

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO FOTOQUÍMICA DE CURCUMINA E AZUL DE METILENO

Mateus Leonardo dos Santos, Maria Clara Barbosa Silva de Azevedo, Juliana Ferreira – Strixino, Juliana Guerra Pinto.

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Lab de Fotobiologia Aplicada à Saúde (PHOTOBIO). Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil. mateusleonardo164@gmail.com, mariaclarabsa@gmail.com, juferreira@univap.br, juguerra@univap.br

Resumo

A Terapia fotodinâmica (TFD) é um tratamento baseado na associação de luz, fotossensibilizador (FS), que é uma substância capaz de interagir com a luz, e, na presença de oxigênio molecular gerar espécies reativas de oxigênio. O azul de metileno é um composto muito estudado como FS, assim como a curcumina (CUR), composto natural que vem ganhando destaque recentemente na TFD. Este estudo teve como objetivo avaliar e comparar a degradação de curcumina e Azul de Metileno após irradiação com LED. Os FS foram irradiados em biotables com comprimentos de onda de 660 nm e 450 nm e potências de 46,5 mW.cm⁻² e 110 mW.cm⁻², a absorbância foi avaliada por espectrofotometria. O azul de metileno possui absorção máxima na casa dos 600 a 700 nm, já a curcumina absorve entre 300 a 450 nm, ambos os FS sofreram degradação com a irradiação, notando-se menos absorbância com doses mais altas de energia. Quando associados, a curcumina possui características que permitem se sobressair ao azul de metileno. Nota-se, para todos os FS, a degradação à medida que a dose de energia da irradiação aumenta.

Palavras-chave: Azul de Metileno. Curcumina. Degradação. Fotoquímica.

Área do Conhecimento: Biomedicina

Introdução

A Terapia fotodinâmica (TFD) é um tratamento baseado na associação de três componentes: luz, fotossensibilizador (FS), que é uma substância capaz de interagir com a luz, e, na presença de oxigênio molecular gerar espécies reativas de oxigênio, capazes de destruir as células (BABINSKI et al, 2022). A TFD é uma terapia seletiva, danificando somente as células expostas, isto é, baixa toxicidade às células que não são alvos, sendo por isso, estudada para várias áreas.

O Azul de metileno (AM) é um composto muito utilizado como indicador redox, também estudado como fotossensibilizador para TFD. Possui absorção máxima em 660 nm, baixa toxicidade e alta produção de oxigênio singlete. O AM é um FS estabelecido para TFD, tendo sido estudado em tratamentos contra o câncer, vírus, bactérias, fungos, protozoários e tratamentos odontológicos (DUTRA, 2013).

A curcumina (CUR) é um composto natural obtido através do rizoma da planta *Curcuma longa*, conhecida popularmente como açafrão da Índia ou açafrão da terra (COLLINO, 2014), e vem ganhando destaque recentemente como FS na TFD. Tal composto possui três grupos funcionais: uma porção dicetona, dois grupos fenólicos e duas ligações duplas conjugadas. É considerada um ótimo doador de hidrogênio, propriedade que é indicada como maior responsável por suas propriedades antioxidantes. A CUR apresenta absorção na região de 300 a 500 nm, sendo sensível à degradação térmica, além de ser fotodegradável (CAMATARI, 2017).

Considerando a importância dos FS para a TFD, a utilização e relevância do AM e CUR como FS, este estudo teve como objetivo avaliar e comparar a degradação desses compostos após irradiação com LED em 450 e 660 nm, isolados e associados.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Metodologia

Diluição dos fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores foram diluídos da concentração de estoque para a concentração de trabalho utilizando Solução Tampão Salina-Fosfato (PBS). A solução estoque de AM possuía 350 $\mu\text{g/mL}$, sendo 7 $\mu\text{g/mL}$ a concentração escolhida para o trabalho, portanto, diluiu-se 200 μL da solução estoque em 9800 μL de PBS. Para a curcumina, foi escolhida a concentração de trabalho de 200 $\mu\text{g/mL}$, diluindo 200 μL da solução estoque (10 mg/mL) em 9800 μL de PBS. A diluição do grupo Azul de metileno + Curcumina foi dada com 200 μL de solução estoque de AM, 200 μL de solução estoque de CUR e 9600 μL de PBS.

