

MONITORAMENTO DO CORANTE PARAROSANILINA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

*Humberto da Silva Junior; Gutto Raffyson Silva de Freitas; Diogo Roberto Ferreira Néri; Francisco Régis da Silva Pereira; Robson Fernandes de Farias; Francisco Claudece Pereira**

Departamento de Química - Universidade Federal do Rio Grande do Norte UFRN, Brasil

C P 1524, 59072-970, Natal-RN, Brasil.

**E-mail: claudece@ufrnet.br*

Resumo: O corante pararosanilina (P) é um pigmento que apresenta um relevante papel na análise de substâncias química e bactérias do tipo Gram positivo e negativo, além de outros microorganismos. Os ensaios potenciométricos de P mostraram que o corante é um ácido monoprótico e fraco ($pK_a = 8,78$); enquanto a espectrofotometria permitiu estimar seu coeficiente de absorvidade molar (ϵ) igual a $1,48 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$. A curva analítica para a determinação de P apresenta linearidade entre $7,36 \times 10^{-6}$ a $7,36 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e a metodologia foi aplicação em amostras biológicas.

Palavras-chave: pararosanilina, constante de ionização, coeficiente de absorvidade molar, determinação.

Introdução

A conhecida classe dos corantes, baseada na família dos trifenilmetanos, é largamente utilizada na indústria têxtil na pigmentação de nylon, lã, algodão, seda, etc. De forma similar, estes pigmentos desenvolvem um papel relevante quando usados em ensaios bacteriológicos e histopatológicos, bem como na identificação de patógenos de interesse da clínica médica, enquanto outros apresentam ampla atividade bactericida e fungicida [1].

De acordo com a literatura [2] esta categoria de corantes pode apresentar riscos quanto a neoplasia de tecidos, devido intoxicações por atividades ocupacionais e/ou contaminação ambiental. A toxicidade destes, baseia-se em sua reatividade com espécies oxigenadas ou excitação durante terapias fotodinâmicas. Assim, seu potencial carcinogênico encontra-se correlacionado a sua oxidação através de sistemas específicos, ou pela ação

da enzima peroxidase, produzida pela tireóide, gerando aminas primárias e aromáticas [3].

Pararosanilina (P), cloridrato de benzeno-amina 4-(4-aminofenil)(4-imino-2,5-ciclohexadiano-1-ilideno)-metil, paramagenta, magenta ou fucsina básica (CAS 569-61-9; CI 42500), Figura 1, é um corante da família dos triarilmetanos, e tem destacada aplicação da análise de diversos compostos nas mais distintas matrizes, além de apresentar potencialidades na investigação clínica de bactérias do tipo Gram positivo e negativo e outros tipos de microorganismos [2].

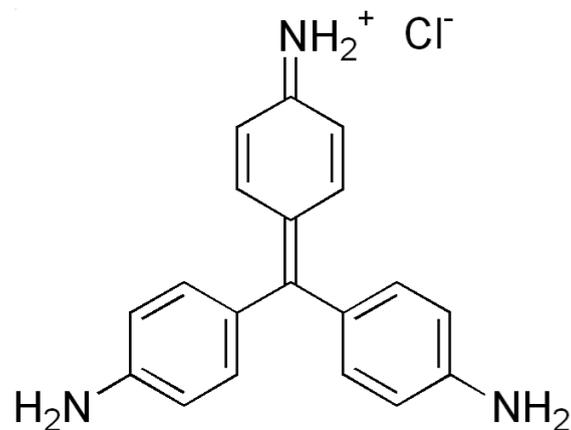


Figura 1. Fórmula estrutural da pararosanilina.

Este composto é um dos raros corantes que apresenta a propriedade de se tornar inflamável em determinadas condições. Além de amplamente utilizado pela indústria têxtil e de curtume, também apresenta larga atividade como marcador de colágeno, tecido muscular e mitocondrial, além de identificador da presença do bacilo de Koch. Em adição, o corante possui amplo espectro anestésico, bactericida e fungicida. Suas propriedades toxicológicas manifestam-se pela irritação da derme, dos olhos, aparelho respiratório; podendo alcançar o trato gastrointestinal provocando náuseas, vômitos, diarreia etc. Relatos da literatura têm mostrado que a exposição prolongada ao corante, pode causar danos aos constituintes do sangue, fígado, baço e na tireóide, bem como ao sistema nervoso, além de sintomas de enxaqueca, vertigens, letargias e contração muscular [4]. Alguns trabalhos têm mostrado que o corante encontra-se associado ao aumento no risco de incidência de câncer de bexiga [5].

