

**1 OBJETIVO**

Descrever o procedimento de análise de Nitrogênio Amoniacial, pelo método do fenato, utilizado pelo Serviço de Análises Químicas (SERVAQ), seu controle de qualidade e registro dos resultados.

**2 CAMPO DE APLICAÇÃO E VIGÊNCIA**

Este método se aplica a amostras de água natural, água tratada e água residual do setor de SERVAQ e passa a vigorar a partir da data de aprovação.

**3 TERMOS E DEFINIÇÕES**

TERMO / SIGLA		DEFINIÇÃO
3.1	Branco do Método	Água purificada grau 2 ou superior, analisada no lugar da amostra. Usada para verificar a contaminação com o analito de interesse nos reagentes, na água purificada e no processo de análise e sua contribuição para o erro do resultado.
3.2	MRC	Material de Referência Certificado, é um material suficientemente homogêneo e estável que foi estabelecido como sendo adequado para seu uso pretendido. As propriedades especificadas foram caracterizadas por um procedimento metrologicamente válido. Vem acompanhado de um certificado que fornece o valor das propriedades, a incerteza associada e uma declaração de rastreabilidade metrológica.
3.3	Padrão de Verificação Inicial	Solução Padrão contendo os analitos de interesse em uma concentração igual ao ponto médio da curva de calibração. Afim de fazer uma verificação inicial diária da exatidão da curva. O Padrão de Verificação deve ser diferente do utilizado para o preparo da curva de calibração.
3.4	SERVAQ	Serviço de Análises Químicas.
3.5	RBC	Rede Brasileira de Calibração.

**4 REFERÊNCIAS**

*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 24<sup>a</sup> ed., EUA. 2022.*

INMETRO – Avaliação de Dados da Medição: Guia para Expressão da Incerteza de Medição – GUM 2008. 1<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro, 2012;

ABNT NBR 5891: Regras de arredondamento na numeração decimal. Rio de Janeiro, 2014;

NBR 9898 – Preservação e Técnicas de Amostragem de Efluentes Líquidos e Corpos Receptores. Rio de Janeiro: ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), 1987;

DOQ-CGCRC-022, Orientações para aplicação dos requisitos técnicos da ABNT NBR ISO/IEC 17025 na acreditação de laboratórios de calibração para o grupo de serviço de físico-química. Rev. 03 – JUL / 2019;

DOQ-CGCRC-08 - Orientação sobre validação de métodos analíticos. Rev. 09 – JUN / 2020;

POP-INEA-GERLAB-204 – Garantia da Qualidade dos Resultados;

POP-INEA-GERLAB-205 – Validação de Métodos de Ensaios;

DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO AMONIACAL  
(MÉTODO DO FENATO)

POP-INEA-GERLAB-209 – Estimativa da Incerteza da Medição;

POP-INEA-GERLAB-601 – Medidas Gerais de Segurança e Prevenção de Acidentes;

POP-INEA-GERLAB-602 – Preparo, Identificação e Controle de Soluções e Reagentes;

POP-INEA-GERLAB-604 – Limpeza e Descontaminação de Vidraria e Materiais Diversos de Laboratórios;

POP-INEA-GERLAB-635 – Incerteza de Medição Labwin UNC;

POP-INEA-GERLAB-218 Controle de Qualidade das Frascarias;

POP-INEA-GERLAB-800 – Água reagente.

## 5 RESPONSABILIDADES GERAIS

FUNÇÃO	RESPONSABILIDADE
SERVAQ	A análise crítica deste documento é de responsabilidade do SERVAQ. A execução dos procedimentos descritos é de responsabilidade dos técnicos e analistas do SERVAQ.

## 6 PROCEDIMENTOS

### 6.1 Aspectos de Segurança

6.1.1 Acompanhar rigorosamente as medidas estabelecidas no POP-INEA-GERLAB-601– Medidas Gerais de Segurança e Prevenção de Acidentes.

6.1.2 Na análise de amostras de águas residuais, despejos industriais ou águas contaminadas, somente manipular as mesmas utilizando luvas.

6.1.3 Caso as amostras apresentem odor forte ou contaminação por produtos voláteis usar máscaras durante o ensaio e/ou manipular as mesmas em capela.

