

EFEITO DO SOLVENTE SOBRE AS PROPRIEDADES ESPECTROSCÓPICAS DO AZUL DE METILENO

Adriana Lima¹, Augusto Gracetto², Carlos Eduardo G. Biondo², Vagner Batistela², Noboru Hioka², Divinomar Severino³, Antônio Eduardo da Hora Machado⁴, Máira R. Rodrigues⁵, Hueder P. M. de Oliveira⁵

¹Universidade do Vale do Paraíba/ FCS. Av. Shishima Hifumi, 2911 – São José dos Campos – SP

²Universidade Estadual de Maringá /Departamento de Química. Av. Colombo, 5790 – Maringá – PR

³Universidade de São Paulo / Instituto de Química. Av. Prof. Lineu Prestes, 748, São Paulo – SP.

⁴Universidade Federal de Uberlândia/Instituto de Química – Laboratório de Fotoquímica. Av. João Naves de Ávila, 2121 – Bloco 1D – 38408-100 Uberlândia, MG

⁵Universidade do Vale do Paraíba/ IP&D. Av. Shishima Hifumi, 2911 – São José dos Campos – SP
drikalima00@hotmail.com, mrr@univap.br, hueder@univap.br

Resumo: Com o intuito de verificar a influência do solvente sobre o azul de metileno, corante que apresenta grande potencial para uso em Terapia Fotodinâmica (TFD), foram feitos estudos espectroscópicos de fluorescência em misturas água/etanol e água/acetonitrila. Devido ao fato de apresentar hidrofobicidade, tanto a emissão quanto a excitação do azul de metileno, foram melhor visualizadas quando a concentração de um dos solventes orgânicos usados prevalecia. A formação de agregados diméricos ou oligoméricos em misturas com alta proporção de água, tende a dificultar a aplicação em TFD, uma vez que o fenômeno de auto-agregação diminui a capacidade de formação de oxigênio singlete. Nos espectros de emissão e excitação obtidos, foi possível perceber um decréscimo da intensidade de fluorescência nas misturas com mais de 30% de água, conseqüência da formação de agregados. O presente estudo servirá de apoio para pesquisas posteriores, onde se averiguará a proporção de solventes para se atingir uma melhor atividade fotodinâmica para corantes diversos aplicáveis à TFD.

Palavras – chave: Azul de metileno, misturas de solventes, fluorescência, agregação.

Área de conhecimento: Química e Engenharia Biomédica.

Introdução

O azul de metileno (AM) é um corante aromático heterocíclico solúvel em água ou em álcool. Possui rendimento quântico de formação de oxigênio singlete da ordem de 0,5 e baixo potencial de redução (REDMOND 1999). É um corante pouco tóxico, que absorve intensamente na região do UV-visível ($\lambda_{m\acute{a}x} = 664\text{nm}$ em água) e mostra boa eficiência fotodinâmica na morte de células cancerígenas, podendo ser excitado por luz mono e policromática dentro da janela terapêutica (TARDIVO et al. 2004). É um corante que possui uma estrutura básica de caráter hidrofílico, porém quando metilado apresenta hidrofobicidade (LIMA, 2004). Possui tendência a formar agregados devido à presença de agentes agregadores como polieletrólitos, ou em função de solventes que favorecem a formação de

agregados, como por exemplo, a água, dependendo da concentração de AM em solução. A formação de agregados altera a eficiência da fotossensibilização, diminuindo a quantidade de oxigênio singlete gerada na presença de um estímulo luminoso (WAINWRIGHT et al., 1997; FALJONI – ALÁRIO, 2003; SEVERINO et al., 2003). O fenômeno de auto-agregação pode ser minimizado pela inclusão na estrutura de substituintes carregados positiva ou negativamente, em virtude da repulsão eletrostática, aumentando a hidrofiliabilidade do corante (MACHADO, 2000, GABRIELLI et al., 2003).

A principal aplicação do azul de metileno está dentro do ramo da TFD como agente fotossensibilizante, porém não apenas em Oncologia. Estudos têm

trabalhado a possibilidade de aplicações farmacológicas (STOCCHÉ et al., 2004).

