

## Influência da adsorção de ácido úrico em MCM-41 na avaliação de atividade fotodinâmica química

## Influence of uric acid adsorption on MCM-41 in the evaluation of chemical photodynamic activity

### RESUMO

Donizeti Leonardo Mancini Tolari  
[donizetileonardo3@gmail.com](mailto:donizetileonardo3@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

Ana Claudia Pedrozo da Silva  
[anapedrozo1@gmail.com](mailto:anapedrozo1@gmail.com)  
Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil

André Luiz Tessaro  
[andretessaro@utfpr.edu.br](mailto:andretessaro@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade baseada em incidir luz em determinado comprimento de onda em compostos fotossensíveis (FS) desencadeando processos fotofísicos que geram espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singleto. A eficiência da técnica é avaliada pelo rendimento quântico, determinado por fosforescência utilizando um equipamento caro e de difícil acesso. Devido a esta dificuldade metodologias indiretas utilizando agentes sequestrantes foram desenvolvidas, a metodologia de Atividade Fotodinâmica Química (AFQ) é muito empregada, utilizando o ácido úrico (AU) como sequestrante. O emprego de sílica mesoporosa (MCM-41) como agente carreador de FS vem sendo muito explorado em TFD. Considerando o curto raio de ação do oxigênio singleto e uso frequente da AFQ para a avaliação da eficiência de formação desta espécie, o estudo da adsorção de moléculas de AU em MCM-41 se faz necessário, uma vez que a localização deste agente sequestrante é fundamental para sua reação com o oxigênio singleto gerado. Desta forma, avaliou-se a adsorção do AU nas nanopartículas de sílica, simulando as concentrações utilizadas nos ensaios de AFQ. Contudo nas condições avaliadas as a adsorção de AU às nanopartículas foi relativamente baixa, indicando que ao menos sob a ótica da adsorção os resultados de AFQ obtidos a partir de formulações contendo MCM-41 não são interferido pela posição do AU. Mesmo assim, tais resultados abrem espaço para uma avaliação em concentrações maiores para verificar se o fenômeno apresenta maior intensidade.

**Recebido:** 19 ago. 2020.

**Aprovado:** 01 out. 2020.

**Direito autorial:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ácido úrico. Adsorção. Atividade fotodinâmica química. Nanopartículas. Terapia fotodinâmica.

### ABSTRACT

Photodynamic Therapy (PDT) is a modality based on shining light at a certain wavelength in photosensitive compounds (PS), triggering photophysical processes that generate reactive oxygen species, such as singlet oxygen. The efficiency of the technique is assessed by the singlet oxygen quantum yield, determined by phosphorescence using an expensive equipment and difficult to access. Due to this difficulty, indirect methodologies using scavengers have been developed, the methodology Photodynamic Activity (PA) is widely used, using uric acid (UA) as scavenger. Currently the use of mesoporous silica (MCM-41) as nanocarriers for PDT has been highlighted. Taking into account the short site of action of singlet oxygen and the frequent use of AFQ for the evaluation of the generation of this species, the study of the adsorption of AU molecules into MCM-41 is fundamental, since the



location of this scavenger is essential for its reaction with the generated singlet oxygen. is in this way, AU adsorption into silica nanoparticles was evaluated, simulating the concentrations used in the PA assay. However, under the conditions evaluated, the AU adsorption to nanoparticles was relatively low, indicating that, at least from the perspective of adsorption, the AFQ results obtained from formulations containing MCM-41 are not interfered by the AU position. Even though, these results open space for an evaluation in higher concentrations to verify if the phenomenon is more intense.

**KEYWORDS:** Adsorption. Nanoparticles. Photodynamic Activity. Photodynamic therapy. Uric acid.

## INTRODUÇÃO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade clínica para o tratamento de câncer. Ela se baseia em incidir uma intensidade de luz, com comprimento de onda específico, sobre um composto fotossensível (FS). Isto desencadeia uma série de processos fotofísicos, que em presença de oxigênio, faz com que sejam geradas espécies reativas de oxigênio (EROs) que induzem a célula a apoptose (SILVA, 2018, p.1).

