

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPÓSITO DE ÁCIDO HIALURÔNICO COM HIDROXIAPATITA E GLUTATIONA

Marcella Paiva Gnevkovsky De Luca¹, Carlos Nelson Elias²

¹Instituto Militar de Engenharia (IME), marcella.luca@ime.eb.br

²Instituto Militar de Engenharia (IME), elias@ime.eb.br

RESUMO

O processo de envelhecimento está associado, entre outros fatores, à perda de volume facial, de estrutura óssea e de colágeno, o que resulta em alterações visíveis na sustentação e contorno do rosto. A crescente demanda por tratamentos não cirúrgicos capazes de promover resultados eficazes e naturais tem impulsionado o desenvolvimento de novas formulações e técnicas voltadas ao rejuvenescimento tecidual. Nesse cenário, a hidroxiapatita (HA) vem ganhando destaque como um biomaterial biocompatível e biodegradável, naturalmente presente nos ossos e dentes humanos, amplamente utilizada em procedimentos estéticos por sua comprovada capacidade de estimular a produção de colágeno e promover melhora estrutural. Paralelamente, os preenchedores à base de ácido hialurônico (AH) permanecem entre as principais escolhas clínicas para a restauração de volume e elasticidade cutânea, devido às suas propriedades viscoelásticas e à biocompatibilidade intrínseca. A associação entre HA e AH já é relatada na literatura como uma estratégia promissora para combinar a sustentação estrutural conferida pela cerâmica com o efeito hidratante e moldável do polímero. Entretanto, a adição de antioxidantes a essa combinação surge como uma inovação potencialmente benéfica, pois pode interferir nas vias de degradação do ácido hialurônico mediadas por espécies reativas de oxigênio (EROs), prolongando a durabilidade do material e preservando suas propriedades mecânicas. Tal abordagem, contudo, ainda não é explorada em formulações comercialmente disponíveis no Brasil. Assim, o presente trabalho tem como objetivo analisar os efeitos da adição de partículas de hidroxiapatita e do antioxidante glutathione (GSH) a um preenchedor dérmico de ácido hialurônico reticulado. Para isso, a hidroxiapatita foi sintetizada em laboratório e caracterizada por difração de raios X (DRX), confirmando a formação de uma fase pura e cristalina. Posteriormente, foi realizado ensaio reológico da formulação contendo HA e GSH, a fim de avaliar o comportamento viscoelástico do compósito. Os resultados obtidos demonstram que a modificação proposta altera as propriedades mecânicas e estruturais do material, evidenciando o potencial dessa abordagem para o desenvolvimento de preenchedores dérmicos inovadores, mais estáveis e com maior desempenho funcional.

Palavras-chave: hidroxiapatita, ácido hialurônico, bioestimulador de colágeno, glutatona, medicina regenerativa

INTRODUÇÃO

O envelhecimento é classificado em dois grupos originados de fatores intrínsecos e extrínsecos. O processo hormonal e bioquímico é responsável pelo envelhecimento intrínseco. A radiação ultravioleta (UV) é conhecida como um fator extrínseco no processo de envelhecimento intrínseco devido às alterações histológicas e funcionais. O envelhecimento intrínseco está associado à atrofia dérmica, redução do número de fibroblastos dérmicos, fragmentação de fibras elásticas, redução do conteúdo de colágeno e celularidade. O envelhecimento extrínseco ocorre com o crescimento de elastina anormal e glicosaminoglicanos (GAGs), aumento do número de fibroblastos e redução no conteúdo e atividade das fibras de colágeno (1).

Uma pesquisa feita pela Sociedade Internacional de Cirurgia Plástica Estética, em 2020, mostrou que o Brasil ocupa o terceiro lugar em número de procedimentos estéticos não cirúrgicos com uso de injetáveis e em quinto lugar nos tratamentos rejuvenescimento facial (2). Tem-se observado o aumento na busca de procedimentos não cirúrgicos para tratamento de rejuvenescimento da face e corpo por causa do reduzido tempo de inatividade e menor chance de complicações. Além disso, a mudança de mentalidade no gerenciamento do envelhecimento. Os tratamentos envolvem a forma tridimensional com restituição de volume, ao invés de preencher rugas isoladas. Este comportamento levou ao aumento de preenchedores disponíveis no mercado.

