

Artigo

Quantificação de Nitrito em Água Utilizando um Scanner de Mesa

Fabris, B. T.; João, J. J.; Borges, E. M.*

Rev. Virtual Quim., 2020, 12 (3), 569-582. Data de publicação na Web: 28 de Abril de 2020

<http://rvq.sbg.org.br>

Nitrite Quantification in Water Using a Flatbed Scanner

Abstract: Here, we propose a laboratory experiment, where students determine nitrite concentration in water samples, which were intentionally contaminated with nitrite, using two colorimetric assays. The differential of this laboratory practice was the quantitative method that was carried out using digital images obtained with a flatbed scanner. In the Minoxidil colorimetric assay, nitrite react with Minoxidil providing a yellow compound which absorbs light in 325 nm and 400 nm. In Griess-Ilosvay assay it formed a pink diazo compound that strong absorbs light at 540 nm and it is the reference assay for nitrite determination. The experiments were carried out placing samples and standard solutions in a 96 micro-well plate, then, a digital image of the plate was recorded using a flatbed scanner. R (red), G (green) and B (blue) values were extracted using the ImageJ and inserted in a spreadsheet. In the spreadsheet, limits of quantification (LQ), limits of detection (LO) and concentrations of unknown solutions were calculated. In the Minoxidil assay the LD was 58,1 58,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and the LQ was 176 $\mu\text{mol L}^{-1}$. In the Griess-Ilosvay assay, the LD was 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and the LQ was 6,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The Griess-Ilosvay assay can detected nitrite in concentrations lower than the Minoxidil assay and it was also faster than the minoxidil assay. However, the Minoxidil assay just use a commercial minoxidil formulation that may be purchased in any pharmacy. This laboratory experiment provides undergraduate students an opportunity to learn, quantitative analysis, determine the concentration of an unknown using the calibration plot, calculate percent error, LD and LQ.

Keywords: Minoxidil; nitrite; ImageJ; Griess-Ilosvay method.

Resumo

No presente trabalho é apresentado um experimento onde os alunos utilizam dois métodos colorimétricos para determinar a concentração de nitrito em amostras de água intencionalmente contaminadas. O diferencial deste trabalho foi conduzir os métodos quantitativos utilizando imagens digitais de placas 96 micropoços obtidas com um scanner de mesa. Os métodos colorimétricos utilizados foram os métodos do Minoxidil e de Griess-Ilosvay. No ensaio com o Minoxidil, ocorre uma reação entre o nitrito e o Minoxidil que gera um produto amarelo que absorve em 325 e 400 nm. O método de Griess-Ilosvay é o método de referência para determinar nitrito em água, onde é formado um diazo composto rosa que absorve fortemente em 540 nm. As amostras e os padrões de nitrito foram colocados em uma placa de 96 poços e uma imagem digital da placa foi obtida utilizando um scanner de mesa. Os valores R (vermelho), G (verde) e B (azul) foram extraídos usando o plugin ReadPlate do ImageJ e inseridos em uma planilha eletrônica. Utilizando esta planilha eletrônica, foram determinadas os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) e as concentrações de nitrito nas amostras desconhecidas. O método que utiliza o Minoxidil apresentou LD de 58,1 e LQ de 176,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O método de Griess-Ilosvay apresentou LD de 2,5 e LQ de 6,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O método de Griess-Ilosvay pode ser utilizado para determinar concentrações de nitrito mais baixas que o método do Minoxidil, ele é também mais rápido que o método do Minoxidil. No entanto, o método do Minoxidil utiliza apenas uma formulação comercial de Minoxidil que pode ser comprada em qualquer farmácia. Este experimento proporcionou aos alunos a oportunidade de aprender tópicos como, por exemplo: o processamento de imagens digitais, como fazer uma curva analítica, como determinar a concentração de um analito utilizando a curva analítica, como calcular o erro relativo, além da determinação dos limites de detecção e limites de quantificação.

Palavras-chave: Monoxidil; Nitrito; ImageJ; método de Griess-Ilosvay.

* Universidade Regional de Blumenau, Departamento de Química, Campus 1, Rua Antônio da Veiga 140, Victor Konder, CEP 89012-900, Blumenau-SC, Brasil.

 marcelborgesb@gmail.com
DOI: [10.21577/1984-6835.20200045](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200045)

Quantificação de Nitrito em Água Utilizando um Scanner de Mesa

Bárbara Tomelin Fabris,^a Jair Juarez João,^b Endler Marcel Borges^{a,*}

^a Universidade Regional de Blumenau, Campus 1, Departamento de Química, Rua Antônio da Veiga 140, Victor Konder, CEP 89012-900 Blumenau-SC, Brasil.

^b Universidade do Sul de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Curso de Engenharia Química, Avenida José Acácio Moreira 787, Dehon, CEP 88704-900.Tubarão-SC, Brasil.

*marcelborgesb@gmail.com

Recebido em 1 de Novembro de 2019. Aceito para publicação em 26 de Fevereiro de 2020

1. Introdução

2. Parte Experimental

2.1. Reagentes

2.2. Amostras

2.3. Equipamentos

2.4. Soluções utilizadas no método colorimétrico com o Minoxidil

2.5. Soluções utilizadas no método de Griess-Ilosvay

2.6. Obtenção das imagens digitais

2.7. Obtenção dos valores de RGB

2.8. Análise quantitativa através de imagens digitais obtidas com um scanner de mesa

2.9. Avaliação da curva analítica

2.10. Avaliação do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ)

2.11. Avaliação da precisão

2.12. Avaliação da exatidão

2.13. Preparo das soluções utilizadas no método colorimétrico com o Minoxidil

2.14. Preparo das soluções utilizada no método de Griess-Ilosvay

3. Resultados e Discussão

3.1. Determinação de nitrito em águas de torneira intencionalmente contaminadas utilizando a reação colorimétrica com Minoxidil

3.2. Determinação da concentração de nitrito em águas de torneira intencionalmente contaminadas com o método de Griess-Ilosvay

4. Conclusão

1. Introdução

O nitrito é um poluente encontrado nas águas, especialmente nas proximidades de regiões agrícolas, onde existe adubação com compostos nitrogenados. Normalmente, o nitrato é reduzido a nitrito por micro-organismos. O aumento da concentração de nitrito na água representa um problema de saúde pública, pois altas concentrações podem ser especialmente problemáticas para bebês, grávidas e idosos.¹

Os bebês são sensíveis a altos níveis de nitrito e desenvolvem a doença conhecida como síndrome do bebê azul, onde o excesso de íons nitrito na corrente sanguínea compromete a capacidade de ligação da hemoglobina com o oxigênio devido à estabilidade da ligação dos íons nitrito com o ferro da hemoglobina, podendo levar à morte do bebê.^{2,3} Adicionalmente, o nitrito ainda pode formar nitrosaminas carcinogênicas quando reage com aminas secundárias.²

A agência de proteção ambiental norte americana (EPA, *Environmental Protection Agency*)⁴ e o Ministério da Saúde do Brasil⁵ estipulam que o limite máximo de nitrito em água potável é de 1 mg L⁻¹ (ppm), enquanto a Comunidade Europeia (CE) estabelece que o limite máximo de nitrito em água é de 0,1 mg L⁻¹.⁶

Técnicas instrumentais, como, por exemplo, eletrodos de íons seletivo,¹ cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC),⁷ microeletrodos⁸ e eletroforese capilar⁹ são utilizadas para tal fim. No entanto, estas técnicas têm um custo elevado.