Muitos dos impactos ambientais, decorrentes de descartes sem prévio tratamento de águas contendo esta categoria de corantes, são atribuídos a interações químicas do tipo não covalentes com componentes celulares, tais como, ácidos nucleicos e membranas; além de eventos redox irreversíveis gerando radicais livres [6].

Comumente, as águas de descartes, impregnadas com este tipo de corante, são tratadas através do emprego de métodos que incluem adsorção, precipitação, floculação, fotólise, oxidação e

redução, tratamento eletroquímico e extração por formação de par iônico [1].

Assim, e considerando o alto risco de descarte deliberado deste tipo de corante em corpos d'água, sistemas aquíferos e mananciais de abastecimentos, várias iniciativas têm sido desenvolvidas a fim de degradar este tipo de poluente [1-3, 7-14].

Do ponto de vista da análise química, o corante P tem encontrado larga aplicação na determinação das mais variadas espécies. O monitoramento espectrofotométrico de SO_2 pode ser alcançado através de sua conversão a um cromóforo produzido com o corante [15-20]. De forma similar, a aplicação de protocolos experimentais apropriados, capacita a análise de distintos compostos, tais como, ácido pícrico, sacarina, fenil butazona e a droga Probenecida [21], metanol [22], bromato [23, 24], brometo [25], SO_3^{2-} [26, 27], Formaldeído [28-35], H_2S [36-38], o pesticida organoclorado endossulfano [39], substâncias tensoativas [40], os metais ouro [41] e Paládio [42].

Dados da literatura mostram que o corante pode ser determinado diretamente através de técnicas espectrofotométricas. O protocolo experimental relata o emprego de nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4) em meio de sulfato de dodecil de sódio, a fim de possibilitar a adsorção de P na superfície das nanoestruturas. Este fenômeno capacita as nanopartículas de ferro a uma etapa de pré-concentração e separação deste analito de uma dada matriz. O emprego de técnicas de absorção molecular na região ultravioleta e visível permitiu estabelecer uma curva de trabalho para P que apresenta linearidade no intervalo de concentração entre 10 a 300 ng mL^{-1} e limite de detecção de 7,3 ng mL^{-1} e desvio-padrão de 4%. A sistemática proposta foi aplicada na análise de amostras de um dos rios existentes no Irã [43].

A finalidade do presente trabalho é investigar o comportamento potenciométrico e espectrofotométrico do corante pararosanilina em meio aquoso, em amplo intervalo de pH. Estabelecer as melhores condições experimentais para a sua determinação em matrizes biológica, e extrair alguns parâmetros químicos, tais como sua constante de ionização (K_a) e seu coeficiente de absorvidade molar (ϵ).

Materiais e métodos

Equipamentos

Um espectrofotômetro UV-VIS 1650 PC da marca Shimadzu. Todos os experimentos foram conduzidos com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico. Para a preparação de todas as soluções de trabalho foi empregada uma balança analítica da marca Marte Mict. Todos os valores de pH das soluções utilizadas foram ajustados com um pHmetro da marca Marconi PA200, modelo RS232. Antes de seu uso, o eletrodo combinando de vidro foi previamente calibrado com as soluções fornecidas pelo fabricante. Este equipamento também foi empregado para os estudos volumétricos do corante.

Reagentes

Corante pararosanilina (Merck), ácido acético (Vtec), ácido fosfórico (Merck), ácido bórico (Merck), hidróxido de sódio (Merck), biftalato de potássio (Merck) e etanol (Merck). Todos os reagentes apresentavam grau analítico.

Procedimentos experimentais

Soluções tampão Britton e Robinson (B-R) foram obtidas através da mistura dos ácidos acético, fosfórico e bórico. O pH das soluções, no intervalo de 2 a 12, foi ajustado pela adição de hidróxido de sódio. Soluções do corante foram obtidas através da dissolução do sal diretamente em água. Todas as soluções foram montadas utilizando água destilada.

A curva volumétrica de P foi gerada através da adição de 40mL de P na concentração de 0,0948 mol L^{-1} (50% $\text{H}_2\text{O}:\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) em um becker e, na bureta, NaOH 0,0936 mol L^{-1} , previamente padronizado.

As amostras aquosas, contendo material biológico e o corante P, foram gentilmente cedidas

pelo Centro de Formação Tecnológico (CEFET) da cidade de Natal-RN. Estas foram coletadas e, antes da análise, submetidas a processos de diluição.