**Cuidado:** Fenol é uma substância inflamável, corrosiva, extremamente tóxica. Toda manipulação deve ocorrer dentro de capela química e utilizando luvas de látex natural ou borracha nitrílica.

### 6.2 Equipamentos e materiais

6.1.1 Sistema para destilação e absorção da amônia.

6.1.2 Espectrofotômetro capaz de operar em comprimento de onda de 640 nm.

6.1.3 Cubetas em vidro, quartzo ou poliestireno, de caminho ótico de 1,0 cm (10 nm).

6.1.4 Balões volumétricos de 100 mL.

6.1.5 Pipetas volumétricas de 1 mL, 5 mL e 10 mL.

6.1.6 Pipetas graduadas de 5 mL e 10 mL.

6.1.7 Provetas de 10, 25 e 50 mL.

6.1.8 Tubos de ensaio com tampa de rosca de capacidade aproximada de 30 mL (150mmX20mm).

Código: ME-INEA-GERLAB-630	Data de aprovação: 11/12/2024	Revisão: 02	Paginação: 2 de 9
-------------------------------	----------------------------------	----------------	----------------------

DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO AMONIACAL  
(MÉTODO DO FENATO)

## 6.3 Reagentes, soluções e padrões

6.3.1 Preparar os reagentes e soluções conforme as instruções do POP-INEA-GERLAB-602–Preparo, Identificação e Controle de Soluções e Reagentes.

6.3.2 Padrão Nitrogênio Amoniacal em concentração de 1.000 mg/L.

6.3.3 Fenol alcoólico 11,1% v/v.

6.3.4 Hipoclorito de sódio 5-6% P.A.

6.3.5 Nitroprussiato de sódio 0,5% p/v.

6.3.6 Citrato alcalino (citrato de sódio + hidróxido de sódio).

6.3.7 Tampão Borato.

6.3.8 Hidróxido de sódio 0,1 mol/L.

6.3.9 Ácido sulfúrico. 0,02 mol/L (0,04N).

6.3.10 Solução oxidante (citrato alcalino + hipoclorito de sódio).

6.3.11 Água purificada no mínimo grau 2 (destilada e deionizada) recentemente preparada.

**Nota:** Utilizar padrões diferentes para a curva de calibração e leitura de padrão de verificação. Ambos devem ser adquiridos como solução comercial do Material de Referência Certificado (MRC - Padrão), produzido e certificado de acordo com as normas ABNT NBR ISO 17034 e ABNT NBR ISO/IEC 17025.

## 6.4 Metodologia do ensaio

## 6.4.1 Princípio do Método

O indofenol é uma substância de cor azul intensa, formada pela reação da amônia, presente nas amostras, com fenol e hipoclorito, catalisada pela presença de nitroprussiato. A intensidade da coloração azul que se forma é proporcional à concentração de nitrogênio amoniacal presente na amostra, que pode ser determinada em um espectrofotômetro por leitura em comprimento de onda de 640nm. O método utilizado é o *N-NH<sub>3</sub> 4500 F. Phenate Method* do livro referência *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. A. D. Eaton, L.S. Clesceri, E. W. Rice. Eds. 24<sup>a</sup> ed., EUA. 2022.

## 6.4.2 Interferências

6.4.2.1 Magnésio e cálcio podem precipitar no pH do ensaio e são eliminados por complexação com citrato.

6.4.2.2 A turbidez nas amostras pode causar interferência, podendo ser eliminada pela filtração prévia da amostra.

6.4.2.3 Sulfeto de hidrogênio também interfere na determinação e deve ser eliminado por acidificação da amostra com ácido clorídrico diluído, até pH 3. Seguida de vigorosa aeração da amostra até que não seja mais perceptível nenhum odor de sulfeto de hidrogênio.

