FORMULAÇÃO DE UM HIDROGEL COM AÇÃO CICATRIZANTE UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOGÊNICAS SINTETIZADAS COM HESPERETINA

Palavras-Chave: Formulações, Nanotecnologia, Saúde

Autores/as:

Gabriela Gomes Silva, IQ, UNICAMP

Merianne Mitamara Vasconcelos de Moura, IQ, UNICAMP

Prof.(ª) Dr.(ª) Ljubica Tasic (orientadora) IQ, UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O uso de nanopartículas de prata (AgNP) em aplicações dermocosméticas tem recebido grande destaque, visto que elas auxiliam na permeabilidade de compostos bioativos em camadas mais profundas da pele [1]. Além disso, buscando rotas de síntese mais sustentáveis, o uso de extratos vegetais ricos em moléculas, como os flavonoides, confere ainda mais propriedades às AgNP. Neste projeto, utilizou-se a hesperetina (HST), sendo esta a forma aglicona da hesperidina, ambas bioflavonóides encontrados em frutas cítricas, que apresenta propriedades como ação antioxidante, anti-inflamatória, que auxiliam no processo de cicatrização [2].

Ademais, visando explorar seu potencial na cicatrização, o material escolhido para este projeto é o hidrogel formulado com polímeros naturais, como a carboximetilcelulose (CMC) derivada do ácido celuloseglicólico, e o alginato de sódio extraído de algas marrons. Ambos os polímeros contribuem para manter a região a ser cicatrizada hidratada, proteger de agentes externos e auxiliar na reparação dos tecidos [3,4]. Sendo assim, tem-se como objetivo neste projeto potencializar a ação do hidrogel, tendo as nanopartículas de prata biogênicas sintetizadas com hesperetina (AgNP@BioHST) incorporadas a ele, para que a cicatrização seja favorecida.

METODOLOGIA:

BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS

A metodologia já utilizada pelo grupo de pesquisa para biossíntese de nanopartículas de prata biogênicas sintetizadas com hesperetina (AgNP@BioHST) baseia-se, inicialmente, no preparo de uma solução de hesperetina (HST) 1 mmol/L utilizando 15,1 mg de hesperetina e dissolvê-la em 50 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,005 mol/L. Após completa dissolução, seguindo a proporção 1:1 (v/v) para formação das AgNP@BioHST, adiciona-se ao volume de HST, o volume equivalente de solução de nitrato de prata ($AgNO_3$) 1 mmol/L, mantendo o sistema sob agitação por 30 min a 700 rpm. Posteriormente, ajusta-se o pH da solução com nanopartículas para 7,4 com uma solução de ácido clorídrico (HCl) 1 mmol/L. Após a biossíntese, as AgNP@BioHST foram caracterizadas por Espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering* – DLS), medindo-se os tamanhos e a estabilidade com o equipamento ZETASIZER NANO - ZS - ZEN 3600, Espectroscopia de ultravioleta visível (UV-Vis, Espectrofotômetro Agilent 8453) e obtenção de imagens por Microscopia Eletrônica de Transmissão (Microscópio Eletrônico de Varredura, Quanta FEG 250 equipado com *Scanning transmission electron microscopy* – STEM). Ademais, a amostra após

ser liofilizada foi analisada por Espectroscopia no Infravermelho para confirmar a presença de grupos funcionais da hesperetina na superfície das AgNP@BioHST.

HIDROGEL

Considerando que hidrogéis são materiais com elevado teor de água, sendo esse superior a 90%, foram formulados dois hidrogéis com diferentes proporções de carboximetilcelulose (CMC) (Tabela 1) [5]. Inicialmente, as respectivas massas de água foram aquecidas até 60 °C para solubilizar o conservante líquido constituído pela combinação de fenoxietanol e etilhexilglicerina (*Phenoxyethanol and Ethylhexylglycerin* - PEHG). Em seguida, as soluções foram resfriadas à temperatura ambiente e, por último, a CMC foi adicionada e o sistema foi levado ao homogeneizador (ULTRA TURRAX IKA T18 basic).

