

Ex.: 4.03.99 - Farmácia.

LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICA DE NARINGENINA A PARTIR DE FILME À BASE DE QUITOSANA

Wanessa S. C. Quintão^{1*}, Tais Gratieri², Marcilio Cunha-Filho³, Guilherme M. Gelfuso⁴

1. Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB-DF)
2. Professora Associada da Universidade de Brasília (UnB-DF)
3. Professor Associado da Universidade de Brasília (UnB-DF)
4. Professor Associado da Universidade de Brasília (UnB-DF)

Resumo

Estudos *in vitro* e *in vivo* evidenciam vários efeitos terapêuticos da naringenina [1–3]. Contudo, ela possui baixa biodisponibilidade por via oral [4], o que torna formulações de aplicação transdérmica alvos de interesse, considerando que por essa via não ocorre efeito de primeira passagem, por exemplo [5]. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi desenvolver e avaliar um filme de aplicação transdérmica à base de quitosana, contendo naringenina, como alternativa terapêutica para doenças inflamatórias crônicas.

O filme foi avaliado em estudos de liberação e de permeação cutânea, *in vitro*, utilizando membrana sintética ou pele de suínos acoplados a células de difusão do tipo Franz. Após 72 h, o filme foi capaz de liberar 100% da naringenina contida em sua matriz. Além disso, os estudos de permeação demonstraram liberação sustentada e controlada de naringenina. Dessa forma, o filme parece representar uma formulação promissora para efeito anti-inflamatório sistêmico.

Palavras-chave: flavanona; polímeros; anti-inflamatório

Apoio financeiro: Esse estudo teve apoio financeiro da FAP-DF (projeto número 193.001.741/2017) e CAPES, que forneceu bolsa de estudos a Wanessa de Souza Cardoso Quintão.

Introdução

Naringenina é um bioflavonoide encontrado principalmente em frutas cítricas, tais como *Citrus aurantium* L. e *Solanum lycopersicum* L. Sua ação antioxidante contribui para o tratamento de diversas doenças de origem inflamatória, muitas vezes associadas a um processo de estresse oxidativo, desequilíbrio caracterizado pela grande quantidade de radicais livres [6]. Na literatura, o emprego terapêutico desse composto mostra-se vantajoso pelo potencial anti-inflamatório e imunomodulador [2,3,7], neuroprotetor [8], antitumoral [9], além de ter demonstrado atuar em doenças metabólicas [2,10] e no controle de replicação viral [11].

Apesar do grande potencial terapêutico da naringenina, as aplicações clínicas são limitadas devido à baixa biodisponibilidade oral, de aproximadamente 5,8% [12]. Também possui uma baixa permeabilidade em membranas, além de sofrer considerável metabolismo de primeira passagem antes de alcançar a circulação sistêmica, o que restringe o uso terapêutico dessa substância [13].

Muitos estudos tem sido desenvolvidos na tentativa de melhorar a solubilidade e biodisponibilidade da naringenina, por meio de técnicas como a complexação com fosfolípidos, complexos de inclusão com β -ciclodextrinas, técnicas de condensação enzimática ou nanodispersões [14–17].

O uso de fitoquímicos como naringenina em formulações transdérmicas é de grande valor como alternativa terapêutica e não foi avaliado anteriormente. Assim, considerando a possibilidade de obter um efeito anti-inflamatório sistêmico por aplicação transdérmica de membranas constituídas de polímeros, como a quitosana, esse estudo tem como objetivo desenvolver um filme com esse polímero, para ser empregado como alternativa terapêutica em casos de doenças inflamatórias crônicas [18,19].

Metodologia

Para a formulação, um gel de quitosana foi preparado dissolvendo-se 1,5% (p/v) de quitosana com 75% de desacetilação em uma solução de ácido acético (2% v/v). Após dispersão do polímero, 0,5% (p/v) de uma solução etanólica de naringenina (50 mg/mL) foi incorporado ao gel. Em placas do tipo Petri (9 cm de diâmetro), 20 g de gel foram adicionados em cada placa. O gel foi mantido por 12 h em uma estufa a 60°C, até completa evaporação do líquido e formação do filme. Todos os filmes foram acondicionados em dessecador após retirada da estufa, por 30 min.

