



DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE LIGNINA E HESPERIDINA EXTRAÍDAS DA BIOMASSA DE *Citrus Sinensis* (L.) Osbeck: POTENCIAL APLICAÇÃO EM FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS

Palavras-Chave: nanopartículas, lignina/hesperidina, fotoprotetor.

Autores/as:

**DANIEL CIRILO, IQ, UNICAMP.
SYMONE CASTRO (Coorientadora), IQ, UNICAMP
Prof.(a) Dr.(a) LJUBICA TASIC (orientadora) IQ, UNICAMP**

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de laranjas, que segundo o Fundecitrus (Fundo de Defesa da Citricultura), com em torno de 307,22 milhões de caixas de 40,8 kg em 2023. Na composição da laranja podemos encontrar principalmente água, carboidratos (como frutose, sacarose e glicose), fibras solúveis e insolúveis, vitaminas (principalmente vitamina C, mas também vitaminas A, B₂ e outras) compostos fenólicos (flavonas, flavanonas, ácidos hidroxicinâmicos, carotenóides e antocianinas), limonóides e terpenos^[1]. Entre os compostos com interessantes propriedades, destacam-se a lignina e a hesperidina como potenciais agentes bloqueadores de radiação ultravioleta. Além disso, a hesperidina (Hsd) também é um agente oxidante^[2]. Assim, ambas possuem potencial para serem usadas como fotoprotetores, contudo, algumas propriedades destes compostos precisam ser melhoradas para tal aplicação. A tecnologia de nanoformulações é uma maneira de melhorar certas características dos

compostos e, para fotoprotetores, é uma via interessante. A Nanonização proporciona ao nanomaterial uma maior área superficial, maior reatividade química, aumento da resistência mecânica entre outros^[3]. Ainda, a utilização da tecnologia de nanoformulações para a síntese de nanopartículas de lignina/hesperidina (Np_LigHsd), possibilita uma melhor atividade fotoprotetora quando na forma nanométrica. Além disso, a formulação de um fotoprotetor a base de compostos extraídos da biomassa de laranja, tem-se muitas vantagens ambientais, do que os convencionais fotoprotetores tanto orgânicos quanto inorgânicos.

Portanto, alternativas ambientais e fontes mais baratas para nanoformulações fotoprotetoras devem ser estudadas e elaboradas. Desta forma, o objetivo deste projeto é de extrair a lignina e a hesperidina da biomassa da laranja, caracterizá-las, utilizando técnicas espectroscópicas, em seguida, sintetizar Np_LigHsd, caracterizá-las e utilizar também radiação UV-Vis para avaliar a eficiência. Também como, sintetizar nanoformulações utilizando Np_LigHsd e

avaliar a atividade fotoprotetora e toxicidade.

METODOLOGIA

Extração de Lignina e Hesperidina

Pesou-se 150 g do bagaço úmido que foi lavado com água destilada quente a 80 °C (duas lavagens seguidas) e após isso, foi seco na estufa por 48 h a 65 °C. Em seguida, foi utilizada uma quantidade de 20 g de bagaço seco que foi triturado e misturado com 200 mL de NaOH 0,5 mol/L; a mistura foi então colocada em uma autoclave por 1 h a 120 °C. Em seguida, foi filtrado e ajustado o pH do sobrenadante até 5,5 com HCl 1,0 mol/L. Após isso, foi reduzido o volume para 90 mL no rota-evaporador. Adicionou-se 270 mL de álcool etílico 95% e aguardou-se por 12 h à temperatura ambiente para a precipitação de hemicelulose. Após esse período, procedeu-se a filtração e concentração no rota-evaporador para remoção do álcool. O pH foi então ajustado para 1,5 com HCl 1,0 mol/L para a precipitação da lignina, que foi filtrada utilizando filtração a vácuo e em seguida, lavada com água destilada até pH neutro, e por fim, seca a 60 °C por 72 h.

A Hsd foi extraída com CaCl₂ (7,5% m/V) e posterior ajuste de pH do meio para 11,5 com solução de NaOH 50% (m/V). A Hsd foi precipitada no pH 4,3, filtrada em filtro de 0,22 µm e seca em estufa a 60 °C por 6 h^[4] ^[5].

Nanonização da Lignina/Hesperidina

Foram pesados 2,0 mg de lignina, adicionado 2,0 mL de metanol e sonificado por 30 s. A suspensão foi agitada a 1500 rpm a temperatura ambiente. Foi adicionado gota a gota 7 mL de água, à suspensão sob agitação por 10 min. O sistema reacional foi aquecido 70 °C para a evaporação do solvente. A amostra foi transferida para um frasco âmbar e analisada por DLS e UV-Vis.

