

WANESSA DE SOUZA CARDOSO QUINTÃO

**DESENVOLVIMENTO DE FILME À BASE DE QUITOSANA PARA LIBERAÇÃO
TRANSDÉRMICA DE NARINGENINA**

BRASÍLIA, 2022

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

WANESSA DE SOUZA CARDOSO QUINTÃO

**DESENVOLVIMENTO DE FILME À BASE DE QUITOSANA PARA LIBERAÇÃO
TRANSDÉRMICA DE NARINGENINA**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

BRASÍLIA, 2022

WANESSA DE SOUZA CARDOSO QUINTÃO

**DESENVOLVIMENTO DE FILME À BASE DE QUITOSANA PARA LIBERAÇÃO
TRANSDÉRMICA DE NARINGENINA**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

Universidade de Brasília (UnB)

Prof^a. Dr^a. Pérola de Oliveira Magalhães

Universidade de Brasília (UnB)

Prof^a. Dr^a. Stephânia Fleury Taveira

Universidade Federal de Goiás (UFG)

Prof^a Dr^a. Fabiana Testa Moura de Carvalho Vicentini

Universidade de São Paulo (USP)

AGRADECIMENTOS

Começo meus agradecimentos sempre com Deus em primeiro lugar. Graças a Ele eu tive oportunidades que me fizeram aprender lições que jamais esperava, além do privilégio de partilhar uma jornada com tantas pessoas especiais.

Agradeço imensamente a todo o apoio dos meus pais, Fernando Quintão e Kelly Quintão, e da minha família. Meus pais não tiveram tantas oportunidades de estudos, mas sempre me ensinaram que o estudo abre portas, e pelo esforço deles eu pude ter tantos privilégios para escolher seguir a carreira acadêmica. Sou grata também por ter a melhor irmã do mundo, minha migle, Tatyane Quintão, que me acolhe em muitos momentos dramáticos, abre meus olhos quando é necessário e comemora comigo todas as pequenas vitórias.

Ao meu companheiro, meu ombro amigo, meu cúmplice e amor da vida, Thiago Sampaio, agradeço por ser minha fonte de paz em tempos difíceis, por ser um motivo incrível de inspiração, de dedicação e de orgulho. Agradeço também por estar sempre de prontidão para me auxiliar a compreender um pouco mais da Química e do uso de equipamentos analíticos, o que me ajudou muito a desenvolver esse trabalho. E obrigada por me aturar em dias estressantes, por me oferecer calma no seu abraço, por me incentivar e impulsionar a melhorar cada dia um pouco mais.

Agradeço às minhas amigas Priscila Matos, Rafaella Chaves, Iara Farnesi, Bianca Portuguese, Thiene Meneses, Regina Almeida, Camila Rodrigues e a todos os respectivos companheiros, pelo incentivo e apoio nesse caminho, pela compreensão nos momentos de cansaço físico e mental. Obrigada por serem uma família pra mim.

Aos meus amigos e aos parceiros de trabalhos e de vida, amizades dessa convivência LTMAC. Breno Noronha, Jéssika Rocha, Ana Clara Brathwaite, Ana Luiza Lima, Seila Tolentino, Camila Cardoso, Paula Martins, Ludmila Alvin, Geisa Barbalho, Felipe Pires, agradeço demais a vocês por toda a companhia, pela ajuda, pelos ombros amigos, pelas risadas e pela convivência sempre leve e descontraída. Ao meu amigo, irmão de coração, Ricardo Nunes, dizer somente obrigada não é suficiente para agradecer por tudo o que já fez por mim, por sempre me acolher e estar ao meu lado, pelas conversas, pelo divertimento infinito, pelos puxões de orelha e por todo o apoio.

Às professoras Dra. Líva Sá-Barreto e Dra. Izabel Silva, por participarem dessa jornada acadêmica, pelos ensinamentos e auxílio.

Ao meu orientador, Dr. Guilherme Gelfuso, por me acolher tão bem desde a primeira conversa, lá em 2013. Obrigada pelas oportunidades, pelas broncas, por estar sempre disponível, pela paciência em explicar até os mínimos detalhes. Foram anos de muito aprendizado e crescimento, pessoal e profissional. Eu me lembro das tantas vezes que fez questão que eu sáísse das reuniões entendendo muito bem o que conversávamos. Muitas vezes eu levava em mãos desenhos muito explicativos, orientações claras que me incentivavam a trabalhar da melhor forma possível. Espero ter demonstrado meu comprometimento com tudo o que me propôs a desenvolver, como forma de honrar e de agradecer pelas portas que abriu pra mim.