Tabela 1: Formulações de hidrogéis com CMC

Hidrogel	CMC (g)	PEHG* (g)	Água (g)
H1 (95,45%)	2,25	0,05	47,7
H2 (96,4%)	1,75		48,2

Ademais, foram combinadas as soluções de alginato de sódio 2,5 % wt. e de CMC 1 % wt. para formulação de hidrogel na proporção 1:1 (v/v). Os polímeros foram homogeneizados e colocados em placa de Petri e, posteriormente, a placa foi submersa no banho de coagulação com solução de cloreto de cálcio 0,2 mol/L e deixada por 20 min. Após a reticulação, o hidrogel foi lavado com água Milli-Q para retirar o excesso de cálcio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

CARACTERIZAÇÃO DE AgNP@BioHST

A solução de hesperetina é caracterizada pela sua cor amarelada e, após a adição de $AgNO_3$, a solução muda para uma coloração laranja amarronzada evidenciando a formação das nanopartículas de prata (Figura 1).

Figura 1: Solução de hesperetina à esquerda e solução de AgNP@BioHST à direita.

A amostra de AgNP@BioHST foi caracterizada por Espectroscopia UV-Vis em dois momentos: logo após a síntese e depois de 5 meses (Figura 2). Com base na literatura, a presença de nanopartículas de prata esféricas é evidenciada com um máximo de absorção (Banda de Plasmon) entre 400 e 530 nm e, a partir dos espectros de absorção obtidos (Figura 2), a amostra apresenta um máximo de absorção próximo a 480 nm indicando a presença de AgNP@BioHST na solução [6].

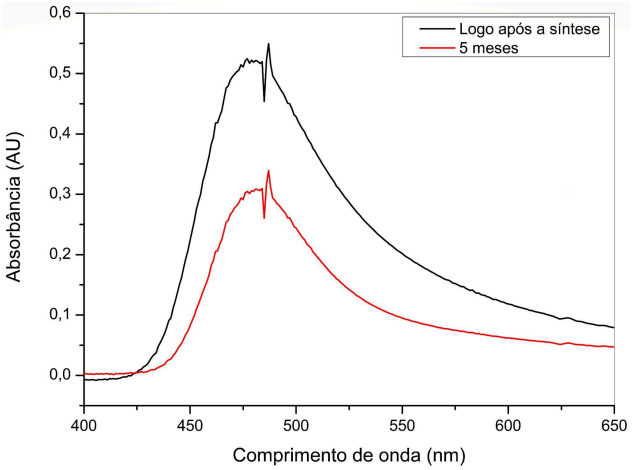

Figura 2: Espectros de absorção do colóide de AgNP@BioHST.

Em ambas as análises, a solução coloidal apresentou nanopartículas de prata esféricas dispersas, porém, com base no espectro, logo após a síntese, a absorbância da amostra atingiu um valor de 0,524 AU e após 5 meses houve uma queda do valor atingindo um máximo de 0,309 AU e um leve alargamento da banda de absorção, podendo ser justificada por possível agregação das nanopartículas e, consequentemente, diminuição da sua estabilidade na solução [7].

Na Tabela 2 estão sumarizados os dados correspondentes às análises físico-químicas das AgNP@BioHST.

Tabela 2: Resultados obtidos pela análise do DLS das AgNP@BioHST			
Medida	Tamanho da partícula (d.nm)	Potencial zeta (mV)	PDI
20 min	32 ± 10	- 41 ± 11	0,321
8 dias	34 ± 11	- 41 ± 10	0,234
135 dias	34 ± 15	- 39 ± 8	0,435

De acordo com a literatura, a estabilidade do sistema coloidal é determinada com valores de potencial zeta menores que -30 mV e considerando os dados apresentados, tem-se que a metodologia utilizada para biossíntese de AgNP@BioHST lhe confere grande estabilidade [8]. Ademais, o tamanho hidrodinâmico determinado pelo DLS considera a camada de solvatação das partículas e a homogeneidade do sistema é indicada com índice de polidispersividade (PDI) inferiores a 0,3 e com os dados obtidos (Tabela 2) tem-se que a amostra de AgNP@BioHST apresentou tamanhos de partículas mais homogêneos logo após a síntese e após 8 dias [6].

