



Produção e caracterização de nanopartículas contendo naringenina

Production and characterization of nanoparticles containing naringenin

Bruna Franzon Rossi¹, Odinei Hess Gonçalves², Byanca Pereira Moreira de Oliveira³, Viviane Augusta de Medeiros Garcia Cunha⁴

RESUMO

A naringenina é um polifenol encontrado em frutas cítricas e tem sido investigada devido suas atividades farmacológicas. No entanto, a baixa solubilidade em água e a instabilidade fisiológica limitam o uso da naringenina em aplicações terapêuticas ou em alimentos nutracêuticos. Uma alternativa para melhorar a atividade deste composto é o uso de técnicas de nanoencapsulação. O objetivo do trabalho foi nanoencapsular a naringenina utilizando-se Poloxamer 407 como encapsulante, verificando a efetividade do método e a interação entre o composto bioativo e o encapsulante. As nanopartículas foram obtidas através da técnica de dispersão sólida. Para a caracterização das nanopartículas foram realizadas análises de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Espectroscopia no Infravermelho (FTIR), e para verificar a interação entre a naringenina e o encapsulante foram realizadas análises no UV-Vis. A ausência do pico de fusão do composto encapsulado e o deslocamento do pico do P407 nas nanopartículas indicaram a eficiência da encapsulação, assim como a identificação de picos característicos de ligações químicas nos espectros de FTIR. A análise no UV-Vis comprovou a interação entre os compostos devido a mudanças no espectro de absorção da naringenina. Os resultados encorajam a continuação das pesquisas no sentido de formular alimentos contendo a naringenina encapsulada.

Palavras-chave: Nanoencapsulação, compostos bioativos, dispersão sólida, alimentos nutracêuticos.

ABSTRACT

Naringenin is a polyphenol found in citrus fruits and has been investigated for its pharmacological activities. However, its low water solubility and physiological instability limit the use of naringenin in therapeutic applications. An alternative to improve the activity of this compound is the use of nanoencapsulation techniques. The objective of this work was to nanoencapsulate naringenin using Poloxamer 407 as an encapsulant, verifying the effectiveness of the method and the interactions between the bioactive compound and the encapsulant. The nanoparticles were produced using the solid dispersion technique. For the characterization of the nanoparticles, Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Infrared Spectroscopy (FTIR) analyzes were performed, while the verification of interactions between naringenin and the encapsulant were evaluated by UV-Vis. Efficient encapsulation was suggested by the absence of the melting peak of the encapsulated compound and the displacement of the P407 peak in the nanoparticles sample, as well as by the identification of characteristic peaks of bonds in the FTIR spectra. UV-Vis analyses demonstrated an interaction between the compounds due to changes in the absorbance spectrum of naringenin. These results encourage further research to formulate foods containing encapsulated naringenin.

Keywords: Nanoencapsulation, bioactives compounds, solid dispersion, nutraceutic foods.

1 INTRODUÇÃO

Os flavonóides se caracterizam por ser uma classe de compostos naturais que estão amplamente distribuídos em plantas e alimentos vegetais, sendo atribuídas a eles diversas propriedades biológicas, como



atividade antioxidante, anti-inflamatória, antialérgica e anti-cancerígena (BRONNER; BEECHER, 1995). As suas principais classes são os flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanas, isoflavonoides e antocianinas (FLAMBÓ, 2013).

A naringenina pertence à família das flavanonas, sendo encontrada em abundância no suco de toranja, frutas cítricas e pele de tomate (AKBARZADEH; PARVARESH; ..., 2016). Grapefruit (*Citrus paradisi*) é a principal fonte alimentar deste polifenol, onde é responsável por 70% do conteúdo de flavonóides (ERLUND, 2004). A naringenina tem sido amplamente investigada pois possui atividades farmacológicas tais como: ação antioxidante, vasorrelaxante, hepatoprotetora, anti-inflamatória e antidepressiva (LI et al., 2014). No entanto, a baixa biodisponibilidade, resultado da baixa solubilidade em água e instabilidade fisiológica, limita o uso da naringenina em aplicações terapêuticas (RAJAMANI et al., 2019).

