



**Universidade Federal de Ouro Preto**

**Escola de Farmácia**

**Trabalho de conclusão de curso II (TCC006)**



**George Alberto Dias**

**Validação de método analítico para determinação de nitrogênio total em amostras de via úmida (chuva e neblina).**

**Ouro Preto MG**

**2018**





**Universidade Federal de Ouro Preto**

**Escola de Farmácia**

**Trabalho de conclusão de curso II (TCC006)**



**George Alberto Dias**

**Validação de método analítico para determinação de nitrogênio total em amostras de via úmida (chuva e neblina).**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia

**Orientador: Profa. Dr. Eneida Maria Eskinazi Sant'Anna**

**Coorientador: Dr. Davi Oliveira e Silva**

**Ouro Preto MG**

**2018**

D541v Dias, George Alberto.  
Validação de método analítico para determinação de nitrogênio total em amostras de via úmida (chuva e neblina). [manuscrito] / George Alberto Dias. - 2018.

40f.: il.: color, graf.; tabs.

Orientadora: Profª. Drª. Eneida Maria Eskinazi Sant'Anna .

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia.

1. Métodos analíticos. 2. Nitrogênio. 3. Neblina. 4. Chuva. I. Sant'Anna, Eneida Maria Eskinazi. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 502

Catálogo: ficha.sisbin@ufop.edu.br



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP  
**Escola de Farmácia**

ESCOLA DE FARMÁCIA



## TERMO DE APROVAÇÃO

### **Validação de método analítico para determinação de nitrogênio total em amostras de chuva e neblina**

Trabalho de Conclusão de Curso defendido por **George Alberto Dias**  
e aprovado com nota 9,0, em 29 de Novembro de 2018, pela  
comissão examinadora:

Prof.ª Dra. Yasmine Antonini Itabaiana  
(DEBIO-ICEB-UFOP)

Dr. Davi Oliveira e Silva  
(Coorientador-DEBIO-ICEB-UFOP)

Prof.ª Dra. Eneida Maria Eskinazi Sant'Anna  
(Orientadora-DEBIO-ICEB-UFOP)



## Lista de notações

<b>Cu</b>	cobre
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	fosfato dipotássico
<b>mL</b>	mililitro
<b>µg/L</b>	micrograma por litro
<b>N</b>	nitrogênio
<b>N<sub>2</sub></b>	nitrogênio molecular
<b>N<sub>2</sub>O</b>	monóxido de dinitrogênio
<b>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	trióxido de dinitrogênio
<b>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	pentóxido de dinitrogênio
<b>NH<sub>3</sub></b>	amônia gasosa
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	íon amônio
<b>nm</b>	nanômetro
<b>mg/L</b>	miligrama por litro
<b>NO</b>	monóxido de nitrogênio
<b>NO<sub>2</sub></b>	dióxido de nitrogênio
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	íon nitrito
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	íon nitrato
<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Nitrogênio de nitrato
<b>P</b>	fósforo
<b>Pb</b>	chumbo
<b>S2</b>	solução intermediária
<b>S1</b>	Solução estoque
<b>Zn</b>	zinco
<b>MRC</b>	Materiais de referência certificados
<b>Abs</b>	Absorbância

**ppm** partes por milhão

**ppb** partes por bilhão

**CONAMA** Conselho Nacional do Meio Ambiente

## Lista de tabelas

Tabela 1 - Diluições referentes á curva padrão de nitrato .....	27
Tabela 2 - Precisão dos resultados tomando-se 25mL de amostra.....	28
Tabela 3 - Precisão dos resultados tomando-se 50mL de amostra.....	28
Tabela 4 - Valores de concentração obtidos após implementação de protocolo .....	29
Tabela 5 - Valores de absorvância dos padrões e da matriz fortificada com concentrações conhecidas de nitrogênio.....	32
Tabela 6 - Valores de sensibilidade obtidos a partir das curvas de calibração em dias diferentes.....	32
Tabela 7 - Exatidão obtida a partir da recuperação do analito em três diferentes níveis de concentração .....	33
Tabela 8 - Representação da precisão do método através da repetitividade .....	33

## **Lista de Quadros**

Quadro 1 - Fórmulas utilizadas para o limite de detecção .....	20
Quadro 2 - Valores de absorvância dos brancos obtidos em dias diferentes de experimento .....	30

## Lista de figuras

Figura 1 - Pico relativo ao comprimento de onda de maior absorção .....	29
Figura 2 - Curva de calibração e coeficiente de determinação.....	31
Figura 3 - Perfil de seletividade do método mostrando efeito da matriz em concentrações baixa, média e alta .....	31

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	14
2.1 Nitrogênio.....	16
2.2. Formas de nitrogênio .....	16
2.3. Metodologias de quantificação de nitrogênio total.....	17
2.3.1. Método Kjeldahl.....	17
2.3.2. Método de Dumas.....	17
2.3.3. Coluna redutora de cádmio.....	18
2.3.4. Método de Valderrama .....	18
2.4. Parâmetros de Validação.....	19
2.4.1. Seletividade .....	19
2.4.2. Limite de Detecção (LD) .....	19
2.4.3. Limite de Quantificação (LQ) .....	21
2.4.4. Linearidade e Curva de Calibração.....	21
2.4.5. Sensibilidade .....	22
2.4.6. Exatidão .....	23
2.4.7. Precisão .....	24
<b>3. OBJETIVO GERAL</b> .....	24
<b>4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	25
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25
5.1. Reagentes e soluções.....	25
5.2. Varredura do comprimento de onda.....	26
5.3. Seletividade .....	26
5.4. Limite de detecção.....	26
5.5. Limite de quantificação .....	26
5.6. Linearidade, faixa de trabalho e sensibilidade .....	26
5.7. Exatidão .....	27
5.8. Precisão .....	27
6.1. Elaboração de protocolo de análise de nitrogênio total. ....	27
6.3. Validação do método.....	29
6.3.1. Varredura do comprimento de onda ( $\lambda$ ) .....	29
6.3.2. Limite de quantificação .....	29
6.3.3. Limite de detecção.....	30
6.3.4. Faixa de trabalho, linearidade e curva de calibração .....	30
6.3.5. Seletividade .....	31

<b>Figura 3 - Gráfico de seletividade do método mostrando efeito da matriz em concentrações baixa, média e alta. ....</b>	<b>31</b>
<b>6.3.6. Sensibilidade .....</b>	<b>32</b>
<b>6.3.7. Exatidão .....</b>	<b>33</b>
<b>6.3.8. Precisão .....</b>	<b>33</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>39</b>

## RESUMO

O presente trabalho se propôs a adaptar, implementar e validar um método analítico para quantificação de nitrogênio total em amostras de deposição úmida (chuva e neblina), vias consideradas potencialmente como de baixa concentração de elementos. O método analítico proposto baseou-se na oxidação do nitrogênio total das amostras a íon nitrato, com posterior complexação com tartarato e formação de um composto de cor amarela que pôde ser quantificado por espectrofotometria no comprimento de luz visível. Após a adaptação do método, foi elaborado o procedimento operacional padrão que foi executado utilizando-se amostras de chuva e neblina, coletadas na Universidade Federal de Ouro Preto e no Parque Estadual do Itacolomi, por meio de coletores passivos de chuva e neblina. Averiguou-se a confiabilidade dos dados obtidos por meio da validação do método analítico através de parâmetros estabelecidos em guias de validação de órgãos competentes como ANVISA e INMETRO. Obtiveram-se experimentalmente os limites de detecção e quantificação. A faixa de trabalho foi estipulada entre o limite de quantificação inferior e superior, utilizando-se como valor médio a concentração máxima permitida pelo CONAMA para ambientes lênticos, faixa em que o método apresentou linearidade com alto coeficiente de determinação. A seletividade foi adequada apenas para valores de concentração baixo e médio, sugerindo interferência dos componentes da matriz em concentrações altas. A sensibilidade foi baixa devido à concentração da ordem de ppb, sendo isto uma limitação da espectrofotometria no visível. A exatidão do método foi adequada para concentrações médias e a precisão foi satisfatória para valores acima de 300 µg/L. Portanto o método mostrou-se linear, com limite de quantificação e detecção aceitáveis, seletivo para concentrações baixas e médias, exato para concentrações médias e com precisão satisfatória.

Palavras chave: análises químicas, nitrogênio, neblina, chuva

## 1. INTRODUÇÃO

O nitrogênio é o gás de maior abundância na composição do ar atmosférico, perfazendo cerca de oitenta por cento da sua totalidade. Esse elemento faz parte da constituição das rochas e solos e está presente em todos os seres vivos. Apresenta-se sob a forma de gás inerte ( $N_2$ ), amônia ( $NH_3$ ), proteínas (matéria orgânica) e óxidos em geral ( $NO_x^y$ ), onde x representa o número de átomos de oxigênio e y a carga do íon. Todas essas formas estão distribuídas na natureza e seguem um ciclo denominado ciclo do nitrogênio, onde cada espécie sofre reações de oxirredução para tornarem-se mais estáveis (GALLO, L. 2013).

As atividades antrópicas são responsáveis pela produção e acúmulo de materiais contendo compostos nitrogenados que posteriormente são lançados no meio ambiente, alterando o ciclo biogeoquímico do N. Como exemplo podemos citar a agricultura que faz uso de fertilizantes e agrotóxicos que contêm nitrogênio em sua composição; a agropecuária, responsável pelo lançamento de matéria orgânica (MOSIER, A. 2013); a atividade industrial que libera gases contendo óxidos de nitrogênio advindos do processo de produção (HE, Z. 2017), e finalmente, o setor de mineração responsável pela emissão de material particulado e rejeitos de minério com alto conteúdo de componentes nitrogenados como éter-aminas, que quando em contato com o meio ambiente causam prejuízos (CARNEIRO, M. 2018).