Ao professor Dr. Paulo Eduardo de Souza e à professora Dra. Fabiane Hiratsuka e pela disponibilidade e colaboração. Agradeço também ao professor Dr. Leandro Hilgert, pelo auxílio e disposição. Dedico ainda meus agradecimentos aos técnicos do laboratório da UnB-FCE, pelo auxílio durante o trabalho, em especial à Luma de Lira, por ser sempre muito solícita e por alegrar os dias de trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Hematologia e Células-Tronco (LHCT) – FS/UnB, especialmente ao professor Dr. Felipe Saldanha de Araújo e à Amandda Évelin, pela disposição e colaboração especial em uma área desafiadora pra mim, que me ofereceu resultados melhores que o esperado.

Por fim, sou muito grata pelo auxílio financeiro concedido pela CAPES, imprescindível para o desenvolvimento de toda a pesquisa.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Naringenina é um bioflavonoide encontrado principalmente em frutas cítricas, como *Citrus aurantium* L. Possui muitos benefícios farmacológicos, incluindo antiaterogênico, anti-inflamatório e anticancerígeno, mas uma baixa biodisponibilidade por via oral. Considerando a possibilidade de um efeito anti-inflamatório sistêmico por via transdérmica, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um filme transdérmico de quitosana contendo naringenina e avaliar a permeação cutânea do flavonoide a partir dele. Um método de CLAE simples, preciso e seletivo para determinação de naringenina em formulação e em estudos *in vitro* foi desenvolvido e validado. Em ensaios com células mononucleares, a naringenina induziu um aumento em dois marcadores anti-inflamatórios (IL-10 e TGF- β 1) a 10 μ g/mL. Além disso, também foi capaz de reduzir a proliferação de linfócitos T e a expressão de IL-1 β , que tem papel pró-inflamatório. Após verificação da compatibilidade da naringenina com a quitosana por meio de ensaios de análise térmica, foram preparados filmes de quitosana em solução ácida. Em seguida, a naringenina (0,5% p/p) foi incorporada em solução do polímero, que foi submetida ao processo de secagem por 12 h a 60 °C. Os filmes foram caracterizados e a estabilidade avaliada ao longo de 90 dias. Assim, um filme de quitosana flexível e espesso (0,04 μ m) contendo naringenina foi desenvolvido, e demonstrou homogeneidade nos ensaios de teor, além de força de ruptura de $8,81 \pm 0,18$ N. Considerando o teor, o filme permaneceu estável por 30 dias. A liberação *in vitro* de naringenina foi progressiva e seguiu os modelos cinéticos de primeira ordem ($R^2=0,97$) e de Korsmeyer-Peppas ($R^2=0,91$). Quando aplicado topicamente, o filme de quitosana estimulou uma difusão constante e contínua de naringenina através da pele, durante as 72 h. O fluxo de permeação foi de $0,3 \pm 0,01$ μ g/cm²/h, que corresponde a uma concentração permeada 14 vezes ($p<0,05$) maior que a obtida com a solução utilizada como controle. Portanto, os filmes de quitosana contendo naringenina demonstraram características físicas e organolépticas adequadas para uso dérmico, e foram capazes de aumentar a absorção da naringenina através da pele. Assim, o filme desenvolvido deve ser uma alternativa promissora para o tratamento prolongado de condições inflamatórias pela via transdérmica.

Palavras-chave: naringenina, filme de quitosana, transdérmico, anti-inflamatório.

ABSTRACT

Naringenin is a bioflavonoid found primarily in citrus fruits such as *Citrus aurantium* L. It has many pharmacological benefits, including anti-atherogenic, anti-inflammatory, and anti-cancer, but low oral bioavailability. Considering the possibility of a systemic anti-inflammatory effect via the transdermal route, the aim of this work was to develop a transdermal film of chitosan containing naringenin and to evaluate the cutaneous permeation of the drug from it. A simple, accurate and selective HPLC method for determination of naringenin in formulation and in in vitro studies was developed and validated. In mononuclear cell assays, naringenin induced an increase in two anti-inflammatory markers (IL-10 and TGF- β 1) from 1,0 μ g/mL. In addition, it could reduce the expression of IL-1 β and the proliferation of T lymphocytes, which has a pro-inflammatory role. After verifying the compatibility of naringenin with chitosan by means of thermal analysis tests, DD \geq 75% chitosan films were prepared in acidic solution. Then, naringenin (0.5% w/w) was incorporated into the polymer solution, which was subjected to a drying process for 12 h at 60 °C. The films were characterized and the stability evaluated over 90 days. Thus, a flexible and thick chitosan film (0.04 μ m) containing naringenin was developed, which demonstrated adequate homogeneity in the content tests, in addition to a rupture strength of 8.81 ± 0.18 N. Considering the content, the film remained stable for 30 days. Naringenin was progressively released to the physiological media following both first order ($R^2 = 0.97$) and Korsmeyer-Peppas ($R^2 = 0.91$) kinetics. When topically applied, the chitosan film could stimulate a constant and continuous diffusion of drug across the skin over 72 h. Indeed, the permeation flux of naringenin was 0.30 ± 0.01 μ g/cm²/h, which means a concentration in the receptor solution 14-fold ($p < 0.05$) higher than that provided by the drug solution used as a control. Therefore, the chitosan films containing naringenin demonstrated physical and organoleptic characteristics suitable for dermal use and could increase the phytochemical absorption through the skin. Thus, the developed film should be a promising alternative for the treatment of inflammatory conditions for prolonged periods by the transdermal route.