Inserção de Hsd: Usando a amostra de nanopartícula de lignina, foi inserida a hesperidina 1%, 5%, 25% e 50% m/m, a partir de uma solução de Hsd 1 mg/mL

preparada em metanol. Na Figura 1, está ilustrado o processo de formulação de nanopartículas da lignina e hesperidina^[5].

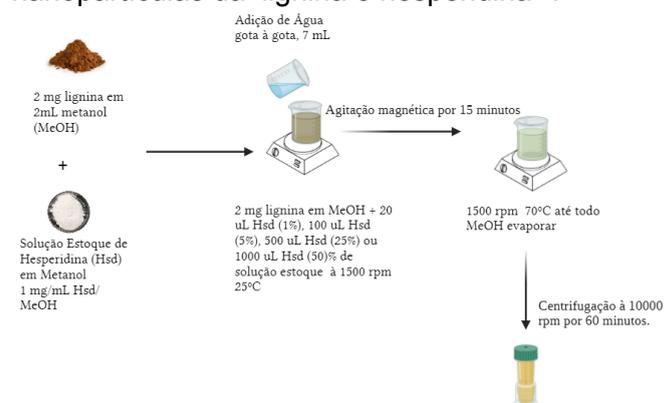


Figura 1: Fluxograma da rota de síntese das nanopartículas de lignina/hesperidina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização da Lignina e Hsd

Para caracterização da lignina e da hesperidina, foram utilizados os seguintes métodos: RMN de sólidos ¹³C (CP/MAS), RMN de líquidos (10 mg da amostra em 600 µL de DMSO) e FT-IR. O espectro no infravermelho da lignina é apresentado na Figura 2 (A). O espectro de RMN de ¹³C da lignina é apresentado na Figura 2 (B), e é possível identificar (160-120 ppm) os átomos de carbono C-O, C-H e C-C em anéis aromáticos, o que é esperado, sendo que a lignina apresenta um alto conteúdo de aromáticos e grupos -OH.

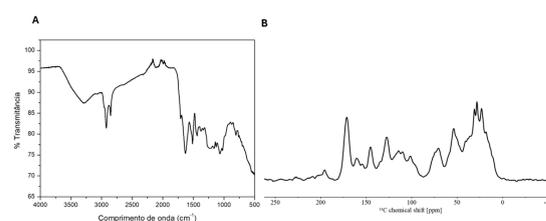


Figura 2: Espectros da lignina: (A) no infravermelho e de (B) RMN de ¹³C (CP/MAS).

Espectro de infravermelho da hesperidina, é apresentado na Figura 3 (A), o da Hsd padrão (Sigma) que é representado pela linha tracejada e o da Hsd extraída, para compararmos sua semelhança, é notório que não há grandes diferenças entre a Hsd extraída e a Hsd padrão. É possível

observar uma banda em 3500 cm^{-1} , assinalada as hidroxilas (O-H).

O espectro de RMN de ^1H da hesperidina é ilustrado na Figura 3 (B) sendo que a Hsd extraída apresenta a estrutura comparável à encontrada na literatura. Foi possível identificar que, há duas estruturas glicosídicas da Hsd, além de notar-se, dois anéis benzênicos aromáticos, com substituintes, sendo observado que em 3,8 ppm, o grupo $-\text{OCH}_3$ em um destes anéis aromáticos.

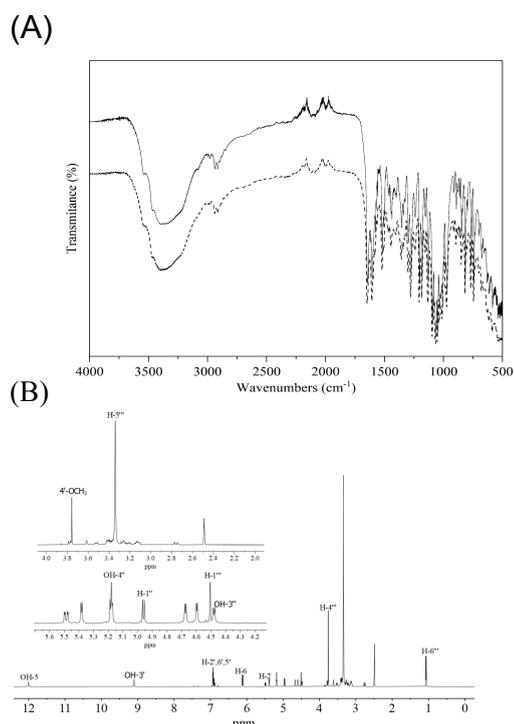


Figura 3: Espectros da Hsd: (A) no infravermelho (FT-IR) - do padrão (Sigma), linha tracejada e linha sólida Hsd extraída e (B) RMN de ^1H de líquidos.