Dentre os danos causados no ambiente podemos citar a eutrofização de lagos, rios e mananciais, fator que compromete a qualidade da água para consumo humano (OLIVER, N. et al. 2017). Quando se ingere água com altas concentrações de óxidos de nitrogênio podem ocorrer o aparecimento de doenças como a metahemoglobinemia, que pode ser fatal em recém-nascidos (FERNÁNDEZ, J. 2018).

Além do lançamento destes compostos diretamente nas águas e nos solos, ocorre também a emissão destes no ar, causando poluição. Por estarem presentes no ar na forma particulada ou dissolvida, podem sofrer processo de carreamento através da chuva e da neblina, e retornar à superfície causando os prejuízos anteriormente citados. Quando transportados pela chuva e pela neblina, é possível que estes compostos se concentrem, pois, as gotículas de chuva e neblina possuem grande área de contato devido ao seu tamanho reduzido, e o carreamento destas gotículas por grandes distancias também favorece o enriquecimento da concentração. Alguns estudos relatam que a neblina possui maior potencial de concentração de elementos quando comparada com a chuva (BAETA, H. 2012).

Considerando o alto potencial da presença de compostos nitrogenados, faz-se necessário aprimorar as etapas de métodos analíticos capazes de quantificar o nitrogênio total em amostras

líquidas de baixo volume, como a neblina. Dentre as técnicas para quantificação podemos citar o método Kjeldahl, que é ideal para matéria orgânica, mas não quantifica formas oxidadas (APHA, 2005), o método de Dumas para nitrogênio total, que fornece resultados satisfatórios porém é uma metodologia onerosa (METCALF, L e EDDY, H. 2003), o método da coluna redutora de cádmio, que é um dos métodos preconizados para determinação de nitrogênio total (APHA 2005), e o método do salicilato ou Valderrama, que é um método geralmente aplicado para amostras de água de superfície (MURPHY, J. e RILEY, J.1962).

Entretanto, deve-se avaliar se o método proposto para análise, fornece resultados confiáveis. A avaliação da confiabilidade dos resultados é denominada validação de método, e deve ser executada toda vez que se crie, implemente ou modifique uma metodologia analítica. As modificações incluem variação da quantidade de amostra utilizada, mudança de componentes da matriz, mudança de equipamentos ou de reagentes. A validação deve ser executada por profissionais treinados, utilizando-se equipamentos qualificados e calibrados, e os dados obtidos devem ser documentados de forma a facilitar sua rastreabilidade. Para sua execução é necessário protocolo bem estabelecido com detalhamento dos parâmetros e procedimentos a serem aplicados na validação (FDA, 2015).

Dentre os parâmetros da validação citam-se: seletividade, garantia que o analito é quantificado sem sofrer a interferência de outros componentes da matriz; o limite de detecção que é a menor quantidade de analito que pode ser detectada mas não necessariamente quantificada; o limite de quantificação, parâmetro este que fornece a menor quantidade de analito que pode ser quantificado com precisão e exatidão satisfatórias; faixa de trabalho onde numericamente os resultados ficarão contidos e o resultado esperado se situe no meio desta faixa, linearidade do método observada pela proporcionalidade entre a concentração e o sinal fornecido; a sensibilidade, referente à variação do sinal obtido em relação a variação da concentração e deve ser a melhor possível; a exatidão é o quanto as concentrações obtidas estão de acordo com uma concentração de referência tida como verdadeira e a precisão que está relacionada com a variabilidade dos resultados levando-se em consideração, tempo, local e diferentes analistas (INMETRO, 2010).

A cidade de Ouro Preto situa-se no quadrilátero ferrífero, região responsável pela maior parte da produção de minério no Brasil, contribuindo com mais de sessenta por cento da produção total do país (COELHO, T. 2012), portanto contribui ativamente na emissão de rejeitos que podem conter grandes quantidades de nitrogênio total provenientes por exemplo de éter aminas usadas no beneficiamento do minério de ferro. Estes rejeitos por sua vez são

carreados através da chuva e da neblina, portanto faz-se necessário uma metodologia confiável de análise de nitrogênio total presente nestas vias de deposição, pois esse parâmetro pode ser utilizado para monitoramento tanto da qualidade do ar como prever resultados de impactos causados pela atividade mineradora.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

Poluição do ar é definida como emissão antrópica de gases ou material particulado em concentrações suficientes para causar danos diretos ou indiretos nos seres vivos, nos ecossistemas ou causar alterações estruturais e paisagísticas. Apesar das emissões antropogênicas serem as mais danosas aos seres vivos, as emissões naturais também devem ser consideradas pois impactam diretamente a composição atmosférica e o clima (MONKS, O. 2009).

As emissões antrópicas vêm superando quantitativamente as emissões naturais provenientes da lixiviação dos solos e deposições atmosféricas, devido ao crescimento populacional e conseqüente aumento da atividade industrial e de exploração de recursos naturais como carvão e minério. Dentre os compostos de interesse ambiental emitidos destacam-se N, P e metais como Zn, Cu, Pb e Cd (MOLISANI, M. 2013). Segundo MOLISANI, M. 2013, as emissões antrópicas são responsáveis pela maior deposição de metais e nutrientes nas águas em comparação com fontes naturais de emissão.

Segundo a organização mundial de saúde, estima-se que cerca de 3 bilhões de pessoas ainda usam a queima de combustíveis sólidos como fonte de energia (madeira, carvão mineral, rejeitos de plantio, esterco animal, carvão vegetal) para uso familiar, contudo os efeitos dos gases liberados são nocivos à saúde resultando em cerca de 4,12 milhões de mortes prematuras de crianças e adultos segundo estimativas da organização mundial de saúde em 2012 (WHO, 2012). Dentre os poluentes atmosféricos, destaca-se o material particulado (PM), por possuir o maior caráter tóxico. Ressalta-se que o diâmetro das partículas está intimamente ligado ao impacto sobre a saúde, visto que partículas menores atingem mais facilmente o trato respiratório. A queima de biomassa libera partículas menores que 2.5 µm. Estudos correlacionando níveis de poluição por material particulado emitido por queima de biomassa indicam correlação direta entre o aumento da poluição com incidência de problemas respiratórios (CARMO, C. 2013).

Além da queima de combustíveis, a atividade mineradora também é responsável pelo lançamento de material particulado na atmosfera. Uma mina de exploração a céu aberto pode produzir cerca de 10 toneladas de poeira por dia que são lançadas na atmosfera causando

impactos na população local, além de serem transportadas por grandes distâncias impactando regiões afastadas do ponto de mineração (ANDRADE, P. 2013).

A superfície da terra funciona como um depósito para vários gases traços e aerossóis advindos da atmosfera e como fonte de vários outros num processo de troca constante. O entendimento deste ciclo é de suma importância para o entendimento de perturbações climáticas causadas por emissões antrópicas. Neste contexto citam-se as emissões de compostos de nitrogênio (Oxidados e reduzidos) que no último século superaram as emissões naturais em pelo menos cinco vezes. Como o nitrogênio é um elemento limitante ao crescimento de microrganismos em diversos ecossistemas, essas modificações causam um profundo impacto na biodiversidade (ERISMAN et al., 2008 e FOWLER, D. 2009).

Associado às emissões antropogênicas está o aumento de material particulado e aerossóis derivados de compostos de nitrogênio, que são removidos da atmosfera tanto por deposição úmida quanto seca. Gases e material particulado emitidos para atmosfera são transportados para a superfície terrestre por deposição seca ou úmida (OLADOSU, N. 2017). A deposição úmida ocorre quando a chuva dissolve os gases solúveis e os arrastam consigo. Já a deposição seca ocorre por difusão dos gases e transporte pelo vento, retirando os componentes da atmosfera e os depositando na superfície, processo que torna o ar atmosférico mais limpo (RODRIGUES, R. 2009).

Os poluentes podem ser transportados por curta distância e serem depositados na vizinhança sem qualquer tipo de transformação, ou podem sofrer processo de transporte por longas distâncias e neste caso o fator tempo é crucial e dá margem para transformação destes compostos antes de serem depositados na superfície. (OLADOSSU, N. 2017).

Além da chuva, a neblina também é caracterizada como via de deposição úmida e pode ser definida como gotículas de água suficientemente pequenas para se manterem em suspensão no ar formando nuvens que podem tocar o solo ou não. (SCHOOL, M.; EUGSTER, W. e BURKARD, R. 2010). A neblina possui maior potencial de concentração de metais e compostos de nitrogênio devido ao tamanho reduzido das gotículas, o que propicia maior área de contato para transferência de material entre o ar atmosférico e a água contida na neblina. De fato, quando ambas as formas de deposição úmida são comparadas, observa-se maiores concentrações de metais e nitrogênio total na neblina. Em algumas regiões dos Estados Unidos por exemplo, foram encontradas concentrações de nitrogênio e metais cerca de 200 vezes maior na neblina, e em florestas da Alemanha essa concentração atingiu 1000 vezes os valores encontrados na chuva (ZIMMERMANN, L. e ZIMMERMANN, F. 2002).

Em Ouro Preto, região situada no quadrilátero ferrífero onde há intensa atividade mineradora, foram encontrados valores altos de concentração de nutrientes como nitrogênio na neblina, superando em até trinta vezes as concentrações observadas na chuva (BAETA, H. 2012).

## **2.1 Nitrogênio**

O nitrogênio é elemento essencial ao ciclo de vida de todos os organismos, fazendo parte dos componentes estruturais das células e inúmeros processos bioquímicos. Outros elementos como o ferro e metais traços também são de suma importância, porém, nitrogênio destaca-se, visto que faz parte de todas as proteínas. As principais fontes de nitrogênio total são: os compostos contendo nitrogênio, tanto de plantas quanto de animais, nitratos, nitrito e nitrogênio atmosférico (METCALF, L. e EDDY, H. 2003).