Entretanto, o aumento do tamanho hidrodinâmico, de 70 d.nm (medida após 20 min) para 102 d.nm (medida após 135 dias), do tamanho da partícula e diminuição em módulo do potencial zeta ao longo do tempo, podem ser justificados por uma possível agregação das partículas no sistema, que, consequentemente, diminui a homogeneidade das partículas, também indicada pelo aumento do PDI atingindo o valor de 0,435 após 5 meses.

Através das imagens obtidas por STEM da solução coloidal de AgNP@BioHST (Figura 3), pôde-se determinar o tamanho real das partículas tendo a distribuição do tamanho apresentada na Figura 4, uma vez que a medida realizada considera o núcleo metálico da partícula.

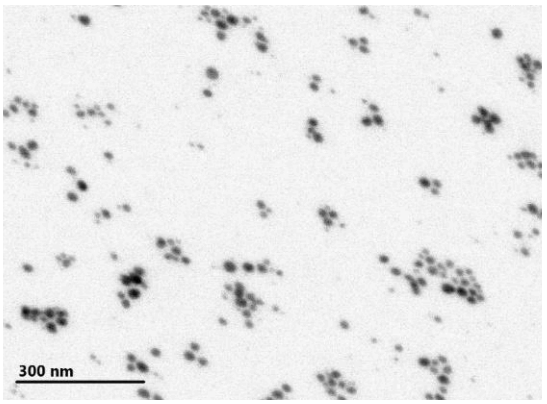

Figura 3: Imagem de AgNP@BioHST obtida por STEM.

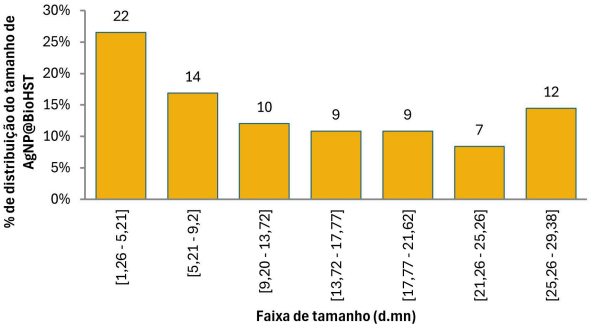

Figura 4: Histograma de distribuição de tamanho de AgNP@BioHST.

Por essa caracterização, as AgNP@BioHST apresentam um tamanho inferior ao encontrado pela análise com o DLS, sendo o maior tamanho determinado correspondente a 29 d. nm em comparação com o tamanho hidrodinâmico de 70 d. nm e tamanho da partícula de 32 d. nm na medida após 20 min de síntese (Tabela 2), assim, é possível justificar que as partículas apresentam uma camada superficial estabilizadora sobre o núcleo metálico, além da dupla camada elétrica que lhe confere estabilidade e diminui a agregação entre as partículas [1].

A partir da Espectroscopia no Infravermelho (IV) é possível identificar biomoléculas e grupos funcionais presentes na amostra de AgNP@BioHST através das frequências de vibração características de cada ligação [9]. Considerando a estrutura molecular da hesperetina (HST) (Figura 5), espera-se que o espectro das nanopartículas sintetizadas (Figura 6) apresente grupos funcionais correspondentes à aglicona, já que esta biomolécula reveste a nanopartícula.

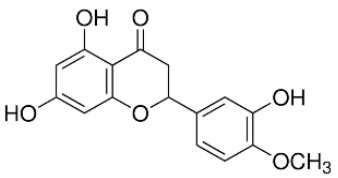

Figura 5: Molécula de hesperetina.