No Brasil, o método oficial para a determinação do nitrito, segundo a NBR 12619,^{10,11} é o método

Griess-Ilosvay, no qual o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido, formando um diazo composto que reage com o cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED), gerando um composto de coloração rosa intensa (Figura 1)². O método de Griess-Ilosvay.¹

González-Jiménez¹ *et al.*, propuseram um experimento didático para determinar a concentração de nitrito em águas, que consiste na reação entre o Minoxidil e o íon nitrito (Figura 2) para gerar uma substância com forte absorção em 325 nm e 400 nm.

O Minoxidil (6-(1-piperidinil)-2,4-pirimidinediamine 3-oxido, 6-(1-piperidinil)-2,4-pyrimidinediamine 3-oxide, CAS 38304-91-5), mostrado na Figura 2, foi o primeiro fármaco aprovado pelo FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) contra a alopecia (calvície).¹ O Minoxidil pode ser comprado, como solução tópica, a um preço acessível e sem receita médica em qualquer farmácia.

O Minoxidil é incolor e possui um anel aromático passível de sofrer reação eletrofílica na posição 5. Como o nitrito é um eletrófilo em potencial, ele reage com o Minoxidil por intermédio desta reação eletrofílica na posição 5 (Figura 2), para formar o Nitrosominoxidil que tem coloração amarela.

A velocidade da reação entre o Minoxidil e o íon nitrito varia em função do pH e pela força iônica. González-Jiménez *et al.*,¹ recomendam que a reação seja realizada em uma solução de NaCl 0,18 mol L⁻¹ a pH 4.

Imagens digitais obtidas com *smartphones*, câmeras digitais e *scanners* podem ser utilizadas para fins quantitativos com a mesma eficiência que um espectrofotômetro.¹² Imagens digitais vem sendo largamente utilizadas na área de

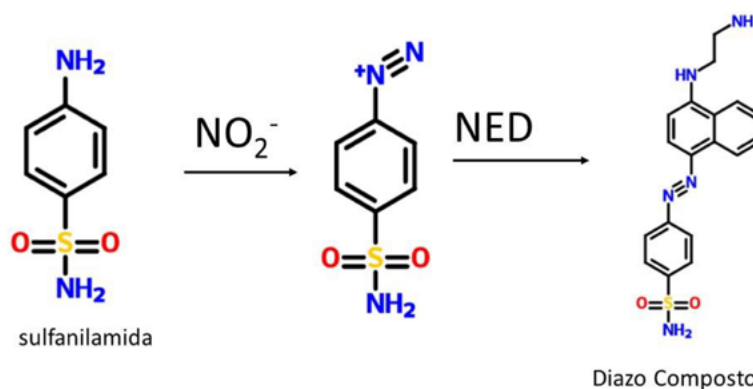


Figura 1. Representa um mecanismo de reação usada no método de Griess-Ilosvay

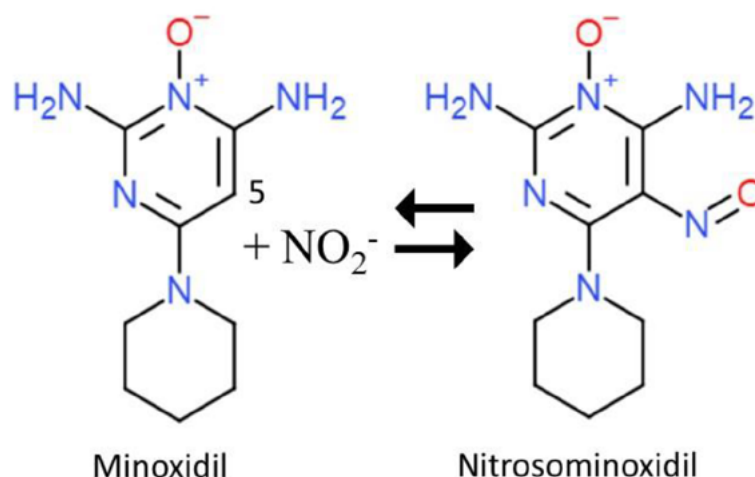


Figura 2. Formação do Nitrosominoxidil através da reação entre Minoxidil com o nitrito

ensino,¹²⁻³⁴ como, por exemplo, quantificação de nanopartículas de ouro em suplementos alimentares,²⁶ quantificação de proteínas através do método de Bradford e biureto,²⁷ quantificação de fosfato em refrigerantes a base de cola,²⁸ quantificação de manganês em pilhas,²⁹ titulação espectrofotométrica de vinho tinto,³⁰ determinação de nitrito em água de aquário,³¹ determinação da massa de aspirina em comprimidos,³² determinação da massa de vitamina C em comprimidos³³ e determinação de cromo em couro.³⁴

Além dos experimentos didáticos descritos anteriormente, as imagens digitais vem sendo cada vez mais utilizadas para diversos fins quantitativos, como, por exemplo, a determinação de arsênio³⁵ e ferro em águas,³⁶ determinação da percentagem de etanol em bebidas destiladas,³⁷ determinação da concentração de iodeto em sal de cozinha,³⁸ quantificação de corantes em balas,³⁹ e diferenciação de tintas de canetas.⁴⁰

Capitán-Vallvey⁴¹ *et al.*, revisaram inúmeras aplicações de imagens digitais obtidas com *smartphones*, câmeras digitais e scanner para as mais diversas aplicações. Zarei⁴² mostrou como imagens digitais capturadas com *smartphones* ou outros dispositivos podem ser utilizados para testes rápidos para diagnóstico. Morbioli *et al.*,⁴³ descreveram como a detecção colorimétrica com dispositivos analíticos baseados em papel (*Paper-based analytical devices*, μ PADs) pode ser realizada utilizando imagens digitais.

Já foi reportado na literatura que imagens digitais obtidas com scanners sofrem pouca influência da luz ambiente.^{12,28-30} Portanto, este trabalho foi realizado utilizando imagens digitais de placas de 96 poços

obtidas com um *scanner* de mesa.

Neste trabalho, os alunos tiveram a oportunidade de determinar a concentração de nitrito em amostras de água que forma intencionalmente contaminadas utilizando dois métodos colorimétricos (Minoxidil e Griess-Ilosvay). Por sua vez, realizar experimentos quantitativos utilizando imagens digitais representa uma alternativa viável para instituições de ensino onde estes equipamentos não estão disponíveis. Os principais objetivos didáticos foram a demonstração dos princípios básicos do desenvolvimento de um método colorimétrico, o uso de materiais alternativos, a utilização de imagens digitais em um método quantitativo, o cálculo do erro relativo e a determinação do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ).