Keywords: naringenin, chitosan film, transdermal, anti-inflammatory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado da teoria básica de ação dos antioxidantes.	7
Figura 2. Estrutura química básica química dos flavonoides.....	9
Figura 3. Estrutura química básica de diferentes flavonoides.	10
Figura 4. Estruturas moleculares da naringenina e da naringina.....	12
Figura 5. Diagrama esquemático da suposta regulação da linfopietina estromal do timo (TSLP) pela naringenina, em mastócitos.	13
Figura 6. Camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme.	16
Figura 7. Camadas da epiderme..	17
Figura 8. Estruturas das camadas da pele e rotas de penetração de substâncias: (a) intercelular; (b) transcelular e (c) via anexos, como folículo piloso e glândulas sebácea e sudorípara.	19
Figura 9. Aparência do sistema de aplicação de substâncias por filme: (A) Filme aplicado no antebraço; (B) Fácil remoção do filme não pegajoso, flexível, sem resíduos.....	21
Figura 10. Estruturas químicas da quitina e quitosana.....	22
Figura 11. Preparação da pele de orelha de suínos para estudos de recuperação e permeação: (A) Retirada da pele da orelha, com bisturi; (B) pele inteira; (C) Pele fixada em placa de isopor, com alfinetes, dermatômetro; (D) Pele dermatomizada.	27
Figura 12. Filme acondicionado em filme plástico e sachê aluminizado.	40
Figura 13. Célula de difusão do tipo Franz modificada, com filme entre os compartimentos doador e receptor.	41
Figura 14. Cromatograma representativo de naringenina a 4 µg/mL dissolvida em metanol, com tempo de retenção da naringenina em 7,2 min.....	49
Figura 15. Cromatogramas representativos de naringenina: (A) Sobreposição dos cromatogramas de naringenina a 4,0 µg/mL, Brancos - extratos de estrato córneo e de pele de orelha suína, em metanol; (B) Naringenina com extrato metanólico de estrato córneo; (C) Naringenina com extrato metanólico de pele..	50
Figura 16. Cromatogramas (CLAE) referentes à injeções de soluções de: (I) Branco - Metanol grau HPLC; (II) Naringenina a 4,0 µg/mL, em metanol; (III) Branco tampão - Pluronic® F127 2,5% (p/v) em tampão fosfato (pH 7,4); (IV) Naringenina em solução de	

Pluronic® F127 2,5% (p/v) em tampão fosfato (pH 7,4); (V) Solução em metanol 1:5 (v/v) preparada a partir de filme de quitosana diluído em ácido acético e água 1:1 (v/v) na proporção 1:5 (p/v); (VI) Naringenina em filme de quitosana diluído na solução preparada em (V)..	51
Figura 17. Cromatogramas (CLAE) referentes à injeções de soluções de: (A) Naringenina a 4,0 µg/mL; (B) Naringenina a 4,0 µg/mL diluída em peróxido de hidrogênio 25% (v/v); (C) Naringenina a 4,0 µg/mL após hidrólise ácida com HCl 1 mol/L; (D) Naringenina a 4,0 µg/mL após hidrólise básica com NaOH 1 mol/L.....	52
Figura 18. Representação gráfica da correspondência entre as curvas analíticas obtidas por CLAE, para naringenina.	54
Figura 19. Avaliação da proliferação de células T em células mononucleares de sangue periférico, estimuladas por 72 h com diferentes concentrações de naringenina.	60
Figura 20. Efeito da naringenina na expressão de citocinas em células mononucleares de sangue periférico, após 72 h: IL-10, TGF-1β e IL-1β.....	62
Figura 21. Análises de DSC de antes do tratamento térmico: I, III e V; após tratamento térmico: III, IV e VI.....	64
Figura 22. Primeira derivada de análise termogravimétrica (DrTG) da naringenina, da quitosana e da mistura física preparada com os dois compostos 1:1.	66
Figura 23. Filmes de quitosana >75% DD contendo naringenina (0,5% p/p)..	71
Figura 24. Filmes de quitosana >75% DD C, D e E, contendo naringenina (0,5% p/p)..	73
Figura 25. Avaliação do teor de naringenina contida nos filmes de quitosana ao longo do período do estudo de estabilidade acelerada (90 dias).....	75
Figura 26. Fotos de filmes à base de quitosana, preparados com 0,5% (p/p) de naringenina, ao longo de 90 dias de armazenamento.....	77
Figura 27. Fotos de filmes à base de quitosana, preparados sem naringenina, antes e após 90 dias de armazenamento em três condições de temperatura: refrigeração (4 °C ± 2 °C), ambiente (25 °C ± 2 °C) e câmara climática (40 °C ± 2 °C).	78
Figura 28. Perfil de liberação (72 h) da naringenina a 0,5% (p/p) do filme de quitosana >75% DD, em solução tampão fosfato 0,01 mol/L (pH 7,4) com 2,5% (p/v) de Pluronic® F127.....	82