Resultados e discussão

Comportamento potenciométrico de P

O estudo preliminar sobre o comportamento do corante P, em função das variações nos valores de pH do meio reacional, foi avaliado através da construção da curva volumétrica (pH versus volume de NaOH). O resultado deste ensaio é mostrado na Figura 2.

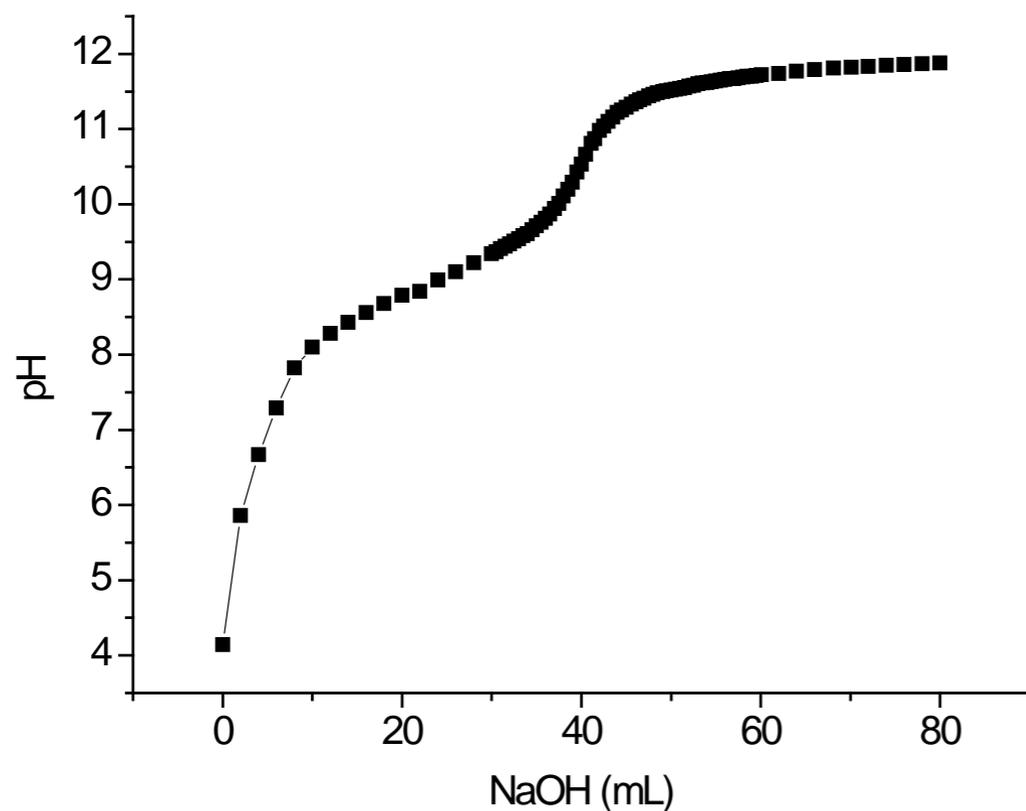


Figura 2. Curva volumétrica da titulação de 40 mL de P 0,095 mol L⁻¹ com NaOH 0,094 mol L⁻¹.

A curva sigmoide mostra que o corante se comporta como um ácido fraco [44]. Somente um ponto de equivalência pode ser constatado em valores de 40,5 mL da adição de NaOH, confirmando que a substância é um ácido monoprótico. Estes resultados são condizentes com o processo de desprotonação de um dos grupos aminas existentes na estrutura do corante, (Figura 1).

Os dados volumétricos permitiram calcular as concentrações da espécie salina e do ácido remanescente. Soluções que apresentam este tipo de componentes são chamadas de soluções reguladoras e, seus estudos são regidos pela relação de Henderson e Hasselbalch [44]. Assim, a expressão que permite a avaliação de pH deste sistema é:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \left\{ \frac{[\text{sal}]}{[\text{ácido}]} \right\}.$$

No caso da titulação de corante pararosianilina com NaOH, a função salina será representada por P, enquanto sua forma ácida por HP. Assim, e considerando esta relação como uma função linear, o gráfico dos valores das concentrações de P e HP em função do pH permite determinar o valor de pKa. Esta relação é mostrada na Figura 3.