Caracterização das nanopartículas:

As nanopartículas foram caracterizadas pelas técnicas de DLS (Espalhamento Dinâmico de Luz) e por UV-Vis para analisar a estabilidade e também, a absorvância na faixa esperada de radiação UVB.

Todas foram analisadas durante 1 mês, por DLS, para analisar seu potencial zeta (ζ) e além disso, seu tamanho. Com isso, foi possível obter uma média semanal de estabilidade e de tamanho de todas as

análises. Também, foi possível avaliar se há uma grande instabilidade nas nanopartículas, o que não foi observado. As partículas de lignina, de acordo com a literatura [8], deverão apresentar entre 5 a 500 nm de diâmetro, o que de fato foi observado, sendo que as nanopartículas de ligninas sintetizadas apresentaram tamanhos de 290-520 nm.

Durante a execução do projeto (Tabela 1) foram monitoradas propriedades físico-químicas, tais como o tamanho das nanopartículas e o potencial zeta, análises feitas do dia 16/10 ao dia 06/11 de 2023. A partir das análises foi possível observar que o tamanho das nanopartículas, das nanopartículas, somente da lignina, da lignina/Hsd 5%, Hsd 25% e Hsd 50%, estão variando de até 520 nm. Os PDI permaneceram menores que 0,4 o que mostra que as nanopartículas sintetizadas apresentam polidispersidade satisfatória. Os potenciais zetas permaneceram menores do que -30 mV, indicando a sua alta estabilidade nos 30 dias de análises.

Tabela 1: Tamanho, PDI e potencial zeta (ζ) das nanopartículas sintetizadas

Nanopartículas	Tamanho (nm)	PDI	ζ (mV)
Np_Lig	282.7 ± 78	0.220	-35.0 ± 4.7
Np_LigHsd5	293.3 ± 79	0.266	-36.9 ± 5.7
Np_LigHsd25	266.8 ± 94	0.230	-34.0 ± 6.9
Np_LigHsd50	522.5 ± 140	0.291	-36.7 ± 5.2

Os espectros de absorvância na região UV-Vis estão apresentados na Figura 4. A hesperidina e a lignina apresentaram a absorvância máxima em 280 nm, na faixa de radiação UVB. Observa-se que as nanopartículas de lignina absorvem na região de UVA-UVB (280-400 nm). Ainda, foi observado que com o aumento de concentrações de Hsd, a intensidade de absorção em 280 nm é maior. Este resultado indica que o objetivo de aumentar a absorção na região do ultravioleta através da combinação da lignina com Hsd foi alcançado. Importante destacar que apenas as Np_LigHsd5 apresentaram esse aumento na absorção.

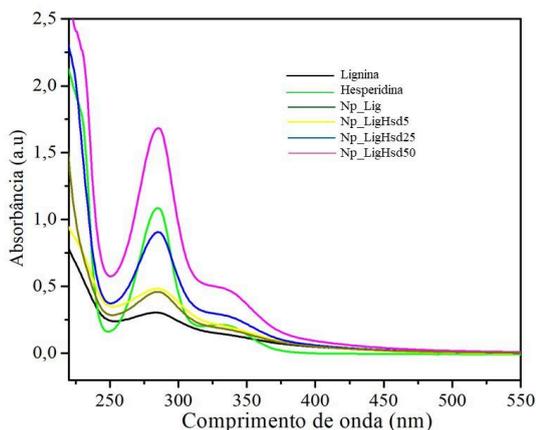


Figura 4: Gráfico de absorvância de UV-Vis das nanopartículas sintetizadas.

Eficiência de Encapsulamento - EE

A eficiência de encapsulamento de Hsd em nanopartículas de lignina foi determinada por diferença, considerando a quantidade total inicialmente adicionada na nanoformulação e a fração não encapsulada de Hsd que passa através do poro do filtro (Amicon® Ultra-0.5 microfiltros, corte molecular de 10 kDa) utilizado no método de ultrafiltração e centrifugação. Para a determinação da Hsd não encapsulada, a suspensão de nanopartículas (500 µL) foi submetida à centrifugação usando dispositivos de celulose regenerada com um corte molecular de 10 kDa (Amicon® Ultra-0,5 microfiltros) e centrifugada a 24.000 × g, 20 °C por 40 min. Uma curva de calibração foi construída usando diferentes concentrações de Hsd em MeOH. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro UV-Vis em 280 nm. A leitura da nanolignina foi subtraída da leitura da nanoHsd. Uma curva de calibração a partir de um padrão de Hsd em MeOH (+500 µL de DMSO) - 0,1 mg mL⁻¹ (100 µg mL⁻¹) foi construída, com as seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 5,0; 7,5 e 10 µg mL⁻¹ (Figura 5).



