

PROPRIEDADES ESPECTROSCÓPICAS DO AZUL DE TOLUIDINA

Mirian Marcolan¹, Leonardo M. Moreira¹, Augusto Gracetto², Noboru Hioka², Priscila Afonso Martins¹, Antônio Eduardo da Hora Machado³, Máira R. Rodrigues¹, Lúcia Codognoto¹, Hueder P. M. de Oliveira^{1*}

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

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

³Universidade Federal de Uberlândia/IQ Av. João Naves de Ávila, 2121,1D, Uberlândia, MG
hueder@univap.br

Resumo: O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de verificar a influência das propriedades do solvente sobre o comportamento fotofísico do Azul de Toluidina (AT). Estudos espectroscópicos de fluorescência foram efetuados em misturas água/etanol, água/acetonitrila e água/dioxano. Por serem hidrofóbicas, as características espectroscópicas desse composto são mais bem visualizadas quando a mistura de solventes apresenta o solvente orgânico em maior proporção. Em altas concentrações de água, o corante tende a formar agregados diméricos ou com estruturas maiores, o que dificultaria sua eventual aplicação em Terapia Fotodinâmica (TFD), uma vez que o fenômeno de auto-agregação diminui a capacidade de formação de espécies reativas de oxigênio, tais como o oxigênio singleto. De fato, é extremamente importante o desenvolvimento de novos estudos visando a uma melhor adequação da proporção de solventes para uma melhor absorção/emissão dessas moléculas. Desta forma, além de uma maior compreensão das propriedades fotofísicas de corantes, como, por exemplo, o AT, é possível avaliar o potencial deste tipo de fotossensibilizador para eventuais aplicações futuras no ramo da biomedicina.

Palavras – chave: Azul de toluidina, fluorescência, agregação.

Área de conhecimento: Química e Engenharia Biomédica.

Introdução

O corante fenotiazínico azul de toluidina (AT) é um corante aromático heterocíclico solúvel em água ou em álcool, que absorve intensamente na região espectroscópica do ultravioleta-visível. É um agente fotossensibilizante muito eficaz na inativação de organismos patogênicos como bactérias e vírus (WAINWRIGHT, 1997). Ademais, este composto apresenta estrutura química muito semelhante àquela referente ao corante amplamente estudado na literatura Azul de Metileno, sendo que ambos apresentam significativa similaridade quanto a certas características fotofísicas. Desta forma, o grande conteúdo de informações de caráter físico-químico referentes ao azul de metileno, incluindo suas propriedades espectroscópicas e eventuais potencialidades terapêuticas como agente fotossensibilizante, poderia ser profundamente explorado visando a uma compreensão mais pormenorizada deste sistema químico.

Estudos com o AT mostraram a eficiência deste composto orgânico como uma substância antifúngica e bactericida, haja vista sua ação inibidora do metabolismo de algumas bactérias

gram-positivas e gram-negativas (ITO, 1977; WILSON, 1994; BHATTI *et al.*, 1998).

A combinação de AT com um estímulo luminoso favorece a formação de espécies reativas de oxigênio, como é o caso do oxigênio singleto, que é uma espécie de oxigênio citotóxico, cuja ação bactericida está bem estabelecida na inibição de diversos microorganismos, como por exemplo, bactérias periodontopatogênicas (BHATTI *et al.*, 1998). De fato, a ação oxidante das espécies reativas de oxigênio pode causar, inclusive, fotodegradação em diferentes espécies de adenovírus (HIATT *et al.*, 1960).

Além de ser usado como droga fotossensibilizante, o AT tem sido empregado para avaliar a eficácia de métodos de coloração na identificação de alterações no complexo DNA – Proteína de espermatozoides humanos, (ROCHA *et al.*, 2002).