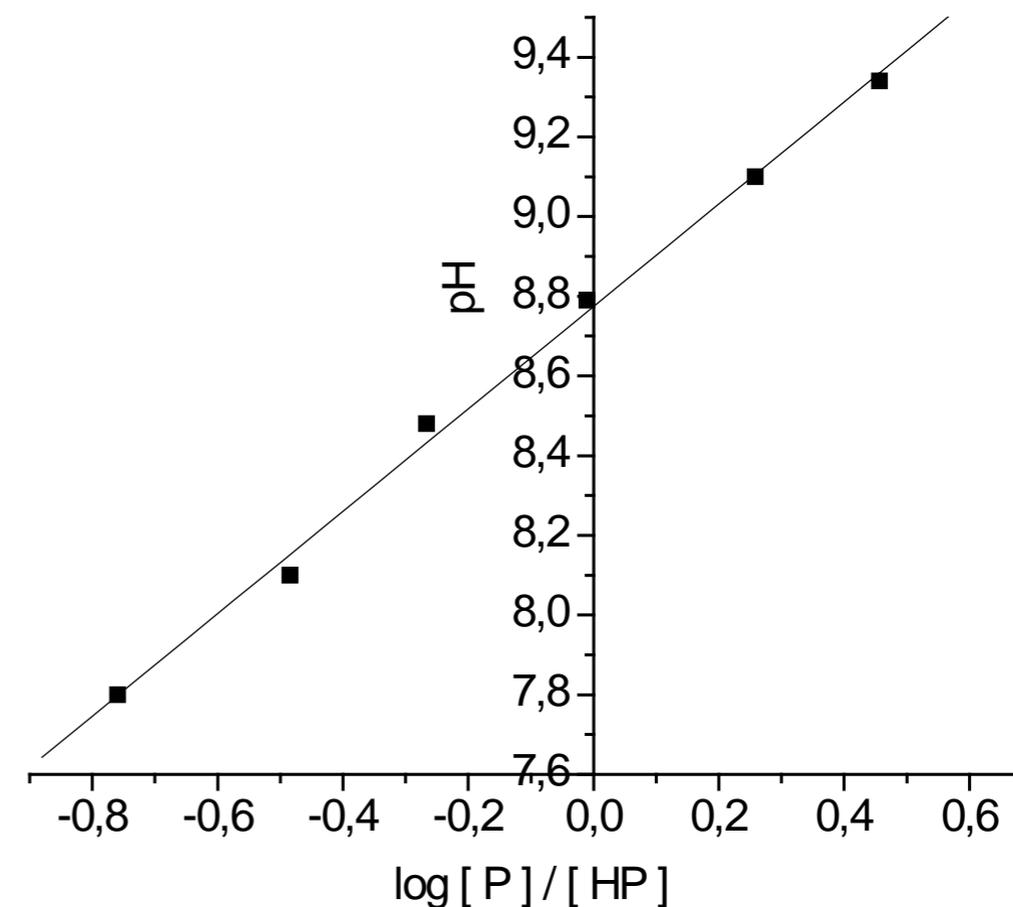


Figura 3. Gráfico da relação de pH versus $\log \left\{ \frac{[P]}{[HP]} \right\}$

A regressão linear destes dados permite a obtenção do coeficiente linear igual a 8,78. Este valor fornece o pKa da forma ácida (HP) o que corresponde a um Ka de $1,66 \times 10^{-9}$. Estes dados mostram que o ácido apresenta uma pequena constante de ionização e, portanto, é uma substância fraca.

Comportamento espectrofotométrico de P

O comportamento espectrofotométrico de P foi inicialmente investigado para concentração de

$6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em solução tampão B-R pH 3,0. Os espectros são bem caracterizados apresentando duas bandas de absorção. Em λ 545 nm observa-se um intenso pico correspondente a absorção da estrutura quinoidal existente no corante [7]. Em λ 289 nm é possível constatar a ocorrência de um pequeno evento atribuído a absorção da radiação eletromagnética pelas funções aromáticas do pigmento. Em λ 490 nm e λ 340 nm registram-se pequenos ombros, Figura 4.