Figura 5: Curva de calibração usada para a quantificação da Hsd nas nanopartículas.

A eficiência de encapsulamento foi calculada através da Equação 1:

$$EE (\%) = (C \text{ Hsd calculada encapsulada} / C \text{ Hsd teórica encapsulada}) \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

A EE calculada obtida foi de 90,54%, 95% e 97,5% para Np_LigHsd5, Np_LigHsd25 e Np_LigHsd50, respectivamente.

Estudos do fator de proteção solar (FPS) *in vitro*

O método espectrofotométrico foi utilizado para medir o FPS das nanopartículas de lignina/hesperidina sintetizadas. Além disso, o FPS da lignina pura e da hesperidina foi avaliado. Todas as amostras foram analisadas nas mesmas concentrações de lignina e hesperidina. Como mostrado na Figura 6, o FPS aumentou com o aumento das quantidades de nanopartículas de hesperidina, alcançando o valor de 8,1 para Np_lig. É possível notar que pelo menos 25% de hesperidina é necessário para aumentar o FPS da nanopartícula de lignina. Esses valores foram considerados excelentes, uma vez que a concentração das nanopartículas foi baixa, apenas 0,03 µg mL⁻¹. Na literatura, o FPS da lignina e das nanopartículas de lignina é comumente medido após ser misturado com creme ou protetor solar comercial para verificar as mudanças no valor do FPS. Assim, os valores encontrados aqui

não podem ser diretamente comparados a esses trabalhos.

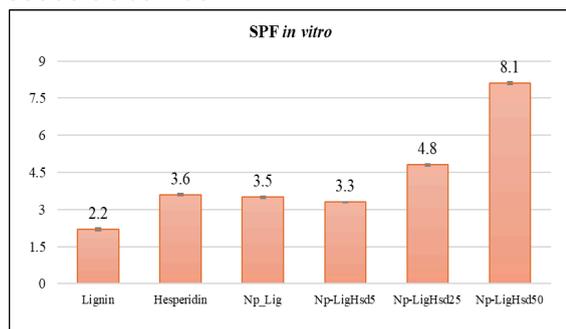


Figura 6: Gráfico de barras do FPS para lignina, hesperidina e nanopartículas sintetizadas pelo método espectrofotométrico.

CONCLUSÕES

As caracterizações da hesperidina (Hsd) e da lignina demonstraram que os produtos isolados da casca da laranja apresentaram uma pureza alta, como, por exemplo, demonstrado na comparação da Hsd comercial e a Hsd extraída.

As análises por DLS (*Dynamic Light Scattering*), mostram que as nanopartículas formuladas apresentam uma estabilidade grande quando foram avaliadas (apresentam o potencial zeta menor que -30 mV), além de um tamanho consideravelmente constante de 300 a 400 nm. Além disso, todas as formulações apresentaram valores de polidispersibilidade menores que 0,300, considerada adequada.

Os resultados de eficiência de encapsulamento demonstraram que a síntese das nanopartículas foram feitas com sucesso.

A avaliação de toxicidade das nanopartículas sintetizadas nas formulações fotoprotetoras é a etapa final deste projeto, que será efetuada ainda em meados do mês de Agosto.

Portanto, esse projeto demonstra a importância da aplicação de resíduos naturais, para maior aproveitamento de resíduos de citrus, no caso apresentado. Além disso, os resultados demonstram que as moléculas estudadas em potencial são excelentes para a síntese de formulações fotoprotetoras.

Agradecimentos

Agradecimentos ao Laboratório de Química Biológica (LQB) do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), que acolheram a ideia do projeto e principalmente aos órgãos de fomento a pesquisa, a Pró-Reitoria de Pesquisa da Unicamp e ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) que financiaram este projeto.

REFERÊNCIAS

1. CASTRO, Symone. et al. **Sequential extraction of hesperidin, pectin, lignin, and cellulose from orange peels: towards valorization of agro-waste.** *Biofpr* Vol. 18, 2024.
2. CHOI, Sung. et al. **A comparative study of hesperetin, hesperidin and hesperidin glucoside: Antioxidant, anti-inflammatory, and antibacterial activities *in vitro*.** *Antioxidants* Vol. 11, 2022.
3. Almeida, et al. **Síntese de nanopartículas - Revisão da literatura,** *Revista Agrária Acadêmica* Vol. 4, 2021.
4. STANISIC, Danijela, et al. **New sustainable process for hesperidin isolation and anti-ageing effects of hesperidin nanocrystals,** *Molecules* Vol. 25, 2020.
5. PORTO, Deyvid. et al. **Orange trunk orange trunk waste-based lignin nanoparticles encapsulating curcumin as a photodynamic therapy,** *ACS Applied Polymer Materials* Vol. 3, 2021.