Grupos experimentais

Os testes foram realizados com os FS em grupos de 5 a 50 J.cm^{-2} . os grupos estão listados a seguir na tabela 1.

Tabela 1- grupos experimentais

Fotossensibilizador	Grupos
Curcumina	Grupos de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 J.cm^{-2} .
Azul de metileno	Grupos de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 J.cm^{-2} .
Azul de metileno + Curcumina	Grupos de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 J.cm^{-2} .

Fonte: O autor (2023)

Irradiação dos Fotossensibilizadores

Para irradiação do AM, foi utilizado Biotable no comprimento de onda de 660 nm com potência de 46,5 mW.cm^{-2} .

Para irradiação da curcumina, a irradiação foi realizada em Biotable constituída de 48 LEDs, com potência de 3 W por LED, no comprimento de onda de 450 nm com potência de 110 mW.cm^{-2} .

Para o grupo Azul de metileno + Curcumina os mesmos equipamentos citados foram utilizados, tendo realizado irradiação primeiro no comprimento de onda de 450 nm com potência 110 mW.cm^{-2} e após com a irradiação com comprimento de onda de 660 nm e potência de 46,5 mW.cm^{-2} .

Avaliação do espectro de absorção por Espectrofotometria UV-Visível

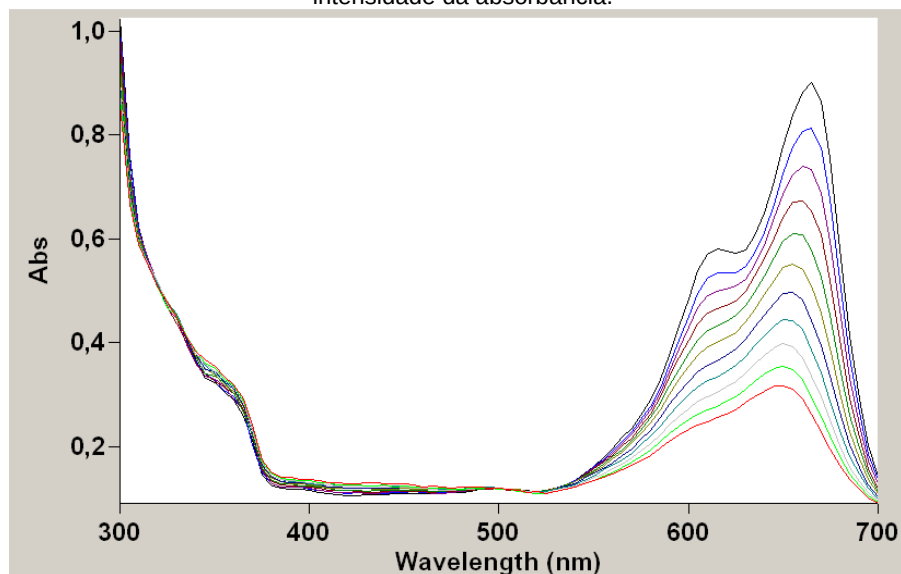
A avaliação da degradação pós irradiação foi realizada através de espectrofotometria UV, utilizando espectrofotômetro Varian Cary 50, em função scan, com espectro de leitura entre 300 nm e 700 nm. Os dados foram posteriormente exportados para o software Microsoft Excel.

Resultados

Foram realizadas as irradiações dos grupos e os resultados estão nas imagens dos gráficos a seguir. A Figura 1 apresenta os resultados da irradiação do azul de metileno de todas as variações de fluência.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Figura 1-Espectro de absorção do Azul de Metileno no ponto zero, (linha preta) e após irradiação com LED em 660 nm nas fluências de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 J.cm⁻², sendo possível observar queda na intensidade da absorbância.