O oxigênio molecular tem seu estado fundamental na forma de oxigênio tripleto ( $^3\text{O}_2$ ), possuindo dois elétrons desemparelhados em orbitais degenerados  $\pi_x^*$  e  $\pi_y^*$ . Já quando excitado, possui duas formas degeneradas, onde os elétrons ocupam um mesmo orbital  $\pi^*$ . Devido a isto, um orbital fica vazio, garantindo uma maior participação nas reações, causado por um grande caráter eletrofílico que atinge. Neste estado, ele é chamado de oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) e é uma das principais espécies causadoras do dano fotodinâmico (MACHADO, 2000, p.2).

Além de tudo, o oxigênio singleto possui um tempo de vida de inferior a 0,04  $\mu\text{s}$  em sistemas biológicos, implicando em um raio de ação muito curto, de aproximadamente 0,02  $\mu\text{m}$ . Estas características fazem com que o dano ocorra apenas na região onde o mesmo é gerado o que garante a seletividade da técnica (MACHADO, 2000, p.2).

A eficiência da TFD e, conseqüentemente, seu uso está associada a quantidade de  $^1\text{O}_2$  produzido, que é avaliado por meio do rendimento quântico ( $\Phi_\Delta$ ). A atual determinação de  $\Phi_\Delta$  é realizada por metodologia de fosforescência. Usa-se um espectrofluorímetro para infravermelho próximo resolvido no tempo acoplado a uma fotomultiplicadora resfriada a  $-80^\circ\text{C}$  por nitrogênio líquido, um equipamento caro e de difícil acesso (RABELLO, 2012, p.53).

Por este motivo, foram desenvolvidas metodologias indiretas que fazem uso da Atividade Fotodinâmica Química (AFQ). A AFQ emprega o uso de um sequestrante de oxigênio singleto que é adicionada na solução analisada. Assim, a fotoexcitação do FS, inicialmente com radiação monocromática, gera  $^1\text{O}_2$  o qual é removido do meio pelo agente sequestrante. Um dos sequestrantes mais utilizados é o ácido úrico (AU), que possui a vantagem de absorver na região do ultravioleta, não sobrepondo seu espectro com a maioria dos FS utilizados, o que permite seu monitoramento. Recentemente alternativas empregando fontes de iluminação de luz de LED, policromática, foram propostas onde o ácido úrico (AU) é empregado como substrato (GEROLA, 2012, p.15).

A maioria dos fármacos utilizados em TFD é constituída por compostos hidrofóbicos o que torna o processo de formulação fundamental para o sucesso fotodinâmico. Isso se deve ao fato de que uma vez autoagregado os FS utilizados perdem, sobremaneira, sua capacidade de geração de oxigênio singleto. Assim, diversos sistemas nanoparticulados são utilizados como carreadores na TFD, tais como, micelas poliméricas, lipossomas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas de sílica, etc. Destes sistemas a utilização de nanopartículas de sílica ganha destaque, isso devido ao seu potencial para uso eficiente, por possuir uma uniformidade em seus poros e uma enorme área superficial, que permitem a inclusão de uma elevada carga de FS (LIN, 2012, p.16).

Desde sua descoberta em 1992 pelos cientistas da Mobil Corporation, as peneiras moleculares recebem muita atenção, dentre estas temos a *Mobil Composition of Matter No. 41* (MCM-41) estudada extensivamente. A sílica mesoporosa do tipo MCM-41 apresenta arranjos hexagonais de poros cilíndricos, sendo sintetizados por automontagem em cima de micelas de surfactantes (VALLET-REGI, 2001, p.308).