## 6.4.3 Preservação de Amostras / Condicionantes para análise

Código: ME-INEA-GERLAB-630	Data de aprovação: 11/12/2024	Revisão: 02	Paginação: 3 de 9
-------------------------------	----------------------------------	----------------	----------------------

**DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO AMONIACAL  
(MÉTODO DO FENATO)**

6.4.3.1 A determinação do teor de nitrogênio amoniacial ( $N-NH_3$ ) deve ser efetuada o mais rápido possível após a entrada das amostras no SERVAQ. Caso, a determinação não possa ser realizada imediatamente, as amostras devem ser mantidas refrigeradas a 4°C por um prazo de até 24 horas. Para preservação das amostras por até 28 dias, é necessário mantê-las congeladas em temperatura aproximada de -20° C ou acidificá-las até pH < 2 e conservá-las em temperatura de 4° C.

6.4.3.2 As amostras devem ser coletadas e mantidas em frascos de vidro (borosilicato) ou de plástico (polietileno ou equivalente), bem fechados e sem adição de preservantes. Os frascos devem seguir os controles de qualidades estipulados no POP-INEA-GERLAB-218 - Controle de Qualidade das Frascarias.

6.4.3.3 Em amostras de efluentes antes da determinação do nitrogênio amoniacial é necessária uma etapa prévia de destilação da amostra conforme o item 5.7, para eliminação dos interferentes.

6.4.3.4 Na determinação de nitrogênio amoniacial ( $N-NH_3$ ) em água tratada e águas naturais, as concentrações normalmente encontradas dos interferentes não causam problema. Neste caso, pode-se efetuar a determinação diretamente na amostra sem necessidade de tratamento prévio, apenas removendo alguma turbidez presente por filtração.

6.4.3.5 As vidrarias utilizadas na determinação devem seguir o procedimento de limpeza e descontaminação descrito no POP-INEA-GERLAB-604 – Limpeza e Descontaminação de Vidraria e Materiais Diversos de Laboratórios. Sendo assim, antes de ser utilizada, a vidraria empregada na determinação, recomenda-se colocar de molho em solução ácida (ácido clorídrico 10%).

**6.4.4 Destilação prévia das amostras****6.4.4.1 Preparo do Equipamento**

6.4.4.1.1 Em um bêcher de 250 mL colocar 100 mL de água purificada, adicionar 5 mL de solução tampão de borato e homogeneizar.

6.4.4.1.2 Verificar e ajustar o pH dessa mistura até pH 9,5 pela adição de hidróxido de sódio, gota a gota e com agitação constante.

6.4.4.1.3 Iniciar a destilação para a descontaminação do sistema, e recolher ao menos 40 mL do destilado.

6.4.4.1.4 Colocar na saída do destilador um erlenmeyer 250 mL contendo 10 mL de ácido sulfúrico 0,02 mol/L como solução de absorção.

**Cuidado:** Certifique-se que a saída do destilador fique imersa na solução de absorção de ácido sulfúrico 0,02 mol/L

6.4.4.1.5 Ao parar o aquecimento, deixar esfriar e manter a aparelhagem montada até imediatamente antes de iniciar a destilação da amostra.

**6.4.4.2 Preparo da Amostra**

6.4.4.2.1 Em um bêcher de 250 mL colocar 100 mL da amostra e adicionar 5 mL de solução tampão de borato e homogeneizar.

6.4.4.2.2 Verificar e ajustar o pH dessa mistura pela adição de hidróxido de sódio, gota a gota e com agitação constante, até pH 9,5.

6.4.4.2.3 Transferir para o tubo da aparelhagem previamente descontaminada e adaptar ao destilador.

<b>Código:</b> ME-INEA-GERLAB-630	<b>Data de aprovação:</b> 11/12/2024	<b>Revisão:</b> 02	<b>Paginação:</b> 4 de 9
--------------------------------------	---	-----------------------	-----------------------------

DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO AMONIACAL  
(MÉTODO DO FENATO)

6.4.4.2.4 Colocar na saída do destilador um erlenmeyer 250 mL contendo 10 mL de ácido sulfúrico 0,02 mol/L como solução de absorção.

**Cuidado:** Certifique-se que a saída do destilador fique imersa na solução de absorção.

6.4.4.2.5 Após o termo da destilação neutralizar o destilado com hidróxido de sódio 1mol/L.

6.4.4.2.6 Utilizar esta solução destilada para executar a determinação conforme o item 9.6.

## 6.4.5 Determinação de nitrogênio amoniacial da amostra

6.4.5.1 Transferir para um tubo de ensaio com capacidade aproximada de 30 mL com tampa rosqueável, 10,0 mL da amostra ou do destilado obtido na etapa prévia de destilação.