- Figura 29.** Análise de correlação por cinética de liberação de naringenina com aplicação nos modelos de primeira ordem, Kormeyer-Peppas, Higuchi e Hixson..84
- Figura 30.** Perfil de permeação (72 h) da naringenina a 0,5% (p/p) do filme de quitosana >75% DD, e da Solução Controle.85
- Figura 31.** Naringenina quantificada na solução receptora, na recuperação do estrato córneo e da pele remanescente, após estudos de permeação de 72 horas com (A) Filme à base de quitosana e (B) Solução de naringenina (1 mg/mL) preparada na solução do meio receptor..87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Desenho fatorial para análise de robustez do método desenvolvido para quantificação da naringenina.....	33
Tabela 2. Amostras preparadas para análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG).....	36
Tabela 3. Componentes da formulação dos filmes de quitosana contendo naringenina.	38
Tabela 4. Modelos matemáticos aplicados ao estudo cinético de liberação de naringenina do filme.....	43
Tabela 5. Métodos analíticos publicados para determinação de naringenina em diferentes matrizes utilizando cromatografia.....	47
Tabela 6. Condições analíticas da metodologia proposta para quantificar naringenina nas formulações e em após experimentos <i>in vitro</i> de liberação e de permeação cutânea em comparação a uma metodologia previamente validada.	48
Tabela 7. Teor de naringenina obtido após preparo de soluções a 4,0 µg/mL, por CLAE.	52
Tabela 8. Análise da precisão e da exatidão intracorrida e intercorrida do método de quantificação para a naringenina diluída em metanol.	56
Tabela 9. Demonstração experimental dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método cromatográfico para análise de naringenina.....	57
Tabela 10. Porcentagem de recuperação de naringenina do estrato córneo e da pele dermatomizada, utilizando metanol como solvente extrator.....	58
Tabela 11. Resumo estatístico da análise do desenho fatorial (2 ³) para análise de robustez do método de quantificação da naringenina.	59
Tabela 12. Doseamento de naringenina por CLAE, antes e após o tratamento térmico, a 60° por 12 horas. Concentração teórica a 4,0 (µg/mL).....	67
Tabela 13. Formulações testadas durante o desenvolvimento dos filmes de quitosana contendo naringenina.....	69
Tabela 15. Caracterização dos filmes quanto à espessura e teor de naringenina.....	72

Tabela 16. Capacidade de hidratação (%) dos filmes de quitosana, contendo naringenina.	72
Tabela 17. Solubilidade de Naringenina (mg/mL) em diferentes solventes e meios testados.....	80
Tabela 19. Modelos cinéticos aplicados para o perfil de liberação da naringenina a partir do filme de quitosana e respectivos coeficientes de correlação obtidos para as curvas.	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IFA	Insumo Farmacêutico
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMSPs	Células mononucleares de sangue periférico
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EC	Etrato córneo
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EtOH	Etanol
G6PD	Glicose-6-fosfato-desidrogenase
GSH-Px	Glutaciona peroxidase
GSR	Glutaciona redutase
GST	Glutaciona S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HOCl	Ácido hipocloroso
IL	Interleucina
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
MeOH	Metanol
NaOH	Hidróxido de Sódio
NAR	Naringenina
NF- κ B	Fator Nuclear kappa Beta
NO	Óxido nítrico
Nrf2	Fator nuclear derivado de eritoide 2
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH	Radical hidroxil
PPG	Propilenoglicol
-SH	Grupo sulfidril
SOD	Superóxido dismutase
TG	Termogravimetria
TNF- α	Fator de necrose tumoral
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo geral	4
2.2. Objetivos específicos	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1. Atividade antioxidante e inflamação	5
3.2. Flavonoides e naringenina	8
3.3. Pele: composição, estrutura e função	15
3.4. Via de administração transdérmica	18
3.5. Sistemas transdérmicos	20
3.6. Filmes de quitosana	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. Material	26
4.2. Obtenção de pele de orelha de suínos	26
4.3. Desenvolvimento e validação de método analítico	27
4.3.1. Seletividade	28
4.3.2. Linearidade	29
4.3.3. Precisão e exatidão	30
4.3.4. Estudos de recuperação da naringenina da pele	31
4.3.5. Limite de detecção e quantificação	32
4.3.6. Robustez	32
4.4. Avaliação <i>in vitro</i> do potencial anti-inflamatório da naringenina	33
4.4.1. Isolamento das células mononucleares de sangue periférico (CMSPs)	33