2. Parte Experimental

2.1. Reagentes

Ácido clorídrico 37%, cloreto de sódio 99% e nitrito de sódio 99% todos da Vetec (Duque de Caxias, Rio de Janeiro). Ácido fosfórico (85%) da Synth (Diadema, São Paulo). N-(1 naftil) etilenodiamina (NED) da Sigma-Aldrich e sulfanilamida (Êxodo, Sumaré). Todas as concentrações percentuais em (m/m).

2.2. Amostras

Os testes foram realizados com água de torneira coletadas no bloco I do Campus 2 da

Universidade Regional de Blumenau. Estas amostras de água de torneira foram coletadas em um Becker, alguns minutos antes da execução do experimento e intencionalmente contaminadas com soluções de NaNO_2 , representando concentrações conhecidas de nitrito. (veja seções 2.13-2.14).

2.3. Equipamentos

As medidas de absorvância foram mensuradas em um espectrofotômetro modelo 1800 da Shimadzu (Kyoto, Japão). As imagens digitais foram obtidas utilizando um *scanner* Canon LIDE 120 (Tokyo, Japão). Todas as soluções foram preparadas em água deionizada obtida com deionizador Permutation da E.J. Kringer & Cia LTDA (Curitiba, Paraná).

2.4. Soluções utilizadas no método colorimétrico com o Minoxidil

Preparo da Solução de Minoxidil: A solução de Minoxidil $4,78 \text{ mmol L}^{-1}$ foi preparada pela diluição de 2,00 mL da solução comercial em um balão volumétrico de 100,00 mL completando-se o volume com água deionizada. As soluções colorimétricas foram preparadas utilizando diversos fármacos que contém o Minoxidil como princípio ativo. Neste trabalho foram utilizados os fármacos Aloxiidil da Theraskin, PANT da Ache e Minoxidil (medicamento genérico) da Biosintética. Estes fármacos são uma solução Minoxidil ($\text{MM } 209,25 \text{ g mol}^{-1}$) de concentração 50 g L^{-1} ($0,24 \text{ mol L}^{-1}$) (Solução A).

Preparo da Solução de NaCl: A solução $4,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl ($\text{MM } 58,44 \text{ g mol}^{-1}$) foi preparada dissolvendo-se 12 g de NaCl em um becker com 40 mL de água deionizada que, posteriormente, foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 50,00 mL, completando-se o volume com água deionizada (Solução B).

Preparo da solução de HCl: A solução $0,17 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl foi preparada utilizando-se uma pipeta graduada, com transferência de 0,7 mL de HCl ($36,46 \text{ g mol}^{-1}$) concentrado (37%, $1,3 \text{ g mL}^{-1}$) para um becker, contendo 25 mL de água deionizada; posteriormente, a solução foi quantitativamente transferida para um balão volumétrico de 50,00 mL, completando-se o volume com água deionizada (Solução C).

Preparo da solução colorimétrica: A solução colorimétrica foi preparada pela mistura de 100 mL da solução A com 2 mL da solução B e 2 mL da solução C.

As soluções padrão foram preparadas misturando 2 mL de cada solução com 2 mL de solução colorimétrica.

O branco corresponde a 2,00 mL de água de ionizada mais 2,00 mL da solução colorimétrica

Neste método, a absorvância foi mensurada em 325 nm e 400 nm utilizando cubetas de quartzo. Devemos ressaltar, que cubetas de poliestireno não são apropriadas para determinar a absorvância nestes comprimentos de onda, sendo recomendado o uso de cubetas de quartzo.

2.5. Soluções utilizadas no método de Griess-Ilosvay

Preparo do reagente sulfanilamida a 0,5% m/v: 125 mg de sulfanilamida $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$ foram dissolvidos em 25 mL de solução de ácido fosfórico 5%. A solução é estável por 1 a 2 meses (Solução D).

Preparo da Solução NED: 200 mg de cloreto de alfa-naftiletilenodiamina ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2$, NED) forma dissolvidos em 25 mL de água. Estoque em frasco âmbar sob refrigeração. A solução é estável por uma semana e deverá ser desprezada quando apresentar alteração da coloração (Solução E).

As soluções padrão e as amostras foram preparadas misturando 2 mL de cada solução com 0,2 mL da solução D, após 6 minutos, foi adicionado 0,2 mL da solução E. Estas soluções se mostraram estáveis por uma semana quando guardadas na geladeira.

O branco corresponde a 2,00 mL de água deionizada mais 0,20 mL das soluções D e E. Neste método a absorvância é mensurada a 540 nm. Cubetas de poliestireno são recomendadas para determinar a absorvância em 540 nm.

2.6. Obtenção das imagens digitais

As imagens foram obtidas com 600 dpi no formato *Joint Photographics Experts Group* (JPEG). As opções de correção automática da imagem pelo software foram desabilitadas e o *software* do *scanner* foi o *Canon IJ ScanUtility*. A Figura 3 mostra como a placa deve ser colocada no scanner, posteriormente, a tampa deve ser fechada e uma imagem da placa é obtida.

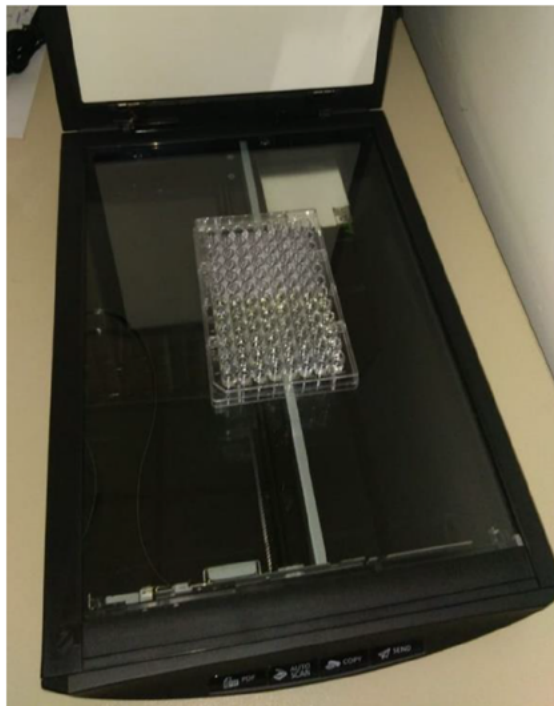


Figura 3. Posicionamento de uma placa de 96 poços no scanner

2.7. Obtenção dos valores de RGB

Os valores de RGB foram extraídos das imagens utilizando o *freeware* ImageJ⁴⁴. Os valores de cada canal (RGB) de todos os poços da microplaca podem ser extraídos simultaneamente utilizando o *plugin* “ReadPlate” do ImageJ⁴⁵.