Para quantificar a naringenina nos filmes de quitosana, foram cortados pedaços de 1,5 cm de diâmetro. Em seguida, cada pedaço foi pesado e dissolvido em uma solução de ácido acético (50%), completando o volume para 10 mL, em balão volumétrico. A solução permaneceu sob agitação por 30 min. Uma amostra de 100 μ L foi diluída em 5 mL de metanol e filtrada em membrana de porosidade de 0,45 μ m. Cada amostra foi quantificada por um método simples, preciso e seletivo, desenvolvido e validado em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), modelo Shimadzu LC 20-AD. As análises foram realizadas em triplicata. A homogeneidade do fármaco no filme também foi calculada pela determinação da concentração média de três pedaços, de locais diferentes do mesmo filme, mediante cálculo do coeficiente de variação.

Para avaliar o filme de quitosana formado, estudos de perfil de liberação *in vitro* e de permeação em pele

in vitro foram conduzidos. Os estudos de liberação *in vitro* foram realizados em células de difusão verticais do tipo Franz, montadas com os filmes de quitosana, aplicados diretamente sobre cada compartimento receptor, vedado com *parafilm*. Este último compartimento foi preenchido com uma solução receptora preparada com Pluronic® a 2,5% (p/v) em tampão fosfato 0,01 mol/L isotônico e fisiológico (pH 7,4).

Nos estudos de permeação *in vitro*, as células de Franz foram montadas com pele de orelha de suínos, colocada entre os compartimentos doador e receptor. Os filmes de quitosana foram hidratados em água milliQ por 1 min, e em seguida, aplicados sobre a pele, em contato direto com o estrato córneo. A pele e o filme foram cobertos com *parafilm*, para evitar contaminação das amostras e garantir a manutenção da hidratação durante o experimento. O compartimento receptor foi preenchido com a mesma solução utilizada nos estudos de liberação.

Tanto o estudo de liberação quanto o de permeação foram conduzidos por 72 h, realizando-se coletas de 1 mL do meio receptor a cada hora nas primeiras 12 h, e em seguida, a cada 12 h até o término do período. O volume retirado da solução receptora foi repostado com meio receptor novo a cada coleta. Durante os ensaios, as células foram mantidas sob agitação a 500 rpm, em banho-maria, a uma temperatura de $32 \pm 2^\circ\text{C}$. As alíquotas coletadas do compartimento receptor foram filtradas com membranas de porosidade de $0,45 \mu\text{m}$ e levadas ao CLAE para análise de fármaco. Os experimentos foram conduzidos com 5 replicatas.

Resultados e Discussão

O perfil de liberação obtido mostrou que o filme foi capaz de liberar aproximadamente 60% da naringenina em apenas 6 h e, a partir desse momento, exercer um controle maior da liberação, de modo que a liberação foi sustentada até o final do experimento, quando houve a liberação de 100% da substância.

Este *burst* inicial de liberação é importante em um sistema transdérmico para garantir que um depósito do fármaco seja rapidamente formado no estrato córneo, garantindo que um gradiente de concentração se forme e se estabeleça um fluxo de fármaco através da pele em direção à corrente sanguínea. Ainda, o controle da liberação de naringenina com o passar do tempo também se faz necessário, para que o fluxo seja mantido constante durante todo o tempo de aplicação do filme sobre a pele e o filme funcione, assim, como reservatório do fármaco ao longo desse tempo [18].

Para se compreender o mecanismo pelo qual o fármaco era liberado do filme, o perfil de liberação do fármaco foi analisado segundo vários modelos cinéticos. Os valores do coeficiente de correlação foram maiores para os modelos de primeira ordem e Korsmeyer-Peppas. O valor de correlação correspondente ao modelo de primeira ordem demonstra que a liberação da naringenina a partir do filme ocorre baseada na difusão segundo a primeira lei de Fick, em que o fluxo de difusão ocorre na direção contrária à do gradiente de concentração [20]. Assim, segundo o modelo cinético de primeira ordem, o fármaco é liberado de forma proporcional à quantidade restante no interior da matriz, de modo que a quantidade de fármaco liberado tende a decrescer com o tempo [21].

O valor do coeficiente de correlação do perfil de liberação da naringenina a partir do filme foi maior ao aplicar os modelos de primeira ordem ($n = 0,97$) e de Korsmeyer-Peppas ($n = 0,91$), estando muito próximo ao limite superior do intervalo de $0,45 > n > 0,89$. Pela característica da quitosana em meio aquoso, os resultados sugerem, portanto, um mecanismo de transporte que combina a difusão do fármaco (transporte Fickiano, primeira ordem) e transporte anômalo (não-Fickiano), em que ocorre, ao mesmo tempo, difusão pela matriz e relaxamento das cadeias poliméricas [20].

