

ESTUDO DA ADSORÇÃO DE BROMETO DE ETÍDEO EM RESINA XAD-7

Mônica Winkler de Oliveira, Alexandre W. S. Hilsdorf, Astréa F. de Souza Silva e André Fernando Oliveira*

Núcleo de Ciências Ambientais, Universidade de Mogi das Cruzes, Av. Cândido X. A. Souza, 200 08780-911 Mogi das Cruzes - SP, Brasil

Recebido em 3/4/08; aceito em 16/12/08; publicado na web em 11/5/09

STUDY OF ETHIDIUM BROMIDE ADSORPTION ON XAD-7 RESIN. The adsorption of ethidium bromide on XAD-7 resin was studied. The Freundlich model was the most representative isotherm model to describe the sorption behavior. A solid-liquid equilibrium model was proposed to explain the resin mass influence on the sorption. The equilibrium constant value estimated was 2.31. The results showed an ethidium bromide ion-pair physical adsorption, with adsorption enthalpy equals to -19.33 kJ/mol. A pK_2 value equals to 4.69 ± 0.01 was estimated by two distinct methods. The results will be applied to the ethidium bromide preconcentration aiming its decomposition.

Keywords: ethidium bromide; XAD-7 resin; adsorption isotherm.

INTRODUÇÃO

A Química Verde, um conceito importante atualmente, tem como preocupação o desenvolvimento de tecnologias e processos que levam em consideração os impactos à saúde humana e ao meio ambiente, por meio, por exemplo, da diminuição do uso e da geração de materiais perigosos, gerados pelos inúmeros produtos fundamentais à humanidade.¹

O brometo de etídeo (EtBr) é um composto derivado da fenantridina,² cujos equilíbrios ácido-base de Bronsted são apresentados na Figura 1, e muito utilizado em laboratórios de biologia molecular para corar ácidos nucleicos, pois, quando intercalado na estrutura de DNA, o sistema formado fluoresce com uma cor vermelho-alaranjado³ sob luz ultravioleta.^{3,4} Desta maneira, este composto é um severo poluente devido à capacidade de se intercalar na estrutura do DNA, apresentando um elevado potencial mutagênico e carcinogênico.³⁻⁵

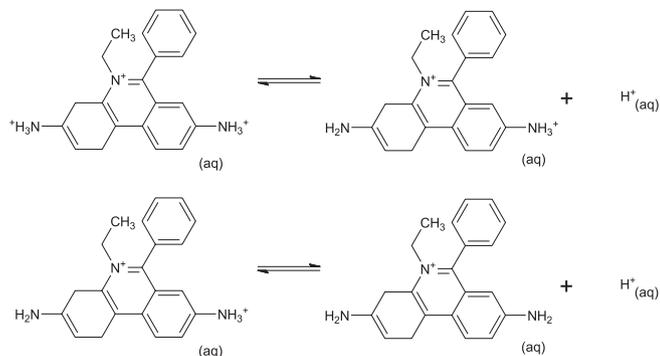


Figura 1. Equilíbrios ácido-base de Bronsted-Lowry do sistema Etídeo (CAS 1239-45-8)

Vários procedimentos são descritos para a destruição do brometo de etídeo, principalmente sua adsorção em carvão ativo seguida de incineração do conjunto,^{6,7} enquanto que outros procedimentos incluem a destruição com agentes oxidantes e redutores,^{2,4} como permanganato de potássio e hipoclorito de sódio. Alguns autores,

entretanto, não recomendam essa prática, pois há indícios da produção de resíduos também tóxicos.⁴ Além disso, as baixas concentrações do brometo de etídeo nos resíduos também dificultam sua destruição.²

A XAD-7 é uma resina polimérica adsorvente composta por monômeros de éster-acrílico que possui polaridade intermediária. Tem sido usada para remover poluentes orgânicos de resíduos aquosos, para adsorver tanto materiais hidrofóbicos de água como materiais hidrofílicos de sistemas não-aquosos,⁸ assim como na pré-concentração de substâncias húmicas⁹ e metais, após adsorção de compostos quelantes.¹⁰

O estudo do comportamento do EtBr sobre XAD-7 é importante para o desenvolvimento de metodologia para pré-concentração desse composto, visando posterior destruição. Espera-se a adsorção deste cátion nesta resina neutra, através da formação de par iônico.¹¹ O objetivo deste trabalho foi, portanto, estudar o processo de adsorção do brometo de etídeo em resina XAD-7.