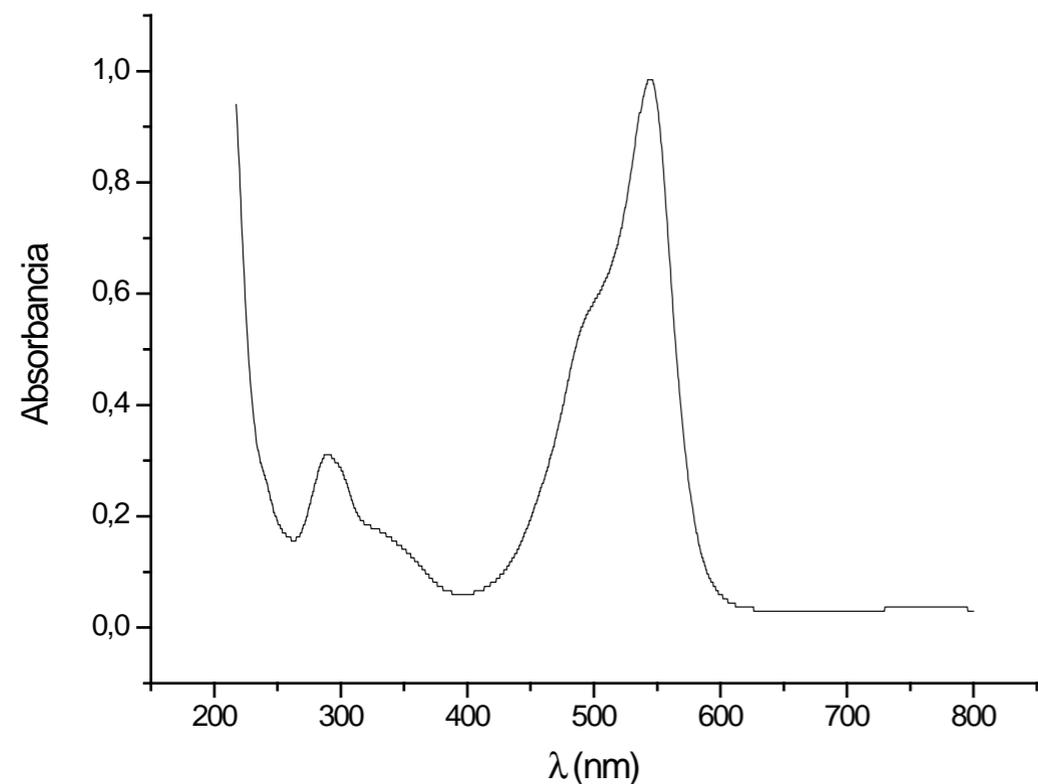


Figura 4. Espectro de absorção de $6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de pararosanilina em tampão B-R pH 3,0.

O efeito das variações da concentração hidrogeniônica sobre os sinais espectrofotométricos de $8,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de P foi avaliado em amplo intervalo de pH de 2,0 a 12,0 em sistema tamponante B-R, Figura 5.