Realmente, a ampla possibilidade de utilizações fotofísicas e fotoquímicas de AT o predispõe como interessante protótipo para diversas aplicações na ciência e na tecnologia, sobretudo em função de seu elevado rendimento quântico. Neste contexto, destaca-se a possível

aplicação como agente fotossensibilizante em Terapia Fotodinâmica (TFD).

No presente trabalho, foi desenvolvido um amplo estudo da influência do sistema de solvente nas propriedades espectroscópicas e fotofísicas (excitação, emissão e espalhamento de luz ressonante (ELR) do Azul de Toluidina (AT).

Materiais e Métodos

Foram utilizadas onze soluções contendo AT em 2 mL de diferentes proporções água/etanol, onze amostras de água/acetoneitrila e onze exemplares de água/dioxano, variando cada um destes sistemas de solvente de 0 a 100% de água, utilizando de intervalos de 10 em 10%. O AT (Aldrich, 85%) foi previamente recristalizado em acetona/metanol. As medidas foram efetuadas 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 obtidos a partir dos picos de máximo de intensidade indicados nos espectros de excitação das amostras. As amostras foram condicionadas em cubetas, e as medidas foram desenvolvidas no modo *front-face*.

Estudos de ELR (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 $\Delta\lambda = 0$ nanômetros (nm) (este valor corresponde ao intervalo de espera para coletar a emissão após a excitação), a fim de verificar eventuais processos de auto-agregação.

Resultados e discussão

Os espectros de fluorescência são largos e apresentam o mesmo perfil espectral, independente da mistura de solventes utilizada, com espectros largos e bem definidos. Por outro lado, as intensidades das bandas variam com a proporção de solventes. Os dados evidenciam uma dependência da fluorescência com a proporção de água nas respectivas misturas.

As figuras 1 e 2 ilustram a emissão de fluorescência para o AT em misturas água/etanol e água/acetoneitrila, respectivamente. É possível perceber uma maior intensidade de fluorescência em etanol e acetoneitrila puros, com o composto se apresentando na forma monomérica. Na medida em que aumenta a proporção de água em ambas as misturas, a intensidade de fluorescência cai, fato associado com a auto-

agregação do fotossensibilizante. O fenômeno de agregação está associado às características dos solventes, pois a água tende a favorecer a agregação em virtude das moléculas de corantes em geral serem hidrofóbicas. De fato, está bem estabelecido na literatura que a agregação de corantes é importante gerador de supressão de fluorescência em função dos contatos gerados neste processo.

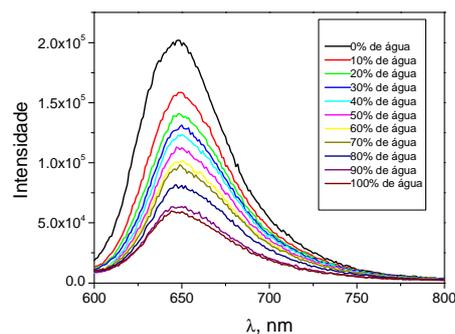


Figura 1: Espectro de emissão do AT para mistura água/etanol, T = 298 K.

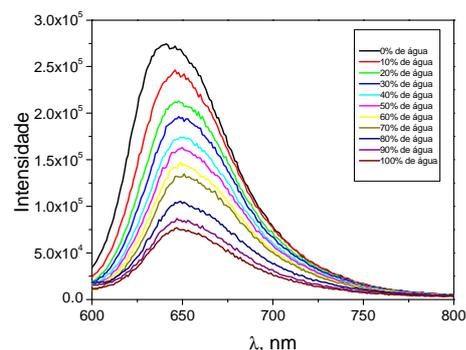


Figura 2: Espectro de Emissão do AT para a mistura água/acetoneitrila, T = 298 K.

Na Figura 3, onde o solvente orgânico é o dioxano, o comportamento é praticamente o mesmo quando ainda há a interação de solventes. Em dioxano puro, a intensidade de fluorescência cai, mostrando que não há a mesma interação das moléculas do corante com as moléculas do solvente, como no caso do etanol e a acetoneitrila. O dioxano é um solvente apolar e não prótico, o que pode explicar algumas das características espectrais observadas.