6.4.5.2 Adicionar 0,5 mL de fenol alcoólico 11,1 % v/v em etanol.

6.4.5.3 Adicionar em seguida 0,5 mL de nitroprussiato de sódio 5 % p/v.

6.4.5.4 Adicionar por último 1,0 mL de solução oxidante (citrato alcalino + hipoclorito de sódio).

6.4.5.5 Fechar o tubo de ensaio com a tampa de rosca, homogeneizar a solução com auxílio de agitador automático e deixar desenvolver cor em temperatura ambiente (22 a 27°C) e sem contato com luz natural por no mínimo 1 hora.

**Obs.:** A coloração azul se desenvolve em 1 hora e é estável por até 24 horas.

6.4.5.6 Após o desenvolvimento da cor, ler a absorbância em comprimento de onda de 640 nm, utilizando cubeta de 1 cm de caminho ótico.

6.4.5.7 Caso a concentração de N-NH<sub>3</sub> da amostra ultrapasse 1,50 mg/L fazer uma diluição adequada da amostra e repetir a determinação.

6.4.5.8 Registrar todos os dados e valores obtidos no FRM-ME-630-01 Memoria de análise N-amoniacial.

6.4.5.9 Executar quaisquer cálculos necessários e expressar os resultados conforme estabelecido no **item 6**.

## 6.4.6 Preparação da curva de calibração

6.4.6.1 A periodicidade da preparação da curva de calibração dependerá da performance apresentada pelos controles de qualidade empregados e da validade do Padrão (MRC).

6.4.6.2 Após os padrões falharem pela segunda vez consecutiva no controle de qualidade será necessário preparar uma nova curva de calibração.

6.4.6.3 É necessário o preparo de nova curva de calibração sempre que o equipamento passar por manutenção e calibração RBC.

6.4.6.4 Preparar inicialmente uma curva de calibração composta de pelo menos cinco pontos com concentrações que abranjam pelo menos a faixa até 1,50 mg/L de nitrogênio amoniacial (p. ex. 0,30 – 0,60 – 1,50 mg/L). Usar esta curva para calcular a concentração de N-NH<sub>3</sub> nas amostras.

6.4.6.5 Certificar que na curva de calibração obtida haja linearidade dentro da faixa de interesse ( $r^2 = 0,995$  ou maior).

Código: ME-INEA-GERLAB-630	Data de aprovação: 11/12/2024	Revisão: 02	Paginação: 5 de 9
-------------------------------	----------------------------------	----------------	----------------------

**DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO AMONIACAL  
(MÉTODO DO FENATO)**

6.4.6.6 Tomar exatamente uma alíquota de 1,00 mL da solução estoque padrão de nitrogênio amoniacial (1.000 mg/L N-NH<sub>3</sub>) e transferir para balão volumétrico de 100,00 mL.

6.4.6.7 Completar o volume do balão com água purificada e homogeneizar bem. Esta solução tem uma concentração de 10 mg/L (1,00 mL = 0,01 mg N-NH<sub>3</sub>).

6.4.6.8 Utilizando a solução preparada anteriormente (1,00 mL = 0,01 mg N-NH<sub>3</sub>), preparar padrões nas concentrações especificadas na tabela a seguir, através da utilização dos volumes indicados de cada solução.

<b>Concentração do padrão a ser preparado</b>	<b>Volume de solução de N-NH<sub>3</sub> de 10,0 mg/L a ser utilizado</b>
0,10 mg/L de N-NH <sub>3</sub>	1,00 mL da solução.
0,30 mg/L de N-NH <sub>3</sub>	3,00 mL da solução.
0,60 mg/L de N-NH <sub>3</sub>	6,00 mL da solução.
0,90 mg/L de N-NH <sub>3</sub>	9,00 mL da solução
1,20 mg/L de N-NH <sub>3</sub>	12,00 mL da solução
1,50 mg/L de N-NH <sub>3</sub>	15,00 mL da solução

6.4.6.9 Adicionar, com auxílio de pipetas volumétricas calibradas, cada um dos volumes indicados da solução padrão de nitrogênio da tabela anterior para balões volumétricos calibrados RBC de 100,00 mL.

