

## DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE NARINGINA E NARINGENINA NANOENCAPSULADAS<sup>1</sup>

### *DEVELOPMENT, CHARACTERISATION AND EVALUATION OF CYTOTOXICITY OF NANOCAPSULED NARINGIN AND NARINGENIN*

**Carla Fontoura Ferreira<sup>2</sup>, Leticia Malgarim Cordenonsi<sup>3</sup>, Cayane Genro Santos<sup>4</sup>,  
Isabel Roggia<sup>4</sup>, Fernando Bandeira Sulczewski<sup>4</sup>, Luiz Carlos Rodrigues Junior<sup>4</sup>,  
Carina Rodrigues Boeck<sup>5</sup> e Renata Platcheck Raffin<sup>6</sup>**

#### RESUMO

As espécies reativas (ERs) e o estresse oxidativo contribuem para a fisiopatologia de diversas doenças. Uma alternativa inovadora de proteção aos órgãos como o cérebro é o uso de flavonoides com ação antioxidante como a naringina e a naringenina. No entanto, esses dois compostos apresentam baixa biodisponibilidade quando administrados pela via oral. Uma alternativa para contornar essa limitação é a utilização de nanocarreadores, como as nanocápsulas (NC), que possibilitam o aumento da biodisponibilidade e da eficácia da substância ativa. Diante disso, no presente trabalho foram avaliados o perfil de liberação dos fármacos a partir das suspensões *in vitro* assim como determinados os efeitos dos fármacos nanoencapsulados na viabilidade celular em linhagem de células Vero. As NCS de naringina e naringenina apresentaram pH ácido, diâmetro de partícula inferior a 95 nm, índice de polidispersão menor que 0,2. O potencial zeta foi negativo, entre -12,46 e -17,6 mV e a eficiência de encapsulação foi de 93% para naringina e 96% para a naringenina. Os resultados do ensaio de viabilidade celular pela redução do MTT mostraram que as suspensões de NCS causaram redução da viabilidade celular nas concentrações de 5, 50 e 500 µg/mL quando comparadas com o controle, nos períodos de 24 e 72h de incubação. Para o estudo do perfil de liberação, foi empregada a técnica de diálise, sendo que 46,5% de naringina e 6,9% de naringenina foram liberadas para o meio, em um período de 9h. As NC formadas demonstraram características adequadas para administração oral. Além disso, pode-se concluir que a concentração menos citotóxica para os dois flavonoides no modelo celular estudado é inferior a 5 µg/mL.

**Palavras-chave:** estresse oxidativo, flavonoides, nanopartículas, viabilidade celular.

#### ABSTRACT

*The reactive species (ERs) and the oxidative stress contribute to the pathophysiology of several diseases. An innovative alternative for the protection of organs such as the brain is the use of flavonoids with antioxidant activity such as naringin and naringenin. However, these two compounds exhibit low bioavailability when administered orally. An alternative to overcome this limitation is to use nanocarriers, such as nanocapsules (NC), which allow the increase of the bioavailability and efficacy of the active ingredient. Therefore, the present study evaluated the release profile of drugs from suspensions in vitro as well as certain effects of nanocoated drugs on cell viability in Vero cell line. The NCS naringin and naringenin showed acidic pH, particle diameter*

<sup>1</sup> Trabalho realizado no Programa de Pós-graduação em Nanociências.

<sup>2</sup> Aluna de doutorado do Programa de Pós-graduação em Nanociências - Centro Universitário Franciscano.

<sup>3</sup> Colaborador - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

<sup>4</sup> Colaboradores - Centro Universitário Franciscano.

<sup>5</sup> Coorientador - Centro Universitário Franciscano.

<sup>6</sup> Orientadora - Centro Universitário Franciscano. E-mail: reraffin@gmail.com

less than 95 nm, polydispersity index lower than 0.2. The zeta potential was negative, between -17.6 and -12.46 mV and the encapsulation efficiency was 93% to 96% for naringin and naringenin. The results of the cell viability test by MTT reduction showed that the NCS suspensions caused the reduction of cell viability at concentrations of 5, 50 and 500 µg/mL when compared to the control one, for incubation periods of 24 and 72h. For the study of the release profile it was used the dialysis technique, and 46.5% of naringin and 6.9% of naringenin were released into the environment over a period of 9h. The formed NC demonstrated some characteristics suitable for oral administration. Moreover, it can be concluded that less cytotoxic concentration for the two flavonoids in the cell model studied in flavonoids is lower than 5 µg/mL..

**Keywords:** oxidative stress, flavonoids, nanoparticles, cell viability.

## INTRODUÇÃO

Estudos prévios indicam que o estresse oxidativo é um dos principais fatores envolvidos na patogênese de doenças. As espécies reativas (doravante Ers) reduzem os níveis de antioxidantes em vários órgãos e tecidos (MAES et al., 2009). Além disso, induzem danos em biomoléculas como lipídios, proteínas, DNA e RNA (MARINO et al., 2011). O cérebro, em particular, é altamente vulnerável ao dano oxidativo devido à alta utilização de oxigênio, ao teor elevado de ácidos graxos poliinsaturados e aos baixos níveis de atividade antioxidante endógena em relação aos outros tecidos. Neste contexto, a liberação de ERs pode modificar a integridade estrutural e funcional da membrana celular, causando a inativação das enzimas e morte celular (FLOYD; HENSLEY, 2002).