Durante a formação da espécie agregada, as unidades monoméricas se associam e se estabelecem de maneiras diversas, sendo possíveis diferentes orientações de momentos dipolares de transição de cada monômero (KASHA, 1963; ARBELOA et al 1982). De fato, é importante ressaltar que a razão entre os

diferentes solventes é um importante fator determinante da orientação de cada molécula de Azul de Toluidina assim como a constante dielétrica dos mesmos. Desta forma, diferentes relações percentuais de concentração podem originar diferentes tipos de agregação e, conseqüentemente, diferentes níveis alteração espectroscópica, tanto no que se refere à absorção como em se tratando do rendimento quântico de emissão de fluorescência.

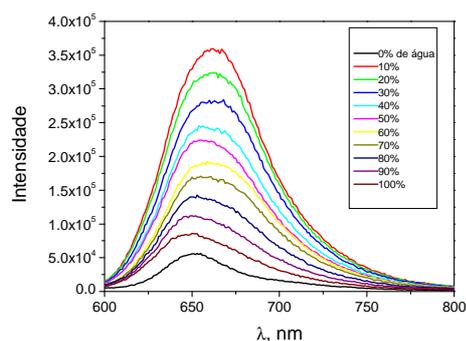


Figura 3: Espectro de Emissão do AT para uma mistura água/dioxano, T = 298 K.

Vale acrescentar que mesmo 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 do etanol e da acetonitrila), o ambiente torna-se favorável aos corantes na forma monomérica, originando, conseqüentemente, altas intensidades de excitação e emissão.

Estes decréscimos são consideráveis, e estão relacionados com a diminuição do número de monômeros livres. Provavelmente, estas condições de meio favorecem a formação de pequeno agregado, como por exemplo, dímeros, uma vez que este decréscimo é bastante pronunciado para ser atribuído ao efeito do solvente (MARGALIT *et al.*, 1983)

Importante registrar outro fator decisivo que diz respeito à questão da viscosidade. A viscosidade tende a induzir um aumento do comprimento de onda máximo de emissão, em função da porcentagem de água nas diversas misturas de solventes utilizados (Figura 4). A viscosidade interfere diretamente nos processos de desativação do estado excitado do corante tornando-os mais lentos em meios mais viscosos. Este aumento da viscosidade impede que haja movimentos de rotação interna dos grupamentos presentes na molécula do corante, resultando num aumento da intensidade de fluorescência e, como conseqüência, de uma menor supressão dos estados excitados. O decréscimo no valor de máximo de emissão a partir de 0,7 cP pode ser

um indicativo de saturação do corante por moléculas do solvente (via interações intermoleculares como ligação hidrogênio e interações dipolo-dipolo).

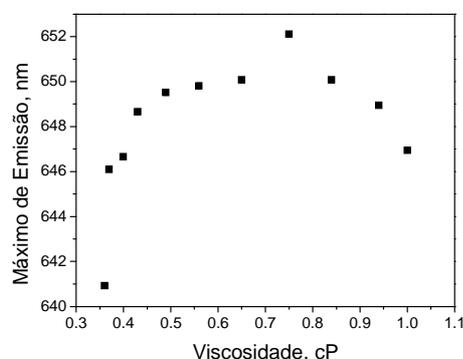


Figura 4: Variação do comprimento de onda máximo de emissão em função da viscosidade para mistura água/acetonitrila, T = 298 K.

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. 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, como ilustra a figura 5. Vale registrar que está bem estabelecido na literatura a tendência de deslocamento batocrômico (para maiores comprimentos de onda) com o aumento da constante dielétrica do meio, como função da maior polarizabilidade e acessibilidade dos orbitais pi anti-ligantes em relação aos orbitais pi ligantes, o que diminui a energia da transição eletrônica em questão. Também aqui há um decréscimo nos valores de máximo de emissão que também podem ser explicados em função da solvatação das moléculas do corante pelas do solvente.