A atividade mineradora também contribui com o carreamento de compostos contendo nitrogênio para o ambiente. Do processamento do minério surgem dois produtos, o concentrado do minério de ferro, que é utilizado como matéria prima pela indústria e o rejeito contendo subprodutos não reutilizáveis, como a sílica e a argila, que por sua vez são depositados em barragens das mineradoras. Junto a esse rejeito pode-se encontrar em altas concentrações compostos orgânicos que são utilizados durante o processo de flotação, e neste contexto podemos citar compostos orgânicos contendo nitrogênio em sua estrutura, como aminas alifáticas, mais precisamente éter-aminas que são responsáveis pela separação entre o minério de ferro e a sílica (SILVA, F. 2009).

Neste quadro, a deposição de nitrogênio no ambiente pode ocasionar diversos impactos como: eutrofização de lagos e mananciais comprometendo sua biodiversidade, excesso de nitrato nas águas para consumo humano o que pode causar doenças como a metahemoglobinemia e toxicidade do ar causando problemas respiratórios (ANEJA, V. 2001).

## **2.2. Formas de nitrogênio**

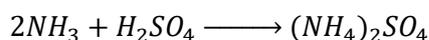
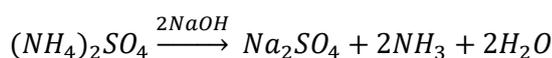
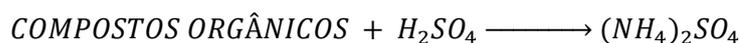
O termo nitrogênio total refere-se a soma das seguintes formas: nitrogênio orgânico, amônia, nitrito e nitrato. O nitrogênio orgânico consiste da mistura de aminoácidos, proteínas e glicoproteínas, e podem apresentarem-se na forma solúvel ou particulada. (METCALF, L. e EDDY, H. 2003). As concentrações de nitrogênio em amostras de água, podem ser determinadas pelo método de Kjeldahl (que consiste em digestão ácida da amostra afim de converter todo o nitrogênio orgânico em amônia com posterior determinação colorimétrica (SILVA, L. et al, 2006)), pelo método de Dumas (que se baseia na conversão do nitrogênio total em N<sub>2</sub> gasoso (METCALF, L. e EDDY, H. 2003)), por meio da oxidação do nitrogênio total em

nitrato e subsequente redução para nitrito em coluna redutora de cádmio (APHA 2005) ou reação do nitrato com salicilato, formando p-nitrosalicilato (MURPHY, J. e RILEY, J.1962).

## 2.3. Metodologias de quantificação de nitrogênio total

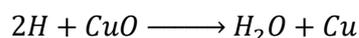
### 2.3.1. Método Kjeldahl

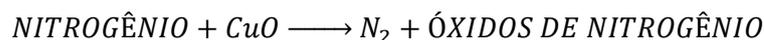
O método Kjeldahl foi desenvolvido para determinação de nitrogênio orgânico e amônia, não podendo ser utilizado na determinação das demais formas de nitrogênio como azida, azina, hidrazona, semicarbazona, grupos nitrila, compostos n-nitrosos heterocíclicos, nitrito e nitrato. A técnica é dividida em semimicro Kjeldahl e macro Kjeldahl, diferenciando-se apenas nos aparatos e nas quantidades mínimas de amostra. Para amostras contendo altas concentrações de nitrogênio usa-se micro Kjeldahl, que pode quantificar neste caso concentrações da faixa de 0,2 a 2,0 mg (APHA, 2005). Por outro lado, usa-se macro Kjeldahl para faixas menores de concentração, podendo ser aplicado também em amostra mais concentradas, porém macro Kjeldahl necessita de quantidades maiores de amostra quando estas estão diluídas. As amostras coletadas devem ser imediatamente analisadas após coletadas e em caso de posterga das análises, deve-se acidificá-las usando-se H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e armazenar a -4°C (APHA, 2005). As etapas do método são: Aquecimento da amostra na presença de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, oxidando matéria orgânica a sulfato de amônia, adição de NaOH em excesso, que converte sulfato de amônia em sulfato de sódio e amônia livre. A amônia livre então reage novamente com excesso de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, que por sua vez, em excesso, é titulado usando-se NaOH. O esquema resumido da equação é o seguinte (APHA, 2005):



### 2.3.2. Método de Dumas

A análise quantitativa de nitrogênio pelo método de Dumas consiste no aquecimento das amostras contendo nitrogênio juntamente com óxido de cobre em excesso e em presença de CO<sub>2</sub>. Nitrogênio livre, CO<sub>2</sub> e água são liberados pela reação assim como óxidos de nitrogênio de acordo com a reação a seguir (METCALF, L e EDDY, H. 2003):





Os óxidos de nitrogênio formados na reação são reduzidos a  $\text{N}_2$  quando passados por uma coluna contendo cobre. O gás  $\text{N}_2$  é assim coletado em tubo graduado, onde o volume de  $\text{N}_2$  obtido é usado para se calcular a massa de nitrogênio por meio da equação dos gases (METCALF, L e EDDY, H. 2003).

O método de dumas ganhou destaque quando em 1990 foram proibidos o uso de mercúrio e cádmio em laboratórios do Canadá e da Austrália. Ambos são validados por órgãos internacionais, porém Dumas é o método mais preciso enquanto Kjeldahl é o mais difundido, usual, devido á razões de natureza comercial e possibilidade de conflitos, sendo assim adotado pela comissão europeia. Não obstante, o método é capaz de quantificar tanto as formas orgânicas quanto as formas inorgânicas do nitrogênio, porém com a desvantagem do alto custo de implantação do método (MÜLLER, J. 2017).

### **2.3.3. Coluna redutora de cádmio**

O método da coluna redutora de cádmio baseia-se na redução quantitativa dos íons nitrato para íons nitrito na presença de cádmio, portanto, nitrogênio orgânico e amônia devem ser convertidos previamente em nitrato. A parte principal da técnica consiste em se passar a solução contendo os íons nitrato, por uma coluna de vidro preenchida com grânulos de cádmio tratados com sulfato de cobre. O  $\text{N-NO}_3^-$  sofre uma reação de diazotização com sulfanilamida e depois conjugado com N-(1-naftil)-dihidrocloreto de etilenodiamina, o composto de coloração rosa é então determinado colorimetricamente. O limite de detecção da técnica é 10  $\mu\text{g/L}$  podendo quantificar um máximo de 1000  $\mu\text{g/L}$  (APHA, 2005).

### **2.3.4. Método de Valderrama**

O método de Valderrama se baseia na oxidação simultânea dos compostos nitrogenados em um meio básico, através de um sistema ácido bórico hidróxido de sódio. Após oxidação dos compostos de nitrogênio das amostras, a nitrato, pode-se inferir as concentrações de nitrogênio através da quantificação de um composto formado pela reação do nitrato com salicilato de sódio, formando p-nitrosalicilato, de cor amarela, que pode ser quantificado por espectrofotometria a 420 nm. O método é adequado para concentrações de 100 a 2000  $\mu\text{g/L}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  (MURPHY, J. e RILEY, J.1962).

Além das técnicas oficiais já em uso, podemos citar também métodos não destrutivos e mais sofisticados com precisão e exatidão comprovadas como a análise por ativação de fótons

baseado em emissão de raios gama durante a transição de  $N^{14}$  para  $N^{13}$ . Cromatografia líquida e absorção atômica (MADLIKOVA, M. 2018).

Neste contexto, visando o desenvolvimento e implementação de metodologias analíticas, deve-se avaliar se o método é eficiente e realiza aquilo que se propõe. Esse Processo de avaliação é denominado validação. Alguns Parâmetros de validação que devem ser averiguados durante implementação são: seletividade e especificidade, limites de detecção e quantificação, faixa de trabalho e linearidade, precisão e exatidão (FDA, 2015).

## **2.4. Parâmetros de Validação**

### **2.4.1. Seletividade**

A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar porventura presentes, distinguindo-os do composto de interesse (ANVISA, 2017). Para se testar a seletividade de um determinado método analítico, pode-se usar diversas abordagens dentre as quais podemos citar adição de padrão na matriz e comparação dos resultados com outra técnica comprovadamente específica (FORTI, M. 2011).

Ainda segundo FORTI, M. 2011, o método da adição de padrão é usado quando não é possível obter a matriz livre da substância de interesse. Para se proceder desta forma, constroem-se duas curvas analíticas, em que uma delas está presente apenas a substância de interesse e na outra a substância de interesse adicionada na própria matriz. Após a confecção das curvas analíticas, sobrepõe-se ambas e se elas forem paralelas fica comprovada a seletividade do método por não haver interferência dos componentes presentes na matriz. Já no teste de seletividade usando técnicas alternativas, pode-se usar por exemplo espectrometria de massas e ressonância magnética (FORTI, M. 2011).

### **2.4.2. Limite de Detecção (LD)**

Limite de detecção é a menor concentração dos analitos que pode ser detectada pelo método em análise, mas não necessariamente quantificada; está diretamente relacionada com ruídos inerentes ao método e sinais relativos à brancos de amostras. O Limite de detecção pode ser obtido de várias formas dentre as quais pode-se destacar três: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI, M. 2004).

#### **2.4.2.1. Método visual**

É utilizado para determinar o limite de detecção utilizando a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, de tal modo que se possa distinguir entre

ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração detectável (RIBANI, M. 2004). Para a validação de um método analítico, normalmente é suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito pode ser distinguida do sinal do branco (INMETRO, 2010).