Uma alternativa para contornar esse problema é a utilização de técnicas de encapsulação. As nanopartículas poliméricas contendo naringenina constituem uma estratégia promissora para promover uma liberação controlada, direcionamento do fármaco no sítio de ação e aumento da resposta terapêutica do composto (MALGARIM et al., 2016). Métodos de encapsulamento podem ser desenvolvidos com o intuito de proteger e aprimorar a atividade *in situ* desses compostos (BUDEL et al., 2020; KERDUDO et al., 2014).

Testes envolvendo a naringenina nanoencapsulada com os encapsulantes éter sulfobutil-ciclodextrina e quitosana pela técnica de gelificação iônica mostraram um aumento da solubilidade do composto bioativo, sendo ainda, considerado uma alternativa para o sistema ocular de administração de medicamentos, devido a fácil administração, tempo prolongado de liberação do medicamento, biodisponibilidade ocular melhorada e frequência de dosagem reduzida (ZHANG et al., 2016).

(GRATIERI et al., 2020) verificaram o uso da técnica de precipitação por mudança de solvente, onde foram obtidos complexos de inclusão de ciclodextrina com naringenina. Os testes demonstraram melhoria na estabilidade e desempenho da dissolução do composto, além de melhoras no perfil anti-inflamatório em comparação com o produto *in natura*, e conseqüente aumento da viabilidade industrial do bioativo.

A técnica de nanoencapsulação por dispersão sólida consiste em misturar um polímero encapsulante e o composto bioativo a ser encapsulado (hidrofóbico) que são solubilizados em um solvente orgânico comum (etanol ou uma solução hidro-alcoólica). Em seguida, são submetidos à sonicação, para indução da interação (ligação de hidrogênio) entre o polímero e as moléculas encapsuladas, finalizando com a evaporação de todos os solventes utilizados (HELENO et al., 2018).

O Poloxamer 407 é bastante utilizado como encapsulante nas nanoestruturas pois apresenta uso seguro como agente gelificante de formulações para a administração intranasal e ocular de muitos medicamentos (FAKHARI; CORCORAN; SCHWARZ, 2017; GRATIERI et al., 2010).

Sabendo-se das limitações do uso da naringenina em sua forma pura, a utilização de uma técnica de encapsulação seria viável a fim de melhorar a estabilidade e solubilidade do composto bioativo, possibilitando assim sua aplicação futura? Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi nanoencapsular a naringenina através da técnica de dispersão sólida verificando a efetividade do método aplicado e avaliando a interação entre o bioativo e o encapsulante, com a proposta de utilizar o composto nanoencapsulado, posteriormente, em suplementos alimentares.

2 MÉTODO

As nanopartículas de naringenina foram obtidas e caracterizadas no laboratório do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTA) no Câmpus de Campo Mourão - PR, no ano de 2020. Para a produção das nanopartículas de naringenina foram utilizados álcool etílico (Dinâmica, 99,5%), o polímero



Kolliphor Poloxamer 407 (massa molar de 12.000 g/gmol, Sigma-Aldrich), Tween 80 P.S. (Dinâmica) e naringenina (Sigma-Aldrich). Brometo de potássio foi utilizado para as análises de Espectroscopia de Infravermelho. Etanol também foi utilizado para as análises de UV-Vis.

As nanopartículas de naringenina foram obtidas pela técnica de dispersão sólida. O encapsulante utilizado foi o surfactante Poloxamer 407. A mistura de etanol (37,5g), Tween 80 (0,009g) e o Poloxamer 407 (0,9g) pesadas em um béquer foi submetida ao banho de água a 60°C até que houvesse a dissolução completa e a solução ficasse transparente. Posteriormente, a solução foi colocada em leve agitação magnética por aproximadamente 5 minutos, sendo então, adicionado o bioativo naringenina (0,090g) ao béquer que foi deixado por mais 10 minutos de agitação. A mistura foi submetida ao banho de ultrassom (Fisher Scientific, 120 W) por 3 minutos (30 segundos ligado e 10 segundos desligado). A dispersão resultante foi evaporada em estufa com circulação e renovação de ar a 40°C. As amostras secas foram refrigeradas e protegidas da luz.

