

# PROPRIEDADES ESPECTROSCÓPICAS DE CORANTES COM POTENCIAL USO EM TERAPIA FOTODINÂMICA EM SOLUÇÃO

**Adriana Lima<sup>1</sup>, Douglas Gassetta<sup>2</sup>, Augusto Gracetto<sup>3</sup>, Noboru Hioka<sup>3</sup>, Máira Regina Rodrigues Magini<sup>4</sup>, Hueder Paulo Moisés de Oliveira<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>UniVap/FCS - Av. Shishima Hifumi, 2911, São José dos Campos, SP

<sup>2</sup>UniVap/FEAU – Av. Shishima Hifumi, 2911, São José dos Campos, SP

<sup>3</sup>Departamento de Química – Universidade Estadual de Maringá – Avenida Colombo, 5790, Maringá, PR

<sup>4</sup>UniVap/IP&D - Av. Shishima Hifumi, 2911, São José dos Campos, SP

hueder@univap.br

**Resumo** – Com o objetivo de verificar a influência do solvente sobre corantes com potencial uso em Terapia Fotodinâmica, estudos de espectroscopia de fluorescência foram feitos em misturas água/etanol. Os dados mostraram que os corantes estudados sofrem influência direta da composição da mistura, bem como da constante dielétrica da mesma. Como os corantes são hidrofóbicos por natureza, suas propriedades espectroscópicas são mais pronunciadas quando a mistura possui uma maior proporção de etanol. Em altas concentrações de água, os mesmos sofrem processo de agregação molecular formando dímeros ou estruturas maiores. Este tipo de estudo é importante pois mostra em que faixa de concentração e em quais proporções de solventes estas moléculas possuem maior eficiência de emissão, o que indiretamente revela as possibilidades da geração de moléculas oxidativas com aplicação biomédica.

**Palavras-chave:** Corantes, Misturas água/etanol, Fluorescência, Agregação.

**Área de conhecimento:** Química, Engenharia Biomédica.

## Introdução

Corantes são moléculas que podem ser tanto orgânicas como inorgânicas que apresentam como característica principal a presença de um ou mais anéis benzênicos; por isso, estes compostos são também chamados de benzenóides. A aplicação mais recente destes compostos diz respeito ao campo de processos biológicos, utilizando para isso as mais diversas técnicas analíticas e, também com aplicações terapêuticas (terapia fotodinâmica). Em geral são compostos que agregam em solução aquosa. Possuem bandas de absorção/emissão na região do UV-Vis e, sensíveis ao ambiente químico em que se encontram.

Alguns dos corantes mais utilizados no campo da terapia fotodinâmica (TFD) são o Azul de Metileno que pode ser usado como droga (Stocche et al., 2004); a safranina que pode ser usada no diagnóstico da infecção causada pelo protozoário *Cyclospora cayatanensis*, (MEZZARI; ANTUNES; WIEBBELLING, 1999); o azul de toluidina usado para avaliar a eficácia dessa coloração na identificação de alterações no complexo DNA – Proteína de espermatozoides humanos, (Rocha et al., 2002) e, o azul do Nilo usado em análises histológicas bovinas para possíveis aplicações no homem (Filho et al., 2004).

Neste trabalho, foram estudados os corantes azul de metileno (MB), azul de toluidina (TB), azul do nilo (NB), safranina (Saf) e azure A

(Az), em misturas água/etanol a fim de verificar a influência do solvente sobre as propriedades espectroscópicas destes.

## Materiais e Métodos

Para cada corante, foram utilizados onze amostras de 2 mL de água e álcool nas seguintes proporções: a amostra 1 com total porcentagem de álcool, a amostra 2 com 10% de água e 90% de álcool, a amostra 3 com 20% de água e 80% de álcool, e assim sucessivamente até atingirem a total porcentagem de água. Neste mesmo procedimento foi acrescentado 0,3 mL de corante, em suas respectivas amostras, de modo que a concentração dos corantes ficasse abaixo da concentração de agregação ( $\sim 1.10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>), a fim de impedir a interferência de quaisquer outros processos nas análises dos dados obtidos. As medidas foram feitas a 25°C e em concentração de  $10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>. Os espectros de excitação e emissão foram obtidos em um espectrofluorímetro Jobin-Yvon Spex FluoroMax-2. Os espectros de excitação foram usados em substituição aos de absorção dada a maior sensibilidade destes. Os espectros de emissão foram tomados a partir dos picos de máximo de intensidade dos espectros de excitação das amostras. As amostras foram condicionadas em cubetas de quartzo (1 x 1 cm). Foram obtidos os espectros de excitação e emissão dos corantes nestas condições. Os espectros de excitação foram feitos para se obter o valor do comprimento de onda de excitação e

consequentemente os espectros de emissão dos corantes avaliados. Os valores dos máximos de excitação ficaram na faixa de 520 a 680 nm. O erro envolvido em cada medida é menor do que 5%.

