

# ESTUDO DOS EFEITOS DA INCIDÊNCIA DE LASER (He-Ne, 633nm) SOBRE AMOSTRAS DE AZUL DE METILENO

*Iuri Rojahn da Silva<sup>1</sup>, Paulo Roxo Barja<sup>1</sup>, Adriana Lima<sup>2</sup>, Hueder Paulo Moisés de Oliveira<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Laboratório de Fotoacústica Aplicada a Sistemas Biológicos (FASBio), Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento (IP&D), UNIVAP, Avenida Sishima Hifumi, 2911, Urbanova, 12244-000, São José dos Campos/SP, e-mails: iuri@univap.br, barja@univap.br

<sup>2</sup>Laboratório de Biopolímeros e Fotoquímica, Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento (IP&D), UNIVAP, Avenida Sishima Hifumi, 2911, Urbanova, 12244-000, São José dos Campos/SP, e-mail: hueder@univap.br

**Resumo** - O presente trabalho visa investigar os efeitos do laser (He-Ne, 633 nm) sobre amostras de azul de metileno submetidas à exposição prolongada a esta radiação. Para atingir este objetivo, foram utilizadas diferentes técnicas experimentais, incluindo medidas fotoacústicas em função do tempo, utilizando uma célula fotoacústica aberta (OPC). A transmitância foi medida através de uma resistência dependente de luz (LDR), a absorvância e a fluorescência das amostras foi determinada com um espectrofluorímetro Jobin-Yvon Spex FluoroMax-2. Os resultados indicam que a exposição prolongada ao laser de He-Ne resulta na alteração de propriedades ópticas e térmicas do azul de metileno, gerando alteração no sinal fotoacústico, aumento da transmitância e redução na fluorescência das amostras.

**Palavras-chave:** Azul de metileno, terapia fotodinâmica (TFD), fotoacústica, fluorescência, transmitância.

**Área do Conhecimento:** Engenharia Biomédica

## Introdução

A terapia fotodinâmica (TFD) baseia-se em reações fotoquímicas realizadas por agentes fotossensibilizantes e luz, sendo utilizada principalmente em locais onde seja observado crescimento celular anormal. Possui como principais vantagens o fato de ser um método eficiente, não invasivo. Segundo Sant'Anna (2006), na TFD, após ativação por luz, a substância fotossensibilizante transfere a energia para o oxigênio molecular, formando o "oxigênio singlete", particularmente reativo. Após transferir energia, o fotossensibilizante volta a seu estado inicial; nova carga de luz permite repetir o processo. Deste modo, a substância age como catalisador para reações de oxidação-redução e de formação de radicais livres.

Entre as substâncias empregadas em TFD está o azul de metileno (AM), corante que possui uma conhecida ação antimicrobiana, incrementada pela presença de luz, sendo um dos compostos mais antigos utilizados na TFD. Com a absorção de luz, as moléculas de AM vão para o estado triplete, decaindo por transferência de energia para as moléculas de oxigênio que, deste modo, vão para o estado singlete (BAPTISTA et al, 2000).

O efeito fotoacústico consiste na produção de som por absorção de luz modulada. A energia luminosa absorvida pela amostra é convertida em calor por desexcitação não-radioativa. As ondas térmicas são propagadas até a camada de ar adjacente à amostra, gerando ondas de pressão

proporcionais ao calor produzido na amostra pela absorção de luz. Segundo o modelo de pistão acústico para a difusão térmica (ROSENCWAIG; GERSHO, 1976), este sinal pode ser detectado por um microfone acoplado à câmara fotoacústica. A técnica fotoacústica baseia-se neste efeito e permite caracterizar um material em termos de suas propriedades ópticas (absorção) e térmicas (difusividade e efusividade térmicas). Em 2005, medidas fotoacústicas em amostras de AM permitiram observar um aumento progressivo na amplitude do sinal após irradiação por laser He-Ne (LIMA et al, 2005). Este comportamento foi relacionado à capacidade reativa das moléculas de azul de metileno que, sob irradiação, poderiam interagir com a base de alumínio, que atuaria então como doadora de elétrons.

O estudo da transmitância óptica consiste em determinar a fração de energia luminosa que atravessa uma amostra. A transmitância (T) está relacionada à quantidade de energia e ao comprimento de onda da radiação incidente. Já a absorvância (A) corresponde à determinação da fração de energia luminosa absorvida pela amostra. Além da transmissão e da absorção, a luz incidente sobre a amostra pode sofrer reflexão parcial, o que é avaliado através das medidas de refletância. Por fim, a absorção de luz pela amostra pode também originar o fenômeno de fluorescência, quando parte da luz absorvida é reemitida em comprimento de onda superior ao incidente.