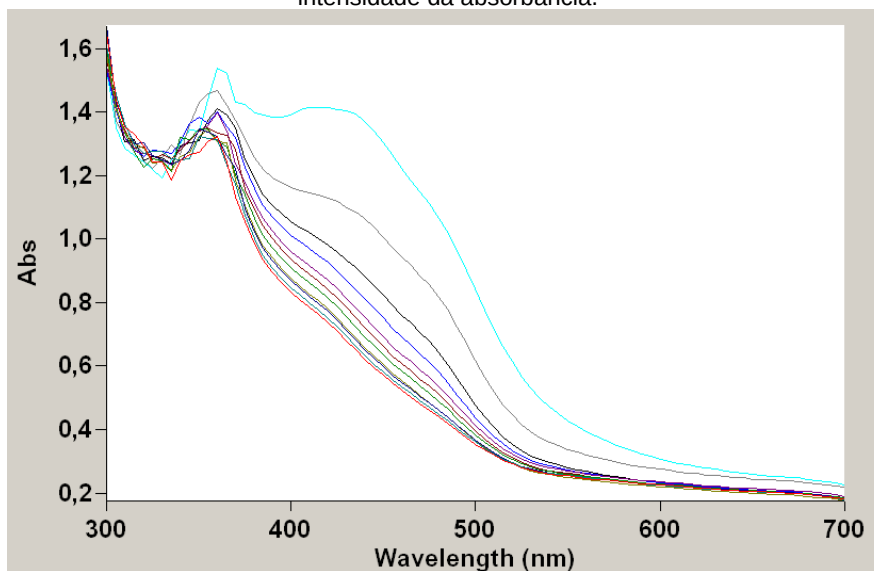


Fonte: O autor (2023)

O azul de metileno apresentou absorção máxima em 660 nm, podendo também ser possível observar que houve a diminuição do valor de absorbância conforme o passar dos grupos, indicando a degradação do composto.

Conforme a Figura 2, a curcumina apresentou características importantes, como pico de absorção entre 400 a 500 nm, no ponto inicial, sem irradiação. É possível observar também que ocorreu degradação do composto conforme o decorrer dos grupos, isto é, a medida em que a dose de energia aumenta.

Figura 2- Espectro de absorção da curcumina no ponto zero, (linha azul clara) e após irradiação com LED em 660 nm nas fluências de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 J.cm⁻², sendo possível observar queda na intensidade da absorbância.

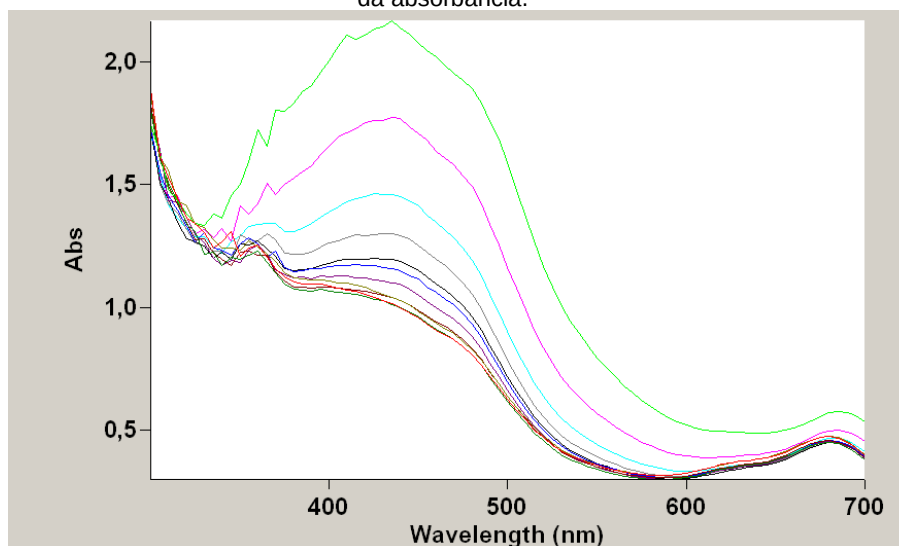


Fonte: O autor (2023)

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

A Figura 3 retrata o espectro de absorção do azul de metileno associado à curcumina após irradiação, e demonstra maior absorção da CUR, no ponto inicial, quando associada ao AM em comparação com a CUR pura. O contrário foi observado no pico de absorção do AM, menor quando associado à curcumina. Paralelo a isso, foi possível observar uma maior degradação do AM quando em comparação ao grupo CUR, visto que a região de 660 nm apresenta baixa absorbância, embora, seja mais notável o decaimento da CUR entre os grupos tratados.