## Resultados e Discussão

Os dados indicaram que há uma dependência dos valores de máximo de excitação (não mostrado) e emissão dos corantes com a proporção de água nas misturas (figura 1).

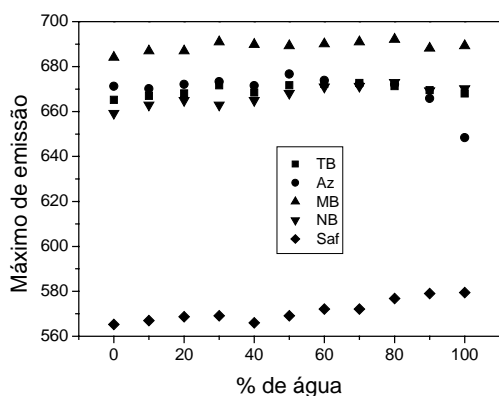


Figura 1 – Variação do comprimento de onda máximo de emissão em função da porcentagem de água para cada sistema.

À medida que aumenta a quantidade de água, ocorre uma diminuição na intensidade de excitação (figura 2) e emissão (figura 3) dos corantes. Este efeito está relacionado com a inibição parcial ou a maior fricção na rotação de grupos substituintes como  $-CH_3$ ,  $-NH_2$ ,  $-N(CH_3)_2$  e  $-N(CH_2CH_3)_2$  dos corantes. Um outro fato a ser considerado é que sondas que apresentam grupamentos  $NH_2$  na estrutura, como o azul do Nilo, podem apresentar processos de transferência de carga intramolecular, influenciando nas propriedades fotofísicas dos corantes (NAGASAWA; YOSHIHARA, 1994; DOUHAL, 1994; Yoshihara et al., 1994; GROFCSIK; KUBINYI; JONES, 1996; DUTTA; KAMADA; OHTA, 1996). A partir de valores das constantes de velocidade de desativação radiativa ( $k_r$ ) e não-radiativa ( $k_{nr}$ ) é possível confirmar que as mudanças observadas nas propriedades espectrais dos corantes são devidas ao processo de transferência de carga intramolecular.

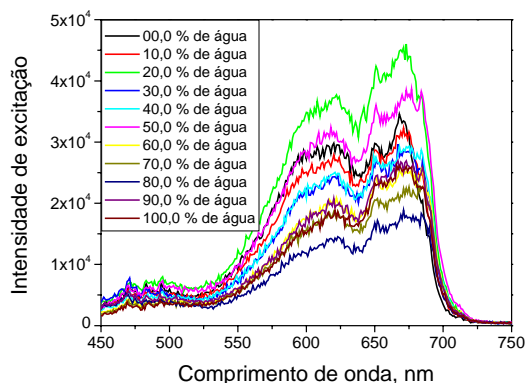


Figura 2 – Variação da intensidade de excitação para o corante azul de metileno em misturas água/etanol.

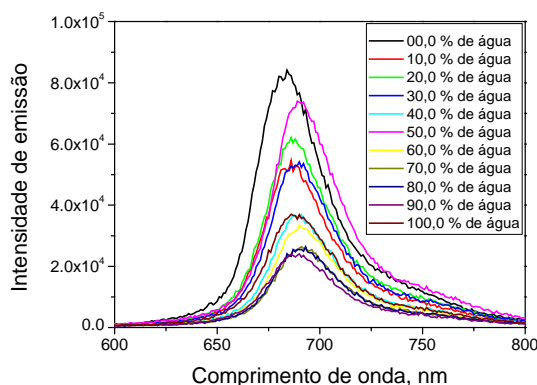


Figura 3 – Variação da intensidade de excitação para o corante azul de metileno em misturas água/etanol.

Há também a questão da viscosidade, visto que o aumento da quantidade de água na mistura aumenta a viscosidade da mesma. Isto interfere também nos processos de desativação do estado excitado dos corantes tornando-os mais lentos em meios mais viscosos. Este aumento da viscosidade impede a rotação interna dos grupamentos presentes nas moléculas dos corantes, resultando num aumento da intensidade de fluorescência. Os valores dos comprimentos de onda de absorção e emissão dos corantes dependem da polaridade do solvente, deslocando os mesmos para maiores/menores comprimentos de onda. Os deslocamentos observados para os diversos corantes utilizados estão de acordo com dados presentes na literatura (figura 4) (NAGASAWA; YOSHIHARA, 1994; DOUHAL, 1994; Yoshihara et al., 1994; GROFCSIK; KUBINYI; JONES, 1996; DUTTA; KAMADA; OHTA, 1996).

