primeiros pontos de todos os métodos possuem uma menor precisão, fato comum devido à chance de erro quando trabalha-se com pequenas massas e grandes volumes.

#### 4.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO

As amostras de água mineral envasada foram submetidas à determinação de nitrato, por três (3) diferentes métodos. Procedeu-se as medições das amostras, em cinco (5) replicatas independentes para cada modo operacional. As médias das concentrações dessas amostras foram calculadas pela aplicação das absorbâncias nas curvas de calibração construídas. Os valores de nitrato de sódio, expressos em mg.L<sup>-1</sup>, estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores de nitrato das amostras de água mineral envasada, expressos em mg L-1 de N

Métodos	Amostras		
	1	2	3
MC (volume)	-0,00747	-0,01808	-0,00559
MC (massa)	-0,01535	-0,02623	-0,01343
MAP	0,051512	0,069876	0,055846
MAP-C	0,084118	0,110525	0,076473

Fonte: Próprio autor

Apesar das diferenças encontradas para o teor de nitrato das amostras analisadas e algumas até abaixo do LOD, verificou-se que os resultados estão todos de acordo com os parâmetros estabelecidos na legislação vigente.

#### 4.6 ESTIMATIVA DA INCERTEZA DA MEDIÇÃO

O uso da abordagem bottom-up teve como vantagem poder estimar a contribuição percentual das componentes de incerteza de cada método utilizada para a identificação de nitrato em águas, dados apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Componentes de incerteza da determinação espectrofotométrica de nitrato em água mineral usando a abordagem bottom-up baseada no modelo de regressão dos mínimos quadrados

Métodos	Incertezas					
	u'(C) (%)	u'Fd (%)	u'Fd' (%)	u'(int) (%)	u'(v) (%)	u'(Camostra) (%)
MC (volume)	1,1	0,4	Nc	4	Nc	4,6
MC (massa)	4,9	Nc	Nc	1	Nc	5
MAP	1,1	0,2	0,4	6	Nc	1,2
MAP-C	2,3	1,3	N/T	0,004	0,2	2,7

Nc= não considerado  
Fonte: Próprio autor

Com a incerteza padrão combinada da concentração estimada de água mineral, u'(Camostra), calculada pela Equação 5, obteve-se incertezas adequadamente baixas com valores de 1,2 a 5 %, sendo maiores para os métodos MC e MAP, ou seja, mais incertos. A construção da curva de calibração e o preparo da solução estoque foram os fatores que mais contribuíram para as incertezas dos métodos convencionais de volume e massa, respectivamente.

$$u'(Camostra) = Camostra \sqrt{(u'(C))^2 + (u'(Fd))^2 + (u'(Fd'))^2 + (u'(int))^2 + (u'(v))^2}$$

Sendo:

u'(Camostra) - Incerteza padrão da concentração estimada da amostra

Camostra - concentração estimada da amostra

u' (Fd) - Incerteza padrão do fator de diluição

u' (Fd)' - Incerteza padrão do fator de diluição 2

u'(int) - Incerteza padrão da curva de calibração

u'(v) - Incerteza padrão do volume da amostra

u'(C) - Incerteza padrão da solução estoque

## 5 CONCLUSÃO

O nitrato consiste em um composto químico muito encontrado em águas naturais, no entanto sua presença em elevada concentração indica a contaminação causada, principalmente pela falta de condições higiênico-sanitárias.

Em particular, dentre os métodos para determinação do nitrato em água mineral, tem-se o espectrofotométrico na região do ultravioleta, que consiste na leitura direta da absorbância da amostra em meio ácido, porém suscetível a efeito de matriz.

Em relação ao preparo das soluções de calibração, é possível sugerir que o comportamento foi estatisticamente aceitável, pois comparando as concentrações teóricas, com as concentrações experimentais, percebe-se uma semelhança quanto aos valores de  $r$  e comprovam a ótima qualidade da curva analítica.

Quanto à validação, os métodos mostraram-se lineares evidenciados pelo bom coeficiente de correlação linear, juntamente com o tratamento dos resíduos, com comportamento homocedástico, ou seja, distribuição aleatória dos resíduos ao longo das abscissas.

Definiu-se o Limite de Detecção dos métodos e o Limite de Quantificação conforme os dados apresentados na Tabela 2. A Precisão foi representada pelo % CV apresentando valores aceitáveis, assim como os da Exatidão dado pelos valores de recuperação.

As estimativas bottom-up da incerteza da medição, envolvidas na preparação das soluções calibradoras, revelaram-se realistas quando aplicadas à análise de amostras de água mineral envasada e produziram resultados metrologicamente compatíveis. O levantamento da contribuição relativa das componentes de incerteza permite otimizar os custos e a incerteza da medição a partir de intervenções nas análises.

Os métodos desenvolvidos são aplicáveis, sendo o de adição cumulativa de padrão muito promissor, visto que se encontrou um menor limite de detecção e quantificação, incluindo uma ótima validação e avaliação da incerteza das medições.