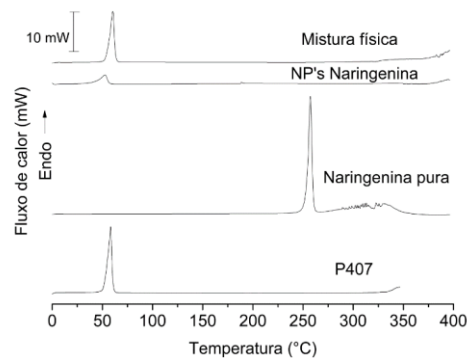
Para avaliar o estado físico das nanopartículas, empregou-se a Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC, Perkin Elmer 4000). As amostras avaliadas foram de naringenina pura, as nanopartículas, o encapsulante e a mistura física. Sendo a mistura física composta das nanopartículas de naringenina, da naringenina pura e do encapsulante. As amostras foram avaliadas com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, em uma faixa de temperatura de 0 a 400°C e com fluxo de nitrogênio gasoso de 50 mL/min. Para identificar possíveis interações químicas entre os reagentes utilizados na obtenção das nanopartículas de naringenina, foi realizada a análise da Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR, Shimadzu, IR Affinity-1) na faixa de 3500 cm⁻¹ a 500 cm⁻¹ com resolução de 2 cm⁻¹ e 32 *scans* cumulativos.

Foi realizada a análise de espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) a fim de avaliar quantitativamente a interação entre o encapsulante Poloxamer P407 e o composto bioativo naringenina. Foram realizadas diferentes diluições em balões volumétricos contendo etanol (50 mL) com objetivo de aumentar gradualmente a proporção entre o Poloxamer 407 e a naringenina. Os espectros de UV-Vis (OceanOptics, Red Tide USB 650 UV) foram obtidos através do uso de cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

3 RESULTADOS

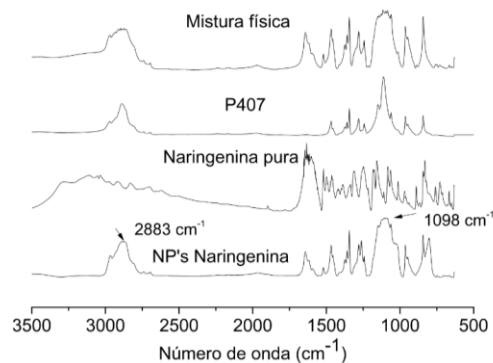
Na Figura 1 estão apresentados os termogramas obtidos na análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) da naringenina, das nanopartículas contendo naringenina, da mistura física e do encapsulante (P407). A Figura 2 mostra os espectros obtidos na Espectroscopia no Infravermelho (FTIR). A Figura 3 apresenta os espectros de UV-Vis para diferentes concentrações de encapsulante em relação à naringenina e a relação entre o fator de interação F e exemplos dos espectros de UV-Vis obtidos.

Figura 1 - Curvas de DSC das nanopartículas de naringenina em relação ao encapsulante, à naringenina pura e à mistura física.