Nos estudos de permeação, o filme foi capaz de promover permeação da naringenina para a solução receptora a uma concentração quantificável pelo método analítico, antes de 2 h de experimento (1,81 h). Isso significa que a partir desse ponto, o sistema tende a apresentar uma liberação de naringenina constante até o final das 72 h de aplicação do filme sobre a pele. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores, que avaliaram formulações contendo fármacos lipofílicos [22–24], com valores de *lag time* para início da permeação constante dos fármacos sempre menores que 5 h.

Com o controle, no entanto, somente após 72 h de experimento foi possível quantificar $1,58 \pm 0,12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de naringenina, quantidade 14 vezes menor que a permeada a partir do filme ($21,91 \pm 0,60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), no mesmo tempo. Após 72 h, a quantidade de naringenina que permeou foi de aproximadamente $38,50 \mu\text{g}$.

O perfil de permeação da naringenina demonstra que a formulação desenvolvida foi capaz de aumentar de forma expressiva a passagem do fitoquímico através da pele. Isso pode ser atribuído à característica catiônica da quitosana, uma vez que as cargas positivas do polímero interagem com as cargas negativas das células epiteliais, resultando em uma reorganização estrutural das proteínas *tight junction*. Dessa forma, o polímero é capaz de aumentar a permeação de fármacos através da pele [25].

Além de atuar como promotor de permeação, a quitosana é um polímero que também contribui para a formação de uma matriz, capaz de atuar como depósito do ativo [26]. Isso garante a liberação transdérmica constante de naringenina. Além disso, o filme aplicado sobre a pele atua de forma oclusiva, o que diminui a possibilidade de ocorrer desidratação da pele, fenômeno capaz de reduzir a permeação [27].

Foi possível notar um padrão de difusão progressivo da naringenina, com fluxo de aproximadamente $0,30 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ e coeficiente de permeabilidade K_p calculado como sendo $3,23 \times 10^{-4} \text{ cm}/\text{h}$. Thein-Han e colaboradores (2004) desenvolveram filmes à base de quitosana e demonstraram que o polímero pode tornar a liberação do fármaco mais lenta e progressiva, principalmente quando apresenta grau de desacetilação superior a 70%. Assim, o uso do polímero em filmes pode contribuir para uma ação contínua e prolongada da naringenina. Em estudos realizados por Chen *et al.* [24], foram avaliadas diferentes microemulsões contendo ibuprofeno ($\log P = 3,5$) para liberação transdérmica. O *lag time* do fármaco variou entre 1,84 e 2,63 h, resultado próximo ao obtido com a naringenina, e os autores identificaram que propilenoglicol atuou como promotor de absorção

eficiente, por contribuir para aumentar a solubilidade do fármaco na pele, modificando o coeficiente de partição. Este componente, como discutido anteriormente, também compõem o filme de quitosana e devem ter tido efeito promotor complementar à quitosana.

De acordo com a literatura, são necessários ao menos 5 $\mu\text{mol/L}$ de naringenina para um efeito terapêutico considerável a nível celular [4]. No entanto, a dose refere-se à quantidade de naringenina administrada por via oral. Considerando que boa parte da flavanona é degradada pelo metabolismo de primeira passagem, a liberação em fluidos biológicos pela administração oral é pequena [28]. Assim, os resultados da avaliação *in vitro* da permeação de naringenina contida no filme através da pele são promissores para efeito terapêutico, tendo em vista que após 72 h, a liberação de naringenina foi de aproximadamente 38,50 μg , que corresponde a 9,42 $\mu\text{mol/L}$. Vale ressaltar que os resultados condizem com a liberação do flavonoide a partir de filme com apenas 1,5 cm de diâmetro. A dose já seria adequada para efeito a nível celular, mas pode ser ajustada por meio da aplicação de um filme com maior diâmetro, contendo mais naringenina.

Conclusões

O filme demonstrou perfil de liberação no qual o fitoquímico foi liberado de forma proporcional à quantidade restante no interior da matriz. A escolha da quitosana para o desenvolvimento do filme é atrativa por ser um polímero biocompatível e biodegradável, além de possibilitar um aumento de permeação de fármacos.