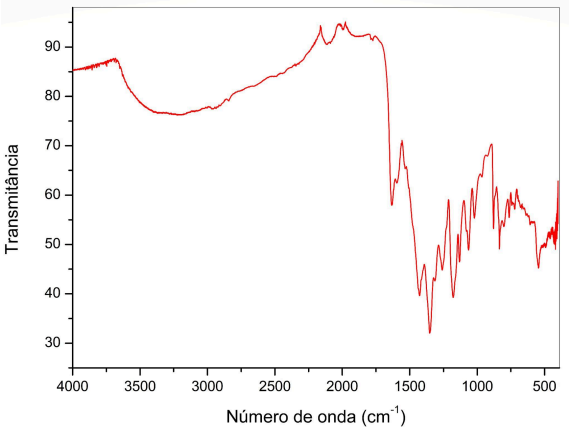

Figura 6: Espectro no infravermelho para AgNP@BioHST.

A partir do espectro, as bandas próximas à região entre 1300-1000 cm^{-1} indicam o estiramento C-O de grupos fenóis. Já próximo a 1630 cm^{-1} a banda pode ser atribuída ao estiramento C=O ou C=C (aromático) presente na HST. Entre 3600-3000 cm^{-1} a banda alargada corresponde ao estiramento livre do grupo hidroxila (OH) podendo ser interações do grupo -OH presentes na HST ou resultado da presença de água na amostra. Assim, tendo em vista as principais bandas mencionadas, tem-se que as nanopartículas analisadas de fato apresentam as ligações características da hesperetina, indicando que essa biomolécula forma a camada superficial da partícula.

FORMULAÇÃO DE HIDROGEL

Com base na literatura, o ambiente úmido contribui para a diminuição da inflamação e melhora a qualidade da cicatrização, dessa forma, optou-se por estudar as formulações de hidrogel com teor de água superior a 95% [3]. Assim, considerando as formulações mostradas na Tabela 1, variou-se a concentração da CMC, a fim de se observarem características distintas entre cada material, visto que a massa de espessante utilizada altera a viscosidade do hidrogel. Embora não tenha sido realizada análises instrumentais até a escrita deste resumo, visualmente os hidrogéis H1 e H2 (Figura 7) apresentaram características distintas em relação a sua viscosidade, sendo a formulação H1 mais viscosa em relação à H2.

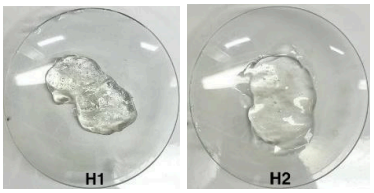

Figura 7: Formulações de hidrogel com CMC, sendo H1 à esquerda e H2 à direita.

A eficácia dos hidrogéis com as AgNP@BioHST incorporadas no processo de cicatrização ainda será testada neste projeto, ainda assim, as formulações foram feitas substituindo 5 mL do volume de água utilizado em cada hidrogel (Tabela 1), por 5 mL de solução colóide de AgNP@BioHST. Os hidrogéis obtidos estão mostrados na Figura 8 e permaneceram com as mesmas características dos hidrogéis controles mostrados na Figura 7.

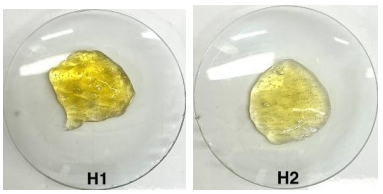

Figura 8: Hidrogéis com CMC e AgNP@BioHST, sendo H1 à esquerda e H2 à direita.

Ademais, o alginato de sódio (polímero natural extraído de algas marrons) também foi testado na formulação de hidrogel combinado com a CMC, devido à capacidade de retenção de água, contribuindo para criação de um ambiente úmido na cicatrização, servindo como barreira de defesa e mantendo um grau ideal de hidratação [10]. O hidrogel formulado (Figura 9), apresentou visualmente maior rigidez e estrutura em relação aos hidrogéis H1 e H2, uma vez que o alginato de sódio reticula com os íons cálcio (Ca^{2+}), enquanto a CMC permanece na estrutura formada aumentando a retenção de água no material.