PARTE EXPERIMENTAL

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e usou-se água deionizada em todos os experimentos. Os espectros de absorção foram obtidos em espectrofotômetro UV-visível Agilent 8453A com cubetas de quartzo com caminho óptico de 10 mm.

Solução de brometo de etídeo - (EtBr) (Merck) $1,23 \cdot 10^{-3}$ mol/L. As demais soluções de trabalho foram preparadas a partir dessa solução estoque por diluição.

Solução tampão universal - foi preparada uma solução contendo citrato 0,05 mol/L, fosfato 0,04 mol/L e ácido bórico 0,05 mol/L, cujo pH foi ajustado com HCl 4,8 mol/L. A força iônica foi corrigida com NaCl para o valor de 0,5 mol/L.

Pré-condicionamento da resina XAD-7 - para garantir a ausência de substâncias previamente adsorvidas à resina, uma massa de resina nova foi lavada com água deionizada e mantida em uma solução de HCl 0,12 mol/L, sob agitação magnética por 4 h. A solução foi filtrada e após a lavagem da resina, com água deionizada, foi mantida em uma solução de NaOH 0,1 mol/L (Synth) sob agitação magnética por mais 4 h. Após este tempo, a resina foi novamente lavada e mantida em água deionizada por uma noite. O tratamento foi finalizado mantendo-se a resina em metanol (J.T Baker) sob agitação por 4 h e depois de filtrada, seca em dessecador a vácuo.¹²

*e-mail: ferqa@umc.br

Procedimento

Para obtenção das isotermas utilizou-se 10 mL de cada solução de EtBr com concentrações de 10 a 100 $\mu\text{mol/L}$, em béqueres contendo diferentes massas de resina de 20 a 500 mg. As misturas foram mantidas em agitação magnética por 10 min e a concentração de EtBr em equilíbrio foi determinada no sobrenadante.

Os efeitos do pH e da temperatura na adsorção de soluto foram avaliados com variação no pH de 2,0 a 7,0 e da temperatura de 10 a 40 $^{\circ}\text{C}$, utilizando-se uma massa constante de 200 mg de resina.

A resina também foi avaliada em termos de retenção de prótons. Para este estudo, uma coluna contendo a resina foi percolada com 2 mL de ácido clorídrico 1 mol/L e lavada com água. Posteriormente pesou-se 500 mg dessa resina, colocou-se 5 mL de água e a mistura foi titulada com hidróxido de sódio 0,09 mol/L.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização e método de quantificação do brometo de etídeo

Para a determinação da concentração de brometo de etídeo na fase aquosa, optou-se pela espectrofotometria molecular. O espectro de absorção do composto apresenta 4 máximos de absorção em 213, 286, 317 e 480 nm.

Os valores de absorvidades molares aparentes referentes aos comprimentos de onda citados foram determinados mediante curvas analíticas obtendo-se de $4,4 \cdot 10^4$; $5,5 \cdot 10^4$; $1,6 \cdot 10^4$ e $5,9 \cdot 10^3$ L/(mol cm), respectivamente, para 213, 286, 317 e 480 nm. Desta maneira, foi escolhido o comprimento de onda igual a 286 nm para o monitoramento da concentração de brometo de etídeo por apresentar a maior sensibilidade da curva analítica (Figura 2).

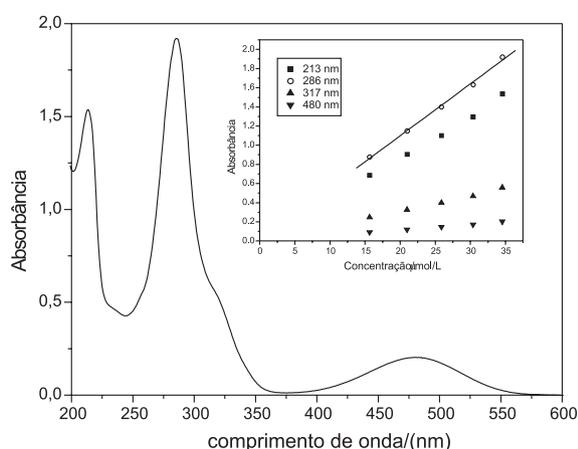


Figura 2. Espectro de absorção molecular de solução de EtBr 35 $\mu\text{mol/L}$. No detalhe, são apresentadas as curvas analíticas nos valores de comprimentos de onda com máximo de absorção

O comportamento do brometo de etídeo foi estudado em diversos valores de pH em tampão universal, conforme apresentado na Figura 3, a fim de compreender o seu comportamento ácido-base. Com o aumento do pH do meio, observa-se o aumento da banda na região de 213 nm e a diminuição em 226 nm devido à diminuição da concentração da espécie protonada. A elevação da linha base abaixo de 213 nm foi devida à presença do tampão universal.