Uma descrição detalhada de como extrair os valores de RGB poderá ser obtida em Colzani *et al.*^{28,29}

Para medidas de absorção de radiação em determinado comprimento de onda, a absorbância é dada pela Eq. 1 onde **A** é a absorbância, **I** é a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra e **I₀** é a intensidade da radiação que emerge da amostra⁴⁸. Quando se utiliza imagens digitais, **I** é o valor de RGB de uma imagem que contém o analito e **I₀** é o valor de RGB de uma imagem que contém apenas o branco.

$$A = -\log_{10}(I/I_0) \quad \text{Eq. 1}$$

2.8. Análise quantitativa através de imagens digitais obtidas com um scanner de mesa.

Uma Tabela no formato Microsoft Excel[®] que foi utilizada na construir das curvas analíticas e para determinar concentração das amostras

fortificadas com o analito é fornecida como um link no Google Drive. A planilha do Microsoft Excel[®] utilizada para o método colorimétrico do Minoxidil está na referência 49 e a planilha utilizada no método de Griess-Ilosvay está na referência 50.

A Figura 4 ilustra a disposição da curva analítica e das amostras em uma placa de 96 poços. Nas posições A1, B1, G1 e H1 estão o branco, nas posições A2, B2, G2 e H2 estão o primeiro ponto da curva analítica e assim sucessivamente. Nas posições C1, D1, E1 e F1 estão a primeira amostra de água fortificada com nitrito e assim sucessivamente. As soluções padrão foram colocadas nas linhas A, B, G e H, enquanto as amostras foram colocadas nas linhas C, D, E e F. Foram colocados 200 μL em cada poço da placa.

A função de cada célula na planilha está explicada como caixas de texto. Os valores de R, G e B são normalizados conforme com a Eq. 2, Eq. 3 e Eq. 4, respectivamente.

$$\bar{R} = R/\sqrt{(R^2 + G^2 + B^2)} \quad \text{Eq. 2}$$

$$\bar{G} = G/\sqrt{(R^2 + G^2 + B^2)} \quad \text{Eq. 3}$$

$$\bar{B} = B/\sqrt{(R^2 + G^2 + B^2)} \quad \text{Eq. 4}$$

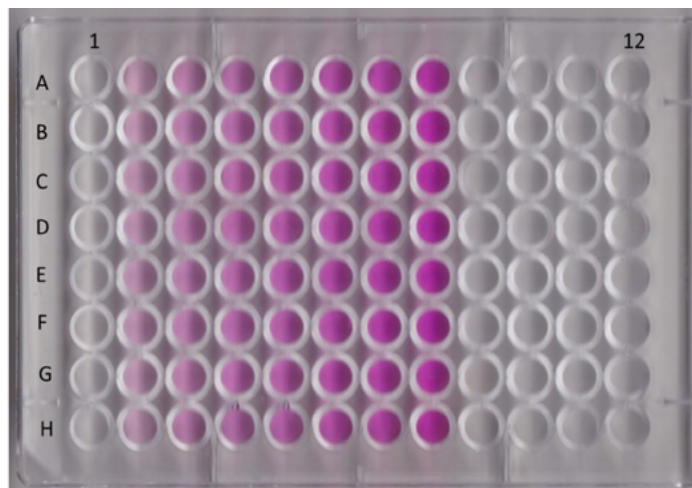


Figura 4. Placa de 96 poços utilizada para determinar a concentração de nitrito em amostras de água de torneira intencionalmente contaminadas com nitrito através do método de Griess-Ilosvay

2.9 Avaliação da curva analítica

O Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) recomenda que a curva analítica seja descrita por um modelo linear como o que é mostrado na Eq. 5. ⁴⁶⁻⁴⁷

$$y = a + bx \quad \text{Eq. 5}$$

O erro aleatório na direção do eixo y é determinado, $s_{y/x}$, pela Eq. 6, onde \hat{y} são os valores de y obtidos com a curva analítica e y são os valores experimentais. Desta forma, quanto menor o valor de $s_{y/x}$ melhor a qualidade do modelo linear proposto para curva analítica. Os coeficientes da curva analítica (a, b e $s_{y/x}$) foram determinadas através da função proj.lin do Microsoft Excel

$$s_{y/x} = \sqrt{\sum_i (y - \hat{y}_i)^2 / n - 2} \quad \text{Eq. 6}$$

2.10. Avaliação do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito que poderá ser detectada, o LD foi determinado pela Eq. 7, onde b é o coeficiente angular da curva analítica e $s_{y/x}$ é o erro aleatório na direção do eixo y ^{51,52}, que foi calculado através da Eq. 6.

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que poderá ser quantificada e foi calculado através da Eq. 8. ^{51,52}

$$LD = (3,3 s_{y/x})/b \quad \text{Eq. 7}$$

$$(10 s_{y/x})/b \quad \text{Eq. 8}$$

2.11. Avaliação da precisão

A precisão é representada pela dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra. O desvio padrão (s) calculado com a Eq. 9 é um indicativo da dispersão dos resultados, onde n é o número de medidas repetidas, feitas a partir de uma mesma amostra. Normalmente, a precisão é avaliada pelo coeficiente de variação (RSD) foi calculado com a Eq. 10, onde m é a concentração média determinada.

$$s = \sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)} \quad \text{Eq. 9}$$

$$RSD = \frac{s}{m} 100\% \quad \text{Eq. 10:}$$

O INMETRO estabelece um RSD máximo aceitável através da equação de Horwitz (Eq. 11)⁴⁷, onde C é a razão entre a massa do analito e a massa da amostra; por exemplo, para concentrações de mg L^{-1} , 10^{-6} , substituindo na equação de Horwitz,

$$RSD_{\text{máximo}} = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad \text{Eq. 11}$$

2.12. Avaliação da exatidão

Representa a concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio

e um valor de referência aceito como verdadeiro.⁵⁶ Neste caso, as soluções de água de torneira são intencionalmente contaminadas para concentrações conhecidas e a exatidão é determinada como “Erro Relativo” que foi calculado utilizando a Eq. 12, onde X_{lab} = valor obtido experimentalmente ou média aritmética de valores obtidos, X_v = valor aceito como verdadeiro.⁴⁷

O INMETRO⁴⁷ e a ANVISA⁵² estabelecem que o erro relativo não pode exceder 15%, exceto no LQ, onde o valor máximo aceitável é de 20%.

$$\%E = [(X_{lab} - X_v) / X_v] \times 100. \text{ Eq. 12}$$

2.13. Preparo das soluções utilizadas no método colorimétrico com o Minoxidil

Para preparar soluções de nitrito de sódio de 200 a 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 0,20, 0,40, 0,60, 0,80 e 1,00 mL da solução de trabalho 10000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NaNO_2 foram adicionados em balões volumétricos de 10,00 mL e os volumes completados até o menisco com água deionizada.

2.14. Preparo das soluções utilizada no método de Griess-Ilosvay.

Foram utilizadas soluções de NaNO_2 com concentrações entre 4,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 19,3. Para preparar estas soluções foi utilizada uma micropipeta, 0,20, 0,40, 0,60, 0,80 e 1,00 mL da solução de trabalho 290 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NaNO_2 foram adicionados em balões volumétricos de 10,00 mL, e o volume foi completando até o menisco com água deionizada.

3. Resultados e Discussão

3.1. Determinação de nitrito em águas de torneira intencionalmente contaminadas utilizando a reação colorimétrica com Minoxidil.