O presente trabalho visa investigar as alterações verificadas nas propriedades de amostras de azul de metileno submetidas a radiação laser por período prolongado. Para atingir este objetivo, foram realizadas medidas fotoacústicas, de transmitância óptica e de fluorescência.

## Materiais e Métodos

**Fotoacústica** – Foram realizadas medidas de evolução temporal do sinal fotoacústico para amostras de azul de metileno (1 mol/L) sob irradiação com laser de He-Ne (633 nm, 2 mW, incidência por um minuto a cada cinco minutos de medida). A montagem fotoacústica utilizada apresentava como fonte de luz uma lâmpada de halógena de tungstênio (24 V, 250 W). A luz era modulada (à frequência de 17 Hz) por um modulador mecânico (Stanford Research Systems – SRS, modelo SR540), sendo direcionada para a janela da célula fotoacústica aberta (OPC, fabricada na UNIVAP com microfone de eletreto comercial). Esta célula e o modulador foram conectados a um amplificador síncrono (Stanford Research Systems – SRS, modelo SR530) para aquisição do sinal. A coleta foi efetuada à taxa de um ponto a cada 2,5 segundos, sendo o registro dos dados realizado através do programa SISCOMF (desenvolvido na UNIVAP). Para realização das medidas, a amostra era posicionada sobre uma folha de alumínio que vedava (com o auxílio de graxa de silicone) a face da célula fotoacústica oposta à janela de vidro. Deste modo, a amostra (0,5 ml) ficava em contato com o ar, recebendo incidência do laser posicionado a cerca de 30 cm, perpendicularmente ao plano da amostra, a OPC (MARCIANO et al., 2004; MARQUEZINI et al., 1991). O esquema da célula OPC utilizada no trabalho é visualizado na Figura 1.

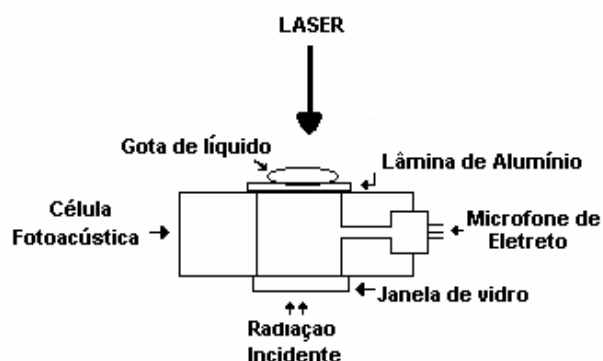


Figura 1- Corte transversal da célula OPC. A radiação modulada incide sobre a superfície interna da célula sem contato luminoso com a amostra transmitindo as variações de pressão até o microfone.

A curva fotoacústica foi ajustada pela equação de Boltzmann:

$$PA(t) = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{-(t-t_0)/dt}} + A_2$$

onde os parâmetros de importância para análise são  $t_0$  (tempo típico – é o tempo em que o sinal atinge 50% da excursão ao nível de saturação) e  $dt$  (intervalo de tempo tal que 67% da transição observada ocorre entre  $t_0-dt$  e  $t_0+dt$ ) (VELOSO, 2006).

**Transmitância** – A transmitância foi avaliada em amostras de azul de metileno à diluição de 0,04 mol/L e volume de 0,5 ml sob irradiação com laser de He-Ne (633 nm, 2 mW). Para a detecção do sinal luminoso que atravessa (transmitância) ou reflete (refletância) a amostra foi utilizada uma resistência dependente de luz (LDR); a medição foi feita com o laser modulado mecanicamente à frequência de 35 Hz. A montagem utilizou um modulador mecânico direcionando o feixe do laser para o LDR, que foi conectado ao amplificador síncrono para a aquisição do sinal. A coleta dos dados foi efetuada a cada minuto durante uma hora. Para a realização das medidas, a amostra era posicionada na vertical entre o feixe do laser e a LDR, como observado na figura 2; para avaliação da refletância, o detetor (LDR) foi deslocado em 180°, a fim de receber a luz refletida.

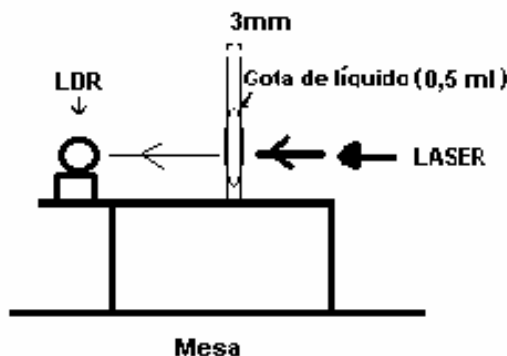


Figura 2- Corte transversal do esquema utilizado para medir a transmitância com a luz do laser modulada e o LDR. Parte da radiação modulada atravessa a amostra de azul de metileno transmitindo uma parte da radiação para o LDR.