Figura 3-Espectro de absorção da CUR + AM no ponto zero, (linha verde) e após irradiação com LED em 660 nm nas fluências de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 J.cm⁻², sendo possível observar queda na intensidade da absorbância.



Fonte: O Autor (2023)

Discussão

O azul de metileno demonstrou, durante os testes, absorção máxima em 664 nm, de acordo com o esperado. Junqueira e colaboradores em 2002, demonstraram que a concentração é um fator importante para o espectro de absorção do AM, pois sua característica de dimerização pode causar alterações, tendo o monômero de AM absorbância máxima na casa dos 664 nm enquanto os dímeros possuem absorção máxima na casa dos 590 nm. Dutra em 2013 destacou que o meio e concentração no qual o azul de metileno está diluído influenciam sua atividade fotodinâmica, isto é, quanto maior a quantidade de dímeros, maior a atividade de trocas eletrônicas, e como consequência, se torna menor o número de transferências com oxigênio molecular, diminuindo a produção de oxigênio singlete. Portanto, é preferencial o uso de soluções que apresentem maior número de monômeros, sendo que, quanto maior a concentração de AM, maior é sua tendência à formação de dímeros (DUTRA, 2013). No presente estudo, o AM foi utilizado em concentração de 7 µg/mL e apresentou absorção máxima na casa dos 664 nm, correspondendo aos resultados dos trabalhos citados.

De acordo com a literatura, a degradação está relacionada à interação entre radicais livres, que se formam como resultado da interação entre as moléculas, e estes radicais livres atuam na degradação das moléculas do AM (HOUAS, 2000). Tardivo em 2005, destaca que o AM tem como uma das características mais importantes, para suas funções biológicas, a sua capacidade de produzir reações fotodinâmicas do tipo I e tipo II. A reação de tipo I está relacionada a transferências energéticas, onde agentes redutores doam elétrons para o AM formando produtos semi-reduzidos, estes produtos podem reagir com o oxigênio molecular e gerar a produção de espécies reativas de oxigênio. Já a reação de tipo II está relacionada a transferência energética entre o azul de metileno excitado e o oxigênio molecular, esta reação é capaz de levar a formação de oxigênio singlete.

Mezzacappo em 2020 comparou em seu estudo a degradação da CUR utilizando lâmpadas fluorescentes e luz azul, sendo com a luz azul a fotodegradação mais rápida. Tal resultado é explicado devido ao alto valor de irradiação da fonte de luz e monocromatismo, e portanto, emite toda a luz na

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

faixa de absorção máxima da CUR. Também destaca em seu trabalho que não ocorre decaimento completo da CUR nas regiões de maior absorção, estando de acordo com o visto no presente estudo, em que se observa degradação rápida da curcumina em luz azul, não ocorrendo completamente.

Trigo Gutierrez em 2016 avaliou a degradação de curcumina encapsulada e obteve resultados semelhantes, tanto com a curcumina encapsulada, quanto com curcumina livre. Lopes em 2019 observou que a curcumina degrada mais com o decorrer do tempo quando comparada a outros compostos analisados, sendo destacado que compostos dímeros e trímeros tendem a ter estabilidade maior que a CUR.

A curcumina é considerada um composto pouco estável, e segundo Chignell e colaboradores em 1993, suas características fotoquímicas podem ser levemente afetadas de acordo com solvente utilizado, sendo possível tender um pouco mais à direção da luz vermelha quando em solventes mais polares. De acordo com Priyadarsini em 2008, na maior parte dos solventes polares a absorção máxima da curcumina se apresenta entre os 420 nm, podendo sofrer variação para até os 435 nm.

Lestari em 2014 discutiu que a curcumina é capaz de se manter estável em temperaturas de até 70 °C, acima dessa temperatura ela aumenta sua degradação, e a exposição a luz solar, de acordo com Tennesen e seus colaboradores em 1986, gera mais produtos de degradação, sendo eles a vanilina e o ácido ferúlico.