A influência do pH no espectro é devido ao equilíbrio de transferência de prótons (equilíbrio ácido-base de Bronsted-Lowry). Pela análise da estrutura da molécula, é possível estimar dois sítios

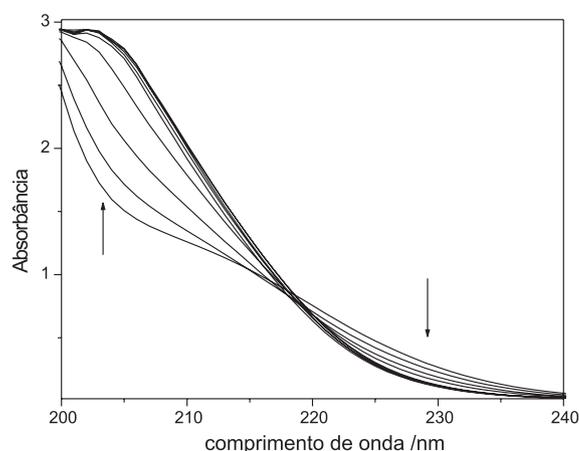


Figura 3. Espectros de EtBr 0,15 $\mu\text{mol/L}$ em diferentes valores de pH. Setas indicam valores crescentes de pH

de protonação, ou seja, as aminas aromáticas, as quais apresentam, usualmente, valores de pKa menores que 5,0, mas, devido à conjugação na fenantridina, uma delas devem apresentar um valor algumas unidades mais baixo.¹³

Assim, os graus de dissociação foram então estimados, considerando-se um sistema pseudo-monoprótico e, portanto, utilizando-se a Equação 1¹⁴

$$\alpha_i = \frac{A_j - B}{A_{\text{máx}} - B} \quad (1)$$

onde α_i é o grau de dissociação para a espécie a espécie 'i'; A_j é a absorbância no comprimento de onda (205 e 226 nm) para o pH igual a j; $A_{\text{máx}}$, a maior absorbância medida nesse comprimento de onda no pH onde se supõe que o grau de dissociação seja igual a 1 e, B é o valor do branco nesse mesmo comprimento de onda.

A partir dos dados experimentais, onde é observado apenas um equilíbrio ácido-base, considera-se que o próton removido nessa faixa de pH corresponde ao segundo próton ionizável do composto (associado ao segundo pKa do composto), devido à elevada acidez do primeiro sítio de protonação, como já discutido.

Desta maneira o pK₂ foi estimado por dois métodos distintos (Figura 4). O primeiro, utilizando a forma logarítmica da equação da constante de acidez (Equação 2)

$$\text{pH} = \text{pK}_2 + \log\left(\frac{\alpha_2}{\alpha_1}\right) \quad (2)$$

onde α_1 e α_2 são, respectivamente, os graus de dissociação da espécie protonada e com um próton a menos. Foi verificado o comportamento linear da Equação 2 sendo, então, o pKa estimado de $4,69 \pm 0,01$ estimado por regressão linear (Figura 4).

Para a estimativa do pKa foi também testado um método não-linear sigmoidal (sigmóide de Boltzmann) para a curva de α_2 em função do pH (Figura 4). Este método é útil para determinar o pKa em sistemas cuja resposta analítica (R) é função apenas de uma espécie do equilíbrio ácido - base pela Equação 3

$$R(\text{pH}) = R_i \cdot \alpha_i + R_o, \quad (3)$$

onde R_o é uma componente constante da resposta que não é influenciada pelo pH e R_i é a resposta da espécie que influencia o sistema. Assim, considerando-se um sistema pseudomonopróticos, o grau de dissociação pode ser calculado pela Equação 4.