4.4.2. Marcação das CMSPs com carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE).....	34
4.4.3. Ensaio de proliferação de linfócitos T	34
4.4.4. Extração de RNA e transcrição do cDNA	35
4.4.5. PCR em tempo real	36
4.5. Análise de compatibilidade entre naringenina e quitosana	36
4.6. Desenvolvimento dos filmes de quitosana	37
4.7. Caracterização dos filmes de quitosana	38
4.7.1. Espessura.....	38
4.7.2. Propriedades mecânicas	38
4.7.3. Capacidade de hidratação (absorção de água)	39
4.7.4. Teor de naringenina dos filmes e homogeneidade	39
4.8. Estudos de estabilidade acelerada dos filmes de quitosana contendo naringenina.....	39
4.9. Solubilidade da naringenina	40
4.10. Ensaio <i>in vitro</i> de liberação	41
4.11. Estudos <i>in vitro</i> de permeação e retenção cutânea	43
4.12. Análise Estatística	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1. Padronização e validação do método analítico	46
5.1.1. Seletividade	49
5.1.2. Linearidade	54
5.1.3. Precisão e exatidão	55
5.1.4. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	56
5.1.5. Estudos de recuperação da naringenina da pele.....	57
5.1.6. Robustez.....	58

5.2.	Avaliação <i>in vitro</i> do potencial anti-inflamatório da naringenina.....	60
5.3.	Análise de compatibilidade IFA/excipiente	63
5.4.	Desenvolvimento de filmes à base de quitosana	67
5.5.	Caracterização dos filmes	70
5.5.1.	Características organolépticas após 15 dias de acondicionamento .	73
5.6.	Estudos de estabilidade química dos filmes de quitosana contendo naringenina.....	75
5.6.1.	Solubilidade da naringenina.....	80
5.6.2.	Estudos de liberação <i>in vitro</i>	82
5.6.3.	Estudos de permeação cutânea <i>in vitro</i>	85
6.	CONCLUSÃO.....	89
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

1. INTRODUÇÃO

Naringenina é um bioflavonoide encontrado principalmente em frutas cítricas, tais como *Citrus aurantium* L. e *Solanum lycopersicum* L. Sua ação antioxidante tem demonstrado contribuir no tratamento de diversas doenças de origem inflamatória, muitas vezes associadas a um processo de estresse oxidativo, desequilíbrio caracterizado pela grande quantidade de radicais livres presentes no organismo (1). Na literatura, o emprego terapêutico desse composto mostra-se vantajoso pelo potencial anti-inflamatório e imunomodulador (2–4), neuroprotetor (5), antitumoral (6), além de ter demonstrado atuar em doenças metabólicas (3,7) e até no controle de replicação viral (8).

Apesar do grande potencial terapêutico da naringenina, as aplicações clínicas são limitadas devido à baixa solubilidade em água ($46,0 \pm 6,0 \mu\text{g/mL}$), em que a dissolução do flavonoide pode ser a etapa limitante de sua absorção (9). De acordo com estudos de farmacocinética, a biodisponibilidade oral da naringenina é baixa, de aproximadamente ~5,81% (10). 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 (11).

Alguns sistemas farmacêuticos já foram desenvolvidos com esse insumo farmacêutico ativo (IFA), tais como nanopartículas de quitosana e alginato de sódio (12) e solução (11) para serem administradas pela via oral e endovenosa em ratos (25 mg/kg). Entretanto, essas apresentações não sanam os problemas relacionados à baixa biodisponibilidade oral, ou utilizam de uma via de administração injetável, que requer profissionais treinados e uma técnica correta para administração. Isso dificulta o uso em tratamentos de doenças inflamatórias diversas de natureza crônica. Nesse sentido, a administração pela via cutânea por meio de um sistema transdérmico poderia aperfeiçoar o uso desse IFA na terapêutica, aumentando biodisponibilidade e aceitabilidade do tratamento pelo paciente (13).

A administração de fármacos pela via transdérmica apresenta inúmeras vantagens. É uma administração indolor, muito aceita pelos pacientes, em que o fármaco não sofre metabolismo de primeira passagem, o que acarreta maior biodisponibilidade e menor toxicidade, uma vez que menores doses são necessárias para se atingir o efeito

terapêutico. Além disso, a terapia pode ser interrompida a qualquer momento pela simples retirada do sistema do contato da pele em caso de intolerância ao medicamento. Ainda, melhora a adesão ao tratamento para um período de ação prolongada, tendo em vista a simplicidade de aplicação e redução de efeitos indesejáveis (14).

Apesar das inúmeras vantagens da via transdérmica, a aplicação de sistemas eficazes requer incorporação de substâncias em formas farmacêuticas que promovam: segurança do tratamento proposto, assegurando também a estabilidade da formulação; facilidade de aplicação; e permeação através da pele em concentrações adequadas do IFA, dentro da faixa terapêutica, garantindo assim a efetividade do tratamento (15).