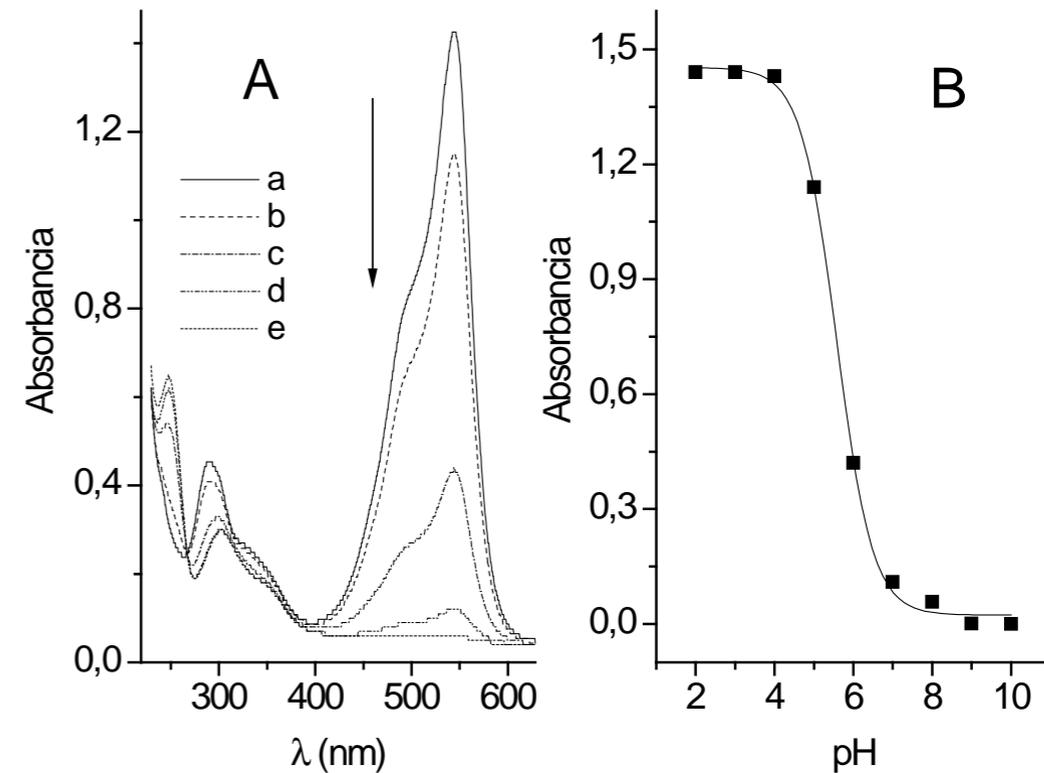


Figura 5 (A). Espectros de absorção molecular (UV-Vis) para $8,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de P em função do pH. Curvas: (a)= pH 4,0; (b)= pH 5,0; (c)= pH 6,0; (d)= pH 7,0 e (e)= pH 8,0. (B): Efeito do pH sobre os sinais de P.

A banda de absorção na região visível apresenta susceptibilidade em função da variação de pH (Figura 5A). O sinal decresce em função do aumento nos valores de pH e extingue-se em $\text{pH} \geq 8,0$. A curva de decaimento do pico em λ 545 nm mostra um perfil sigmoidal (Figura 5B), enquanto o sinal em λ 289 nm exhibe a mesma relação observada para o pico em λ 545 nm; todavia, o sinal apresenta estabilidade em valores superiores de pH. Em adição, o aumento nos valores de pH permite a geração da forma isomérica de P, a qual e possível ser observada em λ 247 nm [7]. Como melhor condição de trabalho foi escolhido tampão B-R pH 2,0.

O efeito da concentração de P sobre o sinal de absorbância foi investigado em amplo intervalo de concentração entre $7,36 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ a

$7,36 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Os resultados deste ensaio são mostrados na Figura 6.

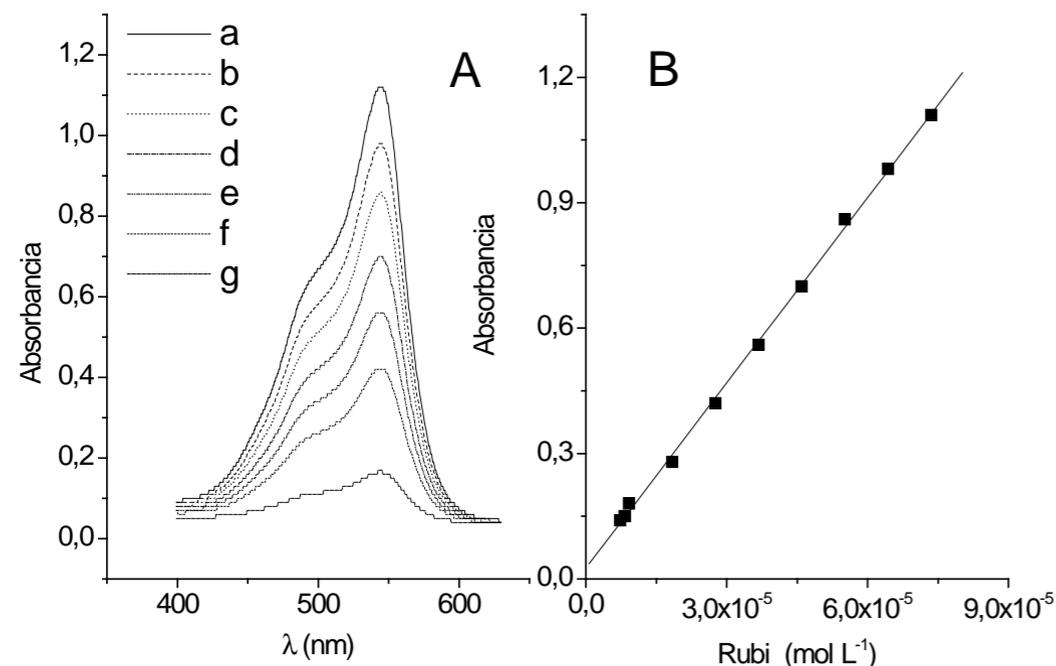


Figura 6 (A). Espectros de absorção UV-Vis para P em tampão B-R pH 2,0. Curvas: (a)= 7,36; (b)= 6,44; (c)= 5,52; (d)= 4,60; (e)= 3,68; (f)= 2,76 e (g)= 1,84 ($\times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$). (B): Curva de calibração para P em tampão B-R pH 2,0.