Em relação à aplicação dos métodos validados, as amostras de água mineral envasadas adquiridas no comércio varejista tiveram resultados satisfatórios por apresentarem valores inferiores ao da legislação vigente (Ministério da Saúde, 2005).

## REFERÊNCIAS

ABINAM - Associação Brasileira De Indústrias De Águas Minerais Naturais. São Paulo. Disponível em: [http://www.abinam.com.br/lermais\\_materias.php?cd\\_materias=398&friurl=-Agua-Mineral:-uma-fonte-de-beneficios-para-a-saude-:](http://www.abinam.com.br/lermais_materias.php?cd_materias=398&friurl=-Agua-Mineral:-uma-fonte-de-beneficios-para-a-saude-:) . Acesso em: 8 jan. 2019.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT NBR ISO/IEC 17025 Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaios e calibração. Rio de Janeiro; 2017, 32p.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Peer verified method program: manual on polices and procedures. Arlington, VA, 1993.

APHA. Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater, 22<sup>nd</sup> Ed.: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Washington, 2012, DC.

BETTENCOURT DA SILVA, R. J. N. Spreadsheet for designing valid leastsquares calibrations: a tutorial. *Talanta*, London, v. 148, p. 177-190, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 274, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico para águas envasadas e gelo. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, F, 23 set. 2005. Seção 1, nº 184, p. 376-377.

BURR, T. et al. Uncertainty quantification for radiation measurements: bottom-up error variance estimation using calibration information, *Applied Radiation and Isotopes*, v. 108, p. 49-57, 2016.

DADAMOS, T. R. L. et al. Use of Monte Carlo simulations for the calculation of the uncertainty estimate in the electrochemical detection of uric acid in plasma samples. *TcheQuimica*. v. 15. n.29 p.196-203, 2018.

EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics. Laboratory of the Govern Chemist, 1 ed., 1998.

GONÇALVES, D. A.; JONES, B. T.; DONATI, G. L. The reversed-axis method to estimate precision in standard additions analysis, *Microchemical Journal*, v. 124, p. 155-8, 2016.

IAL – Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4 ed. [1 ed. digital]. São Paulo – Instituto Adolfo Lutz; 2008. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.Br/index.php?option=com\\_remository&Itemid=7&fun=select&orderby=1&Itemid=7](http://www.ial.sp.gov.Br/index.php?option=com_remository&Itemid=7&fun=select&orderby=1&Itemid=7)>. Acesso em: 08 jan. 2019

KRAGTEN, J. Tutorial review: calculating standard deviations and confidence intervals with a universally applicable spreadsheet technique, *Analyst*, v. 119, n. 10, p. 2161-2165, 1994.

NISHIHARA, L.; Alaburda J. Presença de compostos de nitrogênio em águas de poços. Rev. Saúde Pública v. 32 n. 2 São Paulo abr. 1998. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89101998000200009&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101998000200009&lng=pt&tlng=pt). Acesso em: 08 jan. 2019.

RAMOS, R. de O.; ALBUQUERQUE, M. V. da C.; CARTAXO, A. da S. B.; SILVA, M. C. C. de P. e; SÁTIRO, J. R.; LEITE, V. D.; ARAÚJO, M. C. U. D.; LOPES, W. S. Validação de método espectrofotométrico para determinação do teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água de abastecimento público / Validation of the spectrophotometric method for determining the content of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in public supply water. Brazilian Journal of Development, [S. l.], v. 6, n. 8, p. 61828–61836, 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n8-560. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/15560>. Acesso em: 10 mar. 2023.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Quím. Nova [online]. 2004, vol.27, n.5, pp.771-780. ISSN 0100-4042. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>.

RODRIGUES, J. et al. Designing valid and optimised standard addition calibrations: application to the determination of anions in seawater, Talanta, v. 142, p. 72-83, 2015.

SEGA, M. et al. Uncertainty evaluation for the quantification of low masses of benzo [a] pyrene: comparison between the law of propagation of uncertainty and the Monte Carlo method, Analytica Chimica Acta, v. 920, p. 10-17, 2016.

STELIOPOULOS, P. Extension of the standard addition method by blank addition, Methods X, v. 2, p. 353-359, 2015.

SUZUKI, E. Nitrato e os efeitos na saúde humana. Centro de Vigilância Epidemiológica – CVE. São Paulo, 2013. Disponível em: <http://www.sigrh.sp.gov.br/public/uploads/documents/7394/palestra-04-eliana-suzuki.pdf>. Acesso em: 08 jan. 2019.

VIANA, A. M. E.; BETTENCOURT DA SILVA, R. J. N.; CAMÕES, M. F. G. F. C. Optimization of the determination of chemical oxygen demand in wastewaters, Analytica Chimica Acta, v. 699, n. 2, p. 161-169, 2011.

WANG, Q. et al. Methods for the detection and determination of nitrite and nitrate: A review, Talanta, v.165, p.709-720, 2017.