Soluções de nitrito de sódio com concentrações na faixa de 200 a 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ quando misturadas com Minoxidil, após 70 minutos, apresentam uma coloração amarela (Figura 5), e absorvâncias de 0,2 a 0,5 (Figura 6).

A reação colorimétrica entre o Minoxidil e o nitrito, resulta em um produto amarelo com forte absorção em 325 nm e 400 nm. A absorvância do produto amarelo em 325 nm é mais intensa que em 400 nm (Figura 7).

As Figuras 6 e 7 mostram que a reação colorimétrica que ocorre entre o nitrito e o Minoxidil só atinge o equilíbrio após 70 minutos.

Quando um espectrofotômetro não está disponível no laboratório de ensino a quantificação de nitrito em água também pode ser realizada utilizando imagens digitais obtidas com um scanner de mesa. A Figura 8 mostra as curvas analíticas obtidas com os valores de R (vermelho), G (verde) e B (azul) extraídas da imagem da placa de 96 poços. Somente a absorvância mesurada através dos valores normalizados de B mostram variações apreciáveis em função da concentração de NaNO_2 . Portanto, somente a curva analítica obtidas com os valores de B foi utilizada para quantificar o nitrito de sódio nas amostras de água intencionalmente contaminadas.

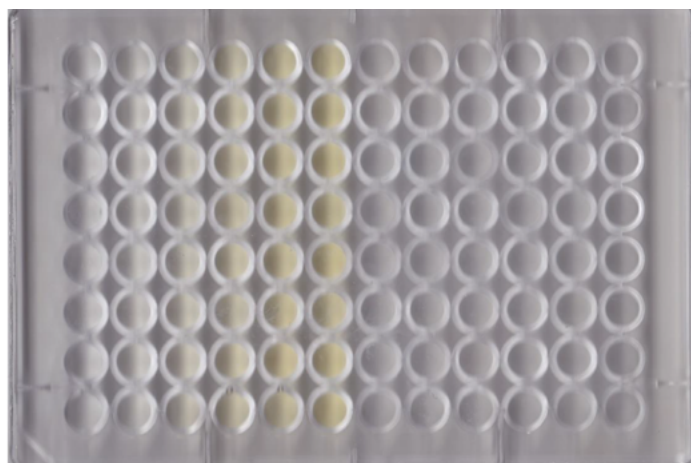


Figura 5. Imagem de uma placa de 96 poços utilizada no método colorimétrico com o Minoxidil e imagens digitais obtidas com um scanner de mesa

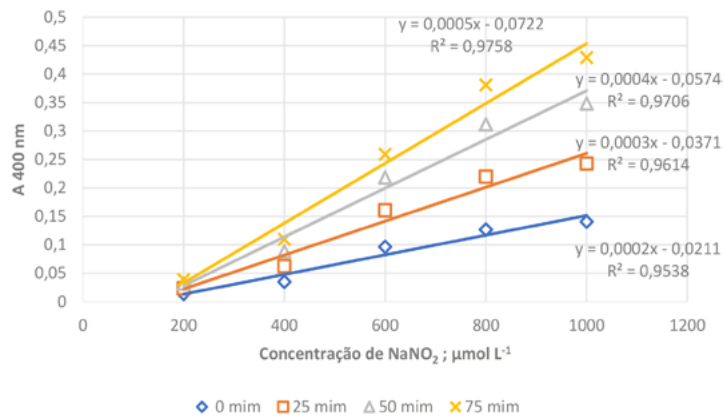


Figura 6. Variações nas curvas analíticas em função do tempo, absorbância mensurada a 400 nm vs concentração de nitrito

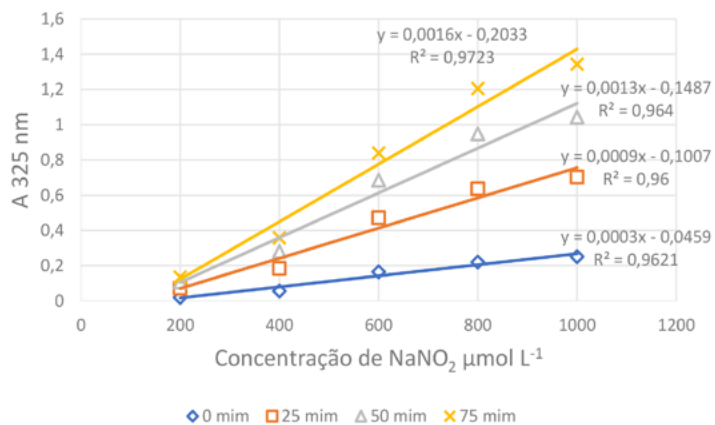


Figura 7. Variações nas curvas analíticas em função do tempo, absorbância mensurada a 325 nm vs concentração de nitrito

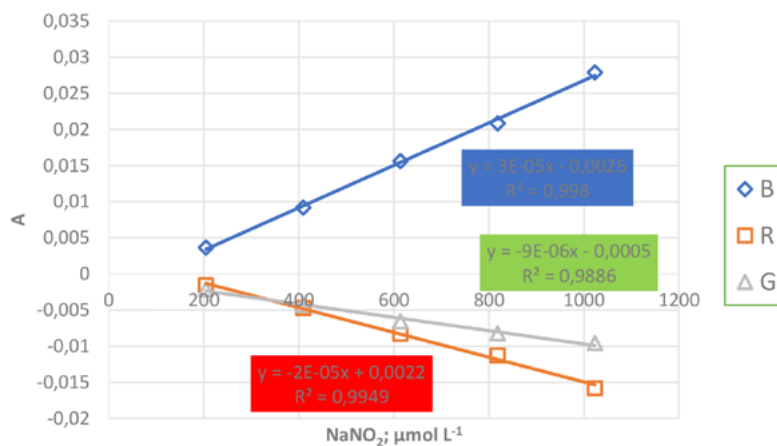


Figura 8. Curvas analíticas obtidas para os valores de R, G e B para as concentrações de 200 a 1000 μmol L⁻¹ de NaNO₂

Quando se utiliza imagens digitais em metodologias quantitativas, a cor que proporciona os melhores resultados é sempre a cor complementar, neste caso, a cor complementar do amarelo é o azul.¹⁴

Para avaliar a efetividade em determinar a concentração de nitrito utilizando imagens digitais, foram analisadas amostras de água de torneira, intencionalmente contaminadas com nitrito de sódio, de concentração conhecidas (Tabela 1) utilizando os valores de B. A precisão foi avaliada através dos valores de RSD e a exatidão através do erro relativo. Na Tabela 1 o RSD e o erro relativo foram menores que 15%, garantindo assim a precisão e a exatidão do método.

Para a curva analítica obtida (Figura 8), o LD foi de 58 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e o LQ foi de 176 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Neste ponto, foi ressaltado que existem diversas formas de calcular o valor de LD e LQ, neste caso, utilizando a curva analítica foi obtido um valor para LQ menor que a concentração mais baixa da curva analítica, um resultado que não é realista, visto que não podemos quantificar amostras com concentrações menores que a menor concentração da curva analítica.