Uma alternativa inovadora de proteção ao cérebro que surge em estudos recentes é o uso de flavonoides. Os flavonoides são compostos polifenólicos de origem natural encontrados em plantas e frutos também apresentam várias propriedades biológicas (GARCIA; CASTILHO, 2008). Dentre alguns dos flavonoides com descrição de ação antioxidante, estão os do gênero *Citrus* (Rutaceae) como a naringina e a naringenina. Esses dois ativos são os principais flavonoides extraídos do pomelo, ainda pouco explorado no Brasil. Quatro tipos de flavonoides estão presentes no gênero *Citrus*, entre eles flavanonas, flavonas, flavonóis e antocianinas. A naringina e a naringenina pertencem à subclasse de flavanonas e são responsáveis pelo sabor amargo das frutas cítricas (ZUANAZZI; MONTANHA, 2002).

A naringina e a naringenina possuem atividades farmacológicas tais como: ação antioxidante, vasorrelaxante, hepatoprotetora, anti-inflamatória e antidepressiva (LI et al., 2014). Além de apresentarem resultados benéficos em modelos de comprometimento de memória, de aprendizado (TOTA et al., 2010) e de efeito neuroprotetor contra déficits cognitivos (BALUCHNEJADMOJARD; ROGHANI, 2006). Apesar do potencial terapêutico, a naringina e a naringenina são substâncias suscetíveis à degradação hidrolítica, apresentam solubilidade limitada em água, sofrem metabolismo de primeira passagem e de baixa biodisponibilidade quando administradas por via oral (RATNAM et al., 2006). Esses fatores podem comprometer a sua utilização clínica reduzindo a sua eficácia. Uma alternativa para contornar esses obstáculos é a utilização de sistemas nanoestruturados, cada vez mais utilizados pela área farmacêutica. Os nanocar-

readores aumentam a ação de extratos vegetais, pois facilitam a passagem de fármacos através da barreira hematoencefálica (BHE) e reduzem a incidência de efeitos colaterais (ALAM et al., 2010).

Diante disso, as nanopartículas poliméricas contendo a naringina e a naringenina constituem uma estratégia promissora e inédita para promover uma liberação controlada, direcionamento do fármaco no sítio de ação e aumento da resposta terapêutica desses compostos. Os dados preliminares, com a metodologia analítica para determinação dos ativos em nanocápsulas, já foram previamente descritos por nosso grupo de pesquisa (CORDENONSI et al., 2015). Assim, este estudo teve por objetivo determinar o perfil de liberação *in vitro* das suspensões e de avaliar os possíveis efeitos da naringina e a naringenina na viabilidade celular das células da linhagem Vero (fibroblastos).

## METODOLOGIA

As suspensões de NC foram preparadas através da técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado descrita por Fessi et al. (1989). A composição das fases empregadas no desenvolvimento das suspensões é descrita na tabela 1 (CORDENONSI et al., 2015). Os componentes da fase oleosa e da fase aquosa das suspensões foram pesados em uma balança analítica em béqueres separados. Posteriormente, as fases foram aquecidas (em banho-maria) à temperatura aproximada de 40°C, ao mesmo tempo em que ocorria agitação magnética, até completa dissolução dos componentes. Em seguida, a fase oleosa foi vertida sobre a fase aquosa com o auxílio de um funil, mantendo-se a agitação durante 10 minutos. Após, o solvente orgânico foi evaporado e o excesso de água reduzido por meio de pressão reduzida em evaporador rotatório até obtenção de volume final 25 mL (concentrações de naringina e de naringenina foram ajustadas para 2 mg/mL (m/v) de cada flavonoide). Como controles, foram utilizadas às suspensões do fármaco livre (sem a adição de polímero e óleo) e nanocápsulas brancas (NCB; sem adição dos ativos), produzidas pelo mesmo método de preparação. Todas as formulações foram preparadas em triplicata.

**Tabela 1** - Composição das suspensões de nanocápsulas contendo naringina e naringenina para um volume final de 25 mL.

Fase oleosa	Quantidade	Fase aquosa	Quantidade
*Naringina	*0,05g	Polissorbato 80	0,385g
*Naringenina	*0,05g	Água	125 mL
Eudragit® L 100	0,25g		
Monoestearato de sorbitano	0,0962g		
Etanol	62,5mL		
Adipato de diisopropila	0,395g		

\*As concentrações de naringina e naringenina foram ajustadas para 2mg/mL (m/v) de cada ativo.

## CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SUSPENSÕES DE NCS DE NARINGINA E NARINGENINA

### Determinação do diâmetro de partícula e índice de polidispersão

O diâmetro e o índice de polidispersão das nanopartículas produzidas foram determinados através da técnica de espalhamento de luz dinâmico em equipamento *Zetasizer*® nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern. Essa análise foi realizada com as amostras diluídas em água (500 vezes, v/v). Os resultados estão expressos em nanômetros (nm), como média de triplicatas de três lotes independentes de suspensões.