Os arranjos da MCM-41 possuem um tamanho uniforme (15 a 100 Å) e uma enorme área superficial (>1000 m<sup>2</sup>/g), com tal área, este material tem um grande potencial para adsorção. O emprego de sílica mesoporosa em tratamentos e liberação controladas de fármacos utilizando da TFD é relatado em diversos trabalhos. Estes utilizam da metodologia AFQ com AU como substrato para a avaliação da eficiência da técnica (CHEN, 1993; MANZANO, 2008; SILVA, 2018).

Considerando o limitado raio de ação e o curto tempo de vida do <sup>1</sup>O<sub>2</sub> associado a formulações que empregam a MCM-41 é possível que a adsorção do AU pela MCM-41 interfira na determinação correta do rendimento quântico via metodologia indireta. Desta forma este trabalho tem por objetivo avaliar a adsorção do AU em nanopartículas de MCM-41 nas mesmas condições utilizadas nos ensaios de AFQ.

## MATERIAL E MÉTODOS

A síntese da sílica amino-funcionalizada foi realizada seguindo a rota básica, para produzir a MCM-41, foi escolhido o método de co-condensação, ou “one-pot” descrito na literatura por Vallet-Regi (2001). Neste método, todos os reagentes são adicionados em uma única etapa.

Em um balão de fundo chato de 500 mL adicionou-se 0,7 g de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) em 340 mL de água deionizada e 2,45 mL de solução de NaOH (2M). Levou-se a mesma a um agitador magnético onde a temperatura foi ajustada para 80 °C, sob agitação. O balão foi mantido em um recipiente contendo areia para uma melhor distribuição de calor. Ao atingir a temperatura, 3,5 mL de tetraetoxisilano (TEOS) foram adicionados lentamente, onde o gotejamento realizou-se em uma frequência média de 1 gota/segundo e manteve-se o meio por duas horas.

Silva (2019) mostra em seus estudos que a funcionalização do material pode ser feita de maneira otimizada e garantindo que a localização dos grupamentos amino seja preferencialmente na superfície do material. Deste modo, assim como descrito, após 90 minutos adicionou-se 0,43 mL de 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) também lentamente. Ao completar o período de duas horas esperou-se o balão esfriar à temperatura ambiente. O produto obtido possuía uma alta turbidez, indicando a formação da sílica.

Filtrou-se o produto a vácuo em funil de Büchner com placa porosa, seguido de lavagens com álcool etílico absoluto e água deionizada (5 lavagens de cada aproximadamente). O sólido obtido foi levado para secar na estufa durante 24 horas a uma temperatura de 60 °C.

Com a sílica sintetizada é necessário realizar a extração do CTAB para liberação dos poros, para isto uma parte da amostra foi calcinada, enquanto outra parte foi submetida a um sistema de refluxo com isopropanol acidificado. Na calcinação a

amostra foi submetida a 550 °C por 6 horas com rampa de aquecimento 1°C/min. A calcinação da amostra retira além do CTAB os grupos amino, ou seja, a sílica fica com seus poros totalmente livres.

A amostra destinada ao refluxo foi adicionada a um balão de fundo chato contendo 100 mL de isopropanol (seguindo a concentração de 4 mg/mL) e acidificado com 2 gotas de HCl. Manteve-se em sistema de refluxo onde a temperatura da mistura era de 80 °C e o banho em 18 °C durante um período de 14 horas.

Após 14 horas, deixou-se a temperatura abaixar até atingir a ambiente, e foi filtrada a vácuo em funil de Büchner com placa porosa, com lavagem de água deionizada em excesso. O sólido foi deixado na estufa em 60 °C até secar.

Foram submetidas ao ensaio de adsorção em solução de ácido úrico as amostras funcionalizadas descritas anteriormente e além destas, amostras de sílica incorporadas com corantes fotossensibilizadores. Os compostos sensíveis incorporados foram a Eritrosina, um corante alimentício aniônico e, Azure A, um corante catiônico. Estes foram incorporados por adsorção física.