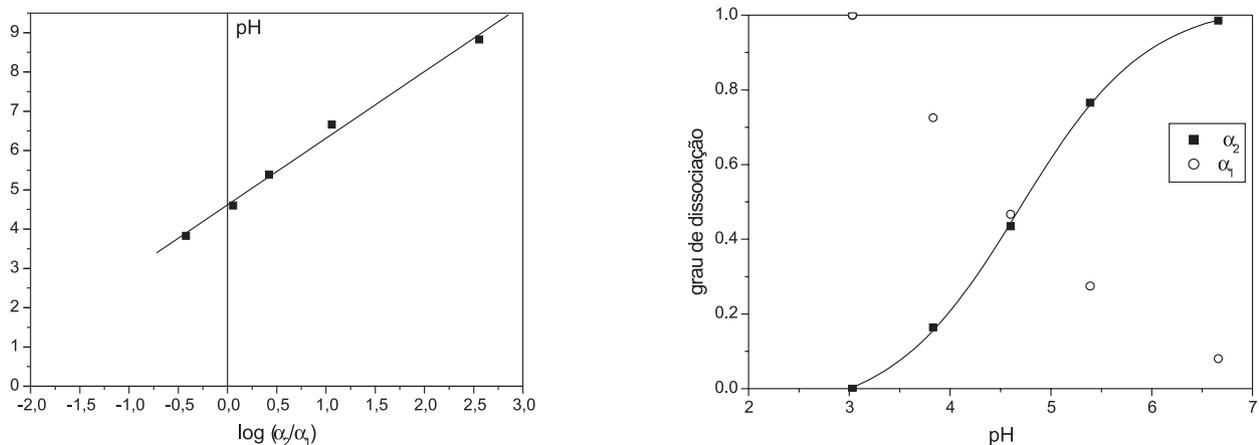


Figura 4. Estimativa do pK_2 do EtBr por dois métodos: (A) método de linearização; (B) método não-linear sigmoidal

$$\alpha_2 = \frac{1}{(1 + 10^{(pH - pK_a)})} \quad (4)$$

Assim, foram obtidos os parâmetros para o modelo não-linear apresentado na Equação 5, com auxílio do software Microcal Origin 6.0

$$y = \frac{(A_1 - A_2)}{(1 + e^{(x - x_0)/dx})} + A_2 \quad (5)$$

onde os termos A_1 e A_2 devem diferir por uma unidade, sendo o segundo igual à absorbância da solução na condição em que o grau de dissociação do composto é igual a 0, ou seja, o valor do branco. O valor estimado do expoente x_0 é igual ao pK_a , fixando-se o termo dx igual a $1/\ln(10)$, ou seja, 0,43429. O valor de pK_a obtido foi igual a $4,69 \pm 0,05$. Este último método é mais interessante, pois não exige que a resposta seja obtida em um grande intervalo de pH.

A importância da determinação dos valores de pK_a de um sistema químico em qualquer estudo em solução (principalmente em solução aquosa) é a compreensão do comportamento das espécies desse sistema em solução.

Estudos de adsorção

No estudo das isotermas do brometo de etídeo adsorvido em resina XAD-7, utilizaram-se diferentes massas da resina e o valor do pH das soluções foi mantido em 7,0, valor em que as aminas estão desprotonadas. A partir das medidas de absorbância (em 286 nm), realizadas após o tempo de agitação e repouso, foram calculadas as quantidades de brometo de etídeo adsorvidas. É importante ressaltar que os valores de pH das soluções foram sempre ajustados para o mesmo valor antes das medidas de absorbância (isto é, igual 4,0) para garantir o mesmo comportamento do sistema em relação à curva analítica.

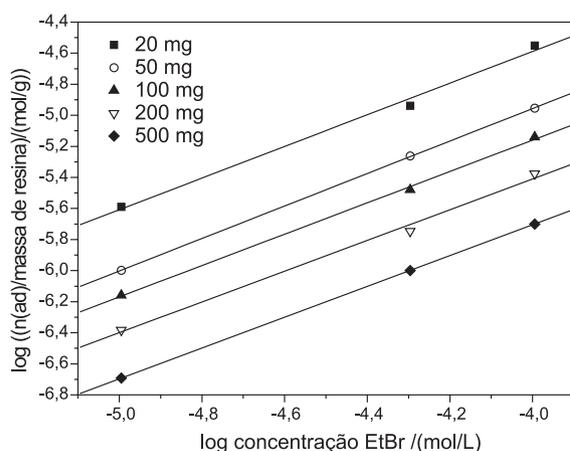


Figura 5. Isotermas de Freundlich para EtBr em diferentes massas de resina XAD-7

O modelo de Langmuir não se mostrou adequado para os resultados obtidos. Foi estudado o modelo da isoterma de Freundlich (Equação 6) o qual apresentou um comportamento linear em todas as condições estudadas, como pode ser observado na Figura 5.