**Quadro 1 - Fórmulas utilizadas para o limite de detecção**

<b>Matriz</b>	<b>Cálculos</b>	<b>Observações</b>
Branco da amostra	$LD = \bar{X} + t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot S$ Sendo: X: média dos valores dos brancos da amostra. t: distribuição de <i>student</i> dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança S: desvio padrão amostral dos brancos da amostra	A média e o desvio padrão amostral dos brancos da amostra são dependentes da matriz.  Válido somente quando os valores dos brancos apresentarem desvio padrão amostral diferente de zero
Branco da amostra com a menor adição aceitável do analito	$LD = (0 + t_{(n-1, 1-\alpha)}) \cdot S$ Sendo: t: distribuição de <i>student</i> dependente do tamanho da amostra e do nível de confiança S: desvio padrão amostral dos brancos com adição dos analito até detecção	A menor concentração aceitável é aquela tida como a concentração mais baixa para a qual um grau de incerteza aceitável pode ser alcançado

Fonte: Adaptado de INMETRO, 2010.

É fundamental que avaliações independentes sejam realizadas em amostras com concentração igual ao limite de detecção determinado. É recomendado um mínimo de 7 replicatas para a determinação do LD. Por exemplo, no caso de se analisar 7 alíquotas, temos  $7-1 = 6$  graus de liberdade de uma matriz de branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito. Para esses graus de liberdade, o valor de *t* unilateral, para 99% de confiança é 3,143. O LD será igual a 3,143 vezes o desvio padrão amostral. O método analítico deve ser especificado e o LD para cada analito deve ser expresso nas unidades apropriadas, de acordo com o preconizado no método analítico.

#### **2.4.2.2. Método da relação sinal-ruído**

Em metodologias cujo o sinal analítico apresenta ruído da linha de base, pode-se estabelecer uma concentração mínima em que este ruído é equiparável ao sinal de brancos analíticos e amostras contendo concentrações mínimas da espécie em análise. Este parâmetro pode ser estimado também como sendo 3 vezes o sinal da linha de base.

#### **2.4.2.3. Método baseado em parâmetros da curva analítica**

De acordo com INMETRO, 2010, o limite de detecção pode ser expresso como a razão entre a estimativa do desvio padrão dos brancos ou do coeficiente linear da equação e o coeficiente angular da curva analítica. Nos cálculos dos desvios deve-se construir curvas analíticas a partir da matriz contendo o composto de interesse na faixa de concentração mais baixa detectável. A fórmula para o desvio é apresentada abaixo, onde *s* representa o desvio padrão dos brancos ou coeficiente linear e *S* a inclinação da reta ou coeficiente angular da curva analítica (INMETRO, 2010):

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S}$$

#### **2.4.3. Limite de Quantificação (LQ)**

Entende-se como limite de quantificação de um determinado procedimento analítico, a menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão satisfatória (ANVISA, 2017). Para efeitos práticos pode ser entendido como a menor concentração dos padrões da curva analítica. Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado com amostras independentes, para averiguar se a tendência e a precisão conseguidas são satisfatórias. O LQ pode ser expresso como o valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 vezes o desvio padrão dos mesmos, ou ser obtido experimentalmente de acordo com o laboratório. Em análises inferiores a 100 ppm admite-se como LQ o ponto de menor concentração da curva analítica.

#### **2.4.4. Linearidade e Curva de Calibração**

Segundo ANVISA, 2017 a linearidade representa a capacidade do método em oferecer respostas diretamente proporcionais à concentração dos analito, dentro de uma faixa de trabalho determinada, geralmente esta faixa é iniciada pelo limite de quantificação e termina na concentração máxima em que o método gera respostas com o menor grau de incerteza. A curva de calibração apresenta os dados estatísticos de interseção, da equação de regressão linear, o coeficiente de correlação ou de determinação e a concentração estimada das soluções padrão.

Para se garantir um mínimo de desvio das respostas analíticas obtidas pela curva de calibração, recomenda-se um mínimo de cinco valores de concentração dentro da faixa de trabalho (BRITO, M. 2003). A equação da reta é apresentada a seguir:

$$y = ax + b$$

Onde: Y=resposta medida (Absorbância)

X = concentração

a = coeficiente angular (sensibilidade)

b = interseção com o eixo y, quando  $x = 0$

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. O coeficiente de correlação linear ( $R$ ) é frequentemente usado para indicar o quanto a reta pode ser considerada adequada como modelo matemático, ou seja, a linearidade pode ser demonstrada pelo coeficiente de correlação da curva de calibração, que não deve ser estatisticamente diferente de 1, observando-se que a inclinação da reta seja diferente de zero. No caso, segundo BRITO, M. 2003 considera-se:

R=1 Correlação Perfeita

0,91<R<0,99 Correlação Fortíssima

0,61<R<0,90 Correlação Forte

0,31<R<0,60 Correlação Média

0,01<R<0,30 Correlação Fraca

R=0 Correlação Nula

#### **2.4.5. Sensibilidade**

A sensibilidade ( $S$ ) é a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. Sob o ponto de vista prático, a sensibilidade constitui o coeficiente angular do gráfico analítico, expresso como coeficiente entre a variação do sinal obtido ( $dy$ ) pela faixa de concentração correspondente ( $dx$ ) (RELACRE, G. 2000):

$$S = \frac{dy}{dx}$$

Em métodos sensíveis, uma pequena diferença na concentração do analito causa grande variação no valor do sinal analítico medido. Esse critério expressa a capacidade do procedimento analítico gerar variação no valor da propriedade monitorada ou medida, causada por pequeno incremento na concentração ou quantidade do analito. Entretanto, tornou-se comum o uso errôneo desse termo para designar método com baixo limite de detecção (BRITO, M. 2003).

#### **2.4.6. Exatidão**

A exatidão associada a processos analíticos é numericamente demonstrada através da tendência, e esta consiste em comparar os valores obtidos nos experimentos com valores adotados como verdadeiros, e é expressa em forma de porcentagem através da equação:

$$\frac{\text{valor esperado}}{\text{valor observado}} \times 100$$

A tendência, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (NEVES, M. 2017). Os principais guias de validação preconizam que os valores adotados como verdadeiros sejam obtidos das seguintes formas: comparações interlaboratoriais, uso de substâncias e materiais de referência e através de ensaios de recuperação (INMETRO, 2010).

As substâncias químicas e materiais de referência são denominados MRC e são fornecidos por órgãos regulatórios como IRMM (*Institute for Reference Materials and Measurements*) e NIST (*National Institute of Standards and Technology*), dos Estados Unidos da América e possuem concentração ou outra grandeza, comprovadas com um índice de incerteza associado (RELACRE, G. 2000).

Já em comparações interlaboratoriais, o valor de referência é obtido por uma metodologia previamente validada e comparado com o valor obtido nos experimentos a serem validados. O terceiro ensaio trata-se dos testes de recuperação que consistem em se avaliar a exatidão do método através da fortificação de amostras reais com o analito de interesse, neste caso a resposta analítica obtida é comparada com a resposta do analito isolado na mesma concentração adicionada, seguindo a fórmula:

$$Re\% = \left[ \frac{\text{valor obtido} - \text{valor real}}{\text{valor real}} \right] \times 100$$

Esta comparação reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. As fortificações devem ocorrer em pelo menos três níveis de concentração da faixa de trabalho, baixo, médio e alto, e de forma a usar a menor quantidade adicionada para não alterar a matriz da amostra (BRITO, M. 2003).

#### **2.4.7. Precisão**

O INMETRO, 2010 destaca que dentre os parâmetros para se analisar a precisão, a repetitividade é o primeiro requisito a ser cumprido. Para análise da repetitividade os seguintes pontos devem ser considerados: mesmo procedimento, mesmo observador, mesmos instrumentos, mesmas condições, mesmo local e repetições no menor espaço de tempo possível. Resultados satisfatórios de repetitividade são obtidos por meio do coeficiente de variação ou desvio padrão relativo (DPR), que deve apresentar valores baixos em termos da dispersão dos resultados. O coeficiente de variação é calculado através da seguinte fórmula:

$$CV\% = DPR = \frac{DP}{M} \times 100$$

Onde: CV= coeficiente de variação

DPR= desvio padrão relativo

M=Média dos resultados.

Um segundo ponto de análise da precisão de métodos analíticos segundo FORTI, M. 2011, é a avaliação da precisão intermediária, definida como precisão dos resultados obtidos em uma mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas variando as seguintes condições: Analistas, equipamentos e tempos. Pode ser expressa por meio da análise do coeficiente de variação.

Para obtenção destes dados de validação, deve se ter protocolo preestabelecido e aprovado, com toda descrição da metodologia e todos os parâmetros avaliados com seus respectivos critérios de aceitação, além do uso de materiais e instrumentos calibrados e certificados (USA FDA, 2015).

### **3. OBJETIVO GERAL**

A partir do Método de Valderrama para quantificação de nitrogênio total em água, elaborar um procedimento para quantificação de nitrogênio total em amostras de chuva e neblina consideradas, em geral, como de baixa concentração.

## 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar protocolo de análise de nitrogênio total em via úmida
- Validar metodologia analítica para determinação de nitrogênio total em via úmida

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. Reagentes e soluções

#### Preparo de solução de hidróxido de sódio 1M

Pesou-se em um béquer de 100mL 20,20 g de hidróxido de sódio (NaOH P.A. micropérolas BIOTEC, 99,0%). Adicionou-se água até a dissolução. Transferiu para balão volumétrico de 500 mL com o auxílio de um bastão de vidro e completou-se com água ultrapurificada.