Cada solução de ácido úrico de  $4,0 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup> permaneceu sob agitação, em Shaker à temperatura de 20 °C, por um período de 24 horas, com sílica mesoporosa em uma proporção 1 mg/mL em tampão fosfato-salino  $0,15$  mol.L<sup>-1</sup> (PBS) com um pH de 7,4.

Após o período, as amostras foram filtradas e o sobrenadante foi analisado. Para a medida da absorvidade foi utilizado o Espectrofotômetro Agilent Cary 60, disponível no laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa da UTFPR – Campus Apucarana. As amostras foram colocadas em cubetas de quartzo (2 faces polidas e caminho óptico de 1,00 cm).

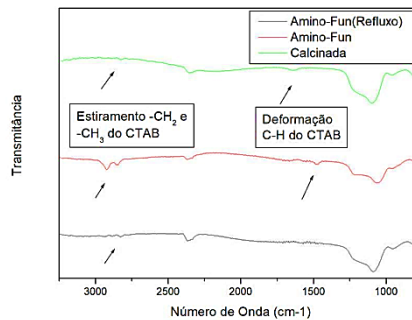
## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para a confirmação da extração do CTAB na amostra foi realizado um espectro na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os espectros foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 650-4000 cm<sup>-1</sup> com 70 varreduras por análise e as amostras foram pastilhadas com KBr seco para se obter pastilhas contendo 1% de amostra.

Os resultados estão na Figura 1 e, quando comparados com a literatura mostraram a eficiência do procedimento. Na literatura relata-se a presença do CTAB devido aos estiramentos simétricos e assimétricos dos grupos CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> apresentados por volta de 3000 cm<sup>-1</sup>. Também tem-se o sinal de deformação C-H referente ao CTAB em 1600 cm<sup>-1</sup> e o sinal em 1470 cm<sup>-1</sup> referente à água adsorvida (SILVA, 2018, p.27).

Com a confirmação de que a extração do CTAB foi efetiva, para a realização dos ensaios de adsorção fez-se um controle para avaliar uma possível ocorrência de degradação do AU no meio. As amostras de controle foram submetidas as mesmas condições que as do ensaio de adsorção com uma concentração de ácido úrico menor ( $1,0 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>) e no final do tempo determinado foi realizada a varredura no espectrofotômetro.

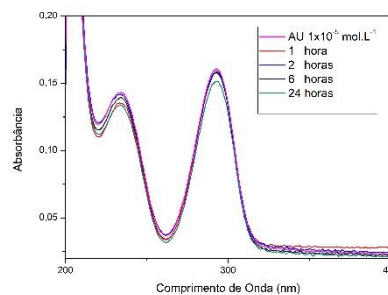
Figura 1 – FTIR Fourier para as amostras de MCM-41.



Fonte: Produção do próprio autor.

Fez-se um controle para avaliar uma possível ocorrência de degradação do AU no meio. As amostras de controle foram submetidas às mesmas condições que as do ensaio de adsorção com uma concentração de ácido úrico menor ( $1,0 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>). Com os dados obtidos e a utilização do software OriginPro 8 os gráficos foram plotados. Para as amostras de controle estes se encontram na Figura 2.

Figura 2 – Espectro de degradação de AU através do tempo.



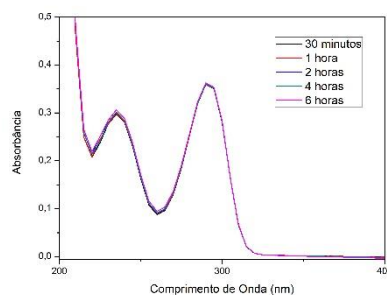
Fonte: Produção do próprio autor.

Por meio dos espectros apresentados na figura 2 é visto que a degradação do ácido úrico em PBS nas condições do experimento não foi significativa para um período de tempo de até 6 horas. Como as metodologias para teste de TFD não ultrapassam este intervalo de tempo pode-se desconsiderar a degradação pequena que ocorre em um período de 24 horas.