$$[EtBr_s] = K_f \cdot C_T^{1/b} \quad (6)$$

onde K_f é capacidade de adsorção e $1/b$ é intensidade de adsorção. Esses parâmetros foram obtidos por regressão linear da curva de linearização (Equação 7) e são apresentados na Tabela 1.

$$\log[EtBr_s] = \log K_f + \frac{1}{b} \log C_T \quad (7)$$

Tabela 1. Parâmetros obtidos para isoterma de Freundlich, em pH 4,0, a partir da Equação 7

Massa de resina/mg	K_f	$1/n$	r^2	sd
20	$0,31 \pm 0,29$	$1,02 \pm 0,08$	0,9934	0,0601
50	$0,17 \pm 0,01$	$1,00 \pm 0,70$	1,0000	0,0053
100	$0,076 \pm 0,028$	$1,01 \pm 0,04$	0,9988	0,0254
200	$0,035 \pm 0,029$	$0,99 \pm 0,07$	0,9945	0,0533
500	$0,018 \pm 0,000$	$0,9920 \pm 0,0002$	1,0000	0,0001

K_f , capacidade de adsorção; $1/n$ intensidade de adsorção, r^2 coeficiente de determinação e sd, estimativa dos desvios padrão dos resíduos

Assim, a inclinação ($1/n$) não diferiu significativamente da unidade, ao nível de 95% de confiança,¹⁵ para todas as condições experimentais estudadas. Desta maneira, a isoterma de Freundlich é chamada “linear”,¹⁶ ou tipo constant partition.¹⁷

O coeficiente de adsorção K_f permite identificar a capacidade do adsorvente em reter um soluto; pode ser entendido como uma medida da distribuição de equilíbrio entre as fases líquida e sólida.¹⁸ Os valores apresentados na Tabela 1 sugerem interações de natureza dispersiva (forças de London).¹⁹

Ainda que o modelo de Freundlich seja usualmente tratado como empírico, para racionalizar os resultados tomou-se por base um modelo de equilíbrio de adsorção sólido-líquido, considerando-se o par-iônico do brometo de etídeo



quantitativamente definido pela constante de equilíbrio K_s e pelo balanço de matéria,

$$K_s = \frac{[\text{EtBr}_{(s)}]}{[\text{EtBr}_{(aq)}]} \quad (9)$$

$$n_T = n_R + n_{aq} = C_T V_{aq} = [\text{EtBr}_{(s)}] \cdot m_R + [\text{EtBr}_{(aq)}] \cdot V_{aq} \quad (10)$$

onde n é a quantidade de matéria de brometo de etídeo, os sub-índices R e aq se referem às fases resina e aquosa, respectivamente. C_T é a concentração total de brometo de etídeo inicialmente na fase aquosa antes de estar em contato com a resina isenta desse composto.

As Equações 9 e 10 podem ser rearranjadas para estabelecer a relação entre a concentração de brometo de etídeo adsorvido e a sua concentração total no sistema.

$$C_T = [\text{EtBr}_{(s)}] \cdot \left(\frac{m_R}{V_o} + \frac{1}{K_s} \right) \Rightarrow [\text{EtBr}_{(s)}] = \frac{C_T}{\left(\frac{m_R}{V_o} + \frac{1}{K_s} \right)} = K_f C_T \quad (11)$$

Assim, a Equação 11 é uma expressão clássica da Equação de Freundlich linear, se pH, temperatura e força iônica são mantidos constantes. É interessante observar que o modelo utilizado é análogo ao equilíbrio de partição.²⁰

A relação do termo linear com a massa de resina pode ser obtida a partir da Equação 7.

$$\frac{1}{K_f} = \left(\frac{1}{V_o} \right) m_R + \left(\frac{1}{K_s} \right) \quad (12)$$

Na Figura 6 é apresentado o gráfico da recíproca dos termos lineares da Equação logarítmica de Freundlich e a massa de resina, com valores apresentados na Tabela 1. Observando o comportamento