**Fluorescência** – Os espectros de emissão foram obtidos em um espectrofluorímetro Jobin-Yvon Spex FluoroMax-2. Os espectros de emissão foram tomados a partir dos picos de máximo de intensidade dos espectros de absorção das amostras. As amostras foram acondicionadas em cubetas de quartzo 1x1 cm. Os espectros de absorção foram feitos para a obtenção do valor do comprimento de onda de excitação.

A análise dos dados obtidos (incluindo os ajustes de curvas experimentais) foi efetuada com o auxílio do programa Microcal Origin®.

## Resultados

A figura 3 mostra uma curva típica da evolução temporal do sinal fotoacústico para as amostras analisadas.

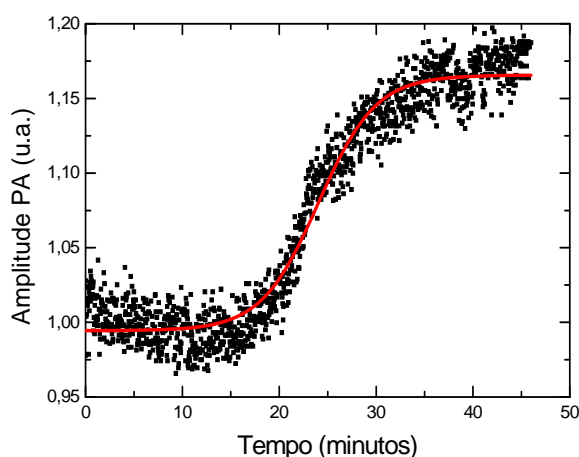


Figura 3 – Exemplo de curva do sinal fotoacústico do azul de metileno em função do tempo; amostra irradiada por laser de He-Ne por um minuto a cada cinco; primeira irradiação com  $t = 5$  minutos. A linha contínua representa o ajuste efetuado (Boltzmann).

A seguir, a tabela 1 mostra os valores normalizados para a curva fotoacústica utilizando os ajustes Boltzmann.

Tabela 1 - Medidas normalizadas para a curva fotoacústica (valores obtidos através do ajuste das curvas pela equação de Boltzmann).

Medidas Normalizadas	A1	A2	$t_0$ (minutos)	Dt (minutos)
Valor médio	1,0	1,1	19	3
Desvio padrão	0,3	0,3	15	2

A figura 4 mostra um exemplo de curva de transmitância para as amostras de azul de metileno em função do tempo de exposição à radiação.

Por fim, a figura 5 mostra as curvas obtidas para a fluorescência do azul de metileno, após três diferentes tempos de irradiação (laser He-Ne).

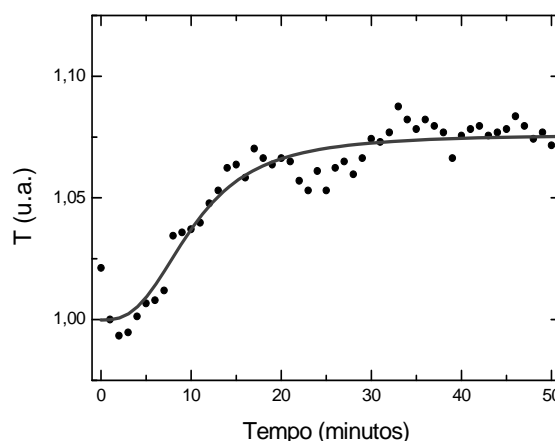


Figura 4 – Curva da transmitância do azul de metileno (à concentração de 1,0 mol/L) em função do tempo. A linha contínua representa o ajuste dos dados experimentais (Boltzmann).

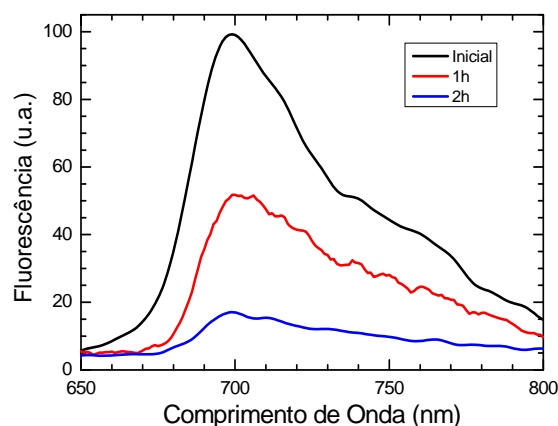


Figura 5 – Curvas de fluorescência do azul de metileno (0,04mol/L): i) antes da incidência de laser; ii) após uma hora de incidência; iii) após duas horas de incidência.