A correlação entre a concentração de P e absorvância mostrou obediência a Lei de Beer [44] em todo o intervalo investigado. A regressão linear entre essas grandezas permitiu a geração da função: $y = 0,025 + 1,48 \times 10^4 P$, $R = 0,999$, $n = 10$, onde P = a concentração do corante (mol L $^{-1}$), R = coeficiente de correlação e n = número de medidas. Através destes dados foi possível estimar o coeficiente de absorvância molar (ϵ), para o pigmento P como sendo igual $1,48 \times 10^4$ mol $^{-1}$ cm $^{-1}$ L. O limite de detecção foi encontrado em 2×10^{-6} mol L $^{-1}$, através de três leituras superior ao desvio-padrão do branco, dividido pela sensibilidade de calibração. A sensibilidade analítica foi calculada como sendo $2,07 \times 10^7$ [45].

Aplicação do procedimento desenvolvido foi realizada através do método da curva de trabalho (Figura 6 B). As amostras cedidas pelo CEFET-RN foram submetidas a diluição e efetuadas as leituras óticas. Os sinais de absorvância

foram interpolados na equação da reta: $y = 0,025 + 1,48 \times 10^4 P$ e os resultados são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração do corante pararosanilina em amostras biológicas.

Amostras	P (\pm NC) (mol L $^{-1}$) *
1	$9,0 (\pm 0,5) \times 10^{-3}$
2	$1,0 (\pm 0,6) \times 10^{-2}$
3	$9,6 (\pm 0,3) \times 10^{-3}$
4	$9,8 (\pm 0,4) \times 10^{-3}$
5	$8,5 (\pm 0,6) \times 10^{-3}$

* NC = nível de confiança para 95% para n=3.

Conclusões

Os estudos espectrofotométricos mostraram que o corante P apresenta um valor bastante elevado de ϵ ; enquanto a utilização da técnica potenciométrica possibilitou calcular seu pKa, comprovando a natureza fraca deste ácido orgânico. Além disso, o corante apresenta elevada sensibilidade analítica e de calibração, baixo limite de detecção e quantificação, e sua determinação em matrizes aquáticas pode ser realizada sem a necessidade de tratamentos enfadonhos das amostras.

Abstract: Pararosaniline dye (P) is a pigment which has a significant role in analysis of chemical substances and gram-positive and negative bacteria, as well as other microorganisms. Potentiometric essays of P have shown that the colorant is a weak monoprotic acid (pKa = 8,78); and the spectrophotometry allows to estimate its molar absorption coefficient as $1,48 \times 10^4$ mol $^{-1}$ cm $^{-1}$ L. The analytical curve for a determination of P has linearity between $7,36 \times 10^{-6}$ and $7,36 \times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$, and the methodology was application in biological samples.

Keywords: Determination, Ionization Constant, Molar Absorption Coefficient, Pararosaniline.

Referências

- [1] R. K. Sani, U. C. Banerjee, *Enzyme and Microbial Technology*, 24 (1999) 433.
- [2] A. O. Martins, V. M. Canalli, C. M. N. Azevedo, M. Pires, *Dyes and Pigments*, 68 (2006) 227.
- [3] C. C. Chen, H. J. Fan, C. Y. Jang, J. L. Jan, H. Lin, C. S. Lua, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 184 (2006) 147.
- [4] V. K. Gupta, A. Mittal, V. Gajbe, J. Mittal, *Journal of Colloid and Interface Science*, 319 (2008) 30.
- [5] D. R. Doerge, H. C. Chang, R. L. Divi, M. I. Churchwell, *Chem. Res. Toxicol.* 11 (1998) 1098.
- [6] Y. Eldem, I. Ozer, *Dyes and Pigments*, 60 (2004) 49.
- [7] M. M. Kosanic, J. S. Trickovic, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 149 (2002) 247.
- [8] M. T. Ball, B. Morjaria, A. I. Motara, P. M. O'Boyle, E. J. Russell, J. K. Sugden, *Dyes and Pigments*, 36(3) (1998) 223.
- [9] X. Feng, S. Zhu, H. Hou, *Water SA*, 32(1) (2006) 43.
- [10] V. Brezova, J. Pigsova, B. Havlinova, D. Dvoranova, M. Durovic, *Dyes and Pigments*, 61 (2004) 177.
- [11] S. Y. An, S. K. Min, I. H. Cha, Y. L. Choi, Y. S. Cho, C. H. Kim, Y. C. Lee, *Biotechnology Letters*, 24 (2002) 1037.
- [12] V. V. Jarikov, D. C. Neckers, *J. Org. Chem.* 66, (2001) 659.
- [13] X. Li, G. Liu, J. Zhao, *New J. Chem.* 23 (1999) 1193.
- [14] S. Naskar, S. A. Pillay, M. Chanda, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 113 (1998) 257.
- [15] M. Kass, A. Ivaska, *Analytica Chimica Acta*, 449 (2001) 189.
- [16] M. A. Segundo, A. O. S. S. Rangel, *Analytica Chimica Acta*, 427 (2001) 279.
- [17] M. A. Segundo, A. O. S. S. Rangel, A. Cladera, V. Cerda, *Analyst*, 125 (2000) 1501.