3.2. Determinação da concentração de nitrito em águas de torneira intencionalmente contaminadas com o método de Griess-Ilosvay

A reação colorimétrica utilizada para determinar a concentração de nitrito no método de Griess-Ilosvay é rápida e se completa em apenas 6 minutos, os alunos se mostraram impressionados com a cor rosa desenvolvida pelas soluções (Figura 9). Por sua vez, as soluções se mostraram estáveis por uma semana e, apenas, 25 mL das soluções D e E foram suficientes para preparar mais de 100 amostras.

Figura 10 mostra as curvas analíticas obtidas com a absorbância mensurada 540 nm e com os valores de R, G e B extraídos das imagens digitais. O verde foi a única cor que apresentou variação em função da concentração de nitrito, por esta razão, os valores de G foram utilizados na quantificação de nitrito em água. Onde a curva analítica obtida com a absorbância mensurada a 540 nm tem um coeficiente angular ligeiramente maior que a curva analítica obtida com os valores de G, extraídos das imagens digitais (Figura 10).

Tabela 1. Determinação da concentração de nitrito ($\mu\text{mol L}^{-1}$) em amostras de água, intencionalmente contaminadas com nitrito utilizando os valores de B

^a X _v	^b X _{lab}	^c RSD	^d %E
200	235	5,0	14,9
400	393	3,1	-4,1
600	609	10,9	-0,8
800	875	3,6	6,9
1000	933	14,4	-8,8

^aX_v é a concentração verdadeira da amostra. ^bX_{lab} é a média dos valores obtidos experimentalmente (n = 4). ^cRSD calculado com a Eq. 10 (n = 4) e ^d|%E| erro relativo calculado com a Eq. 12

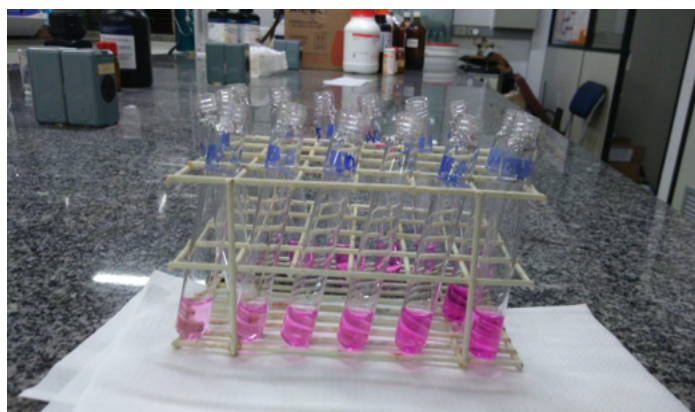


Figura 9. tubos de ensaio contendo as soluções padrão de nitrito após a reação colorimétrica no método de Griess-Ilosvay

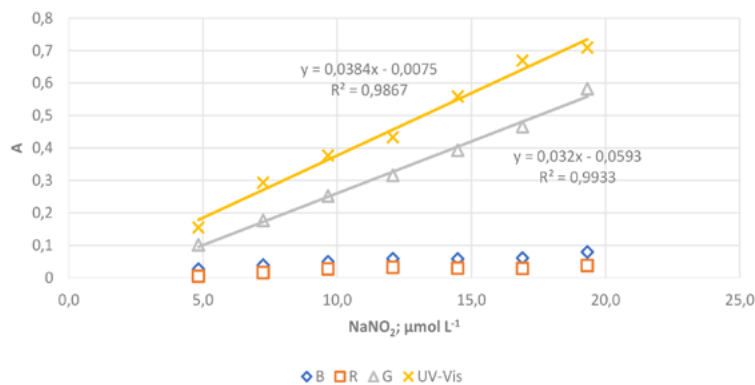


Figura 10. Curvas analíticas obtidas com a absorvância mensurada a 540 nm (UV-vis), e com os valores de R, G e B, para as concentrações na faixa de 4,9 a 19,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NaNO_2

Através da curva analítica (Figura 10), o LD foi de 2,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e o LQ foi de 6,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Estes baixos valores de LD e LQ representam que baixas concentrações de nitrito podem ser quantificadas. Isto se deve a coloração rosa intensa do método de Greiss-Ilosvay.

Foram analisadas amostras de água de torneira, intencionalmente contaminadas com nitrito de sódio, de concentrações conhecidas (Tabela 2). A precisão foi avaliada através dos valores de RSD, onde os valores de RSD observados foram menores que 15%, garantindo assim a precisão do método.

A exatidão e precisão do método foram avaliados através do erro relativo e do desvio padrão relativo, onde foram observados erros relativos ligeiramente maiores que 15% e desvios padrões relativos menores que 12%. Para concentrações de nitrito de 4,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$, o erro relativo e o desvio padrão relativo foram inferiores a 15%, o que indica que o método é preciso no LQ determinado (6,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

4. Conclusão

Na região do vale do Itajaí, a concentração de nitrito na água de torneira é inferior a 4,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (0,2 mg L^{-1}). Portanto, para este experimento didático, foram utilizadas amostras de água de torneira intencionalmente contaminadas com nitrito, as amostras foram fortificadas em faixas de concentração compatíveis com o método utilizado.

Como a ANVISA especifica que a curva analítica deve ter um mínimo de cinco níveis de concentração,⁵² as curvas analíticas construídas neste experimento didático foram preparadas com no mínimo cinco níveis de concentração.

Utilizando imagens digitais, o método Griess-Ilosvay se mostrou efetivo para determinar a concentração de nitrito na faixa de 4,8 a 19,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e reação calorimétrica atinge o equilíbrio em menos de 10 minutos. Por sua vez, o método do Minoxidil foi efetivo para determinar concentração

Tabela 2. Determinação da concentração de nitrito ($\mu\text{mol L}^{-1}$) em amostras de água, fortificadas com nitrito utilizando os valores de G.

^a X _v	^b X _{lab}	^c RSD	^d %E
4,8	4,7	11,9	-3,5
7,2	8,2	6,1	13,2
9,7	11,5	9,0	18,8
12,1	14,8	8,1	22,2
14,5	17,1	1,4	17,8
16,9	18,7	1,3	10,6
19,3	19,6	1,6	-3,5

^aX_v é a concentração verdadeira da amostra. ^bX_{lab} é a média dos valores obtidos experimentalmente (n = 4). ^cRSD calculado com a Eq. 10 (n = 4) e ^d|%E| erro relativo calculado com a Eq. 12

de nitrito na faixa de 200 a 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e a reação só atinge o equilíbrio em 70 minutos.

Os alunos gostaram conduzir um método quantitativo utilizando imagens digitais adquiridas com um scanner. Adicionalmente, eles gostaram de realizar cálculos utilizando planilhas eletrônicas.

Nós concluímos que o experimento didático proposto serviu aos propósitos desta prática de ensino, porque serviu para ensinar conceitos como construir uma curva analítica, determinar a concentração de nitrito em uma amostra desconhecida através da curva analítica, determinar o erro relativo, o LD e o LQ.