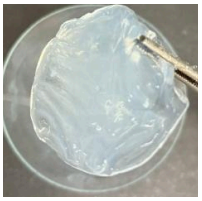

Figura 9: Formulação de hidrogel com alginato de sódio e CMC.

CONCLUSÕES:

Considerando que este trabalho de iniciação científica ainda está em andamento, até o momento a metodologia para a biossíntese de AgNP@BioHST apresentou alta reprodutibilidade, resultando em nanopartículas de prata com alta estabilidade. Ademais, o uso da hesperetina como solução redutora dos íons prata é eficaz, uma vez que, com as caracterizações realizadas, foi indicada a presença de uma camada estabilizadora no revestimento das nanopartículas com grupos funcionais presentes na molécula de HST.

Em relação às formulações de hidrogel com carboximetilcelulose, ambas apresentaram grande fluidez, porém, mesmo com alto teor de água, a formulação H1 apresentou maior viscosidade e essas características permaneceram as mesmas com a incorporação das AgNP@BioHST ao hidrogel. Em comparação, o hidrogel formulado com a mistura de alginato de sódio e CMC apresentou maior rigidez e estruturação, mas ainda assim com grande potencial para estudos futuros para sua aplicação como ação cicatrizante.

BIBLIOGRAFIA

[1] TROMBETTA, F. M. F. **Aplicação de nanobiotecnologia em dermocosméticos: Avaliação da compatibilidade entre ácido hialurônico hidrolisado e nanopartículas de prata e ouro revestidas com hesperetina**. Dissertação de mestrado, Campinas, 2025.

[2] SANTOS, J. S.; GONZATTO, M. P. **Citrus flavonones into nanotechnology based formulations to skin treatment**. *Ars Pharmaceutica.* 2024, *65*, 84-92.

[3] NUUTILA, K.; ERIKSSON, E. **Moist wound healing with commonly available dressings**. *Advances in Wound Care.* 2021, *10*, 685-698.

[4] MONTEIRO, M.S.D.S.B.; SANTOS, T.M.D.; OLIVEIRA, C.A.; FREITAS, Z.M.F.D; SANTOS, E.P.D. **Desenvolvimento e avaliação de hidrogéis de carboximetilcelulose para o tratamento de feridas.** *Infarma Cienc. Farm.* 2020, *32*, 41-55.

[5] CAO, H.; DUAN, L.; ZHANG, Y.; CAO, J.; ZHANG, K. **Current hydrogel advances in physicochemical and biological response-driven biomedical application diversity**. *Signal Transduction and Targeted Therapy.* 2021, 426, 1-31.

[6] GOMES, D.M.D. **Otimização da síntese verde de nanopartículas de prata para incorporação em gel antimicrobiano.** Dissertação de mestrado**,** Manaus, 2019.

[7] TASIĆ, L. **Química em 50 ensaios**, Campinas: Editora Átomo, 274-281, 2017.

[8] DAS, P.; DAS, M.K. Nanocosmeceuticals: Concept, opportunities, and challenges, in Nanocosmeceuticals innovation, application, and safety*,* Editor Das, M. K., 1st. Ed., Academic Press, 2022, pg. 95-138.

[9] THOMPSON, J.M. **Infrared Spectroscopy,** Singapura: Pan Stanford Publishing, 2018, 1-28.

[10] ZHANG, H.; LIN, X.; CAO, X.; WANG, Y.; WANG, J.; ZHAO, Y. **Developing natural polymers for skin wound healing**. *Bioactive Materials.* 2023, *33*, 355-376.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Serviço de Apoio ao Estudante (SAE-Unicamp). À Prof.ª Dr.ª Ljubica Tasic por toda orientação e auxílio, assim como a toda a equipe dos Laboratórios de Química Biológica e de Espectroscopia, que deram suporte sempre que precisei.