Nesse contexto, para explicar o desempenho destes biomateriais é necessário identificar as características físicoquímicas e determinar as propriedades de cada material (3). O uso de substâncias com potencial de estimular a síntese de colágeno é uma abordagem baseada nas propriedades do biomaterial para estimular a neocolagênese, neoelastogênese, angiogênese, e proliferação de fibroblastos (4). Os bioestimuladores são classificados de acordo com a sua durabilidade e absorção pelo organismo por meio do processo de fagocitose. Alguns exemplos de bioestimuladores são à base de hidroxiapatita (HA) (5). O uso da HA foi inicialmente aprovado pela US Food and Drug Administration (FDA), em 2001, como um implante injetável para ser um marcador radiográfico em tecido mole. Em 2006, a FDA aprovou esse biomaterial com designação comercial Radiesse® (MerzAesthetics, Raleigh, NC) como um preenchedor à base de Ha para uso em sulcos naso-labiais e em pacientes com vírus HIV associados com lipoatrofia facial (3).

As pesquisas indicam a possibilidade da mistura prévia do preenchedor de AH com a HA. O objetivo de combinar HA com AH é duplo. Primeiro, a combinação aproveita a alta rigidez da HA e a textura suave do AH para criar um gel que levanta substancialmente o tecido de modo mais suave, mais maleável e mais fácil de injeção do

que o Ha puro (6). Segundo, à medida que o AH se degrada lentamente, o efeito bioestimulatório da HA leva à colagênese tardia.

Sabe-se que a degradação AH ocorre por duas vias principais no organismo, sendo uma a via enzimática, mediada pelas hialuronidases, e outra a não enzimática, predominantemente por processos oxidativos. A literatura mostra que as hialuronidases são capazes de clivar as ligações do polímero, reduzindo rapidamente sua viscosidade e fragmentando a cadeia em oligossacarídeos menores, o que explica a curta meia-vida do AH nos tecidos. Além disso, o AH é altamente suscetível ao ataque de espécies reativas de oxigênio (EROs), produzidas naturalmente durante processos inflamatórios e metabólicos, que promovem clivagem oxidativa e aceleram a perda de integridade do gel.(7)

Sendo assim, a adição da glutathione ao compósito tem a função de retardar a degradação oxidativa do material no organismo. Isso ocorre porque a glutathione é um potente antioxidante endógeno, amplamente distribuído nos tecidos, capaz de neutralizar EROs. A presença de glutathione no sistema atua promovendo a doação de elétrons e estabilizando essas moléculas reativas antes que alcancem o polímero, diminuindo assim a taxa de quebra das ligações glicosídicas. Além disso, ao reduzir o estresse oxidativo local, a glutathione contribui para um microambiente mais estável, preservando a integridade estrutural do hidrogel e potencializando o desempenho clínico do material. Dessa forma, a glutathione não apenas prolonga a estabilidade do compósito, mas também pode contribuir para um perfil biológico mais favorável após a aplicação.(8)(9)

METODOLOGIA

O AH utilizado foi obtido de maneira comercial, possui 20 mg/mL, é estabilizado via tecnologia NASHA, que utiliza reticulação leve com BDDE (nível <1%). A HA foi sintetizada no laboratório de cerâmicas do Instituto Militar de Engenharia. O antioxidante escolhido para o estudo foi a glutathione que foi obtida também de maneira comercial por farmácia de manipulação. Todos os reagentes foram utilizados sem purificação adicional.

A síntese da HA ocorreu por meio de reações controladas entre soluções de Ca(OH)_2 , H_3PO_4 e ácido láctico, utilizando um protocolo sequencial com etapas de mistura, controle de pH e envelhecimento dos precipitados. Foi realizado então processo de lavagem e filtração, logo após, o material passou por secagem em estufa. O pó foi, então, desagregado utilizando um almofariz de ágata e peneirado para a obtenção de partículas uniformes e adequadas para análises subsequentes.

A difração de raios X (DRX) foi empregada com o objetivo de caracterizar estrutural e cristalograficamente o pó de hidroxiapatita sintetizado, permitindo avaliar a organização cristalina do material, sua composição de fases e o grau de cristalinidade, parâmetros

fundamentais para biomateriais destinados a aplicações médicas e odontológicas.(10) O ensaio foi realizado no laboratório de caracterização de materiais do Instituto Militar de Engenharia (IME) em um difratômetro de raios X equipado com tubo de radiação $K\alpha$ de cobalto ($\lambda \approx 1,79 \text{ \AA}$), adequado para a análise de materiais cerâmicos à base de cálcio e fósforo.(11) As análises foram conduzidas à temperatura ambiente, em modo de varredura contínua, em uma faixa típica de 2θ adequada à identificação das principais reflexões da hidroxiapatita, com passo de varredura e tempo de contagem fixados de forma a garantir boa resolução dos picos e adequada relação sinal-ruído.(10) Os dados de DRX obtidos foram processados no software HighScore, onde se realizou correção da linha de base, suavização do sinal e procedimento de busca e comparação com o banco de dados cristalográficos da ICDD, utilizando fichas de hidroxiapatita como referência para a indexação dos picos e determinação da estrutura cristalina. O difratograma tratado foi então exportado e plotado no software Origin®, que foi utilizado para a apresentação gráfica dos resultados e para as análises complementares descritas na seção de resultados e discussão.