Nota: Caso utilize balões volumétricos calibrados RBC de volumes diferenciados (exemplo: 50 mL – volumes menores ou 200 mL – volumes maiores) efetuar o cálculo do volume de solução de N-NH<sub>3</sub> de 10,0 mg/L a ser utilizado para cada concentração do padrão a ser preparado.

6.4.6.10 Completar o volume dos balões com água purificada e homogeneizar bem.

6.4.6.11 Fazer um branco utilizando apenas água purificada em lugar dos padrões.

6.4.6.12 Proceder, então, a determinação de nitrogênio amoniacial (N-NH<sub>3</sub>) conforme descrito no item 5.8.

6.4.6.13 Ler a absorbância em comprimento de onda de 640 nm em cubetas de 1 cm de caminho ótico.

6.4.6.14 Traçar uma curva de calibração de absorbância X concentração de N-NH<sub>3</sub> (mg/L).

## 6.5 Validação

6.5.1 Os seguintes parâmetros foram estudados para assegurar que as características de desempenho do método atendem aos requisitos para as operações analíticas pretendida e garantem a adequação do método ao uso pretendido:

- i. Seletividade;
- ii. Linearidade;
- iii. Limites de Quantificação e Detecção do método;
- iv. Recuperação;
- v. Precisão;

Código:	Data de aprovação:	Revisão:	Paginação:
ME-INEA-GERLAB-630	11/12/2024	02	6 de 9

**DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO AMONIACAL  
(MÉTODO DO FENATO)**

6.5.2 Estes estudos de verificação foram realizados com o auxílio de padrões certificados (MRC).

6.5.3 Os resultados encontram-se declarados nos relatórios de validação emitidos pelo módulo de Validação do LABWIN, exceto a linearidade que se encontra salvo no espectrofotômetro.

#### 6.6 Controle de Qualidade e Critérios de Aceitação

6.6.1 Conforme POP-INEA-GERLAB-204 – Controle da Qualidade dos Resultados, abaixo se encontram os critérios que poderão ser utilizados para verificação dos dados e resultados de análise e o consequente controle da qualidade dos resultados analíticos deste método.

6.6.2 Verificar possibilidade de contaminação dos reagentes, da água purificada utilizada e do processo de análise através da análise de um branco do método. Caso os resultados obtidos apresentem concentrações que interfiram nas determinações, todas as etapas devem ser refeitas.

6.6.3 Verificar a curva de calibração antes de analisar as amostras utilizando um padrão de verificação com concentração igual ao ponto médio da curva.

6.6.4 Os valores individuais de cada padrão de verificação devem estar situados dentro dos limites do desvio padrão calculado a partir do teste de reproduzibilidade. Caso os valores obtidos fiquem fora do limite estabelecido, avaliar e corrigir possíveis erros e em seguida repetir a verificação. Se a verificação atender aos limites, continuar as determinações, caso contrário, refazer a curva de calibração.

6.6.5 Lançar os valores do padrão de verificação em uma Carta de Controle de Média de padrão de verificação para avaliação da exatidão da curva de calibração.

6.6.6 Execute uma análise em duplicata de amostras/padrão de verificação para cada batelada para determinar a precisão do método.

6.6.7 Os valores individuais de cada duplicata devem estar situados dentro dos limites do desvio padrão calculado a partir do teste de reproduzibilidade. Caso o valor obtido das duplicatas ficar fora do limite estabelecido, isto pode indicar problemas com o sistema de análise e/ou influência de efeito da matriz das amostras.

6.6.8 Avaliar e corrigir estes possíveis problemas e em seguida repetir as análises. Se a repetição das análises atender aos limites, continuar as determinações, caso contrário, indicar este fato junto com os resultados das amostras daquela batelada.

6.6.9 Os valores das duplicatas das amostras devem ser lançados em uma Carta de Controle de Amplitude de duplicata de amostras/padrão de verificação para avaliação da precisão do método.