A liberação de mais da metade da naringenina contida no filme ocorreu nas primeiras horas de experimento, com liberação da quantidade total ao final do tempo de estudo. Já nos estudos de permeação cutânea realizados *in vitro*, foi possível observar que o filme permitiu a difusão da naringenina e liberação através da pele, o que possibilita um efeito terapêutico a longo prazo.

A ação terapêutica da naringenina está relacionada ao potencial anti-inflamatório, com uso a longo prazo. Contudo, considerando a baixa biodisponibilidade oral, os resultados deste trabalho sugerem que a formulação representa um sistema transdérmico promissor para atuação anti-inflamatória, por via transdérmica.

Referências bibliográficas

- [1] Y. Gao, Z. Wang, Y. Zhang, Y. Liu, S. Wang, W. Sun, J. Guo, C. Yu, Y. Wang, W. Kong, J. Zheng, Naringenin inhibits ng-nitro-l-arginine methyl ester-induced hypertensive left ventricular hypertrophy by decreasing angiotensin-converting enzyme 1 expression, *Exp. Ther. Med.* 16 (2018) 867–873. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6258>.
- [2] S. Hirai, Y.I. Kim, T. Goto, M.S. Kang, M. Yoshimura, A. Obata, R. Yu, T. Kawada, Inhibitory effect of naringenin chalcone on inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages, *Life Sci.* 81 (2007) 1272–1279. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.09.001>.
- [3] W. Zeng, L. Jin, F. Zhang, C. Zhang, W. Liang, Naringenin as a potential immunomodulator in therapeutics, *Pharmacol. Res.* 135 (2018) 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.08.002>.
- [4] B. Salehi, P.V.T. Fokou, M. Sharifi-Rad, P. Zucca, R. Pezzani, N. Martins, J. Sharifi-Rad, The therapeutic potential of naringenin: A review of clinical trials, *Pharmaceuticals.* 12 (2019). <https://doi.org/10.3390/ph12010011>.
- [5] M.R. Prausnitz, R. Langer, Transdermal drug delivery, 26 (2009) 1261–1268. <https://doi.org/10.1038/nbt.1504>. Transdermal.
- [6] N. Khansari, Y. Shakiba, M. Mahmoudi, Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer, *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* 3 (2009) 73–80. <https://doi.org/10.2174/187221309787158371>.
- [7] T.H. Kim, G.D. Kim, H.J. Ahn, J.J. Cho, Y.S. Park, C.S. Park, The inhibitory effect of naringenin on atopic dermatitis induced by DNFB in NC/Nga mice, *Life Sci.* 93 (2013) 516–524. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.07.027>.
- [8] Y. Chtourou, H. Fetoui, R. Gdoura, Protective effects of naringenin on iron-overload-induced cerebral cortex neurotoxicity correlated with oxidative stress, *Biol. Trace Elem. Res.* 158 (2014) 376–383. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-9948-0>.
- [9] S.I. Kanno, A. Tomizawa, T. Hiura, Y. Osanai, A. Shouji, M. Ujibe, T. Ohtake, K. Kimura, M. Ishikawa, Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180-implanted mice, *Biol. Pharm. Bull.* 28 (2005) 527–530. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.527>.
- [10] M.A. Alam, N. Subhan, M.M. Rahman, S.J. Uddin, H.M. Reza, S.D. Sarker, Effect of Citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action, *Am. Soc. Nutr.* 5 (2014) 404–417. <https://doi.org/10.3945/an.113.005603.404>.
- [11] S. Frabasile, A.C. Koishi, D. Kuczera, G.F. Silveira, W.A. Verri, C.N.D. Dos Santos, J. Bordignon, The citrus flavanone naringenin impairs dengue virus replication in human cells, *Sci. Rep.* 7 (2017). <https://doi.org/10.1038/srep41864>.
- [12] F.I. Kanaze, M.I. Bounartzi, M. Georgarakis, I. Niopas, Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects, *Eur. J. Clin. Nutr.* 61 (2007) 472–477. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602543>.
- [13] S.L. Hsiu, T.Y. Huang, Y.C. Hou, D.H. Chin, P.D.L. Chao, Comparison of metabolic pharmacokinetics of naringin and naringenin in rabbits, *Life Sci.* 70 (2002) 1481–1489. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01491-6](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01491-6).
- [14] S. Chaurasia, R.R. Patel, P. Vure, B. Mishra, Oral naringenin nanocarriers: Fabrication, optimization, pharmacokinetic and chemotherapeutic efficacy assessments, *Nanomedicine.* 12 (2017) 1243–1260.