Por fim, executar um método quantitativo utilizando imagens digitais representou uma alternativa interessante quando não é possível adquirir e/ou manter espectrofotômetro.

Agradecimentos

Os autores agradecem as bolsas e auxílio financeiro da FAPESC (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Santa Catarina), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), projeto 402226/2016-0, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Ao Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho (Universidade Federal de São Carlos) e a Dr^a Karen Goraieb pelas contribuições no texto.

Referências Bibliográficas

- González-Jiménez, M.; Arenas-Valgañón, J.; Céspedes-Camacho, I. F.; García-Prieto, J. C.; Calle, E.; Casado, J. Detection of Nitrite in Water Using Minoxidil as a Reagent. *Journal of Chemical Education* **2013**, *90*, 1053. [CrossRef]
- Ramos, L. A.; Cavalheiro, C. C. S.; Cavalheiro, E. T. G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. *Química Nova* **2006**, *29*, 1114. [CrossRef]
- EPA, Environmental Protection Agency. Nitrates and Nitrites TNC Presentation. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/nitrates_nitrites_tnc_presentation.pdf>, Acesso em: 29 agosto 2017.
- EPA, Environmental Protection Agency. Drinking Water Contaminants, EPA 816-F-09-0004. Disponível em: <<https://www.nrc.gov/docs/ML1307/ML13078A040.pdf>>, Acesso em: 29 agosto 2017.
- Brasil, Ministério da Saúde. Portaria Nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. [Link]
- CE, Comunidade Europeia. Jornal Oficial das Comunidades Europeias. Directiva 98/83/CE do Conselho de 3 de Novembro de 1998 relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:31998L0083&from=ES>>, Acesso em: 7 de agosto 2017.
- Khan, M. R.; Wabaidur, S. M.; Alothman, Z. A.; Busquets, R.; Naushad, M.; Method for the fast determination of bromate, nitrate and nitrite by ultra performance liquid chromatography–mass spectrometry and their monitoring in Saudi Arabian drinking water with chemometric data treatment. *Talanta* **2016**, *152*, 513. [CrossRef] [PubMed]
- Silva, S. M.; Alves, C. R.; Correia, A. N.; Martins, R. M.; Nobre, A. L. R., Machado, S. A. S.; Mazo, L.H.; Avaca, L. A. Ultramicroeletrodos. Parte II: Construção e Aplicações. *Química Nova* **1998**, *21*, 78. [CrossRef]
- Colombara, R.; Tavares, M. F.; Massaro, S. Determinação simultânea de ânions por eletroforese capilar: características e aplicações. *Química Nova* **1997**, *20*, 512. [CrossRef]
- ABNT NBR 12619, ABNT: São Paulo, 1995.
- Santos, J. L. O.; Leite, O. D.; Vieira, A. D., Jesus, D. S.; Kamogawa, M. Y. J. Use of a digital image in flow analysis: Determination of nitrite and nitrate in natural Waters. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2016**, *27*, 70. [CrossRef]
- Christodouleas, D. C.; Nemiroski, A.; Kumar, A. A.; Whitesides, G. M. Broadly available imaging devices enable high-quality low-cost photometry. *Analytical chemistry* **2015**, *87*, 9170. [CrossRef]
- Gomes, M. S.; Trevizan, L. C., Nóbrega, J. A., Kamogawa, M. Y. Uso de scanner em espectrofotometria de absorção molecular: aplicação em experimento didático enfocando a determinação de ácido ascórbico. *Química Nova* **2008**, *31*, 1577. [CrossRef]
- Kohl, S. K.; Landmark, J. D.; Stickle, D. F. Demonstration of Absorbance Using Digital Color Image Analysis and Colored Solutions. *Journal of Chemical Education* **2006**, *83*, 644. [CrossRef]
- Montangero, M. Determining the amount of copper (II) ions in a solution using a smartphone. *Journal of Chemical Education* **2015**, *92*, 1759. [CrossRef]
- de Moraes, C. D. L.; Silva, S. R.; Vieira, D. S.; Lima, K. M. Integrating a Smartphone and Molecular Modeling for Determining the Binding Constant and Stoichiometry Ratio of the Iron (II)–Phenanthroline Complex: An Activity for Analytical and Physical Chemistry Laboratories. *Journal of Chemical Education* **2016**, *93*, 1760. [CrossRef]