### Potencial zeta

O potencial zeta foi obtido através de eletroforese (*Zetasizer*® nano-Zs modelo ZEN 3600, Malvern), após diluição das dispersões em solução de NaCl 10 mM (500 vezes v/v). Os resultados estão expressos em milivolts (mV) a partir de três determinações de suspensões diferentes.

### Determinação do pH

O pH das formulações foi determinado utilizando potenciômetro Digimed®, previamente calibrado (com soluções padrão de pH 4,0 e 7,0) diretamente nas suspensões. Os resultados foram expressos a partir da leitura de três suspensões diferentes.

### Determinação do teor da naringina e das naringeninas suspensões e da eficiência de encapsulação

O conteúdo de naringina e de naringenina foi verificado em todos os lotes das formulações. Após o preparo das suspensões, as amostras foram tratadas com água, pH 4,0 (ajustado com ácido clorídrico 0,1 M) (A) e acetonitrila (B) em uma proporção (1:1) (v/v) (fase móvel) com o objetivo de dissolver o polímero e o fármaco. Posteriormente, as mesmas foram filtradas em membrana de poliacetilamida com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$ . As análises das NC de naringina e de naringenina foram realizadas em cromatógrafo HPLC *Prominence* (Shimadzu, Japão), degasser DGU-20A5R, bomba LC-20AT, injetor SIL-20AHT, forno CTO-20A, detector SPD-M20A e controlador CBM-20<sup>a</sup> e Coluna *Purospher*® STAR RP-18, *endcapped* (5 $\mu\text{m}$ ). As condições cromatográficas utilizadas foram a vazão de 1,0 mL/min, o volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$  e em um comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 280 nm. A separação da fase móvel foi realizada utilizando uma eluição por gradiente: 0-4 min 10% -70% de

B; 4-5 min 70-100% B; 5-6 min 100-70% B; 6-8 min 70-10% B. No intervalo entre cada execução, o sistema manteve-se sob um processo de estabilização por três minutos (CORDENONSI et al., 2015).

As concentrações de naringina e de naringenina associadas às NC foram avaliadas considerando as diferenças entre a concentração total dos fármacos na formulação e a concentração dos fármacos na forma livre presente na fase aquosa da dispersão. A determinação do ativo livre foi realizada uma vez, através de ultrafiltração-centrifugação das suspensões utilizando membrana de celulose regenerada 10.000 Da para 0,5 mL (Microcon®- MC Millipore) e quantificando o fármaco livre no ultrafiltrado em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) conforme as condições cromatográficas descritas acima.

## ESTUDOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Foram utilizadas membranas de acetato de celulose (10.000 Da; 25 mm) *Sigma Aldrich*® como sacos de diálise. Os sacos de diálise foram hidratados com água por 24h antes do início da diálise, após foram preenchidos com 1mL de suspensão de NC e imersos em 50mL de meio de liberação constituído de solução tampão (pH 7,4). Os frascos foram fechados e conservados a uma temperatura de 37°C, sendo mantida a agitação magnética. As alíquotas de 1mL do meio de liberação foram coletadas em intervalos de tempo pré determinados (0, 15, 30, 45, 60, min; após de 1 em 1h) por um período de 9h. A cada retirada de alíquota, foram recolocados 1mL de novo meio de liberação ao frasco. As amostras foram filtradas em filtros com poros 0,45 µm (Macherey-Nagel®) e analisadas em CLAE de acordo com as condições cromatográficas citadas anteriormente. As formulações de NC com naringina e com naringenina, e naringina e naringenina nas formas livres foram analisadas em triplicatas de três lotes diferentes.

## VIABILIDADE CELULAR *IN VITRO*

O teste de viabilidade celular foi realizado com células da linhagem Vero (ATCC CCL-81), um fibroblasto de origem primata. As células foram cultivadas em garras de cultura e posteriormente transferidas para placas de 96 poços para os experimentos de viabilidade celular. Brevemente, alíquotas de  $2 \times 10^4$  células/mL foram transferidas para cada poço da placa e cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino, gentamicina e anfotericina. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C com saturação de 5% de CO<sub>2</sub> *overnight* para aderência. Após, foram adicionadas as suspensões de NCB, NC com naringina, NC com naringenina e NC da mistura de naringina e de naringenina nas concentrações de 5, 50 e 500 µg/mL, individualmente em cada poço. Para controle de morte celular, três poços foram tratados com 90 mM de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Após o período de incubação de 24h ou 72h, foi adicionado 20 µL de solução 0,5 mg/mL de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (Invitrogen, ST.EUA) e as

culturas incubadas por mais 4h. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e adicionado 150 µL de DMSO (dimetilsulfóxidoSigma) nas células. A leitura da absorbância foi determinada em uma leitora de placas (Thermoplate) no comprimento de onda de 570 nm. Os testes foram realizados em triplicata.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados a partir do método estatístico de Análise de Variância de uma via (*One Way ANOVA*) e posterior teste de Dunnet. Para todos os grupos, consideraram-se estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$  (utilizou-se o *software GraphPad Prism* versão 5.0 - *GraphPad*, EUA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### SUSPENSÕES DE NC CONTENDO NARINGINA E NARINGENINA

As NC de naringina e de naringenina desenvolvidas apresentaram aspecto homogêneo, com uma coloração leitosa e opaca e pode-se observar um reflexo azulado em virtude do efeito *Tyndall*, característico de suspensões nanométricas (PANG et al., 2012).

### CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SUSPENSÕES DE NCS CONTENDO NARINGINA E NARINGENINA

#### Diâmetro médio e índice de polidispersão

Os resultados apresentados na tabela 2 demonstram que o método de deposição interfacial do polímero pré-formado possibilitou a formação de NC nas formulações independente da presença ou ausência do fármaco.

**Tabela 2** - Características físico-químicas das suspensões.

Parâmetros	*NCB	*NC de naringina e naringenina	NC de naringina	NC de naringenina
Diâmetro de Partícula (nm)± *DP	86,6 ± 2,9	94,8 ± 6,6	94,7 ± 2,7	87,8 ± 2,8
Índice de Polidispersão± DP	0,18 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,13 ± 0,02
Potencial Zeta (mV)± DP	-17,6 ± 0,7	-16,36 ± 2,5	-13,03 ± 1,5	-12,46 ± 1,4
pH± DP	3,77 ± 0,01	3,81 ± 0,01	3,78 ± 0,04	3,84 ± 0,04
Teor de Fármaco± DP			95± 5,0 %	93± 3,1%
Eficiência de Encapsulação			93%	96%

\*Devio padrão (DP), \* Nanocápsulas Brancas (NCB); \* Nanocápsulas (NC).

A partir da avaliação estatística realizada, pode-se inferir que os valores obtidos para o diâmetro médio de partícula, o índice de polidispersão, o potencial zeta, o pH e o teor do fármaco entre todas as formulações apresentam-se com uma distribuição homogênea, pois não houve diferença estatística significativa.

Como pode ser visto em todas as formulações de NC desenvolvidas, o diâmetro médio apresentado mostrou-se reduzido e homogêneo em que estão compatíveis com sistemas nanoestruturados. Os valores de índice de polidispersão foram inferiores a 0,2 indicando homogeneidade na distribuição do diâmetro das nanoestruturas, prevendo a estabilidade das formulações em relação à agregação e à sedimentação das partículas (DE MELO et al., 2010). Os dados obtidos neste estudo corroboram com estudos descritos na literatura por autores que utilizaram *Eudragit*® L100 como polímero. Entre eles, Krishnakumaret al. (2011) verificaram o efeito anti-tumoral de NC de naringenina e obtiveram diâmetro médio de partícula de 90 nm. No trabalho de Yen et al. (2009), ao estudar o efeito anti-hepatotóxico de NC de naringenina, obtiveram 66,2 nm de tamanho de partícula utilizando como polímero o *Eudragit*® e pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado.

Esses resultados demonstram, pela primeira vez, que o desenvolvimento de NC com a combinação de dois flavonoides na concentração de 2 mg/mL contendo o polímero *Eudragit*® L100 é satisfatório para a produção de NC, pois o diâmetro de partícula e o índice de polidispersão são parâmetros físico-químicos importantes para prever a distribuição, a absorção e a liberação no organismo e promissor para aplicação biológica.

## **Potencial zeta**

Nas formulações estudadas, as suspensões de NC apresentaram valores negativos de potencial zeta conforme tabela 2. De acordo com Mora-Huertas et al. (2010), os valores negativos de potencial zeta são obtidos devidos aos grupos carboxílicos nas extremidades da cadeia do polímero, como é o caso de NC produzidas a partir do polímero *Eudragit*® L100, o qual é um copolímero de ésteres de ácido acrílico e metacrílico (ZHANGA et al., 2012).

## **pH das suspensões**

No presente estudo, todas as formulações de NC apresentaram valores de pH ácidos. Segundo Schaffazicket al. (2002), a acidez observada nas formulações pode ser atribuída à estrutura química dos polímeros aniônicos que apresentam na sua estrutura grupos carboxílicos funcionais na cadeia polimérica, determinantes para o caráter ácido nas suspensões que contém o *Eudragit*® L100 como polímero.

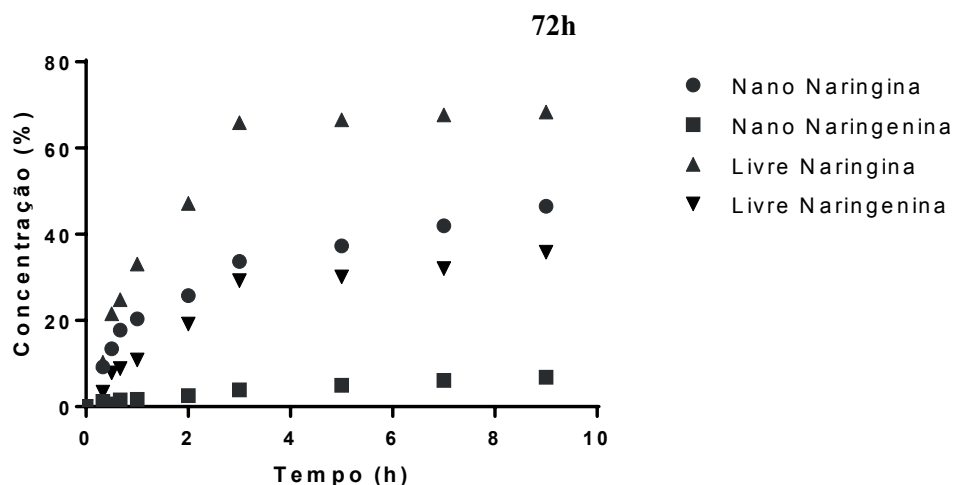
## Teor da naringina e da naringenina nas suspensões e da eficiência de encapsulação