No presente trabalho, foi feito o estudo da influência do solvente nas propriedades espectroscópicas e fotofísicas (excitação, emissão e RLS) do Azul de Metileno.

Materiais e Métodos

Foram utilizadas onze soluções contendo AM (50 μL da solução estoque de azul de metileno com concentração de $1,25 \times 10^{-2}$ mol/l) em 2 mL de diferentes proporções água/etanol e onze de água/acetonitrila, variando-as de 0 a 100% de água. O AM (Aldrich, 85%) foi previamente recristalizado em acetona/metanol. As medidas foram feitas à temperatura de 298 K. A água empregada no preparo das soluções era de grau Milli-Q, e os solventes de grau espectroscópico.

Os espectros de excitação e 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 indicados nos espectros de excitação das amostras. As amostras foram condicionadas em cubetas, e as medidas feitas no modo *front-face*.

Estudos de RLS (Espalhamento de luz ressonante) foram realizados por meio da varredura simultânea de monocromadores de emissão e excitação, no intervalo de 200 a 800 nm com $\Delta\lambda = 0$ nm, a fim de verificar o processo de auto-agregação.

Resultados e discussão

Os espectros de fluorescência são largos, apresentando a mesma estrutura. Suas intensidades de emissão dependem da proporção de água presente no solvente.

As figuras 1 e 2 apresentam os espectros de emissão do AM nas misturas água/etanol e água/acetonitrila respectivamente. Os dados evidenciam o decréscimo da intensidade das amostras de acordo com o aumento da porcentagem de água. Isso acontece devido à presença do grupo CH_3 na estrutura do AM, que, por não interagir com a água, favorece a formação de agregados à medida que cresce a proporção de água na mistura de solventes.

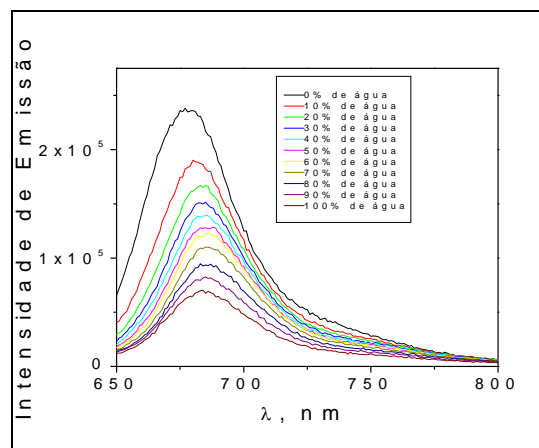


Figura 1: Espectro de emissão do AM para a mistura água/etanol.

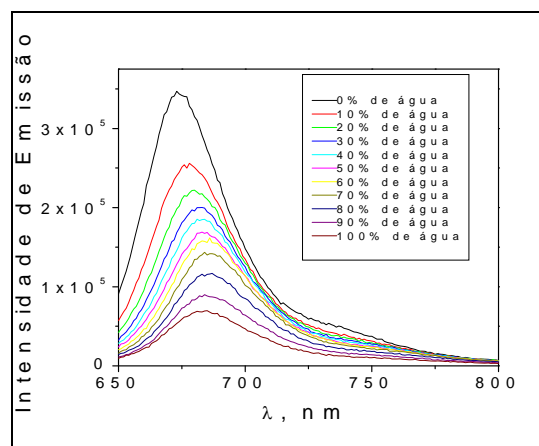


Figura 2: Espectro de emissão do AM para a mistura água/acetonitrila.

Nas figuras 3 e 4 a dependência dos valores de máximo de emissão do AM com a proporção de água nas misturas fica mais evidente. Esta dependência é ainda mais evidente na figura 3, para a mistura água/acetonitrila pelo fato da acetonitrila ser um solvente não – prótico.