Para que a aplicação pela via transdérmica seja eficiente, é necessário considerar os fatores que afetam a absorção de fármacos pela, tais como a espessura, grau de hidratação, folículos pilosos e integridade do estrato córneo. Além disso, a natureza e a concentração dos ingredientes ativos influenciam o processo de permeação cutânea, de modo que as características do sistema devem garantir a penetração através do estrato córneo e a interação com as camadas mais internas da pele, quando se deseja uma ação sistêmica (16).

Considerando os critérios para se obter sistemas eficientes, estratégias têm sido desenvolvidas com o uso de métodos físicos e químicos, norteados no desenvolvimento de dispositivos transdérmicos, as quais devem apresentar propriedades físico-químicas e parâmetros farmacotécnicos adequados para o uso cutâneo. Uma das formas farmacêuticas alvo de estudos com diferentes tipos de fármacos (17–19) consiste em filmes à base de polímeros, como a quitosana.

A quitosana é o segundo polímero mais abundante na natureza, depois da celulose. Esse biopolímero é obtido a partir da desacetilação da quitina, presente no exoesqueleto de crustáceos, e apresenta propriedades atóxicas, biocompatíveis, bioadesivas, além de ser de baixo custo (20). Em razão disso, a quitosana já é muito utilizada para o desenvolvimento de micro e nanopartículas poliméricas com fármacos lipossolúveis e hidrossolúveis (21), além de hidrogeis (22) e filmes (17).

O emprego da quitosana para a obtenção de filmes transdérmicos é especialmente interessante, tendo em vista que esse polímero tem demonstrado atuar como promotor de permeação cutânea de substâncias (23). Dessa forma, espera-se que a incorporação

da naringenina em biofilmes preparados com o polímero quitosana garantam uma liberação adequada do flavonoide pela via transdérmica, atingindo concentrações terapêuticas dentro da faixa efetiva.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi desenvolver um filme de liberação transdérmica à base de quitosana e contendo naringenina para ser empregado como alternativa terapêutica em casos de doenças inflamatórias crônicas.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e validar um método analítico para a quantificação de naringenina em estudos *in vitro* de permeação cutânea e nas formulações de quitosana;
- Analisar a estabilidade térmica da naringenina com a quitosana;
- Avaliar a capacidade anti-inflamatória da naringenina *in vitro* em células mononucleares;
- Desenvolver filmes de quitosana contendo naringenina;
- Caracterizar os filmes de quitosana;
- Avaliar a estabilidade do filme de quitosana selecionado contendo naringenina;
- Verificar a solubilidade da naringenina em diferentes meios;
- Avaliar *in vitro* a liberação de naringenina a partir do filme de quitosana;
- Avaliar *in vitro* a permeação cutânea de naringenina a partir do filme de quitosana.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Atividade antioxidante e inflamação

A inflamação é um mecanismo de resposta natural de reparação e defesa contra danos, sejam eles causados por lesões celulares e teciduais, por exemplo, sejam por agentes externos, como patógenos (1). Muitas doenças crônicas inflamatórias estão ligadas a uma maior produção de radicais livres e resultam em estresse oxidativo e oxidações proteicas, produtos glicados e peroxidação lipídica.

As células apresentam um sistema de defesa antioxidante capaz de regular a eliminação das espécies reativas, o que contribui para homeostase. Nesse sentido, a produção desses compostos em excesso e/ou a deficiência no sistema de defesa antioxidante pode ser prejudicial. Os radicais livres produzidos podem atacar as membranas celulares ou as lipoproteínas, por exemplo, iniciando um processo de peroxidação lipídica, que faz parte do desenvolvimento da aterosclerose (24).

Apesar de todas as defesas antioxidantes, o aumento da formação de radicais livres limita a ação dos sistemas de controle. Inúmeros fatores podem exacerbar a produção e ação de radicais livres, desencadeando o chamado estresse oxidativo. Entre esses, destacam-se o excesso de exposição a fontes de compostos oxidantes como poluição, radiação ultravioleta (UV), álcool, pesticidas, metais, substâncias químicas diversas, estresse, consumo excessivo de produtos industrializados, privação de sono e uma dificuldade metabólica em produzir compostos antioxidantes (fatores genéticos, consequências de estilo de vida prejudicial) (25).