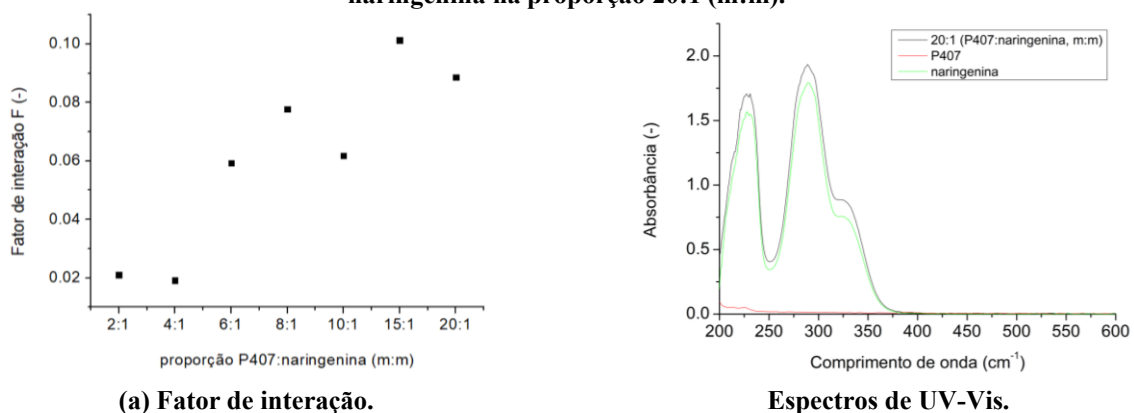
Fonte: Autoria própria (2021).

Figura 2 - Espectros de FTIR das nanopartículas contendo naringenina em relação ao encapsulante, à naringenina e à mistura física.



Fonte: Autoria própria (2021).

Figura 3 - Fator de interação F para diferentes proporções mássicas de naringenina e encapsulante e espectro de absorção em UV-Vis para a naringenina, o encapsulante P407 e a solução contendo P407 e naringenina na proporção 20:1 (m:m).



(a) Fator de interação.

Espectros de UV-Vis.

Fonte: Autoria própria (2021).

Nos termogramas apresentados, é possível identificar o pico da temperatura de fusão (T_f) da naringenina em 257°C, próximo ao encontrado na literatura de 257°C (SANGPHEAK et al., 2015). O pico endotérmico de fusão do polímero P407 foi encontrado próximo a 62°C, também próximo ao encontrado na literatura (57,13°C) (HURLEY et al., 2020). Contudo, a fusão da naringenina não pôde ser detectada na mistura física, possivelmente devido à baixa concentração da naringenina, o que pode levar à não detecção deste composto



durante a análise. Contudo, a ausência do pico de fusão de um composto encapsulado é um indicativo da sua eficiente encapsulação, pois sugere a formação de uma solução sólida amorfa (ROCHA et al., 2014). Soma-se a essa evidência o fato de o pico de fusão do encapsulante P407 nas nanopartículas ter se deslocado em relação ao seu termograma puro.

No espectro de absorção de FTIR do P407 foi possível identificar uma banda de absorção bem definida em 2891 cm^{-1} referente ao grupo C-H alifático e as bandas presentes em 1343 cm^{-1} e 1111 cm^{-1} confirmaram a presença de ligações C-O característicos de grupamento éter (VYAS et al., 2009). Para a naringenina, os picos relativos ao grupamento OH podem ser encontrados em cerca de 3000 cm^{-1} , e para o grupamento C=O em 1897 cm^{-1} e cerca de 1636 cm^{-1} .

Em relação aos espectros de UV-Vis, é importante notar que o encapsulante P407 não apresenta absorção na faixa de UV-Vis avaliada, indicando que mudanças nos espectros não podem ser devido a sua simples presença na solução. É possível observar que houve um aumento do fator de interação entre o encapsulante e a naringenina, o que corrobora os resultados de calorimetria e de FTIR. Houve também o deslocamento do pico máximo de absorção em torno de 230 nm, o que em geral se deve à interação entre grupos funcionais do analito em questão (naringenina).