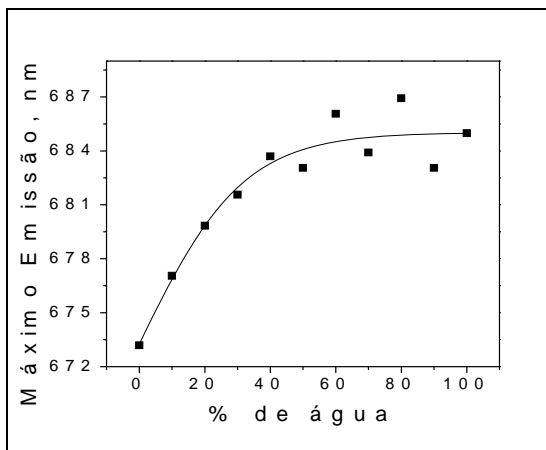


Figura 3: Variação do comprimento de onda máximo de emissão em função da porcentagem de água para mistura água/acetonitrila.

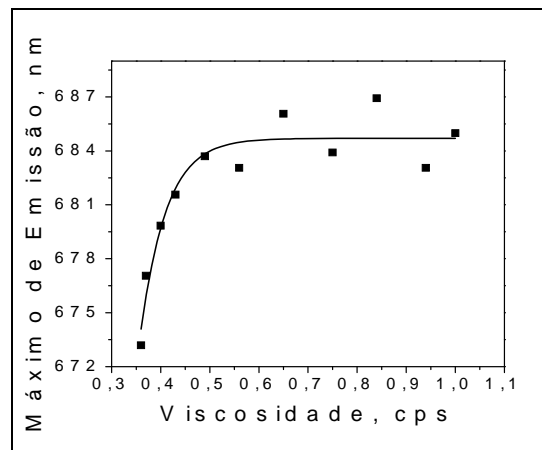


Figura 5: Variação do comprimento de onda máximo de emissão em função da viscosidade em mistura água/acetonitrila.

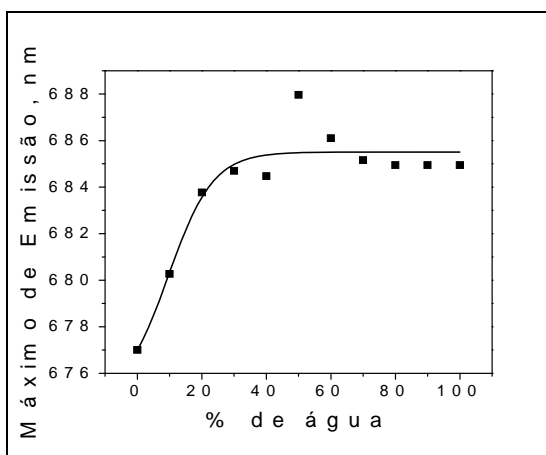


Figura 4: Variação do comprimento de onda máximo de emissão em função da porcentagem de água para mistura água/etanol.

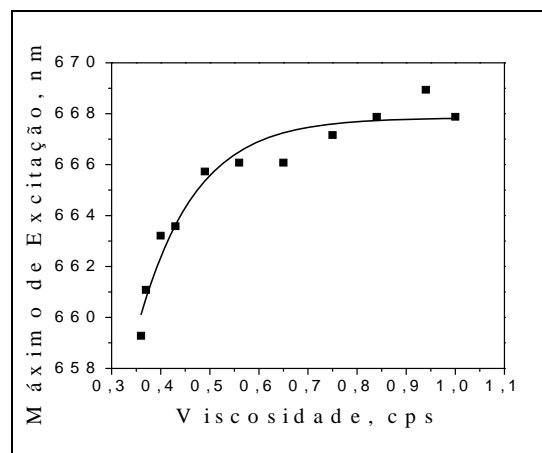


Figura 6: Variação do comprimento de onda máximo de excitação em função da viscosidade em mistura água/acetonitrila.

Há ainda a questão da viscosidade, visto que esta aumenta de acordo com a variação do comprimento de onda máximo de emissão e excitação, em função do teor de água, para a mistura água/acetonitrila (Figuras 5 e 6). O aumento da viscosidade impede a rotação do grupo CH_3 na molécula de AM, resultando em aumento da intensidade de fluorescência (NEUMANN et al. 1993).

Para misturas de solvente com mais de 30% de água, há um intenso decréscimo nas intensidades de fluorescência, em decorrência da auto-agregação do AM em meio aquoso. A figura 7 apresenta esse fenômeno por meio do espectro RLS (Espalhamento de luz ressonante): quanto maior a porcentagem de água, maior o número de agregados em solução.