Para misturas de solvente com mais de 30% de água, há um intenso decréscimo nas intensidades de fluorescência, em decorrência da auto-agregação do AT em meio aquoso. A figura 6 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.

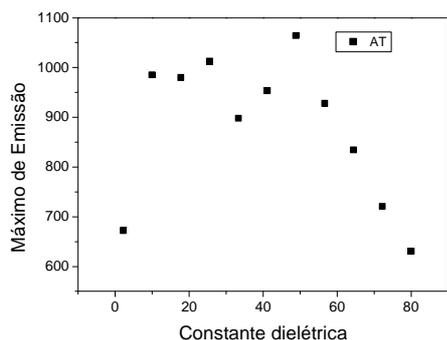


Figura 5: Variação do comprimento de onda máximo de emissão em função da constante dielétrica do sistema para mistura água/dioxano, T = 298 K.

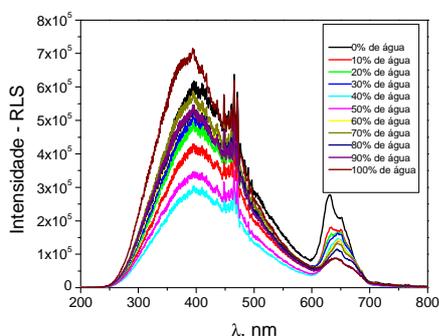


Figura 6: Variação da Intensidade de Sinal RLS em função da porcentagem de água em mistura água/etanol, T = 298 K.

Conclusão

O Azul de Toluidina apresenta características favoráveis para aplicação em Terapia Fotodinâmica como a absorção de luz na faixa terapêutica entre 660 e 670 nm, com elevadas absorvidades molares (dados não apresentados). De fato, assim como as ftalocianinas, que são conhecidas como agentes fotossensibilizantes de segunda geração, o corante AT não absorve, predominantemente, em torno de 400 nm, como ocorre com a maioria das porfirinas (primeira geração), o que evita a competição pela radiação eletromagnética incidente entre o fotossensibilizador e os pigmentos inerentes à epiderme e à derme, como por exemplo, a melanina e a hemoglobina, que também apresentam maior absorção em aproximadamente 400 nm.

Os dados mostram que parâmetros físico-químicos utilizados nos experimentos tais como viscosidade e constante dielétrica tendem a interferir diretamente na fotofísica do AT. Estes dados servirão de apoio para estudos posteriores.

com o intuito de mostrar a proporção adequada de solvente para uma melhor emissão/excitação do AT, levando em consideração o fenômeno de auto-agregação.

Referências bibliográficas

ARBELOA, I. L.; OJEDA, P. R. **Chem. Phys. Letters**, 87(6), p.556-560, 1982.

BHATTI, M.; MACROBERT, A.; MEGHJI, S.; HENDERSON, B.; WILSON, M. A study of the uptake of toluidine blue o by *Porphyromonas gingivalis* and the mechanism of lethal photosensitization. **Photochem Photobiol.** V. 68, P. 370-376, 1998.

HIATT, C.; KAUFMAN, E.; HELPLIN, J.; BARON, S. Inactivation of viruses by the photodynamic action of toluidine blue. **J. Immunol** V. 84, P. 370-376, 1960.

ITO, T. Toluidine Blue: The mode of photodynamic action in yeast cells. **Photochem. Photobiol.** V. 25, P. 47-53, 1977.

KASHA, M., **Radiation Research**, 20, p.55-71 1963.

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.

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.

WAINWRIGHT, M. Non-porphyrin photosensitizers in biomedicine. **Chem. Soc. Rev.** V.25, P. 351-359, 1997.

WILSON, M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. **Int. Dent. J.** V. 44, P. 181-189, 1994.