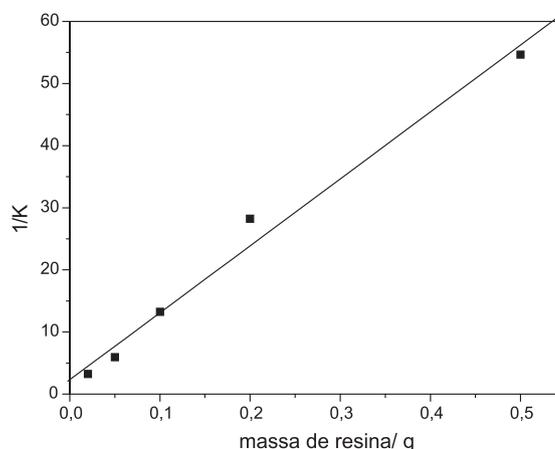


Figura 6. Relação da capacidade de absorção K_f e massa da resina

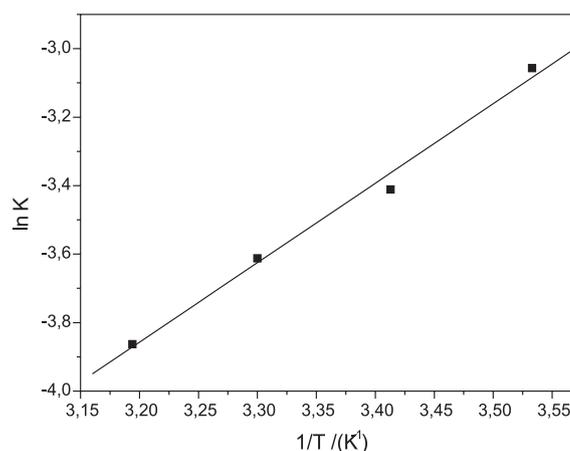


Figura 7. Estimativa da entalpia de adsorção mediante a Equação de van't Hoff

linear previsto na Equação 12, estimou-se a constante de equilíbrio de adsorção condicional K_s em 2,31 L/mg a 25 °C.

As isotermas de Freundlich em diferentes temperaturas foram estudadas e a entalpia de adsorção foi obtida mediante o gráfico de $\ln K_f$ versus $1/T$ (Figura 7) e através da Equação de van't Hoff (Equação 13). Utilizando-se dos valores de K_f obtidos (Tabela 2), estimou-se a entalpia de adsorção em $-19,7 \pm 1,1$ kJ/mol. Isto significa que a adsorção é um processo exotérmico, ou seja, o valor de K_f tende a diminuir à medida que a temperatura se eleva.²¹ Além disso, esse valor é compatível com aqueles processos relacionados a uma adsorção física.²²

$$\frac{d(\ln K_f)}{d(1/T)} = -\frac{\Delta H_{ad}}{R} \quad (13)$$

A fim de avaliar a presença de grupos carboxílicos residuais na resina devido à eventual hidrólise dos ésteres acrílicos, a qual

Tabela 2. Resultados do ajuste das isotermas de Freundlich com o aumento de temperatura

T/(°C)	K_f/K	$1/n$	r^2	sd
10	0,047±0,015	1,024±0,016	0,9998	0,0112
20	0,033±0,041	0,9864±0,0572	0,9967	0,0415
30	0,027±0,062	0,9663±0,0950	0,9904	0,0689
40	0,021±0,007	0,9427±0,0158	0,9997	0,0113

poderia então atuar como uma resina aniônica fraca, uma massa de resina foi titulada com NaOH após ter sido eluída com HCl 1,0 mL e lavada com água. Não foram observados nenhuma desprotonação nem ponto de equivalência, de maneira que é razoável considerar a resina realmente neutra.

No estudo de adsorção em soluções com diferentes valores de pH, não foram observadas variações significativas na adsorção, o que poderia ser atribuído ao fato de não haver a formação de cargas na resina ou no composto e a adsorção ser mesmo de natureza física, onde o adsorbato se encontra ligado à superfície por forças de van der Waals.²² Com essas evidências, sugere-se que esteja havendo a adsorção do par-iônico brometo de etídeo e não apenas do cátion. A estabilidade do par iônico está relacionada à grande polarizabilidade do ânion e ao tamanho do cátion.²³