#### Preparo do reagente oxidante.

Dissolveu-se 50 g de persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$  P.A. Synth 99,0%) e 30 g de ácido bórico ( $H_3BO_3$  P.A. Synth 99,8%) em 350 mL de hidróxido de sódio 1M. Transferiu-se para balão volumétrico de 1 L e completou-se com água ultrapurificada.

#### Preparo da solução padrão de nitrogênio de nitrato ( $N-NO_3^-$ )

Pesou-se 0,7220 g de  $KNO_3$ , previamente seco em estufa (Fanem CLL) a 110°C em balança analítica (Shimadzu AY720), com auxílio de vidro de relógio, em seguida transferiu-se o material para um béquer de 200 mL, Transferiu-se para balão de 1 L e completou-se com água ultrapurificada. A solução final contém 100.000  $\mu g/L$  de  $N-NO_3^-$ .

#### Preparo da Solução de tartarato de sódio e potássio-hidróxido de sódio

Dissolveu-se 400 g de hidróxido de sódio (NaOH P.A. micropérolas BIOTEC, 99,0%) em menos de 1 L de água ultrapurificada, aguardou-se o resfriamento e adicionou-se imediatamente 50 g de tartarato de sódio e potássio. Homogeneizou-se até completa dissolução e aferiu-se até 1 L com água ultrapurificada.

#### Preparo das amostras e da curva de calibração.

Amostras de chuva e neblina foram coletadas no Parque Estadual do Itacolomi e no Campus da Universidade Federal de Ouro Preto, por meio de coletores passivos de chuva e neblina, estocadas em freezer -4 °C e descongeladas em temperatura ambiente por cerca de 24 horas antes das análises. Transferiu-se 135 mL das amostras para frascos de cultura, adicionou-se 27 mL do reagente oxidante e autoclavou-se por 30 minutos a 120 °C 1.2 atm. Após resfriamento, fracionou-se em porções de 50 mL em erlenmeyers identificados, adicionou-se 2 mL de solução de salicilato de sódio e evaporou-se a 100 °C em estufa; após secura, adicionou-

se 1 mL de ácido sulfúrico concentrado ao resíduo dos erlenmeyers distribuindo por todo o fundo. Adicionou-se 50 mL de água ultrapurificada, agitou-se o frasco até a dissolução do resíduo. Logo em seguida adicionou-se 7 mL de solução de tartarato de sódio e potássio, transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL completando com água ultrapurificada. A absorvância das amostras foi obtida em 412 nm. As soluções padrão das curvas de calibração e demais solução-teste foram processadas da mesma forma que as amostras.

## **5.2. Varredura do comprimento de onda**

Para varredura do comprimento de onda, foi utilizada solução diluída com concentração de  $\text{N-NO}_3^-$  de 1200  $\mu\text{g/L}$  obtida a partir de solução estoque de nitrato de potássio na concentração de 100 mg/L. realizou-se varredura para determinação do comprimento de onda onde há maior absorção na faixa de comprimento de onda ( $\lambda$ ) visível. A varredura foi realizadas utilizando-se cubetas de quartzo, de 1 cm de diâmetro. O espectrofotômetro utilizado foi o Evolution 60, que fornece varredura automatizada do comprimento de onda.

## **5.3. Seletividade**

A seletividade do método foi determinada pelo efeito matriz. Foram preparadas soluções de nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ) a partir de solução estoque de 100 mg/L de  $\text{N-NO}_3^-$ , nas concentrações de 150, 1200 e 2400  $\mu\text{g/L}$  utilizando-se água ultrapurificada como solvente. Estas mesmas concentrações foram preparadas utilizando-se neblina como solvente. Pipetou-se 150, 1200 e 2400  $\mu\text{L}$  em balão de 100 mL e completou-se com amostra de neblina. Procedeu-se com a determinação de nitrogênio total.

## **5.4. Limite de detecção**

O limite de detecção foi estipulado através do desvio padrão da análise de 7 replicatas de brancos, pelo método da relação sinal ruído. Os valores foram obtidos em dias diferentes de experimento, totalizando um número mínimo de sete amostras em triplicata. (INMETRO, 2010).

## **5.5. Limite de quantificação**

O limite de quantificação foi estipulado através da curva de calibração, sendo este a menor concentração da faixa de trabalho (INMETRO 2010).

## **5.6. Linearidade, faixa de trabalho e sensibilidade**

Para o teste de linearidade e sensibilidade, foram testados valores entre 150 e 2400  $\mu\text{g/L}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ . A partir de uma solução estoque de 100 mg/L, preparou-se solução de trabalho (S2) de 1000  $\mu\text{g/L}$  diluindo-se 2,5 mL de S1 em balão de 250 mL, realizou-se diluições sucessivas

a fim de se obter os valores de concentrações da curva padrão, com exceção das soluções de 1200 e 2400, que foram preparadas diretamente a partir de S1, de acordo com a tabela 1.

**Tabela 1 - Diluições referentes á curva padrão de nitrato**

Concentrações $\mu\text{g/L}$	Diluição
150	15 mL da S2 para 100 mL de H <sub>2</sub> O
300	30 mL da S2 para 100 mL de H <sub>2</sub> O
600	60 mL da S2 para 100 mL de H <sub>2</sub> O
900	2,25 mL da S1 para 250 mL de H <sub>2</sub> O
1200	3 mL da S1 para 250 mL de H <sub>2</sub> O
2400	6 mL da S1 para 250 mL de H <sub>2</sub> O

## 5.7. Exatidão

Amostras de neblina fortificadas com nitrato foram utilizadas para o teste de exatidão. Foi utilizada como matriz, neblina contendo 2279,67  $\mu\text{g/L}$ , adicionadas de 150  $\mu\text{L}$ , 1200  $\mu\text{L}$  e 2400  $\mu\text{L}$  de nitrato de potássio. Em paralelo foi preparado soluções de nitrato de potássio a partir da solução estoque nas concentrações de 150, 1200 e 2400  $\mu\text{g/L}$ .

## 5.8. Precisão

A precisão do método foi avaliada utilizando-se dados de absorvância obtidos nas replicatas referentes aos pontos da curva padrão, levando-se em consideração dias diferentes de análise (Repetitividade).

# 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 6.1. Elaboração de protocolo de análise de nitrogênio total.

As amostras de neblina são de difícil coleta e por isso nem sempre fornecem quantidades suficientes necessárias aos testes. Por se tratar de amostras com baixas concentrações de nitrogênio total, faz-se necessário o uso de quantidades maiores de amostra para que o método espectrofotométrico seja capaz de quantificar. Não foi possível obter na literatura quantidades usadas na determinação de nitrogênio total, portanto foram propostas duas quantidades iniciais, 25 e 50 mL de amostra para o teste.

Para 25 mL (Tabela 2) o método mostrou-se pouco preciso, fornecendo valores discrepantes de absorvância, devido à grande quantidade de etapas de tratamento das amostras, que ocasionaram perdas, oxidação incompleta dos compostos de nitrogênio e principalmente a concentração baixa das amostras da ordem de ppb. Obtiveram-se respostas precisas com o uso

de 50 mL de amostra (Tabela 3). Como as leituras foram realizadas em triplicata usou-se um mínimo de 150 mL de amostra por teste, quantidade esta que nem sempre foi possível se obter sendo necessária diluição das amostras com água purificada. Procedeu-se diluição, quando necessário, utilizando pipetas e balões volumétricos, sendo fornecido um fator de diluição que foi multiplicado ao valor da concentração final das amostras.

**Tabela 2 - Precisão dos resultados tomando-se 25 mL de amostra**

Concentração $\mu\text{g/L}$	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Média	Desvio padrão	CV %
150	0,039	0,028	0,023	0,03000	0,00668	22,28
300	0,051	0,017	0,006	0,02467	0,01915	77,65
600	0,025	0,031	0,020	0,02533	0,00450	17,75
900	0,053	0,037	0,047	0,04567	0,00660	14,45
1200	0,082	0,210	0,060	0,11733	0,06614	56,37

Abs - Absorbância

**Tabela 3 - Precisão dos resultados tomando-se 50 mL de amostra**

Concentração $\mu\text{g/L}$	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Média	Desvio padrão	CV %
150	0,055	0,061	0,058	0,05800	0,00245	4,22
300	0,119	0,121	0,119	0,11967	0,00094	0,79
600	0,246	0,246	0,240	0,24400	0,00283	1,16
900	0,353	0,355	0,550	0,41933	0,09240	22,03
1200	0,498	0,455	0,462	0,47167	0,01884	3,99

Abs - Absorbância

A elaboração do procedimento operacional padrão referente a análise de nitrogênio total em amostras de neblina foi realizada utilizando-se metodologia usualmente aplicada na limnologia, descritas na literatura (VALDERRAMA, J. 1981 et all) levando-se em consideração os equipamentos e estrutura oferecidos pelo Laboratório de Ecologia Aquática da Universidade Federal de Ouro Preto. Realizaram-se adaptações no método descrito por MURPHY, J. e RILEY, J.1962, pois trata-se de um método de determinação simultânea de fósforo total e nitrogênio total, porém a determinação de fósforo total oferece melhor sensibilidade e facilidade na execução, portanto foi elaborado um protocolo a parte, além do fato da determinação de fósforo demandar quantidade de amostra muito menor que a determinação de nitrogênio total. Após correções nas quantidades de amostra utilizadas, o protocolo foi elaborado e posteriormente executado por usuários do laboratório, utilizando-se amostras de chuva e neblina. Os valores de concentração obtidos são demonstrados na tabela 4.