Após o teste para a verificação de degradação mostrar que esta não é um fator influenciador, foram realizadas as adsorções com as amostras de MCM-41. Na Figura 3 tem-se os espectros obtidos da amostra de sílica calcínada. Vale ressaltar que a sílica submetida ao processo de calcinação tem todo o CTAB removido e juntamente com este o APTES, fazendo com que esta amostra não seja funcionalizada e tenha os poros totalmente livres.

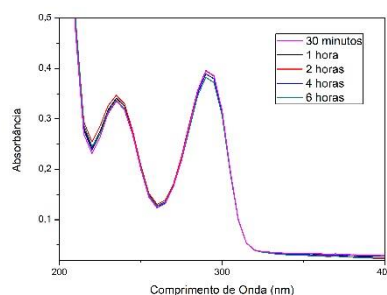
Por possuir os canais livres, a adsorção de AU na amostra deveria ser grande, entretanto quando observamos a Figura 3, este não é o resultado obtido, a adsorção é praticamente nula. Para a sílica que foi submetida ao processo de refluxo, onde os grupos amino permanecem, os espectros estão na Figura 4.

Figura 3 – Espectro de AU ( $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ) após contato com MCM-41 calcinada.



Fonte: Produção do próprio autor.

Figura 4 – Espectro de AU ( $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ) após contato com MCM-41 refluxada.



Fonte: Produção do próprio autor.

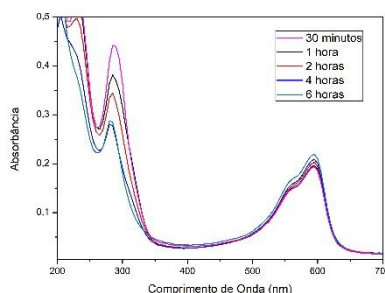
Na Figura 4 é apresentado uma pequena diminuição do sinal de AU após 4 horas de experimento, isso pode ser explicado por uma interação entre as moléculas de AU e os grupos amina presentes na parede da sílica devido a sua funcionalização. Embora seja muito pequena a adsorção pode ser explicada pela interação entre o AU, que no pH estudado encontra-se na forma aniônica, com os a superfície amino-funcionalizada, que apresenta potencial zeta positivo, aproximadamente 17,7 mV (Silva, 2019, p.1606).

Para nível de comparação, amostras possuindo compostos fotossensíveis também foram submetidas ao ensaio de adsorção, os espectros da amostra contendo Azure A estão na Figura 5 e os espectros da amostra contendo Eritrosina na Figura 6.

Nas figuras 5 e 6 é obtido um sinal por volta de 500 a 600 nm, este é atribuído a presença de corante no sobrenadante. Os espectros obtidos mostram que a liberação de Azure A no meio foi bem maior em relação a Eritrosina. Isso deve-se à atração de cargas, de acordo Silva (2019) os ensaios de potencial zeta mostram a superfície da sílica tem um potencial ligeiramente positivo (17,7 mV), logo a atração é maior com moléculas de carga negativa, no caso estudado o corante Eritrosina encontra-se na forma aniônica, de maneira que a interação é mais forte há uma menor liberação do corante no meio.

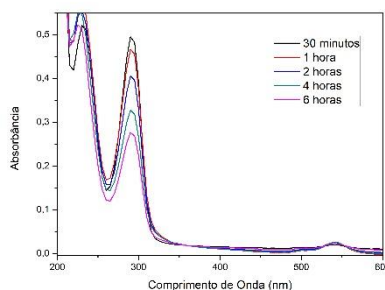
O contrário é apresentado em relação ao Azure, um corante catiônico, neste a interação com os grupos amina presentes na parte externa da MCM-41 é pequena, ocasionando uma liberação do corante no meio.