## Discussão

Em relação às medidas da evolução temporal do sinal fotoacústico, a análise dos dados obtidos para o azul de metileno indica a ocorrência de uma transição lenta, que se completa entre 30 minutos e uma hora após o início dos pulsos de irradiação com laser, conforme pode ser observado na curva da Figura 3. No trabalho de Lima e colaboradores (2005), a estabilização do sinal não foi observada. Isto pode ser explicado pela diferença no tempo total de monitoramento, que no presente trabalho atingiu aproximadamente 50 minutos, enquanto no trabalho anterior (LIMA e al, 2005) foi de 25 minutos (tempo insuficiente para visualizar a estabilização do sinal).

As medidas de transmitância seguem o comportamento visualizado na curva da figura 4, indicando que T aumentou (cerca de 8%) na primeira hora sob incidência de laser. É interessante observar que a curva de transmitância segue o comportamento observado nas medidas fotoacústicas, estabilizando-se cerca de meia hora após o início das medidas. Deste modo, o mesmo processo de transição pode estar sendo observado através de ambas as medidas (fotoacústica e transmitância).

Para as medidas de fluorescência, uma observação atenta do espectro de emissão inicial (antes da exposição ao laser) permite notar, além da banda característica do azul de metileno (centrada em 700 nm), uma banda adicional em torno de 740 nm, sinalizando a presença de azul de metileno na forma agregada. De fato, medidas efetuadas para o espectro de absorção do azul de metileno em solução mostram duas bandas de absorção, centradas em 670 nm (banda característica de monômero) e 609 nm (característica de agregados). Quanto à evolução do espectro de emissão após incidência de laser, não se observa alteração na localização do pico de fluorescência em função da exposição à radiação (figura 5). No entanto, é possível observar o aumento da largura da banda de fluorescência e, principalmente, uma grande diminuição da fluorescência total (com queda de aproximadamente 80% na área sob a curva após 2h de irradiação). Estes dados indicam que a amostra está fluorecendo menos a partir da exposição ao laser.

## Conclusão

As medidas efetuadas por três diferentes técnicas (fotoacústica, transmitância óptica monitorada por LDR e fluorescência) indicam que o azul de metileno passa por alterações durante exposição à radiação laser. Estas alterações podem ser atribuídas a diferentes fatores: aumento de moléculas em estado excitado, aumento na taxa de geração de oxigênio singlete na solução e ocorrência de fotobranqueamento em pequeno grau. Para investigar estas possibilidades, medidas adicionais incluirão a análise das eventuais alterações no espectro de absorção do azul de metileno em função do tempo sob irradiação laser, além de medidas de refletância e transmitância de soluções mais diluídas em função do tempo de irradiação. Espera-se, deste modo, caminhar para um melhor entendimento dos processos fotofísicos e fotoquímicos relacionados à interação do azul de metileno com laser.

## Agradecimentos

P.R.B. agradece à Fapesp pelo apoio concedido (Projeto JP 04/02193-1). H.P.M.<sup>o</sup>, ao suporte financeiro fornecido pela FAPESP (Projeto de auxílio a pesquisa 06/56701-3). A. Lima (IC) agradece ao CNPq pela bolsa concedida.

## Referências

- BAPTISTA M.S.; DIAS L.G.; GUGLIOTTI M; POLITI M.J. Lente térmica de excitação contínua em soluções de azul de metileno. 23<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Poços de Caldas, 2000. Disponível em: <http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/0124/index.html>. Acesso em: 10 jun.2007.
- LIMA, L.D.; MARCIANO, F.R.; COSTA, M.S.; SILVA, M.D.; BARJA, P.R; AVALOS, D.A. Photoacoustic monitoring of Methylene blue irradiated. **Journal de Physique IV**, v. 125, p. 781-783, 2005.
- MARCIANO, F.R; BARJA, P.R; ACOSTA – AVALOS, BELOTO, A.F; SILVA, M.D. Medição da efusividade térmica de líquidos através da técnica fotoacústica utilizando uma célula aberta (opc). **VIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica**. p, 59-62, 2004.
- MARQUEZINI, M.V; CELLA, N; MANSANARES, A.M; VARGAS H; AND MIRANDA, L.C.M. Open photoacoustic cell spectroscopy. **Meas. Sci. Technol.** n.2, p. 396-401, 1991
- ROSENCWAIG, A.; GERSHO, A. Theory of the photoacoustic effect with solids. **J. Appl. Phys.** n. 47, p. 64-69, 1976.
- SANT'ANNA, G. Saúde Bucal – A dinâmica da luz. Revista ABO Nacional, ed.76, v. XIV, n.1. Disponível em: <http://www.abonac.org.br/revista/76/materia-4.php>. Acesso em: 10 jun.2007.
- VELOSO, D.J.D.V. Estudo fotoacústico da nimesulida aplicada à pele in Vivo. 2006. 70f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2006.