O teor total de naringina na suspensão de NC foi de  $95\pm 5,0\%$ , e para a naringenina foi de  $93\pm 3,1\%$ . A eficiência de encapsulação determinada por ultrafiltração-centrifugação foi de 93% e 96% para a naringina e a naringenina, respectivamente resultando em alta eficiência de encapsulação para os dois flavonoides. Esses resultados estão de acordo com Coradini et al. (2014) que em seu estudo desenvolveram NC com combinação de dois polifenóis a curcumina e o resveratrol. A eficiência de encapsulação para as NC foi de aproximadamente 100%, diâmetro médio de cerca de 200 nm, baixo índice de polidispersão.

### LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Um perfil de libertação *in vitro* revela informações importantes quanto à estrutura e o comportamento de uma formulação, podendo prever a quantidade de ativo liberada ao longo do tempo e a duração do efeito do fármaco em estudo (XU et al., 2012). Os perfis de libertação da naringina e da naringenina a partir das formulações de NC com o emprego de sacos de diálise estão representados na figura 1. Durante todo o experimento, foram mantidas as condições *sink* para evitar interferências e garantir o processo difusivo no estudo de libertação. Os ensaios de libertação *in vitro* revelaram perfis de libertação diferentes em função do tempo para cada flavonoide, após sua libertação a partir das NC. Ao fim de 9 horas de ensaio, verificou-se que a naringina apresentou uma difusão rápida em torno de 46,5%, enquanto que a naringenina apresentou uma libertação lenta e sustentada ao longo do tempo, de aproximadamente 6,9%. As formas livres da naringina e da naringenina apresentaram uma taxa de difusão de 68,3% e 36% no mesmo período, respectivamente.

**Figura 1** - Perfil de libertação de naringina e de naringenina nanoencapsuladas e na forma livre.





A menor taxa de liberação da naringenina em relação à naringina pode ser atribuída às suas características lipofílicas e à baixa solubilidade em água, indicando que a naringenina apresenta elevada afinidade pela matriz polimérica e as gotículas de óleo constituintes da formulação. Por outro lado, a naringina apresentou mais rápido perfil de liberação no ensaio. Esses resultados estão relacionados à maior solubilidade da naringina no meio devido à presença de moléculas de glicose em sua estrutura química. De acordo com Xu et al. (2012), diversos fatores podem afetar a liberação de fármacos tais como: a degradação da matriz polimérica, peso molecular, afinidade entre o ativo e o polímero e a estrutura química dos compostos.

No estudo de liberação *in vitro* de Coradini et al. (2014) com o emprego de sacos de diálise com os fármacos resveratrol e curcumina a partir de NC lipídicas sólidas, foi verificado perfis de liberação diferentes em função do tempo para cada polifenol. O resveratrol apresentou uma liberação mais rápida em relação à curcumina. Após um período de 24h, cerca de 90% de resveratrol foi liberado a partir das NC, enquanto que 35% de curcumina foi liberado somente após 72h de ensaio. Os autores sugerem que esses resultados estão relacionados à estrutura química do resveratrol que apresenta mais grupamentos hidroxílicos que a curcumina, possibilitando que esse composto seja parcialmente adsorvido na parede polimérica e assim apresente maior taxa de liberação *in vitro*.

No presente estudo, observa-se que as formas livres da naringina e a naringenina apresentam uma maior liberação a partir do veículo em comparação com as nanoestruturas. Este resultado pode ser explicado pela possível interação entre o fármaco e a parede polimérica, comportamento já observado em estudos de liberação como de Ferranti et al. (1999).

## VIABILIDADE CELULAR (MTT)

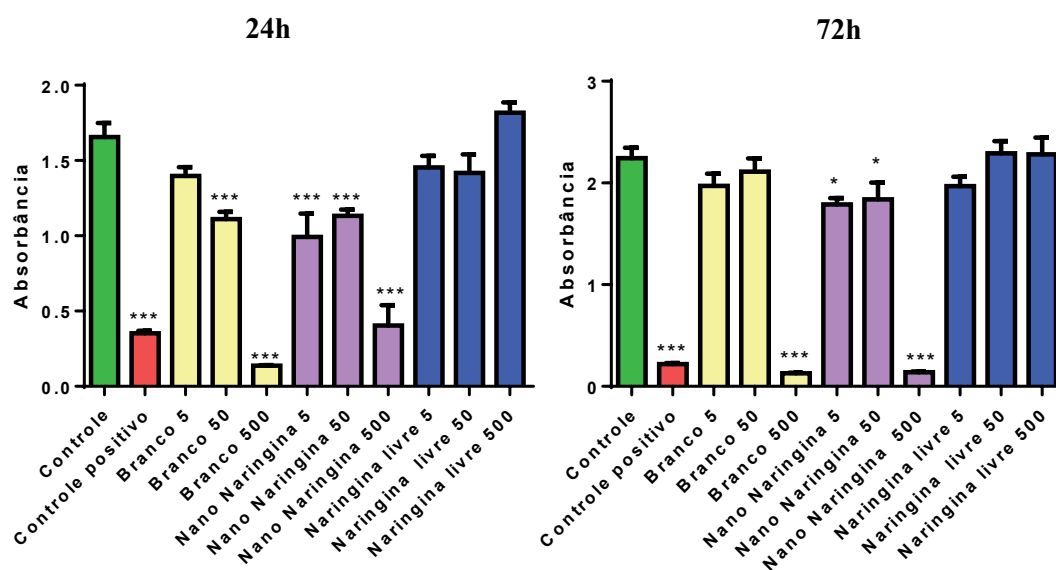
A determinação da viabilidade celular após o tratamento com diferentes compostos pode ser considerada um dos parâmetros para a atividade citotóxica de produtos. O teste de *screening* usualmente aplicado é o MTT. Este teste se baseia na avaliação da atividade das desidrogenases ativas em células viáveis, a partir da converção do composto hidrossolúvel MTT (sal com coloração amarela) no composto insolúvel formazan (coloração violácea), sendo possível estabelecer taxas de citotoxicidade e de proliferação celular, dependendo da combinação de compostos (MIZUNO et al., 2000).

