

Verificação dos métodos espectrofotométricos com ácido fenoldissulfônico e na região do UV, para determinação de nitrato em águas para diálise

Maria do Rosário Vigeta LOPES¹, Cecília Cristina Marques dos SANTOS¹

¹Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Regional de São José do Rio Preto, Seção de Bromatologia e Química

No Brasil, após o acidente em Caruaru (PE) ocorrido em 1996, onde 53 pacientes em terapia renal foram a óbito¹, o Ministério da Saúde elaborou um Regulamento Técnico por meio da Portaria GM/MS nº 2042 de 11 de outubro de 1996, estabelecendo normas de funcionamento a serem cumpridas pelas Unidades de Diálise, que sofreu substituições até a atual Resolução - RDC nº 154/MS de 15 de junho de 2004, que estabelece limite máximo de 2 mg/L para nitrato.

A água de abastecimento dos serviços de diálise, independente de sua origem ou tratamento prévio, deve apresentar as características físicas e organolépticas da água potável, além de respeitar os valores máximos permitidos dos vários componentes, dentre eles o nitrato (máximo de 10 mg/L em Nitrogênio).

Devido a sua alta hidrossolubilidade, elevados teores de nitrato podem estar presentes na água, por este motivo, normas internacionais da OMS recomendam um teor limite, em águas de abastecimento público, de 45mg de nitrato por litro. Os efeitos tóxicos mais relevantes da ingestão de nitrato são a metahemoglobinemia em neonatos e em indivíduos com deficiência congênita de metahemoglobina-reductase, assim como a formação *in vivo* de N-nitrosaminas, que são compostos carcinogênicos e mutagênicos².

Dentre os métodos propostos para a dosagem de íons nitrato está o que utiliza o ácido fenoldissulfônico (espectrofotométrico), técnica descrita em “Métodos físico-químicos para análise de alimentos” Esta técnica apresenta certa desvantagem por permitir análise de um número relativamente pequeno de amostras^{3,4}.

Os objetivos deste estudo foram: avaliar, segundo legislação vigente, o parâmetro físico-químico nitrato, nas águas destinadas à diálise nas unidades do município de São José do Rio Preto – SP; avaliar a variável (nitrato) que afeta a qualidade da água para diálise nos pontos vulneráveis do dialisador (antes e após o tratamento); estudar, comparativamente, os métodos espectrofotométricos (ácido fenoldissulfônico e na região de UV), descritos em “Métodos físico-químicos para análise de alimentos”³, e avaliar os resultados sob a óptica sanitária.

Estudos comparativos e de verificação de parâmetros de validação são necessários para garantir que a escolha do método seja o de maior confiabilidade⁵. Concluímos que os objetivos, propostos foram cumpridos pois foram estabelecidos os padrões de comparação entre os dois procedimentos e avaliação das condições sanitárias da água destinada ao processo de diálise⁶.

Foram analisadas 170 amostras de água provenientes de quatro unidades de hemodiálise do município de São José do Rio Preto – SP, monitoradas pelo programa de vigilância de 2002 a 2004. As coletas foram efetuadas pela equipe municipal de vigilância sanitária (VISA) em dois diferentes pontos: antes do tratamento (água de abastecimento público) e após o tratamento (deionização ou osmose reversa).

Considerando a existência de diversos métodos para a dosagem do íon nitrato e a necessidade de se assegurar confiabilidade aos resultados foi realizado estudo de verificação dos métodos espectrofotométricos com leitura direta na região de ultravioleta (UV) a 205nm (método 1) e com desenvolvimento de cor, a 410nm, que se baseia na nitração do fenol (método 2).

Foi eleito, como referência, o método espectrofotométrico de leitura direta na região do UV, por mostrar-se adequado diante de parâmetros de validação estatisticamente avaliados (Figura 1), além de ser um método de simples execução, economicamente viável e por fornecer resultados rápidos. Os parâmetros estatísticos dos métodos estudados estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros estatísticos do método de referência (UV a 205nm)

Parâmetros	Métodos	
	1	2
Desvio padrão (mg. NO ₃ . L ⁻¹)	0,02	0,03
Coeficiente de variação (%)	3,11	0,91
Limite de detecção (mg. NO ₃ . L ⁻¹)	0,06	0,03

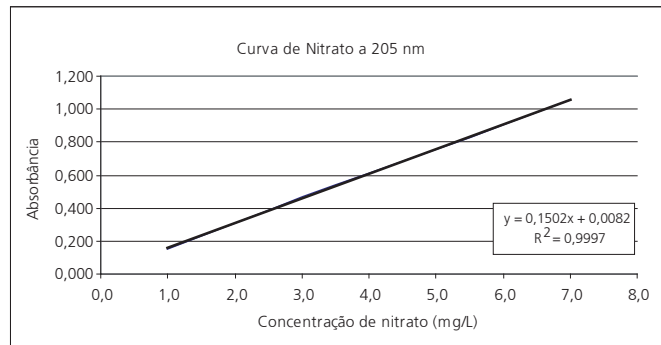


Figura 1. Curva de calibração para o método referência (método 1).

Análise espectrofotométrica com ácido fenoldissulfônico (Método 2)^{3,4}

Curva padrão

Concentração de nitrato: 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 7,0. mg de nitrato/L.

A curva padrão foi feita em duplicata. As absorvâncias obtidas em função das concentrações empregadas foram analisadas graficamente, empregando o programa Excel for Windows (Figura 2).