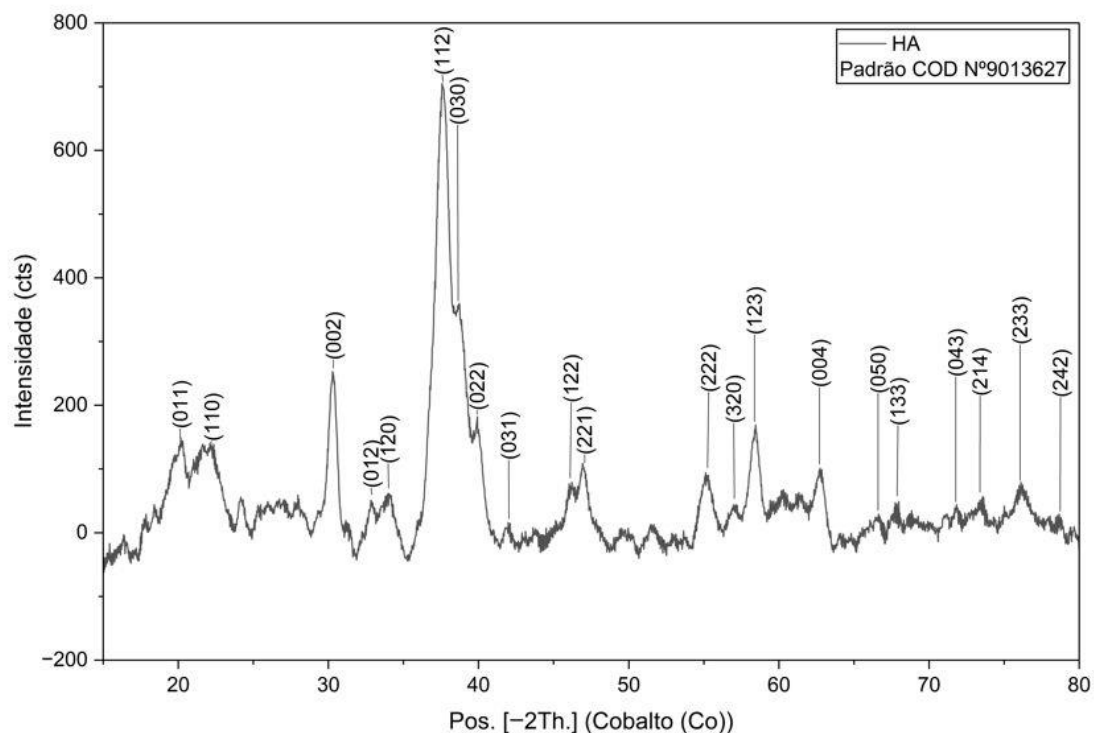
Além disso, reologia foi empregada com o objetivo de caracterizar o comportamento viscoelástico da mistura completa desenvolvida neste trabalho, composta por gel de ácido hialurônico, hidroxiapatita e glutathione, uma vez que propriedades como módulo elástico (G'), módulo viscoso (G'') e viscosidade complexa estão diretamente relacionadas à capacidade de injeção, escoamento, coesão e sustentação do material em aplicações médico-odontológicas. Os ensaios foram realizados no laboratório de reologia da Universidade Federal Fluminense (UFF), em reômetro rotacional de varredura oscilatória, equipado com geometria de placas paralelas, mantendo-se a temperatura controlada em valor próximo ao fisiológico, de forma a simular as condições de uso clínico. Inicialmente, foi realizada uma varredura de amplitude em regime oscilatório, em faixa crescente de deformação (γ), com frequência angular fixa, a fim de determinar a região de viscoelasticidade linear (LVR) da mistura, ou seja, o intervalo de deformação no qual G' e G'' permanecem aproximadamente constantes e o material responde de forma predominantemente elástica-viscosa sem danos estruturais significativos. Definida a LVR, procedeu-se à varredura de frequência, mantendo-se a deformação dentro dessa região e variando-se a frequência angular em uma faixa adequada para géis à base de ácido hialurônico, de modo a avaliar a dependência de G' , G'' e da viscosidade complexa com o tempo de solicitação mecânica.(12) Em todas as etapas, os dados reológicos da mistura completa foram registrados pelo software do equipamento e posteriormente exportados para o Origin®, onde foram plotados os gráficos e calculados parâmetros complementares, que embasam as análises apresentadas na seção de resultados e discussão.