Essa metodologia foi aplicada nesse estudo para investigar se as NC de naringina e de naringenina apresentavam algum efeito sobre a viabilidade das células Vero, nas doses testadas.

Como observado na figura 2, o tratamento das células Vero com as NC de naringina por um período de 24h apresentou uma redução na viabilidade celular nas concentrações de 5, 50 e 500 µg/mL, em relação ao grupo controle. Com as suspensões de NC brancas (sem os ativos),

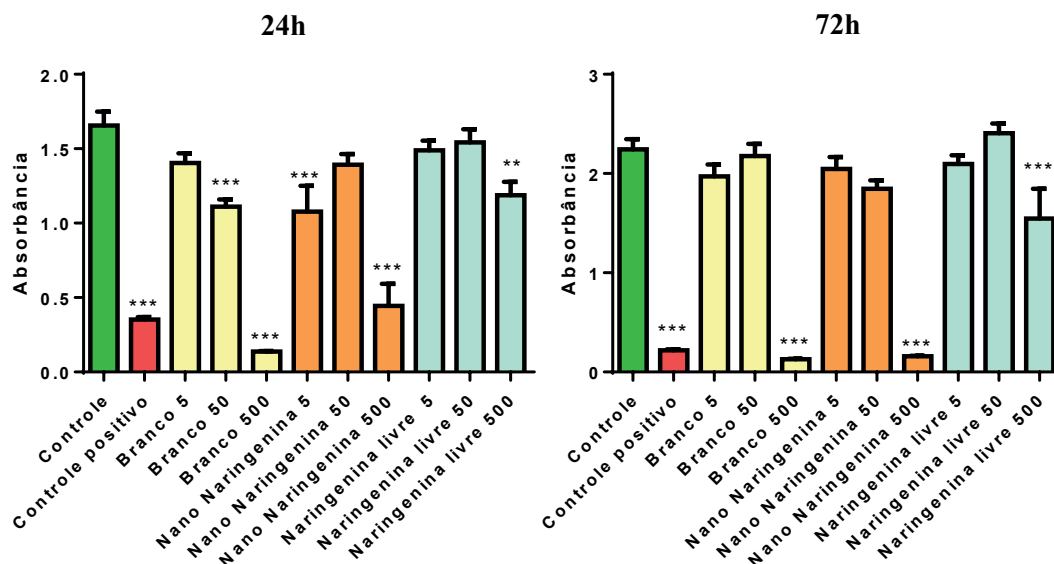
foi observada a redução da viabilidade celular nas diluições equivalentes às concentrações de 50 e 500  $\mu\text{g/mL}$  do ativo, em relação ao grupo controle. Após 72h de incubação, verificou-se uma redução da viabilidade celular nas concentrações de (5, 50 e 500  $\mu\text{g/mL}$ ) das suspensões de NC de naringina quando comparado com o grupo controle. Essa redução na viabilidade é observada com as NC brancas, apenas na maior concentração (500  $\mu\text{g/mL}$ ).

**Figura 2** - Efeito das suspensões de NC de naringina na viabilidade de linhagem de células Vero em 24h e 72h de incubação. Controle negativo: células em meio de cultura; Controle de morte celular: 90 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; As células foram incubadas com 5, 50 ou 500  $\mu\text{g/mL}$  de NC de naringina. Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão e foram analisados por análise de variância de uma via (*One Way ANOVA*) seguida pelo teste de Dunnet. \*\*\* $p < 0,0001$ ; \*\* $p < 0,001$  e \* $p < 0,05$  indicam diferença comparada ao grupo controle.