CONCLUSÕES

O comportamento do brometo de etídeo em solução foi caracterizado com auxílio da determinação do pK_a utilizando-se dois métodos distintos para esse cálculo. O valor obtido foi concordante entre ambos e igual a $4,69 \pm 0,01$. A isoterma linear de Freundlich mostrou-se adequada para explicar a adsorção de EtBr sobre a resina XAD-7 e um modelo de equilíbrio sólido-líquido foi aplicado para esclarecer a influência da massa de resina sobre a adsorção. A constante de equilíbrio envolvida foi também estimada e com um valor igual a 2,31. O pH da solução não influenciou significativamente o sistema, enquanto que com o aumento da temperatura se determinou a entalpia de adsorção da ordem de -19,33 kJ/mol, que indica adsorções por interações físicas apenas.

REFERÊNCIAS

1. Prado, A. G. S.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 738.
2. Zoher, R.; Billich, A.; Keller, U.; Mesnner, P.; *Biol. Chem.* **1988**, *369*, 1191.
3. http://en.wikipedia.org/wiki/Ethidium_bromide, acessada em Março 2008.
4. Lunn, G.; Sansone, E. B.; *Anal. Biochem.* **1987**, *162*, 453.
5. Quillardet, P.; Hofnung, M. O.; *Trends Genet.* **1988**, *4*, 89.
6. Olivier, B.; *Trends Genet.* **1988**, *4*, 90.
7. Hengen, P. N.; *TIBS* **1994**, *19*, 257.
8. <http://www.sigmaaldrich.com/chemistry/aldrich-chemistry/techbulletins/al-142/amberlite-amberlyst.html>, acessada em Dezembro 2008; http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=XAD7|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC, acessada em Dezembro 2008.
9. Santos, A.; Botero, W. G.; Bellin, I. C.; Oliveira, L. C.; Rocha, J. C.; Mendonça, A. G. R.; Godinho, A. F.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 824; Rocha, J. C.; Rosa, A. H.; *Substâncias húmicas aquáticas Interações com espécies metálicas*, 1ª ed., Ed. da UNESP: São Paulo, 2003.
10. Tewari, P. K.; Singh, A. K.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *367*, 562; Subramanian, K. S.; Meranger, J. C.; Wan, C. C.; Corsini, A.; *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **1985**, *19*, 261.
11. Yang, W.; Xia, M.; Li, A.; Yang, L.; Zhan, Q.; *React. Funct. Polym.* **2007**, *67*, 609; Casado-Torrones, S.; Fernández-Sánchez, J. F.; Díaz, B. C.; Carretero, A. S.; Fernández-Gutiérrez, A.; *J. Pharm. Biom. Anal.* **2005**, *38*, 785.
12. Santos, H.O.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de Mogi das Cruzes, Brasil, 2006.
13. Sykes, P.; *A Guidebook to Mechanism in Organic Chemistry*, 6th ed., Pearson: Malásia, 1986; Oliveira, A. F.; *Equilíbrio em solução aquosa orientado à aplicação*, Átomo: Campinas, 2009, no prelo; Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P.; *Organic Chemistry*, Oxford University: Oxford, 2001.
14. Previdello, B. A. F.; Carvalho, F. R.; Tessaro, A. L.; Souza, V. R.; Hioka, N.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 600.
15. Massart, D. L.; Vandeginste, B. G.; Deming, M. S.; Michotte, N. Y.; Kaufman, L.; *Chemometrics: a Textbook*, Elsevier: Amsterdam, 1988.
16. Wedler, G.; *Manual de Química Física*, Calouste Gulbenkian: Lisboa, 2001.
17. Falone, S. Z.; Vieira, E. M.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 849.
18. Alcântara, M. A. K.; Camargo, O. A.; *Sci. Agri.* **2001**, *58*, 567.
19. Guillarduci, V. V. S.; Mesquita, J. P.; Martelli, P. B.; Gorgulho, H. F.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 1226.
20. Stumm, W.; Morgan, J. J.; *Aquatic Chemistry*, 3rd ed., Wiley Interscience: New York, 1996.
21. Atkins, P.; *Físico-química*, LTC: Rio de Janeiro, 2002, vol. 1.
22. Shaw, D. J.; *Introdução à química dos colóides e de superfícies*, EDUSP/Edgard Blucher: São Paulo, 1975.
23. Huheey, J. E.; Keiter, E. A.; Keiter, R.; *Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity*, 4th ed., Prentice Hall: New York, 1977.