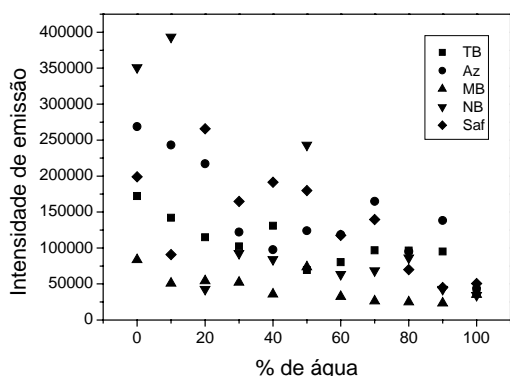


Figura 4 – Variação da intensidade de emissão em função da porcentagem de água para cada sistema.

A diminuição do deslocamento indica uma menor solvatação do estado excitado dos corantes. Altos valores de deslocamento indicam uma reorganização da orientação dos grupos polares dos corantes. Há um aumento significativo para alguns dos corantes na intensidade de emissão quando se varia a proporção do solvente. Este efeito pode ser atribuído à diminuição da polaridade dos solventes (figuras 5 e 6).

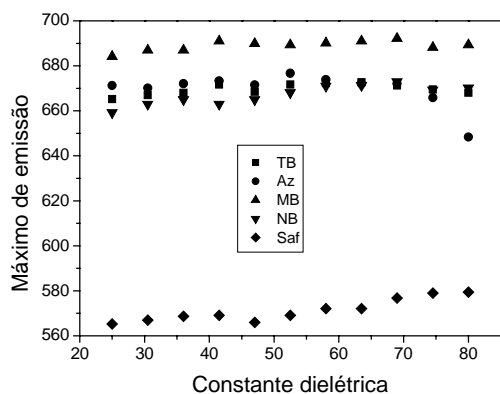


Figura 5 – Variação do comprimento de onda máximo de emissão em função da constante dielétrica do sistema.

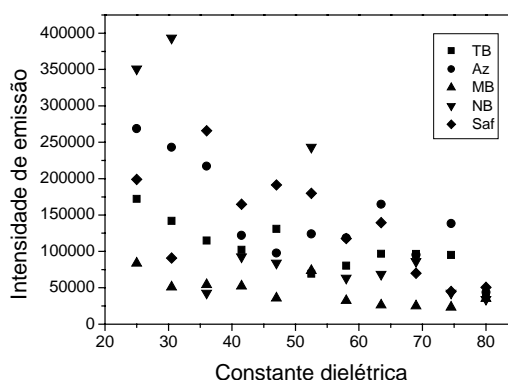


Figura 6 – Variação da intensidade de emissão em função da constante dielétrica do sistema.

A diminuição da polaridade do solvente aumenta a energia de ativação de conversão do estado excitado planar para um estado de transferência de carga intramolecular aumentando o rendimento quântico de fluorescência. Há ainda um outro aspecto a ser considerado nas variações espectrais observadas, sendo este a presença de ligações hidrogênio entre a molécula de corante e do solvente (Yekta et al., 1993; GROFCSIK; JONES, 1992; Mialocq et al., 1991.).

A fluorescência é uma ferramenta espectrofotométrica muito mais sensível do que a absorção. Os espectros de fluorescência são largos e apresentam a mesma estrutura, e as intensidades das bandas variam com o solvente. Nas misturas, os espectros de excitação e emissão apresentam o mesmo perfil. Para misturas de solvente com mais de 30% de água, há um decréscimo intenso nas intensidades, mas sem a presença de pico adicional. Mesmos em altas concentrações de água a emissão não desaparece por completo o que indica que os corantes não ficaram completamente agregados. Com a adição de solvente orgânico (no caso o etanol), o ambiente torna-se favorável aos corantes na forma monomérica, manifestado altas intensidades de excitação e emissão.

Estes decréscimos são consideráveis, e estão relacionados com a diminuição do número de monômeros livres, provavelmente formando uma espécie agregada pequena (ex. dímeros), uma vez que este decréscimo é grande demais para ser atribuído ao efeito do solvente (MARGALIT; SHAKLAI; COHEN, 1983; WEST; PEARCE, 1965; RABINOWITCH; EPSTEIN, 1941). Pode também estar acontecendo o fato que, ou estas espécies absorvem igual aos monômeros, ou (o mais provável) elas tem um arranjo tal que os monômeros absorvem independentemente, mas que se auto-suprimem

na fluorescência, levando a perda de energia de excitação por processos não radiativos.