Em 2015, Schneider destacou que os produtos da degradação da curcumina ainda não possuem suas atividades biológicas totalmente esclarecidas e que futuros estudos seriam necessários para melhor entendimento da questão. Já Zhou e colaboradores em 2017, demonstram que ocorre aumento das atividades biológicas quando a curcumina é estabilizada com outras substâncias, o que indicaria que a maior parte da atividade biológica seria proveniente da curcumina, e não de seus produtos. Outros produtos relevantes da fotodegradação da curcumina, em especial para a TFD, são as espécies reativas de oxigênio, gerando produção de oxigênio singlete e superóxido (PRIYADARSINI; 2008).

No grupo em que houve associação entre azul de metileno e curcumina, foi possível perceber a maior prevalência da CUR, esta característica foi demonstrada por Tonnesen e colaboradores em 1986, onde os autores concluem que a curcumina associada a outros fotossensibilizadores, como o azul de metileno, pode causar um efeito de desestabilizar os outros compostos e se sobressair a outros componentes da mistura, sendo ainda observado pelos autores que a mistura dos dois aumentou a degradação da curcumina, corroborando com os resultados obtidos pelo trabalho.

Conclusão

Conclui-se que a curcumina possui absorção máxima de energia entre 300 e 500 nm, enquanto o azul de metileno possui absorção máxima aproximada de 660 nm. Ambos os FS sofreram degradação ao serem irradiados, sendo notável a diminuição da absorbância à medida em que a dose de energia da irradiação aumenta.

Quando associados, é possível perceber que a CUR, se sobrepõe ao azul de metileno, sendo notória sua degradação, enquanto o AM apresenta maior estabilidade.

Referências

- BABINSKI, Tatiane Patricia et al. Uso da curcumina na terapia fotodinâmica antimicrobiana: uma revisão. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 5, n. 2, p. 7259-7271, 2022.
- CAMATARI, Fabiana Oliveira dos Santos et al. Determinação de curcuminóides e avaliação da capacidade antioxidante contra espécies reativas de Oxigênio e Nitrogênio de extratos de Curcuma longa e constituintes isolados. 2017.
- CHIGNELL, Colin F. et al. Spectral and photochemical properties of curcumin. *Photochemistry and photobiology*, v. 59, n. 3, p. 295-302, 1994.
- COLLINO, Luma. Curcumina: de especiaria à nutracêutico. 2014. 87 f. , 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/124230>>.
- DUTRA, Danilo Antonio Milbradt et al. Avaliação do fotossensibilizador azul de metileno em diferentes formulações para uso em terapia fotodinâmica. 2013.
- HOUAS, Ammar et al. Photocatalytic degradation pathway of methylene blue in water. *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 31, n. 2, p. 145-157, 2001.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

JUNQUEIRA, Helena C. et al. Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 4, n. 11, p. 2320-2328, 2002.

LESTARI, Maria LAD; INDROYANTO, Gunawan. Curcumin. Profiles of drug substances, excipients and related methodology, v. 39, p. 113-204, 2014.

LOPES, Thais de Assis. Fotocatálise e suas aplicações em reações de ciclização oxidativa e terapia fotônicas. 2019.

MEZZACAPPO, Natasha Ferreira. Avaliação dos efeitos subletais da inativação fotodinâmica em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e fotodegradação da curcumina em D-manitol. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PRIYADARSINI, K. Indira. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, v. 10, n. 2, p. 81-95, 2009.

SCHNEIDER, Claus et al. Degradation of curcumin: from mechanism to biological implications. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 63, n. 35, p. 7606-7614, 2015.

TARDIVO, Joao Paulo et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, v. 2, n. 3, p. 175-191, 2005.

TONNESEN, Hanne Hjorth; KARLSEN, Jan. Kinetics of Curcumin Degradation in Aqueous Solution. *Z Lebensm Unters Forsch*, v. 180, p. 402-404, 1985.

TRIGO GUTIERREZ, Jeffersson Krishan. Síntese, caracterização e efeitos fotodinâmicos de curcumina encapsulada em nanopartículas poliméricas. 2016.

ZHU, Julia et al. Potential roles of chemical degradation in the biological activities of curcumin. *Food & function*, v. 8, n. 3, p. 907-914, 2017.