4 CONCLUSÃO

Naringenina foi encapsulada utilizando a técnica de dispersão sólida e utilizando um encapsulante biocompatível (Poloxamer 407). A caracterização físico-química por análise térmica (Calorimetria Diferencial de Varredura) e espectroscópica (Espectroscopia no Infravermelho) demonstraram que houve encapsulação do composto. As análises por Espectroscopia no Ultravioleta-Visível demonstraram haver interação química entre o encapsulante e a naringenina, evidenciada pelo aumento da absorbância da naringenina e também pelo deslocamento do pico máximo de absorção em torno de 230 nm. Os resultados encorajam a continuação das pesquisas no sentido de formular alimentos contendo a naringenina encapsulada.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ pelo apoio financeiro e pela disponibilização da bolsa de estudos. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os autores agradecem ao CAMulti-CM pela realização das análises.

REFERÊNCIAS

- AKBARZADEH, Z.; PARVARESH, F.; ... The effects of Naringenin on some human breast cancer cells: A systematic review. **Archives of Breast ...**, v. 3, n. 2, p. 34–40, 2016.
- BRONNER, W. E.; BEECHER, G. R. Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. **Journal of Chromatography A**, v. 705, n. 2, p. 247–256, jun. 1995.
- BUDEL, R. G. et al. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Toxicological evaluation of naringin-loaded nanocapsules in vitro and in vivo. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 188, n. December 2019, p. 110754, 2020.
- ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutrition Research**, v. 24, n. 10, p. 851–874, 2004.



FAKHARI, A.; CORCORAN, M.; SCHWARZ, A. Thermogelling properties of purified poloxamer 407. **Heliyon**, v. 3, n. 8, p. e00390, 2017.

FLAMBÓ, D. F. A. L. P. Atividades biológicas dos flavonoides: atividade antimicrobiana. **Universidade Fernando Pessoa - Faculdade de Ciências da Saúde. Tese de Mestrado.**, p. 1–43, 2013.

GRATIERI, T. et al. A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 2, p. 186–193, 2010.

GRATIERI, T. et al. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin-complexed naringenin by solvent change precipitation for improving anti-inflammatory effect in vivo. **Carbohydrate Polymers**, v. 231, n. December 2019, p. 115769, 2020.

HELENO, S. A. et al. Laboratory of Separation and Reaction Engineering – Laboratory of Catalysis and Materials Post-Graduation Program of Food Technology (PPGTA), Federal University of Technology Chemical and Food Engineering Department , Federal University of Santa Catarina. **Food Chemistry**, 2018.

HURLEY, D. et al. The effect of cooling on the degree of crystallinity, solid-state properties, and dissolution rate of multi-component hot-melt extruded solid dispersions. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 3, 2020.

KERDUDO, A. et al. Encapsulation of rutin and naringenin in multilamellar vesicles for optimum antioxidant activity. **FOOD CHEMISTRY**, v. 159, p. 12–19, 2014.

LI, P. et al. Six months chronic toxicological evaluation of naringin in Sprague-Dawley rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 66, p. 65–75, 1 abr. 2014.

MALGARIM, L. et al. Desenvolvimento , Caracterização e Avaliação da Citotoxicidade de Naringina e Naringenina Nanoencapsuladas. v. 1, n. December 2015, 2016.

RAJAMANI, S. et al. Naringenin-Loaded TPGS Polymeric Nanosuspension : In-Vitro and In- Vivo Anti-Inflammatory Activity. v. 30, n. 3, p. 225–232, 2019.

ROCHA, B. et al. Curcumin encapsulated in poly-L-lactic acid improves its anti-inflammatory efficacy in vivo. **Advancement in Medicinal Plant Research**, v. 2, n. 4, p. 62–73, 2014.

SANGPHEAK, W. et al. Physical properties and biological activities of hesperetin and naringenin in complex with methylated p-cyclodextrin. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 11, n. December 2015, p. 2763–2773, 2015.

VYAS, V. et al. Physicochemical characterization of solid dispersion systems of tadalafil with poloxamer 407. **Acta Pharmaceutica**, v. 59, n. 4, p. 453–461, 2009.

ZHANG, P. et al. Preparation and evaluation of naringenin-loaded sulfobutylether- β -cyclodextrin / chitosan nanoparticles for ocular drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 149, p. 224–230, 2016.