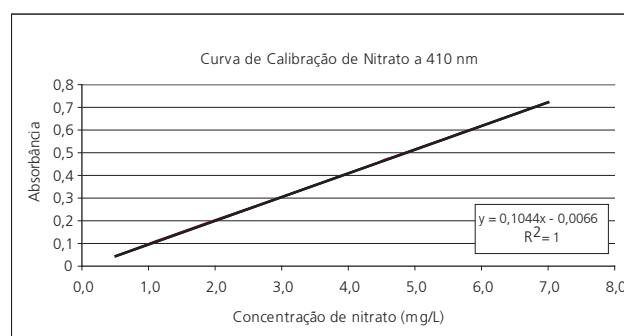


Figura 2. Curva de calibração para o método 2.

A Vigilância Sanitária Estadual identifica, em suas respectivas unidades os laboratórios que prestam serviços analíticos para água para diálise. Estes laboratórios devem manter um sistema de qualidade dos métodos empregados na determinação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos determinados pela RDC nº 154/MS de 15 de junho de 2004, que estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos serviços de diálise e as normas para cadastramento destes junto ao Sistema Único de Saúde⁵.

Tais laboratórios devem possuir um Sistema da Qualidade com procedimentos operacionais descritos e registrados para os referidos ensaios relacionados na RDC nº 154/MS de 15 de junho de 2004, participar de comparações interlaboratoriais no país ou no exterior, realizar auditorias internas no âmbito do seu sistema de qualidade e realizar análise crítica no sistema de qualidade⁵.

Segundo as orientações do Inmetro⁵ para validação de métodos de ensaios químicos foram avaliados os parâmetros:

Linearidade: foi calculada a partir da equação da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e observando-se o coeficiente de correlação linear (R^2). Segundo as instruções do Inmetro⁵, um valor maior do que 0,90 é, usualmente, requerido. Nas Figuras 1 e 2 apresentamos os resultados dos ensaios das curvas de calibração para os métodos 1 e 2, com os respectivos R^2 , para faixa de concentração de 1 a 5 e 0,2 a 3,0 mg/L de nitrato para os métodos 1 e 2, respectivamente. *Limite de quantificação:* para o método 1 foi estudado ao nível de 0,5mg/L de nitrato e para o método 2 0,01 mg/L e ambos apresentaram coeficiente de variação de 0,5%. *Recuperação:* a porcentagem de recuperação do íon nitrato foi estimada pela análise de amostras com

adição de quantidades conhecidas de padrão. Para tanto foram utilizadas 7 replicatas em três níveis de concentração: 0,5; 2,0 e 4,0 mg/L de nitrato (Tabela 2).

Precisão e exatidão: para determinar os parâmetros de precisão e exatidão do método 1 e 2, foram utilizadas concentrações de 0,5; 2,0, e 4,0 mg/L de nitrato por representarem a faixa de maior linearidade e os pontos inferior, mediano e superior da curva de calibração, respectivamente. A precisão foi determinada por meio da repetitividade, expressa como coeficiente de variação (CV) e a exatidão foi calculada em função do erro relativo, empregando-se solução padrão de concentrações conhecidas, testada em três níveis com seis repetições para cada nível (Tabela 3)

Dentre os métodos comparados e também, de acordo com os dados publicados por Mazon EMA,

Oliveira ACG, Brígido BM, Freitas VPS (2005), o método 1 mostrou-se mais adequado, uma vez que o método 2 apresentou grande erro relativo que é uma forma de avaliar a exatidão do método.

Desta forma, é imprescindível que os laboratórios que realizam atividades voltadas à saúde pública, tenham à sua disposição espectrofotômetro UV, pois um método alternativo pode não fornecer um resultado real e assim comprometer as ações de vigilância sanitária pertinentes.

O estudo do ponto de vista do controle sanitário das 170 amostras de água para diálise revelou alta porcentagem de condenação (cerca de 12%) para teores de nitrato, considerando o risco que o procedimento de diálise oferece quanto à presença de sais na água para este fim⁶.

Tabela 2. Resultados relativos à porcentagem de recuperação (métodos 1 e 2)

Concentração (mg/L NO ₃)	Recuperação (%) Métodos	
	1	2
0,5	101,17	96,36
2,0	96,36	99,31
4,0	95,21	98,43

*Média de 7 replicatas.

Tabela 3. Resultados relativos aos parâmetros de validação para precisão e exatidão (métodos 1 e 2)

Concentração (mg/L NO ₃)	CV (%) Métodos		Erro relativo (%) Métodos	
	1	2	1	2
0,5	2,44	0,36	0,012	4,90
2,0	5,17	0,10	0,036	0,69
4,0	1,7	2,28	0,048	1,57

CV= coeficiente de variação

*Média de 7 replicatas.

REFERÊNCIAS

1. Coelho SN. A Água de Caruaru. *Rev Virt Med.* 1998;I;1(3)
2. Fernícola NGG, Azevedo FA. Metemoglobinemia e nitrato nas águas. *Rev Saúde Publ.* 1981; 15:242-8.
3. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. IV edição. Brasília: Ministério da Saúde, ANVISA, 2005.
4. Mazon EMA, Oliveira ACG, Brígido BM, Freitas VPS. Estudo comparativo de métodos para determinação de nitrato em águas para consumo humano. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2005; 64 (1):110-6
5. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial [INMETRO]. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos; 2002.
6. Silva AMM, Martins CTB, Ferraboli R, Jorgetti V, Romão Júnior JE. Revisão/Atualização em Diálise: Água para hemodiálise. *J Bras Nefrol.* 1996; 18(2):180-8.