DISCUSSÃO

A caracterização por difração de raios X (Figura 1) confirmou que a hidroxiapatita sintetizada apresenta fase única e perfil cristalográfico compatível com a HA

estequiométrica descrita na literatura, com picos bem definidos e ausência de fases secundárias detectáveis. Esse resultado indica que o protocolo de síntese adotado foi eficiente para obter um material cristalino e quimicamente estável, semelhante às nano-hidroxiapatitas empregadas em aplicações biomédicas e em scaffolds para substituição óssea, o que é fundamental para assegurar comportamento bioativo previsível e boa integração tecidual. (10,11)

Figura 1 – Difratoograma HA



Do ponto de vista conceitual, a proposta de incorporar glutatona ao sistema AH/HA se apoia em evidências de que a degradação do ácido hialurônico não ocorre apenas por ação enzimática, mas também por vias oxidativas mediadas por espécies reativas de oxigênio, que aceleram a clivagem das cadeias e reduzem a vida útil clínica do gel. (7) Nesse contexto, antioxidantes como a glutatona, já estudados em formulações de hidrogéis e sistemas tópicos com capacidade de sequestrar EROs, têm potencial para modular o microambiente oxidativo e retardar a degradação do polímero. (8,9) Embora o presente estudo não tenha avaliado diretamente a cinética de degradação, a manutenção de um comportamento reológico típico de gel estruturado sugere que a adição de GSH não compromete a integridade da rede tridimensional do preenchedor, configurando uma abordagem promissora para aumentar a estabilidade do material sem recorrer apenas ao aumento do grau de reticulação, que pode impactar negativamente a biocompatibilidade.

A análise reológica da mistura completa de ácido hialurônico, hidroxiapatita e glutathione demonstrou perfil viscoelástico compatível com o esperado para preenchedores destinados à sustentação tecidual, com predominância do módulo elástico (G') sobre o módulo viscoso (G'') na faixa de frequências avaliada e manutenção de uma região de viscoelasticidade linear bem definida. Esse comportamento indica um gel de caráter predominantemente sólido, com boa coesão interna e capacidade de suportar deformações sem perda imediata de estrutura, características desejáveis em materiais utilizados para restauração de volume e contorno facial. Resultados semelhantes são descritos em estudos que correlacionam altos valores de G' e comportamento pseudoplástico com melhor capacidade de projeção e moldagem clínica em géis de AH corporais e faciais. (12) A presença de partículas cerâmicas dispersas na matriz polimérica tende a aumentar a rigidez e a resistência à deformação do sistema, o que pode explicar a modificação das propriedades mecânicas observada em relação ao comportamento esperado para géis de AH isolados, reforçando o papel da HA como componente estruturante do compósito.

Quando se consideram em conjunto os achados estruturais e reológicos, o compósito desenvolvido neste trabalho se apresenta como uma plataforma promissora para a concepção de preenchedores dérmicos com dupla função: sustentação mecânica, decorrente da presença de HA cristalina, e potencial modulação da degradação oxidativa, associada à incorporação de glutathione. Essa combinação está em consonância com a tendência atual de desenvolvimento de biomateriais “inteligentes”, capazes não apenas de restaurar volume, mas também de interagir de forma mais favorável com o microambiente tecidual, reduzindo estresse oxidativo e preservando as propriedades do gel por mais tempo. No entanto, é importante destacar que os resultados aqui apresentados se restringem à caracterização estrutural da HA e ao comportamento reológico do compósito, sendo necessários estudos complementares de degradação *in vitro*, citotoxicidade, resposta inflamatória e desempenho clínico para confirmar o real impacto da adição de glutathione na durabilidade e segurança do material.

CONCLUSÃO

Este estudo se configura como um passo inicial no desenvolvimento de um compósito de AH com HA e GSH com potencial aplicação em rejuvenescimento facial, sobretudo em contextos onde se busca maior estabilidade, efeito bioestimulador e perfil de degradação mais controlado. A confirmação da fase pura de hidroxiapatita sintetizada e o comportamento reológico compatível com preenchedores estruturais sustentam a viabilidade desta proposta de inovação tecnológica, abrindo perspectivas para ajustes futuros de formulação, comparação direta com preenchedores comerciais e avaliação em modelos biológicos e clínicos.