**Observação:** Considerar como batelada uma quantidade de até 20 amostras analisadas nas mesmas condições, em um mesmo dia e utilizando os mesmos reagentes. Quando ocorrer o recebimento de menos de 20 amostras no dia fazer pelo menos um de cada controle e uma duplicata em uma das amostras recebidas/padrão de verificação. O mesmo critério deverá ser adotado para um número maior de vinte amostras e menor que seus múltiplos.

## DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO AMONIACAL (MÉTODO DO FENATO)

### 7 CÁLCULOS E EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

- 7.1 Registrar as absorbâncias lidas, o volume de amostra utilizado, o valor de diluição quando aplicável e utilizando a curva de calibração, determinar as concentrações correspondentes de nitrogênio amoniacial (N-NH<sub>3</sub>) em mg/L.
- 7.2 Para casos em que houver a diluição da amostra analisada e o equipamento utilizado não expressar a concentração do analito mediante leitura direta, considerar os cálculos abaixo:

$$C = Ca \times Fd$$

Onde:

C = concentração de N-NH<sub>3</sub> na amostra analisada em mg/L;

Ca= Leitura direta da concentração analisada, gera pelo equipamento em mg/L;

Fd= Fator de diluição aplicado à alíquota de amostra analisada.

- 7.3 Expressar os resultados finais como nitrogênio amoniacial (N-NH<sub>3</sub>) em mg/L, conforme a tabela a seguir e, se necessário, adotando o critério de arredondamento especificado pela Norma ABNT NBR 5891:

Faixa de concentração encontrada (mg/L)	Expressar o resultado
Menor que 0,10	$< 0,10$ mg/L
$0,10 \leq X < 1,00$	2 algarismos após a vírgula
$1,0 \leq X < 10,0$	1 algarismo após a vírgula
$X \geq 10$	Números inteiros

- 7.4 Caso esteja disponível no laboratório um sistema informatizado para lançamento dos dados (por exemplo, o *LabWin*), os valores obtidos nas análises e, se necessário, os fatores de diluição das amostras devem ser lançados no sistema para que ele execute quaisquer cálculos e expresse os resultados diretamente, conforme os critérios estabelecidos.
- 7.5 Registrar no sistema LabWin os resultados obtidos tanto de amostras como de duplicatas/Spike. Neste caso, o sistema expressará os resultados diretamente, conforme os critérios estabelecidos.
- 7.6 A Estimativa da Incerteza de Medição é realizada de acordo com os critérios definidos no POP-INEA-GERLAB-635 – Incerteza de Medição Labwin UNC. A incerteza estimada da medição será incluída no relatório de ensaio, somente quando ela for relevante para a validade ou aplicação dos resultados de ensaios, quando requerida pelo cliente ou quando afetar a conformidade com um limite especificado.

### 8 REGISTROS

- **FRM-POP-634-02** - REGISTRO DE EXECUÇÃO DE CURVA DE CALIBRAÇÃO DO SERVAQ;
- **FRM-POP-639-01** - REGISTRO DE UTILIZAÇÃO DE EQUIPAMENTOS SERVAQ ESPECTROFOTÔMETROS;
- **FRM-ME-630-01** - MEMÓRIA DE ANÁLISES E CÁLCULOS SERVAQ NITROGÊNIO-AMONIACAL (MÉTODO DO FENATO);
- **FRM-POP-602-01** - CONTROLE INTERNO DE SOLUÇÕES SERVAQ;

**DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO AMONIACAL  
(MÉTODO DO FENATO)**

- **FRM-POP-602-03-** REGISTRO DE PREPARO DE SOLUÇÕES E REAGENTES ESTOQUE SERVAQ.

**9 ANEXOS**

Não aplicável.

**10 HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO**

Atualização para adequação ao POP-INEA-GERLAB-104, NOI-INEA-01-R1 e Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24<sup>a</sup> ed., EUA, 2022.

<b>Código:</b> ME-INEA-GERLAB-630	<b>Data de aprovação:</b> 11/12/2024	<b>Revisão:</b> 02	<b>Paginação:</b> 9 de 9
--------------------------------------	---	-----------------------	-----------------------------