- [18] H. Vekisquez, H. Ramfrez, J. Dfaz, M. G. Nava, B. S. Borrego, J. Morales, *Journal of Chromatography A*, 739 (1996) 295.
- [19] K. Irgum, *Anal. Chem.* 57 (1985) 1335.
- [20] S. K. Goyal, *Environmental Monitoring and Assessment*, 120 (2006) 461.
- [21] M. Wahbi, H. Abdine, M. A. Koranyand M. H. Abdel-Hay, *Analyst*, 103 (1978) 876.
- [22] M. C. Wu, C. M. Jiang, Y. Y. Ho, S. C. Shen, H. M. Chang, *Food Chemistry*, 100 (2007) 412.
- [23] M. Achilli, L. Romele, *Journal of Chromatography A*, 847 (1999) 271.
- [24] L. Romele, M. Achilli, *Analyst*, 123 (1998) 291.
- [25] J. F. Goodwin, *Clinical Chemistry*, 17(6) (1971) 544.
- [26] M. L. Singla, M. Singh, M. S. Walia, S. Singla, P.K. Mahapatra, *Food Chemistry*, 97 (2006) 737.
- [27] B. Badri, *Analyst*, 113 (1988) 351.
- [28] J. M. B. Sendra, S. Pescarolo, L. C. Rodríguez, A. M. G. Campaña, E. M. A. López, *Fresenius J. Anal. Chem.* 369 (2001) 715.
- [29] L. G. Gracia, M. D. L. Castro, *Analyst*, 124 (1999) 1119.
- [30] W. J. Groah, J. Bradfield; G. Gramp; R. Rudzinski; G. Heroux, *Environ. Sci. Technol.* 25 (1991) 117.
- [31] P. E. Georghiou, L. Harlick, L. Winsor, D. Snow, *Anal. Chem.* 55(3) (1983) 567.
- [32] R. R. Mlksch, D. W. Anthon, L. Z. Fanning, C. D. Hollowell, K. Revzan, J. Glanville, *Anal. Chem.* 53 (1981) 2118.
- [33] L. T. Gibsona, W. J. Kerra, A. Nordona, J. Reglinskia, C. Robertsona, L. Turnbulla, C. M. Watt, A. Cheungb, W. Johnstoneb, *Analytica Chimica Acta*, 623 (2008) 109.
- [34] Q. Li, P. Sritharathikhum, M. Oshima, S. Motomizu, *Analytica Chimica Acta*, 612 (2008) 165.
- [35] Y. Y. Maruo, J. Nakamura, M. Uchiyama, M. Higuchi, K. Izumi, *Sensors and Actuators B*, 129 (2008) 544.
- [36] K. Shanthi, N. Balasubramanian; *Microchemical Journal*, 53 (1996) 168.
- [37] K. Sonne, P. K. Dasgupta, *Anal. Chem.* 63 (1991) 427.
- [38] A. Safavi, Z. Ramezani, *Talanta*, 44 (1997) 1225.
- [39] S. K. Dangwal, S. Mithbavkar; *Ann Occup. Hyg.* 39(1) (1995) 115.
- [40] E. Chirila, I. Carazeanu, S. Dobrin, *Talanta*, 53 (2000) 271.
- [41] P. P. W. West, J. K. Carlton, *Anal. Chem.* 27 (1949) 1055.
- [42] P. W. West, E. S. Amls, *Industrial and Engineering Chemistry*, 18(6) (1946), 400.
- [43] B. Zargar, H. Parham, A. Hatamie, *Talanta*, 77 (2009) 1328.
- [44] D. C. Harris, *Análise Química Quantitativa*, LTC editora, Rio de Janeiro RJ, 5ª edição, 2001.
- [45] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Fundamentos de Química Analítica*, Ed. Cengage, São Paulo SP, 8ed, 2008.