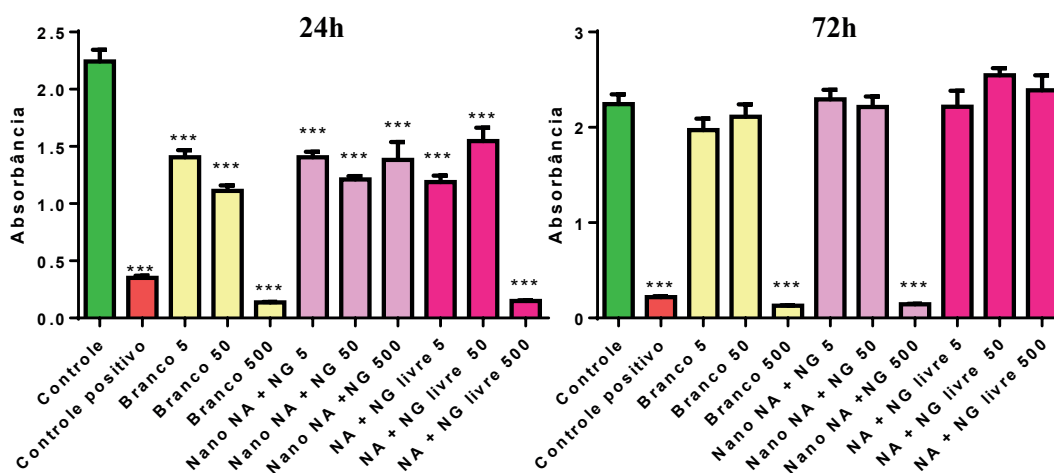
O tratamento de 24h de incubação com as suspensões de NC de naringenina indicam uma redução significativa na viabilidade celular de células Vero quando tratadas com as NC na concentração de 5, 50 e 500  $\mu\text{g/mL}$ , em relação ao grupo controle (Figura 3). Além disso, a naringenina na forma livre (sem adição do polímero) apresentou uma redução na viabilidade celular na maior concentração testada de 500  $\mu\text{g/mL}$ . No tratamento por 72h de incubação, os resultados demonstraram uma redução significativa na viabilidade celular com as NC de naringenina apenas na maior concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ , em relação ao grupo controle. Essa redução na viabilidade é observada com o fármaco livre na maior concentração testada.

**Figura 3** - Efeito das suspensões de NC de naringenina na viabilidade de linhagem de células Vero em 24h e 72h de incubação. Controle negativo: células em meio de cultura; Controle de morte celular: 90 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; As células foram incubadas com 5, 50 ou 500 µg/mL de NC de naringenina. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão e foram analisados por análise de variância de uma via (*One Way ANOVA*) seguida pelo teste de Dunnet. \*\*\*p < 0,0001; \*\*p < 0,001 e \*p < 0,05 indicam diferença comparada ao grupo controle.



A figura 4 demonstra que o tratamento de 24h de incubação com as NC contendo a mistura de naringina e de naringenina promoveu uma redução significativa na viabilidade das células Vero nas concentrações de 5, 50 e 500 µg/mL, em relação ao grupo controle. O mesmo resultado foi observado para os fármacos na forma livre. O tratamento das NC contendo naringina e naringenina por 72h de incubação reduziu a viabilidade celular na maior concentração testada, em comparação ao grupo controle. Não foram observadas alterações significativas com a mistura de naringina e de naringenina nas formas livres.

**Figura 4** - Efeito das suspensões de NC de naringina e de naringenina na viabilidade de linhagem de células Vero em 24h e 72h de incubação. Controle negativo: células em meio de cultura; Controle de morte celular: 90 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; As células foram incubadas com 5, 50 ou 500 µg/mL de NC de naringina e naringenina. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão e foram analisados por análise de variância de uma via (*One Way ANOVA*) seguida pelo teste de Dunnet. \*\*\*p < 0,0001 e \*\*p < 0,001 indicam diferença comparada ao grupo controle.



Neste trabalho, foi utilizada linhagem de células Vero, um fibroblasto de origem primata, para determinar uma possível citotoxicidade das NC contendo naringina e a naringenina, recentemente desenvolvidas. No ensaio de MTT de 24 h de incubação, foi observado que as NC contendo naringina, naringenina e a combinação de NC de naringina e naringenina apresentaram redução da viabilidade nas concentrações testadas.

No entanto, no ensaio de 72h de incubação, houve uma recuperação no crescimento celular nas concentrações testadas para as suspensões de NC de naringenina e a combinação dos dois compostos. Apenas a concentração de 500 µg/mL apresentou significativa e persistente redução da viabilidade das células Vero. A partir desses resultados, podemos sugerir que houve uma perturbação no crescimento celular em 24h de incubação levando uma resposta aguda das células frente ao tratamento com as formulações, descartando portando morte celular pelo tratamento com as nanocápsulas. Além disso, as nanopartículas poliméricas podem aglomerar no meio, sequestrando fatores de crescimento celular presentes, o que pode diminuir a viabilidade no ensaio (MEERLOO et al., 2011).

Além disso, fatores como o pH ácido das formulações de NC utilizadas podem ter influenciado o crescimento inicial das células durante o tratamento de 24h de incubação, pois o meio de cultura utilizado encontra-se em uma faixa de pH neutro. Acredita-se também que a diminuição da viabilidade celular tenha ocorrido devido à diferença de pH entre meio de cultura e as formulações de NC. Segundo Riss et al. (2013), diversos fatores podem causar interferência química no ensaio e comprometer a viabilidade celular, podendo levar a um resultado errôneo, entre eles, meio de cultura em pH baixo ou elevado, exposição prolongada dos reagentes à luz direta e também alguns fármacos.