**Tabela 4 - Valores de concentração obtidos após implementação de protocolo**

Amostras	Concentração µg/L	Desvio padrão	CV%
Lagoa seca 06/10/17	2330,35	0,01080	2,5415
Lagoa seca 23/06/17	1694,18	0,00249	0,8064
Lagoa seca 21/07/17	1710,68	0,00450	1,4398
Chuva OP 27/04/17	707,83	0,00531	3,8037
Chuva OP 18/04/17	1119,50	0,03102	13,9712

### 6.3. Validação da metodologia

#### 6.3.1. Varredura do comprimento de onda ( $\lambda$ )

O comprimento de onda utilizado deve ser aquele em que a espécie química mais absorve a energia radiante, para evitar oscilações e erros nas leituras e melhorar a sensibilidade. De acordo com MURPHY, J. e RILEY, J.1962, o composto p-nitrosalicilato absorve em 420 nm. Experimentalmente obteve-se o pico máximo de absorbância em 412 nm, do composto majoritário formado na reação.

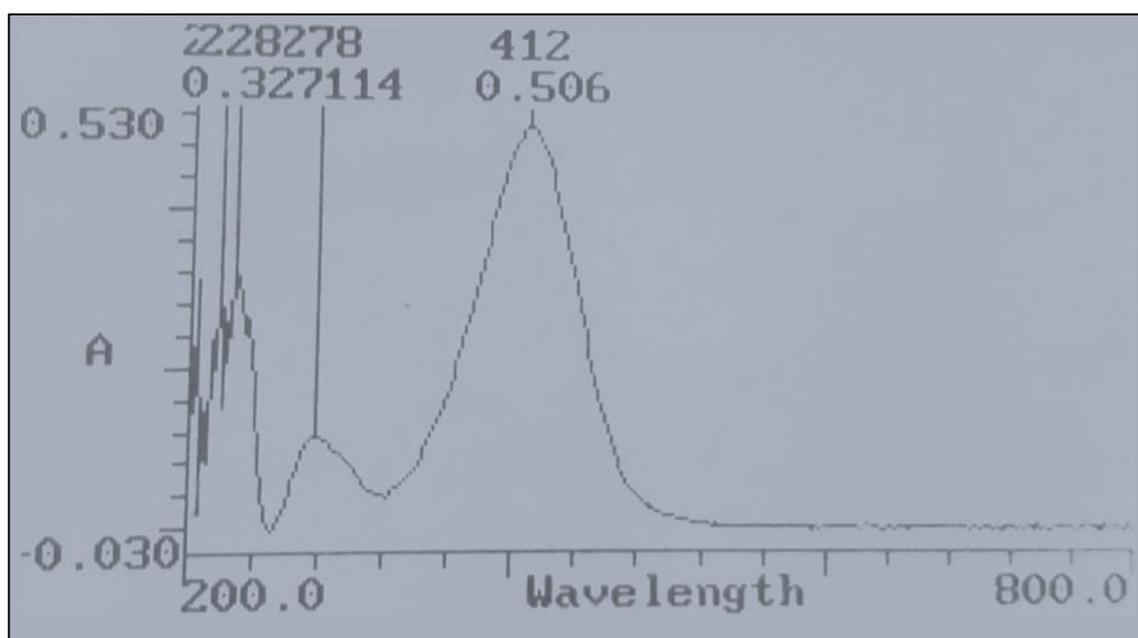


Figura 1 - Pico relativo ao comprimento de onda de maior absorção. Fonte: Próprio autor

#### 6.3.2. Limite de quantificação

O limite de quantificação foi estabelecido em 150 µg/L. De acordo com INMETRO, 2010, para quantificação de elementos traços, usa-se como limite de quantificação o ponto de menor concentração da curva analítica, porém este valor deve ser obtido experimentalmente por brancos fortificados com o analito. Para soluções enriquecidas com nitrato nas concentrações abaixo de 150 µg/L, os valores das absorbâncias não foram diferentes dos valores dos brancos.

### 6.3.3. Limite de detecção

Utilizou-se a relação sinal ruído dos brancos para determinação do LD, sendo o limite de detecção estabelecido pela fórmula  $LD = (0 + t_{(n-1, 1-\alpha)}) \cdot S$ , onde S representa o desvio padrão das 7 medidas dos brancos, mostrado no quadro 1 (INMETRO, 2010). O limite de detecção foi determinado para 95% de confiança para 7 replicatas. A absorbância foi zerada no espectrofotômetro utilizando-se água ultrapurificada.

Quadro 2 - Valores de absorbância dos brancos obtidos em dias diferentes de experimento

Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Desvio	Média
0,062	0,06	0,057	0,078	0,063	0,068	0,070	0,006823	0,065429

Usando-se o valor de  $t$  (*student*) para n-1 replicatas obteve-se o valor de 0,017 de absorbância, ou seja, o limite de detecção estipulado para o método, representou o valor de concentração correspondente a 2 µg/L, segundo a equação a seguir obtida nos estudos de linearidade.

$$y = 0,0004x + 0,0178$$

### 6.3.4. Faixa de trabalho, linearidade e curva de calibração

Foi estabelecido como faixa de trabalho as concentrações entre o limite de quantificação de 150 µg/L e o valor de 2400 µg/L, nesta faixa o método apresentou linearidade com coeficiente de determinação maior que 0,99. O CONAMA estabelece como nível máximo permitido para ecossistemas lênticos, 1270 µg/L de nitrogênio total, valor ao qual os resultados ficaram mais próximos, portanto foi adotado como ponto médio da faixa de trabalho. A linearidade do método foi obtida usando-se cálculo da regressão linear, por meio do cálculo dos mínimos quadrados. A curva de regressão linear mostrada na figura 2, foi obtida em triplicata, em três dias diferentes, totalizando nove replicatas por ponto, sendo os valores expressos por meio da média das concentrações.

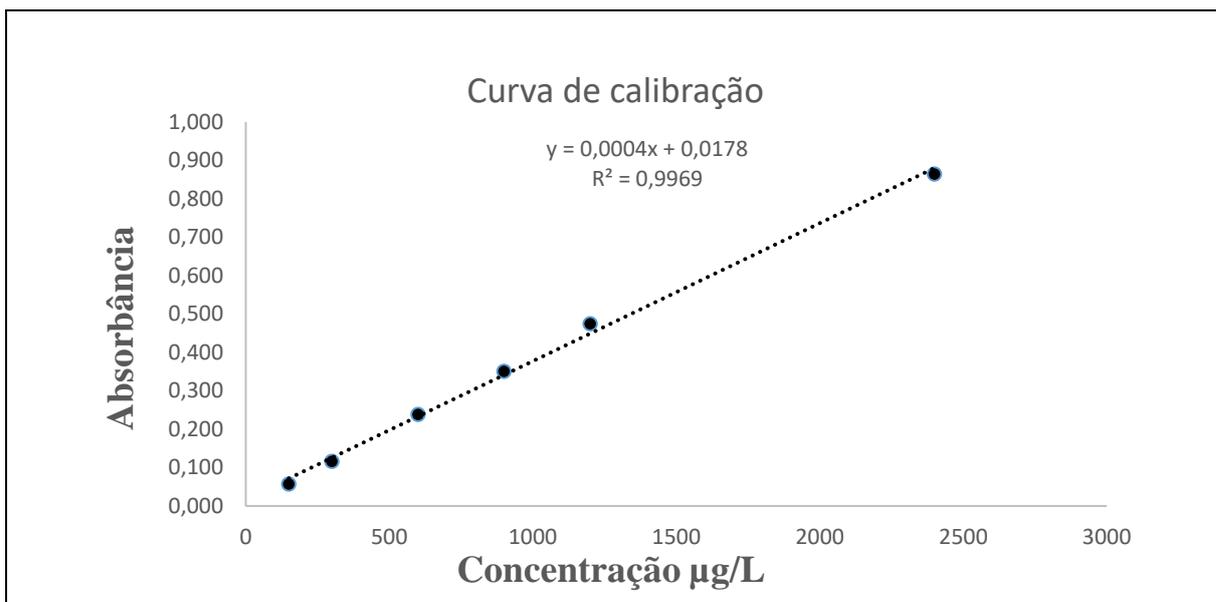


Figura 2 - Curva de calibração e coeficiente de determinação. Fonte: Próprio autor

### 6.3.5. Seletividade

De acordo com o guia de validação de métodos do INMETRO, a matriz da amostra é passível de apresentar interferentes que comprometem o desempenho da medição, podendo aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração (INMETRO, 2010).