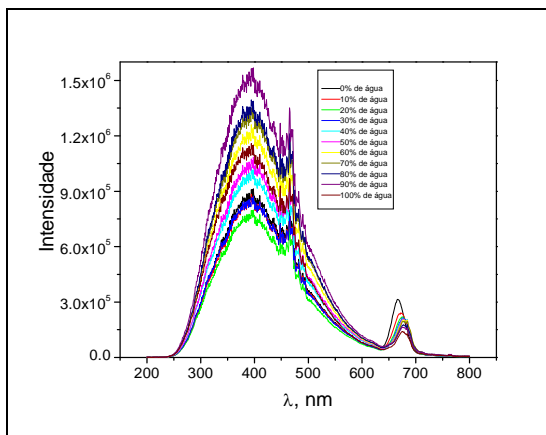


Figura 7: Variação da Intensidade de Sinal RLS em função da porcentagem de água em mistura água/etanol.

Mesmo em altas concentrações de água a emissão não desaparece por completo o que indica que, na concentração empregada, nem todas as moléculas de AM formaram agregados (Figura 1). É importante ressaltar que o fenômeno de auto-agregação não está apenas ligado ao solvente, mas também à concentração e solubilidade do substrato.

Com o emprego de uma mistura de solventes orgânicos (etanol/acetona, por exemplo), o ambiente favorece a permanência dos corantes na forma monomérica, o que é manifestado por altas intensidades de excitação e emissão.

Conclusão

Os dados mostram que parâmetros físico-químicos tendem a interferir diretamente na fotofísica do AM. Estes dados servirão de apoio para estudos posteriores, com o intuito de mostrar a proporção adequada de solvente para uma melhor emissão/excitação do AM, levando em consideração o fenômeno de auto-agregação.

Agradecimentos

Agradecemos ao suporte financeiro fornecido pela FAPESP (Projeto de auxílio a pesquisa 06/56701-3), FAPEMIG (EDT-515/05 e CEX-652/05), CNPq (Universal). A. Lima (IC), Antonio E.H. Machado (PQ 1-C) e

N. Hioka (PQ 2) agradecem ao CNPq pelas bolsas concedidas.

Referências

- REDMOND, R., **Photochemistry and Photobiology**, 1999.
- TARDIVO, J.P.; DEL GIGLIO A.; PASCHOAL, L.H.C.; ITO, A.S.; BAPTISTA, M.S., Treatment of melanoma lesions using methylene blue and RL50 light source. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** V. 1, n. 4, p. 345-346, 2004.
- WAINWRIGHT, M.; PHOENIX, D.A.; RICE, L.; BURROW, S.M.; WARING, J. Increased cytotoxicity and phototoxicity in the methylene blue series via chromophore methylation. **Journal of Photochemistry and Photobiology** V. 40, p. 233-239, 1997.
- FALJONI-ALÁRIO, A. Mudanças no estado spin e na reatividade de citocromo c induzidas por oxigênio singlete e radicais livres gerados fotoquimicamente. In: Workshop em terapia fotodinâmica: Complexo de moléculas fotoativas e suas aplicações. Aspectos físicos, químicos, biológicos e médicos, São Pedro, SP – Anais de Resumo, p. 93-94, 2003.
- SEVERINO, D.; GABRIELLI, D.; BELISE, E.; KOWALSTOWSKI, A.J.; BAPTISTA, M.S. Agregação do azul de metileno em mitocôndrias. In: Workshop em terapia fotodinâmica: Complexo de moléculas fotoativas e suas aplicações. Aspectos físicos, químicos, biológicos e médicos, São Pedro, SP – Anais de Resumo, p. 117-118, 2003.
- MACHADO, A.E.H. Terapia fotodinâmica: Princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, V. 23 n. 2, p.237-243, 2000.
- STOCHE, 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.
- LIMA, L. D.; Dissertação de mestrado – Universidade do Vale do Paraíba, 2004.
- NEUMANN, M. G.; TIERRA, M. J.; **Química Nova** V.16 n. 280, 1993.