O estresse oxidativo corresponde a um desequilíbrio entre a geração de radicais livres e o sistema de defesa contra esses átomos e/ou moléculas (26). Isso porque a geração excessiva de radicais livres nas mitocôndrias depleta as enzimas antioxidantes endógenas e esgota os sistemas de defesa. Esses processos desencadeiam a resposta inflamatória, com atuação de macrófagos, leucócitos e citocinas - interleucinas 1, 6 e 8 (IL-1, IL-6 e IL-8, respectivamente), fator de necrose tumoral (TNF α), prostaglandinas (sintetizadas pelas enzimas ciclooxigenases – COX) e leucotrienos (27). O aumento dos níveis desses agentes contribui para progressão de complicações de caráter inflamatório,

como doenças cardiovasculares, retinopatias e nefropatias (26). Além disso, o risco para a carcinogênese também se eleva (1). Além disso, induz inflamação, lesão e morte celular, comprometendo a função de hepatócitos e inúmeras células no metabolismo (28).

O comprometimento de funções celulares está diretamente relacionado ao início de processos inflamatórios, onde há acometimento das células saudáveis. Nesse sentido, o estresse oxidativo pode ser causa ou consequência de um dano tecidual. Os efeitos culminam no início e progressão de patologias como diabetes, câncer, envelhecimento precoce, doenças autoimunes, hepáticas, neurodegenerativas e cardiovasculares (29).

Em um processo inflamatório crônico, os mecanismos de defesa como ativação de macrófagos e liberação de mediadores inflamatórios continuam acontecendo, o que pode levar a danos irreversíveis às células e tecidos, e até à morte. Esses eventos podem ser observados em diabetes, doenças cardiovasculares e doenças autoimunes (1).

Desse modo, considerando que em um processo de estresse oxidativo não há eficácia completa nas defesas antioxidantes intra e extracelulares, o uso de compostos antioxidantes pode ser benéfico no controle de danos causados por radicais livres (1,30).

Os antioxidantes são substâncias sintéticas ou naturais capazes de promover remoção ou inativação de radicais livres. A atividade antioxidante relaciona-se com a capacidade que compostos apresentam de doar átomos de hidrogênio e elétrons às espécies reativas, e de participar dos sistemas de defesa antioxidantes (Figura 1). Dessa forma, compostos antioxidantes atuam neutralizando os radicais livres. Esses compostos também podem fazer complexação com metais, agindo como agentes quelantes (31).