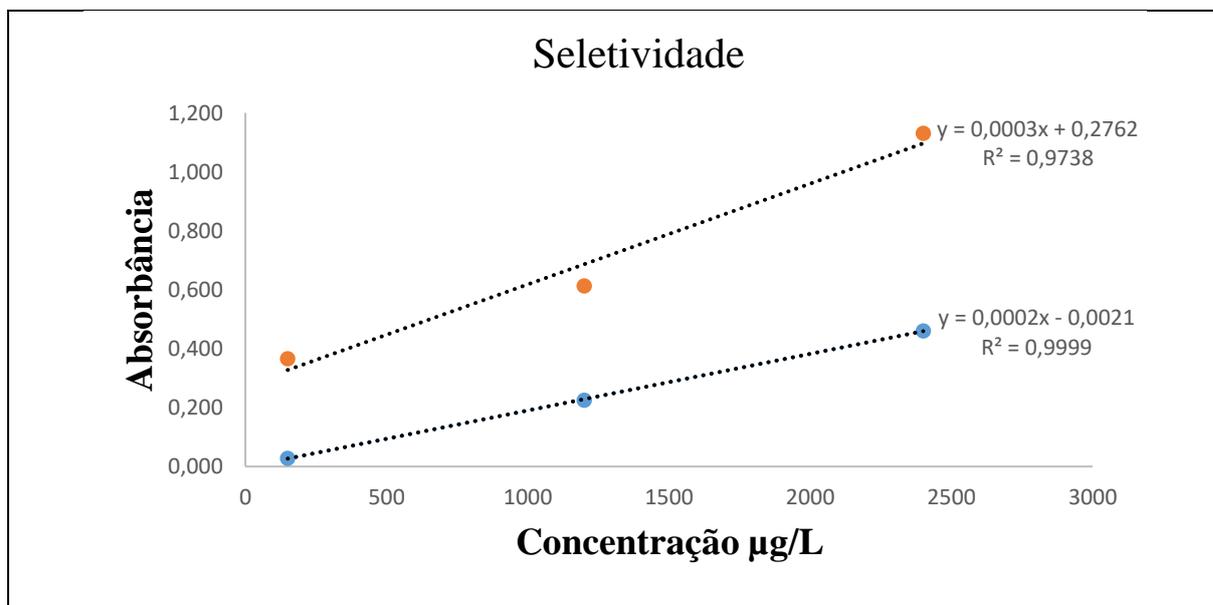


Figura 3 - Perfil de seletividade do método mostrando efeito da matriz em concentrações baixa, média e alta. Fonte: Próprio autor

**Tabela 5 - Valores de absorvância dos padrões e da matriz fortificada com concentrações conhecidas de nitrogênio**

Concentração	Absorvância média dos padrões	Absorvância média fortificada
150	0,028	0,366
1200	0,226	0,614
2400	0,461	1,131

De acordo com o gráfico mostrado na figura 3, concluiu-se que a matriz interferiu nas concentrações adicionadas, superestimando mais visivelmente na maior concentração adicionada (2400 µg/L), este efeito causou diferença na inclinação da reta de calibração. Para garantir a seletividade do método é necessário que a reta obtida pelos padrões seja paralela á reta construída na matriz, ou seja, devem apresentar o mesmo coeficiente angular (DE PAULA, F, 2003), portanto o método apresentou baixa seletividade em altas concentrações, devido á interferentes presentes na neblina que superestimam a concentração de nitrogênio total.

### 6.3.6. Sensibilidade

A sensibilidade do método foi obtida a partir do coeficiente angular da curva de calibração. Valores altos significam que um pequeno incremento na concentração do analito gera uma grande variação na absorvância e o valor baixo deste coeficiente significa que é preciso uma variação muito grande na concentração do analito para gerar uma resposta observável na prática. Na tabela 6 são apresentados os valores médios dos coeficientes angulares obtidos em diferentes dias, em triplicata e respectivo desvio padrão. O valor de sensibilidade apresentou-se baixo, sendo necessários grandes incrementos na concentração do analito para gerar variação perceptível na absorvância. Uma das limitações da sensibilidade do método é a concentração baixa do analito da ordem de microgramas por litro (ppb). Outro fator que acarretou a baixa sensibilidade do método foi própria limitação do espectrofotômetro, porque os dados de absorvância são mostrados com três casas decimais, e de acordo com o coeficiente angular, o incremento de 1 µg gerou uma diferença de 0,0004, ou seja, precisou-se de pelo menos uma variação de 2,5 µg para gerar uma resposta de absorvância de 0,001.

**Tabela 6 - Valores de sensibilidade obtidos a partir das curvas de calibração em dias diferentes.**

Experimento	Curva de regressão	Coeficiente de determinação ( $R^2$ )	Coeficiente angular
NT dia 1	$y=0,0004x + 0,0013$	0,9994	0,0004
NT dia 2	$y=0,0002x + 0,0022$	0,9990	0,0002
NT dia 3	$y=0,0004x + 0,0013$	0,9994	0,0004

NT – Nitrogênio total

### 6.3.7. Exatidão

A exatidão deve ser verificada a partir de, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta, com três réplicas em cada nível (ANVISA, 2016).

A vantagem de se testar exatidão por meio da recuperação é que não existe um MRC como amostra complexa de neblina e chuva, apenas nitrato isolado, portanto a recuperação é mais representativa que o teste com material de referência certificado (MRC). Segundo BRITO, N. 2003, para analitos na faixa de concentração de 0,001 - 0,00001%, são aceitáveis valores de recuperação na faixa de 80 a 110%. De acordo com a tabela 7 pôde-se inferir que a exatidão do método foi comprometida quando se trabalhou com valores nas extremidades da faixa de trabalho. Para a matriz enriquecida na concentração de 150 µg/L observou-se uma supressão da concentração adicionada para menos que 80% e para o enriquecimento de 2400 µg/L houve acréscimo no sinal maior que 110%. Porém para concentrações no meio da faixa de trabalho o método apresentou exatidão satisfatória.

**Tabela 7 - Exatidão obtida a partir da recuperação do analito em três diferentes níveis de concentração**

Concentração adicionada	Concentração da amostra	Concentração Obtida	Recuperação %
150	2279,67	1784,67	73,45
1200	2279,67	3021,33	86,83
2400	2279,67	5606,33	119,80

### 6.3.8. Precisão

A precisão do método foi avaliada pela repetitividade com intervalo de 7 dias, tempo mínimo necessário para execução das etapas do método, mantendo-se inalterados: Procedimento, analista, local, equipamentos e materiais.

**Tabela 8 - Representação da precisão do método através da repetitividade**

Concentração µg/L	Dia 1					
	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Média	Desvio	CV %
150	0,027	0,025	0,033	0,02783	0,00340	12,21
300	0,051	0,052	0,047	0,04950	0,00216	4,36
600	0,110	0,108	0,095	0,10383	0,00665	6,40
900	0,162	0,165	0,138	0,15450	0,01208	7,82
1200	0,190	0,231	0,181	0,20017	0,02176	10,87

Dia 2						
Concentração $\mu\text{g/L}$	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Média	Desvio	CV %
150	0,019	0,033	0,009	0,02033	0,00984	48,41
300	0,058	0,042	0,031	0,04367	0,01109	25,39
600	0,133	0,133	0,091	0,11900	0,01980	16,64
900	0,117	0,103	0,096	0,10533	0,00873	8,29
1200	0,189	0,232	0,201	0,20733	0,01812	8,74

Abs – Absorbância

Segundo BRITO, N. 2003, são aceitáveis coeficientes de variação da ordem de 16-20% para elementos traços (<100 mg/L). Observou-se na tabela 8 que o desvio padrão relativo das amostras diluídas de 150  $\mu\text{g/L}$  e 300  $\mu\text{g/L}$  tendeu para valores acima de 20%, portanto o método foi impreciso para amostras com baixas concentrações, sendo necessário expressar as concentrações finais destas amostras juntamente com seus coeficientes de variação, porém esta alta variação não limitou as análises, visto que as concentrações de nitrogênio total encontradas nas amostras de neblina e chuva coletadas em Ouro Branco e Ouro Preto encontraram-se em concentrações acima de 1200  $\mu\text{g/L}$ .

## 7. CONCLUSÃO

O método mostrou se linear, seletivo para concentrações baixas e médias, preciso para concentrações acima de 300  $\mu\text{g/L}$  e exato para concentrações médias. Futuros trabalhos serão realizados para averiguar o rendimento das reações de oxidação com persulfato e por fim será conduzido um estudo comparativo entre concentrações de nitrogênio total nas vias de deposição úmida da região do quadrilátero ferrífero.

## REFERÊNCIAS

ADMINISTRATION, F.D.; RESEARCH, C.D.E.; RESEARCH, C.B.E. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. Guidance for Industry. **Pharmaceutical Quality/CMC**. 2015.

ANEJA, V. P. et al. Atmospheric nitrogen compounds II: emissions, transport, transformation, deposition and assessment. **Atmospheric Environment**, v. 35, n. 11, p. 1903-1911, 2001. ISSN 1352-2310.

ASSOCIATION, A. P. H.; ASSOCIATION, A. W. W. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. American public health association, 2005.

BAÊTA, H. E.; KOZOVITS, A. **Contribuição da deposição úmida (chuva e neblina) nas relações hídricas e nutricionais de fisionomias de campos ferruginosos na Serra da Brígida, Ouro Preto, MG**. 2012. Dissertation, Universidade Federal de Ouro Preto

BERNATSKY, S. et al. Fine particulate air pollution, nitrogen dioxide, and systemic autoimmune rheumatic disease in Calgary, Alberta. **Environmental research**, v. 140, p. 474-478, 2015. ISSN 0013-9351.

BRASIL ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 166, 24/07/2017. Guia para validação de métodos analíticos - Julho, 2017.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, 2003. ISSN 0103-7277.

CARNEIRO, Marco Aurélio Carbone et al. Carbono orgânico, nitrogênio total, biomassa e atividade microbiana do solo em duas cronossequências de reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista brasileira de ciência do solo**, v. 32, n. 2, p. 621-632, 2008.

COELHO, T. Mineração e dependência no quadrilátero ferrífero. **Revista Intratextos**, v. 3, n. 1, p. 128-146, 2012. ISSN 2176-6789.

DE ZABARTE FERNÁNDEZ, José Miguel Martínez; ÍÑIGUEZ, Juan Pablo García; CAJAL, Mercedes Domínguez. Metahemoglobinemia in infants over one year. **Medicina Clínica (English Edition)**, v. 151, n. 7, p. 278-280, 2018.

FORTI, M. C.; ALCAIDE, R. L. M. Validação de Métodos Analíticos do Laboratório de Aerosóis, Soluções Aquosas e Tecnologias—LAQUATEC. **São José dos Campos: INPE**, v. 1, p. 52, 2011.

FOWLER, D. et al. Atmospheric composition change: ecosystems–atmosphere interactions. **Atmospheric Environment**, v. 43, n. 33, p. 5193-5267, 2009. ISSN 1352-2310.