## CONCLUSÃO

As NC formadas foram analisadas quanto ao diâmetro médio de partícula, o índice de polidispersão, o potencial zeta, o teor do fármaco e a eficiência de encapsulação que demonstram as características adequadas para administração oral.

Os ensaios de liberação *in vitro* revelaram perfis de liberação diferentes em função do tempo para cada flavonoide através da membrana de diálise, após sua liberação a partir das NC. A naringina apresentou uma difusão rápida em torno de 46,5%, enquanto que a naringenina apresentou uma liberação lenta e sustentada ao longo do estudo de aproximadamente 6,9%. As nanocápsulas de naringina e de naringenina demonstraram a capacidade de garantir um efeito imediato e controlado comparadas ao fármaco livre.

O teste para avaliação toxicidade das NC com o ensaio de (MTT) evidenciou efeitos tóxicos agudos, com uma redução na viabilidade celular de linhagem de células Vero nas concentrações de 5, 50 e 500 µg/mL para as suspensões de NC brancas, naringina, naringenina e a combinação dos dois ativos em 24h de incubação. Em 72h horas de incubação, foi observada uma redução significativa na

viabilidade celular somente na concentração de 500 µg/mL para as NC brancas, e as NC com ativos isolados ou em combinação. Pode-se concluir que a concentração menos citotóxica para os dois flavonoides no modelo celular estudado é inferior a 5 µg/mL.

## REFERÊNCIAS

ALAM, M. I. et al. Strategy for effective brain drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 5, p. 385-403, 2010.

BALUCHNEJADMOJARAD, T.; ROGHANI, M. Effect of naringenin on intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive deficits in rat: a behavioral analysis. **Pharmacology**, v. 78, p. 193-197, 2006.

CORADINI, K. et al. Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their in vitro antioxidant effects. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, n. 88, p. 178-185, 2014.

CORDENONSI, L. M. et al. Simultaneous separation and sensitive detection of naringin and naringenin in nanoparticles by chromatographic method indicating stability and photodegradation kinetics. **Biomedical Chromatography**, Published online in Wiley Online Library, DOI: 10.1002/bmc.3531, 2015.

DE MELO, N. F. S. et al. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (l-lactídeo) contendo benzocaína. **Quim. Nova**, n. 33, p. 65-69, 2010.

FERRANTI, V. et al. Primidone-loaded poly-o-caprolacton enano capsules: incorporation efficiency and in vitro release profiles. **Int. J. Pharm.**, v. 193, p. 107-111, 1999.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formulation by interfacial deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. 1-4, 1989.

FLOYD, R. A; HENSLEY, K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. **Neurobiol. Aging**, v. 23, p. 795-807, 2002.

GARCIA, B.; CASTILLO, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **J. Agric food chem**, v. 56, p. 6185-6205, 2008.

KRISHNAKUMAR, N. et al. Enhanced anticancer activity of naringenin-loaded nanoparticles in human cervical (HeLa) cancer cells. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 1, p. 223-231, 2011.

LI, P. et al. Six months chronic toxicological evaluation of naringin in sprague-dawley rats. **Food and chemical toxicology**, v. 66, p. 65-75, 2014.

MAES, M. et al. The inflammatory and neurodegenerative hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. **Metab Brain Dis**, v. 24, n. 1, p. 27-53, 2009.

MARINO, M. et al. Nutrition and human health from a sex-gender perspective. **Mol. Aspects Med**, v. 32, n. 1, p. 3-70, 2011.

MEERLOO, J. et al. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. **Methods in Molecular Biology**, v. 731, p. 237-245, 2011.

MIZUNO, M. et al. Fucogalactan isolated from *Sarcodonaspratus* elicits release of tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide from murine macrophages. **Immunopharmacology**, v. 46, p. 113-121, 2000.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, p. 113-142, 2010.

PANG, C. et al. Thermal conductivity measurement of methanol-based nanofluids with  $Al_2O_3$  and  $SiO_2$  nanoparticles. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 55, p. 5597-5607, 2012.

RATNAM, D. V. et al. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. **J Control Release**, v. 113, p. 189-207, 2006.

RISS, P. H. D. et al. **Cell Viability Assays**, v. 1, p. 1-28, 2013.

SCHAFFAZICK, S. et al. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, n. 1, p. 99-106, 2002.

TOTA, S. et al. Protective effect of quercetin against intra-cerebral streptozotocin induced reduction in cerebral blood flow and impairment of memory in mice. **Behav Brain Res**, v. 209, n. 1, p. 73-79, 2010.

XU, X. et al. A two stage reverse dialysis in vitro dissolution testing method for passive targeted liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 426, p. 211-218, 2012.

YEN, F. L. et al. Naringenin-Loaded Nanoparticles Improve the Physicochemical Properties and the Hepatoprotective Effects of Naringenin in Orally-Administered Rats with CCl<sub>4</sub>-Induced Acute Liver Failure. **Pharmaceutical Research**, n. 4, v. 26, p. 893-902, 2009.

ZHANGA, Y. et al. Thiolated Eudragit nanoparticles for oral insulin delivery: Preparation, characterization and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, p. 341-350, 2012.

ZUANAZZI, J. A. S; MONTANHA, J. A. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre; Florianópolis: Editora da UFRGS, p. 577-614, 2002.