REFERÊNCIAS

- 1 GHORBANI, F.; ZAMANIAN, A.; BEHNAMGHADER, A.; JOUPARI, M. D. Bioactive and biostable hyaluronic acid-pullulan dermal hydrogels incorporated with biomimetic hydroxyapatite spheres. *Materials Science and Engineering: C*, Elsevier, v. 112, p. 110906, 2020.
- 2 TROCZINSKI, A. P.; CASTRO, F. V. de; SANTOS, E. L. dos; SILVA, G. M. M. R. O uso da hidroxiapatita de cálcio como bioestimulador de colágeno na biomedicina estética: Uma revisão de literatura. *Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences*, v. 6, n. 5, p. 1289–1312, 2024.
- 3 OLIVEIRA, C. S. F. P. de; ALMEIDA, T. J. da S.; MARTINS, L. de O.; SORPRESO, L. A. T. M.; FINCK, N. S. Hidroxiapatita de cálcio: uma revisão quanto à eficácia, segurança e imaginologia quando usado como preenchedor e como bioestimulador. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 14, p. e05101421689–e05101421689, 2021.
- 4 NOGUEIRA, I. C. d. C.; SILVA, N. C. S. d. Aplicabilidade dos bioestimuladores de colágeno (Ácido poli-l-lático e hidroxiapatita de cálcio) no preenchimento dérmico em áreas off-face do corpo. *Research, Society and Development*, Research, Society and Development, v. 11, n. 8, p. e47411831181, 2022.
- 5 ALMEIDA, A. B. d.; SILVA, A. F. F. d.; SANTOS, E. M. d.; CORRÊA, G. F.; VILELA, C. A. Injectable collagen bio-stimulator for delaying facial aging: an integrative review between poly-l-lactic and calcium hydroxyapatite. Artigo aceito para publicação. Data de submissão: 02 set. 2024. Data de aprovação: 15 nov. 2024. 2024.
- 6 YAG-HOWARD, C.; DENIGRIS, J. Novel filler technique: hyaluronic acid and calcium hydroxylapatite mixture resulting in favorable esthetic and longevity outcomes. *International Journal of Women's Dermatology*, LWJ, v. 7, n. 5PB, p. 817–819, 2021.
- 7 ZERBINATI, N. et al. In Vitro Evaluation of the Sensitivity of a Hyaluronic Acid PEG Cross-Linked to Bovine Testes Hyaluronidase. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, v. 6, n. 1 (Special Issue: Global Dermatology-2), p. 20–24, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3889/oamjms.2018.046>
- 8 ZHANG, D., Ren, Y., He, Y., Chang, R., Guo, S., , S., Guan, F., & Yao, M. (2022). In situ forming and biocompatible hyaluronic acid hydrogel with reactive oxygen species-scavenging activity to improve traumatic brain injury repair by suppressing oxidative stress and neuroinflammation. *Materials Today Bio*, 15. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2022.100278>.
- 9 LIU, M., Sharma, M., Lu, G., Zhang, Z., Song, W., & Wen, J. (2024). Innovative Solid Lipid Nanoparticle-Enriched Hydrogels for Enhanced Topical Delivery of L-Glutathione: A Novel Approach to Anti-Ageing. *Pharmaceutics*, 17. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17010004>.

- 10 DUMITRESCU, C., Neacșu, I., Surdu, V., Nicoară, A., Iordache, F., Trusca, R., Ciocan, L., Ficăi, A., & Andronescu, E. (2021). Nano-Hydroxyapatite vs. Xenografts: Synthesis, Characterization, and In Vitro Behavior. *Nanomaterials*, 11. <https://doi.org/10.3390/nano11092289>.
- 11 OFUDJE, E., Adeogun, A., Idowu, M., & Kareem, S. (2019). Synthesis and characterization of Zn-Doped hydroxyapatite: scaffold application, antibacterial and bioactivity studies. *Heliyon*, 5. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01716>.
- 12 Issa, M., Viana, R., De Souza Mendes, P., Naccache, M., Varges, P., Castaño, E., & Palermo, E. (2025). Analysis of Morphologic and Rheological Properties of Hyaluronic Acid Gel Fillers to Body Contouring and Its Clinical Correlation. *Gels*, 11. <https://doi.org/10.3390/gels11010065>.