<https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0436>.

- [15] S. Chaurasia, R.R. Patel, P. Vure, B. Mishra, Potential of Cationic-Polymeric Nanoparticles for Oral Delivery of Naringenin: In Vitro and In Vivo Investigations, *J. Pharm. Sci.* 107 (2018) 706–716. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.10.006>.
- [16] M.A. Oliveira, L. Heimfarth, F.R.S. Passos, R. Miguel-dos-Santos, M.R. Mingori, J.C.F. Moreira, S.S. Lauton, R.S.S. Barreto, A.A.S. Araújo, A.P. Oliveira, J.T. Oliveira, A.F. Baptista, A.M.B. Martinez, L.J. Quintans-Júnior, J.S.S. Quintans, Naringenin complexed with hydroxypropyl- β -cyclodextrin improves the sciatic nerve regeneration through inhibition of p75NTR and JNK pathway, *Life Sci.* 241 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117102>.
- [17] L.J. Yang, S.X. Ma, S.Y. Zhou, W. Chen, M.W. Yuan, Y.Q. Yin, X.D. Yang, Preparation and characterization of inclusion complexes of naringenin with β -cyclodextrin or its derivative, *Carbohydr. Polym.* 98 (2013) 861–869. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.07.010>.
- [18] B.K.A. Rasool, U.S. Aziz, O. Sarheed, A.A.A. Rasool, Design and evaluation of a bioadhesive film for transdermal delivery of propranolol hydrochloride, *Acta Pharm.* 61 (2011) 271–282. <https://doi.org/10.2478/v10007-011-0025-3>.
- [19] W.W. Thein-Han, W.F. Stevens, Transdermal delivery controlled by a chitosan membrane, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 30 (2004) 397–404. <https://doi.org/10.1081/DDC-120030934>.
- [20] T. Hayashi, H. Kanbe, M. Okada, M. Suzuki, Formulation study and drug release mechanism of a new theophylline sustained-release preparation, *Int. J. Pharm.* 304 (2005) 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.07.022>.
- [21] C.M. Lopes, J.M.S. Lobo, P. Costa, Formas farmacêuticas de liberação modificada: Polímeros hidrofílicos, *Rev. Bras. Ciências Farm. J. Pharm. Sci.* 41 (2005) 143–154.
- [22] P.K. Kiptoo, K.S. Paudel, D.C. Hammell, R.R. Pinninti, J. Chen, P.A. Crooks, A.L. Stinchcomb, Transdermal delivery of bupropion and its active metabolite, hydroxybupropion: A prodrug strategy as an alternative approach, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 583–594. <https://doi.org/10.1002/jps.21463>.
- [23] Y.S. Rhee, S.Y. Kwon, C.W. Park, N.Y. Choi, W.J. Byun, S.C. Chi, E.S. Park, Characterization of monolithic matrix patch system containing tulobuterol, *Arch. Pharm. Res.* 31 (2008) 1029–1034. <https://doi.org/10.1007/s12272-001-1264-8>.
- [24] H. Chen, X. Chang, D. Du, J. Li, H. Xu, X. Yang, Microemulsion-based hydrogel formulation of ibuprofen for topical delivery, *Int. J. Pharm.* 315 (2006) 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.02.015>.
- [25] J. Smith, E. Wood, M. Dornish, Effect of Chitosan on Epithelial Cell Tight Junctions, *Pharm. Res.* 21 (2004) 43–49. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000012150.60180.e3>.
- [26] S. Puttipipatkachorn, J. Nunthanid, K. Yamamoto, G.E. Peck, Drug physical state and drug-polymer interaction on drug release from chitosan matrix films, *J. Control. Release.* 75 (2001) 143–153. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00389-3](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00389-3).
- [27] K.S. Paudel, M. Milewski, C.L. Swadley, N.K. Brogden, A.L. Stinchcomb, Challenges and opportunities in dermal/transdermal delivery, *Ther. Deliv.* 1 (2010) 109–131.
- [28] K. Wang, T. Liu, R. Lin, B. Liu, G. Yang, X. Bu, W. Wang, P. Zhang, L. Zhou, J. Zhang, Preparation and in vitro release of buccal tablets of naringenin-loaded MPEG-PCL nanoparticles, *RSC Adv.* 4 (2014) 33672–33679. <https://doi.org/10.1039/C4RA04920A>.