Figura 5 – Espectro de AU ( $4,0 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>) após contato com MCM-41/Azure A.



Fonte: Produção do próprio autor.

Figura 6 – Espectro de AU ( $4,0 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>) após contato com MCM-41/Eritrosina.



Fonte: Produção do próprio autor.

Ainda nas figuras 5 e 6 tem-se uma diminuição significativa do sinal de AU, este efeito é atribuído a degradação proporcionada pela presença dos corantes fotossensíveis responsáveis pela geração de oxigênio singleto, os quais degradam o AU. A degradação se apresenta maior no ensaio contendo Azure A pela disposição do material no meio.

## CONCLUSÕES

Através dos ensaios de adsorção de AU em sílica (1 mL/mg) não é possível demonstrar que ocorre a adsorção do composto nos canais da MCM-41. Na amostra calcinada, a que seria responsável pela maior adsorção teoricamente, não se observou um resultado favorável, mostrando que a adsorção não ocorreu ou foi mínima. A amostra submetida ao refluxo apresenta um sinal menor após 4 horas de contato da solução com a MCM-41, porém não mostrou um resultado significativo e por isto não foi averiguada a concentração real de AU após o ensaio.

Quando se tem a presença de compostos que são capazes de gerar o oxigênio singleto, o sinal de AU apresentado tem uma diminuição bem grande quando comparada com as amostras sem estes.

Entretanto, ao menos nas condições utilizadas as nanopartículas, a princípio, não interferem nestes ensaios. Isso deve estar associada a baixa concentração de AU utilizada. Adicionalmente, estes resultados abrem espaço para a continuação desse estudo em intervalos de concentração de AU mais elevada, o que pode possibilitar a utilização desses materiais porosos como adsorventes desta sonda.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço por toda confiança em mim depositada pelo meu professor orientador André, obrigado por me manter motivado durante todo o processo. Sou grato a Ana que auxiliou em todos os momentos e esteve sempre presente. Agradeço também à UTFPR e ao auxílio do LAMAP – Laboratórios Multiusuários de Apoio à Pesquisa do Campus Apucarana.

## REFERÊNCIAS

CHEN, Cong-Yan; LI, Hong-Xin; DAVIS, Mark E. Studies on mesoporous materials: I. Synthesis and characterization of MCM-41. **Microporous materials**, v. 2, n. 1, p. 17-26, 1993.

CHEN, Cong-Yan et al. Studies on mesoporous materials II. Synthesis mechanism of MCM-41. **Microporous Materials**, v. 2, n. 1, p. 27-34, 1993.

GEROLA, Adriana Passarella et al. Chemical determination of singlet oxygen from photosensitizers illuminated with LED: new calculation methodology considering the influence of photobleaching. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 232, p. 14-21, 2012.

LIN, Yu-Shen. Critical considerations in development of mesoporous silica nanoparticles for biological applications. 2012.

MACHADO, Antonio Eduardo da Hora. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.

MANZANO, M. et al. Estudos de sílica mesoporosa MCM-41 para liberação de fármaco: efeito da morfologia de partículas e funcionalização de aminas. **Revista de Engenharia Química**, v. 137, n. 1, p. 30-37, 2008

RABELLO, Bruno Ribeiro et al. Singlet oxygen dosimetry using uric acid as a chemical probe: systematic evaluation. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 238, p. 53-62, 2012.

SILVA, Ana Claudia P. da et al. Synthesis of Highly Ordered Mesoporous MCM-41: Selective External Functionalization by Time Control. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 8, p. 1599-1607, 2019.

SILVA, A. C. P. **Otimização da síntese de nanopartículas de sílica mesoporosa amino-funcionalizadas para incorporação de fármacos fotoativos**. 2018. Dissertação (Mestrado em Química) –Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2018.

VALLET-REGI, M. et al. A new property of MCM-41: drug delivery system.  
**Chemistry of Materials**, v. 13, n. 2, p. 308-311, 2001.