- ¹⁷ Dangkulwanich, M.; Kongnithigarn, K.; Aurnoppakhun, N. Colorimetric Measurements of Amylase Activity: Improved Accuracy and Efficiency with a Smartphone. *Journal of Chemical Education* **2018**, *95*, 141. [CrossRef]
- ¹⁸ Kuntzleman, T. S.; Jacobson, E. C. Teaching Beer's law and absorption spectrophotometry with a smart phone: a substantially simplified protocol. *Journal of Chemical Education* **2016**, *93*, 1249. [CrossRef]
- ¹⁹ Kehoe, E.; Penn, R. L. Introducing colorimetric analysis with camera phones and digital cameras: an activity for high school or general chemistry. *Journal of Chemical Education* **2013**, *90*, 1191. [CrossRef]
- ²⁰ Koesdjojo, M. T.; Pengpumkiat, S.; Wu, Y.; Boonloed, A.; Huynh, D.; Remcho, T. P.; Remcho, V. T. Cost Effective Paper-Based Colorimetric Microfluidic Devices and Mobile Phone Camera Readers for the Classroom. *Journal of Chemical Education* **2015**, *92*, 737. [CrossRef]
- ²¹ Knutson, T. R.; Knutson, C. M.; Mozzetti, A. R.; Campos, A. R.; Haynes, C. L.; Penn, R. L. A Fresh Look at the Crystal Violet Lab with Handheld Camera Colorimetry. *Journal of Chemical Education* **2015**, *92*, 1692. [CrossRef]
- ²² Soldat, D. J.; Barak, P.; Lepore, B. Microscale Colorimetric Analysis Using a Desktop Scanner and Automated Digital Image Analysis. *Journal of Chemical Education* **2009**, *86*, 617. [CrossRef]
- ²³ Moraes, E. P.; Confessda Silva, N. S.; de Moraes, C. D. L.; Neves, L. S. D.; Lima, K. M. G. Low-Cost Method for Quantifying Sodium in Coconut Water and Seawater for the Undergraduate Analytical Chemistry Laboratory: Flame Test, a Mobile Phone Camera, and Image Processing. *Journal of Chemical Education* **2014**, *91*, 1958. [CrossRef]
- ²⁴ Moraes, E. P.; Confessor, M. R.; Gasparotto, L. H. S. Integrating Mobile Phones into Science Teaching To Help Students Develop a Procedure To Evaluate the Corrosion Rate of Iron in Simulated Seawater *Journal of Chemical Education* **2015**, *92*, 1696. [CrossRef]
- ²⁵ Rice, N. P.; de Beer, M. P.; Williamson, M. E. A Simple Educational Method for the Measurement of Liquid Binary Diffusivities. *Journal of Chemical Education* **2014**, *91*, 1185. [CrossRef]
- ²⁶ Campos, A. R.; Knutson, C. M.; Knutson, T. R.; Mozzetti, A. R.; Haynes, C. L.; Penn, R. L. Quantifying Gold Nanoparticle Concentration in a Dietary Supplement Using Smartphone Colorimetry and Google Applications. *Journal of Chemical Education* **2015**, *93*, 318. [CrossRef]
- ²⁷ Gee, C. T.; Kehoe, E.; Pomerantz, W. C.; Penn, R. L. Quantifying Protein Concentrations Using Smartphone Colorimetry: A New Method for an Established Test. *Journal of Chemical Education* **2017**, *94*, 941. [CrossRef]
- ²⁸ Colzani, H.; Rodrigues, Q. E. A. G.; Fogaça, C.; Gelinski, J. M. L. N.; Pereira-Filho, E. R.; Borges, E. M. Phosphate Colorimetric Analysis using a desktop Scanner and automated digital image: A didactical example to teach colorimetric analysis. *Química Nova* **2017**, *40*, 833. [CrossRef]
- ²⁹ Colzani, H.; Scolaro, A. M. T.; Gelinski, J. M. L. N.; Borges, E. M. Determinação de Manganês em Pilhas Utilizando um Scanner. *Revista Virtual de Química* **2017**, *9*, 1672. [CrossRef]
- ³⁰ Volmer, D. A.; Curbani, L.; Parker, T. A.; Garcia, J.; Schultz, L. D.; Borges, E. M. Determination of Titratable Acidity in Wine Using Potentiometric, Conductometric, and Photometric Methods. *Journal of Chemical Education* **2017**, *94*, 1296. [CrossRef]
- ³¹ Bogucki, R.; Greggila, M.; Mallory, P.; Feng, J.; Siman, K.; Khakipoor, B.; King, H.; Smith, A. W. A 3D-Printable Dual Beam Spectrophotometer with Multiplatform Smartphone Adaptor. *Journal of Chemical Education* **2019**, *96*, 1527. [CrossRef]
- ³² Da Silva, R. S.; Borges, E. M. Quantitative Analysis Using a Flatbed Scanner: Aspirin Quantification in Pharmaceutical Tablets. *Journal of Chemical Education* **2019**, *96*, 1519. [CrossRef]
- ³³ da Silva, R. S., Pedroso, A. V., de Jesus, P. C., Gelinski, J. M. L. N., Borges, E. M. Determinação de Vitamina C em Suplementos Alimentares Utilizando Métodos Volumétricos e Espectrofotometria de Absorção Molecular. *Revista Virtual de Química* **2019**, *11*, 155. [CrossRef]
- ³⁴ Costa, V.; Neiva, A.; Pereira-Filho, E. Chromium speciation in leather samples: an experiment using digital images, mobile phones and environmental concepts. *Eclética Química* **2019**, *44*, 62. [CrossRef]
- ³⁵ Pena-Pereira, F.; Villar-Blanco, L.; Lavilla, I.; Bendicho, C. Test for arsenic speciation in waters based on a paper-based analytical device with scanometric detection. *Analytica chimica acta* **2018**, *1011*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁶ Peng, B.; Chen, G.; Li, K.; Zhou, M.; Zhang, J.; Zhao, S. Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with digital image colorimetric analysis for detection of total iron in water and food samples. *Food chemistry* **2017**, *230*, 667. [CrossRef] [PubMed]

- ³⁷ Böck, F. C.; Helfer, G. A.; da Costa, A. B.; Dessuy, M. B.; Ferrão, M. F. Rapid Determination of Ethanol in Sugarcane Spirit Using Partial Least Squares Regression Embedded in Smartphone. *Food Analytical Methods*, **2018**, *11*, 1951. [CrossRef]
- ³⁸ Costa, G. D. O.; Feiteira, F. N.; Schuenck, H. D. M.; Pacheco, W. F. Iodine determination in table salts by digital images analysis. *Analytical Methods* **2018**, *10*, 4463. [CrossRef]
- ³⁹ Botelho, B. G.; Dantas, K. C.; Sena, M. M. Determination of allura red dye in hard candies by using digital images obtained with a mobile phone and N-PLS. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2017**, *167*, 44. [CrossRef]
- ⁴⁰ Valderrama, L.; Valderrama, P. Nondestructive identification of blue pen inks for documentoscopy purpose using iPhone and digital image analysis including an approach for interval confidence estimation in PLS-DA models validation. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2016**, *156*, 188. [CrossRef]
- ⁴¹ Capitán-Vallvey, L. F.; Lopez-Ruiz, N.; Martinez-Olmos, A.; Erenas, M. M.; Palma, A. J. Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review. *Analytica Chimica Acta* **2015**, *899*, 23. [CrossRef]
- ⁴² Zarei, M. Portable biosensing devices for point-of-care diagnostics: Recent developments and applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2017**, *91*, 26. [CrossRef]
- ⁴³ Morbioli, G. G.; Mazzu-Nascimento, T.; Stockton, A. M.; Carrilho, E. Technical aspects and challenges of colorimetric detection with microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs)-A review. *Analytica chimica acta* **2017**, *970*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁴ <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>. Acesso em: 21 setembro 2018
- ⁴⁵ <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/readplate/index.html>. Acesso em: 21 setembro 2018
- ⁴⁶ Thompson, M.; Ellison, S. L.; Wood, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry* **2002**, *74*, 835. [CrossRef]
- ⁴⁷ Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos, DOQ-CGCRE-008, 2016. [Link]
- ⁴⁸ Rocha, F. R., Teixeira, L. S. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. *Química Nova* **2004**, *27*, 807. [CrossRef]
- ⁴⁹ https://drive.google.com/open?id=1A6ubl0tn1ED-D1xLQEpr4rAgUQ1zOV6Rb_. Acesso em: 22 junho 2019.
- ⁵⁰ https://drive.google.com/open?id=1cOaOegEb1D-BoWL_7mMxm3ft9bt7DoTW0. Acesso em: 22 junho 2019.
- ⁵¹ Shrivastava, A.; Gupta, V. B. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists* **2011**, *2*, 21. [CrossRef]
- ⁵² Brasil, Ministério da saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. [Link]
- ⁵³ Oliveira, E. C.; Monteiro, M. I. C.; Pontes, F. V. M.; Almeida, M. D.; Carneiro, M. C.; Silva, L. I. D.; Neto, A. A. Impact of the Analytical Blank in the Uncertainty Evaluation of the Copper Content in Waters by Flame Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of AOAC International* **2012**, *95*, 560. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵⁴ Farias, S. L. D.; Costa, L. G. D.; Calili, R. F.; Rios, R. M.; Oliveira, E. C. D. Avaliação Metrológica da Curva Analítica para Determinação do Teor de Enxofre em Baixíssimas Concentrações em Óleo Diesel S-10. *Química Nova* **2015**, *38*, 852. [CrossRef]
- ⁵⁵ Pimentel, M. F.; Neto, B. B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. *Química Nova* **1996**, *19*, 268. [Link]
- ⁵⁶ Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* **2004**, *27*, 771. [CrossRef]