## Conclusão

Os dados evidenciaram as influências que as propriedades físico-químicas das misturas água/etanol exercem sobre a fotofísica dos corantes estudados. Estes dados serão de grande importância para os estudos posteriores a serem desenvolvidos tais como o processo de agregação molecular destas moléculas e o efeito deste processo sobre as propriedades espectroscópicas dos mesmos.

## Agradecimentos

Agradecemos ao suporte financeiro fornecido pela FAPESP e também ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica fornecida.

## Referências

- Douhal, A., Photophysics of Nile Blue A in Proton Accepting and Electron Donating Solvents, **J. Phys. Chem.** V. 98, n. 50, p. 13131-13137, 1994.
- Dutta, A. K.; Kamada, K.; Ohta, K., Spectroscopic Studies of Nile Red in Organic Solvents and Polymers, **J. Photoch. Photobio. A.** V. 93, n. 1, p. 57-64, 1996.
- Filho, D. H.; Marques, A.; Kafajian-Haddad, A. P.; Zveibel, D. K., Estudo Comparativo das Reações teciduais ao Implante de Pericárdio Bovino e a Inclusão de Politetrafluoroetileno Expandido em Ratos, **Acta Cir. Bras.** V. 19, n. 2, p. 131-135, 2004.
- Grofcsik, A.; Jones, W. J.; Stimulated Emission Cross-sections in Fluorescent Dye Solutions – Gain Spectra and Excited State lifetimes of Nile Blue A and Oxazine 720, **J. Chem. Soc. Faraday T.** V. 88, n. 8, p. 1101-1106, 1992.
- Grofcsik, A.; Kubinyi, M.; Jones, W. J., Intermolecular photoinduced proton transfer in Nile blue and oxazine 720, **Chem. Phys. Lett.** V. 250, n. 3-4, p. 261-265, 1996.
- Margalit, R.; Shaklai, N.; Cohen, S., [Fluorimetric Studies on the Dimerization Equilibrium of Protoporphyrin IX and its Haemato Derivative](#), **Biochem. J.**, V. 209, n. 2, p. 547-552, 1983.
- Mezzari, A.; Antunes, H. B. B.; Wiebbelling, A. M. P., Cyclospora cayetanensis, Um Novo Protozoário a ser Pesquisado, **Rev. Ass. Med. Brasil.** V. 45, n. 4, p. 347-348, 1999.
- Mialocq, J. C.; Hébert, P.; Armand, X.; Bonneau, R.; Morand, J. P., Photophysical and Photochemical Properties of Rhodamine 6G in Alcoholic and Aqueous Sodium Dodecylsulphate Micellar Solutions, **J. Photoch. Photobio. A.** V. 56, n. 2-3, 323-338, 1991.
- Nagasawa, Y.; Yoshihara, K., Temperature Dependence of Ultrafast Intermolecular Electron-transfer faster than Solvation Process, **J. Chem. Phys.** V. 101, n. 7, p. 5717-5726, 1994.
- Rabinowitch, E.; Epstein, L. F., Polymerization of Dyestuffs in Solution. Thionine and Methylene Blue, **J. Am. Chem. Soc.** V. 63, n. 1, p. 69-78, 1941.
- Rocha, H. L. O. G.; Beletti, M. E.; Marcolini, T. T.; Amorin, D. A. Z.; Uso de Laranja de Acridina e Azul de Toluidina na Avaliação da Fertilidade Masculina, **Biosci J.** V. 18, n. 1, p. 65-77, 2002.
- Stocche, R. M.; Garcia, L. V.; Reis, M. P.; Klamt, J. G.; Évora, P. R. B., Uso do Azul de Metileno no Tratamento de Choque Anafilático Durante Anestesia. Relato de Caso, **Rev. Brasil. Anest.** V. 54, n. 6, p. 809-14, 2004.
- Yekta, A.; Duhamel, J.; Brochard, P.; Adiwidjaja, H.; Winnik, M., A Fluorescent Probe Study of Micelle Like Cluster Formation in Aqueous Solutions of Hydrophobically Modified Poly(Ethyleneoxide), **Macromolecules.** V. 26, n. 8, p. 1829-1836, 1993.
- Yoshihara, K.; Nagasawa, Y.; Yartsev, A.; Kumazaki, S.; Kandori, H.; Johnson, A. E.; Tominaga, K.; Femtosecond Intermolecular Electron-Transfer in Condensed Systems, **J. Photoch. Photobio. A.** V. 80, n. 1-3, p. 169-175, 1994.
- West, W.; Pearce, S., The Dimeric State of Cyanine Dyes, **J. Phys. Chem.** V. 69, n. 6, p. 1894-1903, 1965.