GALLO, Luiz Antônio. Metabolismo do nitrogênio: ciclo do nitrogênio. Universidade de São Paulo. 2013. Disponível em: <<http://docentes.esalq.usp.br/luagallo/nitrogenio.htm>> Acesso em 13/11/18.

HE, Zhenyu et al. A novel energy-efficient process for production of nitrogen from air via a reaction-driven membrane reactor. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 56, n. 49, p. 14604-14609, 2017.

HOU, P. et al. Nitrogen and Phosphorous in Atmospheric Deposition and Roof Runoff. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 21, n. 6, 2012. ISSN 1230-1485.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, Q. E. T. **Orientação sobre validação de métodos analíticos: DOQ-CGCRE-008** 2010.

MÁDLÍKOVÁ, M. et al. Nitrogen assay in winter wheat by short-time instrumental photon activation analysis and its comparison with the Kjeldahl method. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, p. 1-8, 2018. ISSN 0236-5731.

MASINI, Jorge Cesar. Demonstrando os fundamentos, potencialidades e limitações da análise por injeção seqüencial. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 704-708, 2008.

MAZON, Elaine Marra de Azevedo et al. Estudo comparativo de métodos para determinação de nitrato em águas para consumo humano. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 64, n. 1, p. 110-116, 2005.

METCALF; EDDY, B.; TCHOBANOGLIOUS, G. **Wastewater Engineering: Treatment Disposal Reuse**. MCGRAN HILL. p61. 2003.

MOLISANI, M. M. et al. Emissões naturais e antrópicas de nitrogênio, fósforo e metais para a bacia do Rio Macaé (Macaé, RJ, Brasil) sob influência das atividades de exploração de petróleo e gás na Bacia de Campos. **Quim. Nova**, v. 36, n. 1, p. 27-33, 2013.

MOSIER, A.; SYERS, J. K.; FRENEY, J. R. **Agriculture and the nitrogen cycle: assessing the impacts of fertilizer use on food production and the environment**. Island Press, 2013. ISBN 1597267430.

MÜLLER, J. ¿ Dumas o Kjeldahl para el análisis de referencia?. FOSS, **Analytical beyond measure**. 2017. Disponível em < [https://www.fossanalytics.com/-/media/files/documents/papers/laboratories-segment/the-dumas-method-for-nitrogenprotein-analysis\\_es.pdf](https://www.fossanalytics.com/-/media/files/documents/papers/laboratories-segment/the-dumas-method-for-nitrogenprotein-analysis_es.pdf) >

MURPHY, JAMES; RILEY, J\_ P\_. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica chimica acta**, v. 27, p. 31-36, 1962.

NASCIMENTO DO CARMO, C.; DE SOUZA HACON, S. Estudos de séries temporais de poluição atmosférica por queimadas e saúde humana. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 11, 2013. ISSN 1413-8123.

NEVES, L. M. M. Controlo da Qualidade: Validação de Métodos em Análise Química. 2017.

OLADOSU, N. O. et al. Wet nitrogen and phosphorus deposition in the eutrophication of the Lagos Lagoon, Nigeria. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 9, p. 8645-8657, 2017. ISSN 0944-1344.

RELACRE, G. 13–Validação de métodos internos de ensaio em análise química. **Lisboa: Relacre**, 2000.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, 2004. ISSN 0100-4042.

RODRIGUES, Renato de Aragão Ribeiro; MELLO, William Zamboni de; SOUZA, Patricia Alexandre de. Aporte atmosférico de amônio, nitrato e sulfato em área de floresta ombrófila densa montana na Serra dos Órgãos, RJ. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 8, p. 1842-1848, 2007.

SCHOLL, M.; EUGSTER, W.; BURKARD, R. Understanding the role of fog in forest hydrology: stable isotopes as tools for determining input and partitioning of cloud water in montane forests. **Hydrological Processes**, v. 25, n. 3, p. 353-366, 2011. ISSN 1099-1085.

SILVA, F. M. F. D. Quantificação de éter-aminas em rejeito da flotação de minério de ferro em função da granulometria. 2009.

SILVA, LÍLIAN IRENE DIAS DA et al. Determinação das formas de nitrogênio e nitrogênio total em rochas-reservatório de petróleo por destilação com arraste de vapor e método do indofenol. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 46-51, Feb. 2006.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION et al. Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics. **Guid Ind**, p. 1-15, 2015.

VALDERRAMA, J. C. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. **Marine chemistry**, v. 10, n. 2, p. 109-122, 1981. ISSN 0304-4203

ZIMMERMANN, L.; ZIMMERMANN, F. Fog deposition to Norway Spruce stands at high-elevation sites in the Eastern Erzgebirge (Germany). **Journal of Hydrology**, v. 256, n. 3-4, p. 166-175, 2002. ISSN 0022-1694.

## 9. ANEXOS

### Distribuição *t student*

t-distribution										
Confidence Level										
	60%	70%	80%	85%	90%	95%	98%	99%	99.8%	99.9%
Level of Significance										
2 Tailed	0.40	0.30	0.20	0.15	0.10	0.05	0.02	0.01	0.002	0.001
1 Tailed	0.20	0.15	0.10	0.075	0.05	0.025	0.01	0.005	0.001	0.0005
df										
1	1.376	1.963	3.133	4.195	6.320	12.69	31.81	63.67	—	—
2	1.060	1.385	1.883	2.278	2.912	4.271	6.816	9.520	19.65	26.30
3	0.978	1.250	1.637	1.924	2.352	3.179	4.525	5.797	9.937	12.39
4	0.941	1.190	1.533	1.778	2.132	2.776	3.744	4.596	7.115	8.499
5	0.919	1.156	1.476	1.699	2.015	2.570	3.365	4.030	5.876	6.835
6	0.906	1.134	1.440	1.650	1.943	2.447	3.143	3.707	5.201	5.946
7	0.896	1.119	1.415	1.617	1.895	2.365	2.999	3.500	4.783	5.403
8	0.889	1.108	1.397	1.592	1.860	2.306	2.897	3.356	4.500	5.039
9	0.883	1.100	1.383	1.574	1.833	2.262	2.822	3.250	4.297	4.780
10	0.879	1.093	1.372	1.559	1.813	2.228	2.764	3.170	4.144	4.586
11	0.875	1.088	1.363	1.548	1.796	2.201	2.719	3.106	4.025	4.437
12	0.873	1.083	1.356	1.538	1.782	2.179	2.682	3.055	3.930	4.318
13	0.870	1.079	1.350	1.530	1.771	2.160	2.651	3.013	3.852	4.221
14	0.868	1.076	1.345	1.523	1.761	2.145	2.625	2.977	3.788	4.141
15	0.866	1.074	1.341	1.517	1.753	2.131	2.603	2.947	3.733	4.073
16	0.865	1.071	1.337	1.512	1.746	2.120	2.584	2.921	3.687	4.015
17	0.863	1.069	1.333	1.508	1.740	2.110	2.567	2.899	3.646	3.965
18	0.862	1.067	1.330	1.504	1.734	2.101	2.553	2.879	3.611	3.922
19	0.861	1.066	1.328	1.500	1.729	2.093	2.540	2.861	3.580	3.884
20	0.860	1.064	1.325	1.497	1.725	2.086	2.529	2.846	3.552	3.850
21	0.859	1.063	1.323	1.494	1.721	2.080	2.518	2.832	3.528	3.820
22	0.858	1.061	1.321	1.492	1.717	2.074	2.509	2.819	3.505	3.792
23	0.857	1.060	1.319	1.489	1.714	2.069	2.500	2.808	3.485	3.768
24	0.857	1.059	1.318	1.487	1.711	2.064	2.493	2.797	3.467	3.746
25	0.856	1.058	1.316	1.485	1.708	2.060	2.486	2.788	3.451	3.725
26	0.856	1.058	1.315	1.483	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435	3.707
27	0.855	1.057	1.314	1.482	1.703	2.052	2.473	2.771	3.421	3.690
28	0.855	1.056	1.313	1.480	1.701	2.048	2.468	2.764	3.409	3.674
29	0.854	1.055	1.311	1.479	1.699	2.045	2.463	2.757	3.397	3.660
30	0.854	1.055	1.310	1.477	1.697	2.042	2.458	2.750	3.386	3.646
40	0.851	1.050	1.303	1.468	1.684	2.021	2.424	2.705	3.307	3.551
50	0.849	1.047	1.299	1.462	1.676	2.009	2.404	2.678	3.262	3.496
60	0.848	1.045	1.296	1.458	1.671	2.000	2.391	2.661	3.232	3.460
70	0.847	1.044	1.294	1.456	1.667	1.994	2.381	2.648	3.211	3.435
80	0.846	1.043	1.292	1.453	1.664	1.990	2.374	2.639	3.196	3.417
90	0.846	1.042	1.291	1.452	1.662	1.987	2.369	2.632	3.184	3.402
100	0.845	1.042	1.290	1.451	1.660	1.984	2.365	2.626	3.174	3.391
∞	0.842	1.036	1.282	1.440	1.645	1.960	2.327	2.576	3.091	3.291



ESCOLA DE FARMÁCIA



## MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

Escola de Farmácia

---

### CERTIFICADO DE CORREÇÃO

Certifico que a discente **George Alberto Dias**, número de matrícula 12.1.2172, defendeu a Monografia intitulada **“Validação de método analítico para determinação de nitrogênio total em amostras de chuva e neblina.”**, em 29 de Novembro de 2018 e **REALIZOU TODAS AS CORREÇÕES REQUERIDAS PELA COMISSÃO AVALIADORA.**

Ouro Preto, 29 / 11 / 2018

---

Profa. Dra. Eneida Maria Eskinazi Sant'Anna  
Orientadora  
(DEBIO-ICEB-UFOP)