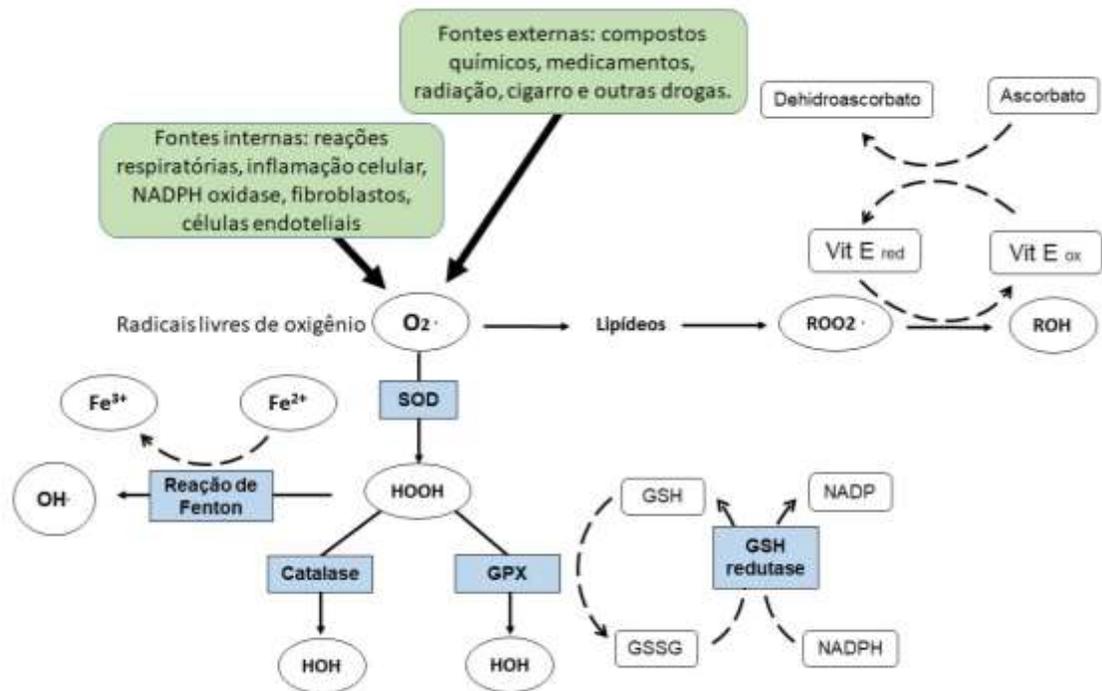


Figura 1. Esquema simplificado da teoria básica de ação dos antioxidantes. O O_2 pode ser produzido por várias reações dentro da célula. As ERO's podem ser convertidas em peróxidos lipídicos HOOH ou LOO, que por sua vez, causam danos celulares. Antioxidantes como vitamina E e enzimas antioxidantes, como SOD, catalase ou GPX são capazes de reagir diretamente, reduzindo os oxidantes. Outros cofatores, como GSH, ascorbato, NADPH e enzimas, como GSH redutase são importantes para regenerar moléculas/enzimas redutoras. O_2 - ânion superóxido; HOOH peróxido de hidrogênio; - EROs - espécies reativas de oxigênio; LOO – peróxidos lipídicos; SOD - superóxido dismutase; GPX - glutathiona peroxidase; GSH – glutathiona; NADPH - fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida; NADP - Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina; OH – radical hidroxila; HOH – molécula de água; Red – reduzida; Ox – oxidada; GSSG – Dissulfeto de glutathiona, forma oxidada da glutathiona. Fonte: Adaptado de Finley *et al.* (2011).

Biomoléculas com ação antioxidante têm propriedades anti-inflamatórias e podem ativar o fator nuclear derivado de eritroide 2 (Nrf2). Esse fator de transcrição tem um papel fundamental no aumento da capacidade antioxidante celular e na redução da inflamação (33,34).

Em nível celular, os antioxidantes funcionam como indutores ou sinalizadores, podendo causar alterações na expressão gênica, que resultam na ativação de enzimas responsáveis pela eliminação de radicais livres e toxinas. Por esses mecanismos, os compostos podem reduzir a carcinogênese, aumentando a atividade de enzimas protetoras, enzimas do processo de destoxificação de fase I (biotransformação) e,

especialmente, a atividade de enzimas detoxificantes de fase II (conjugação), como a glutathione S-transferase (GST) (35).

O potencial antioxidante dos compostos pode variar de acordo com a estrutura química, o tamanho da molécula, a solubilidade, o grau de glicosilação/acilação e grau de conjugação. Além disso, a concentração na fonte vegetal, o processo de absorção e de metabolismo também são fatores que impactam na capacidade antioxidante (36).

Considerando que a exposição a diversos fatores externos que contribuem para o estresse oxidativo é quase inevitável, o uso de compostos antioxidantes torna-se fundamental para remoção das espécies reativas de oxigênio (37). Nesse sentido, é importante conhecer alimentos fontes de antioxidantes, bem como caracterizar esses compostos e prover diferentes formas de incluí-los no cotidiano.

Entre os antioxidantes de origem natural, os compostos fenólicos ou polifenóis são os mais abundantes e que apresentam maior capacidade antioxidante. Esses compostos são utilizados nas indústrias de alimentos para reduzir a oxidação e assegurar a qualidade sensorial e nutricional (36). Antioxidantes também são foco de interesse das indústrias farmacêuticas e indústrias de cosméticos, no desenvolvimento de produtos de menor toxicidade, com eficácia terapêutica e que também possibilitem maior sustentabilidade na produção (38).

3.2. Flavonoides e naringenina

Entre os compostos fenólicos, um grande grupo de metabólitos secundários de plantas amplamente encontrados em várias espécies são os flavonoides. São compostos que geralmente se apresentam como derivados glicosilados, responsáveis por prover às plantas uma maior resistência a condições adversas e defesa contra herbívoros e patógenos (28). Estão presentes em muitos alimentos e atuam como compostos antioxidantes no organismo humano, trazendo inúmeros benefícios, como inibição da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e redução de riscos de doenças cardiovasculares (39).

O termo flavonoide deriva da palavra em latim "*flavus*", que significa amarelo. Apresentam uma estrutura química geral composta de um núcleo flavan, que consiste

em dois anéis aromáticos com seis átomos de carbono cada, interligados geralmente por um heterociclo contendo três átomos de carbono (Figura 2) (8).

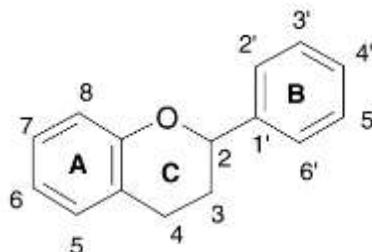


Figura 2. Estrutura química básica dos flavonoides. Fonte: Adaptado de (28).

Há mais de 4000 flavonoides conhecidos, categorizados em grupos, conforme o nível de oxidação e modelo de substituição da cadeia heterocíclica. A biossíntese de flavonoides em plantas deriva da via dos fenilpropanoides, a partir da fenilalanina, tirosina e malonato. As substituições e os diferentes níveis de oxidação na estrutura básica dos flavonoides dão origem às diferentes classes (37).

A partir da substituição do anel C da estrutura básica dos flavonoides (Figura 3), são originados diferentes subgrupos: flavonóis (quercetina, rutina, miricetina, flavonas (luteolina, apigenina, tangeretina), flavanonas (naringenina, hesperetina), catequinas (como epicatequina e galocatequina), flavononóis (aromadendrina), flavanóis, isoflavonas (como genisteína e daidzeína) e antocianidinas (cianidina, perlargonidina) (37,40).

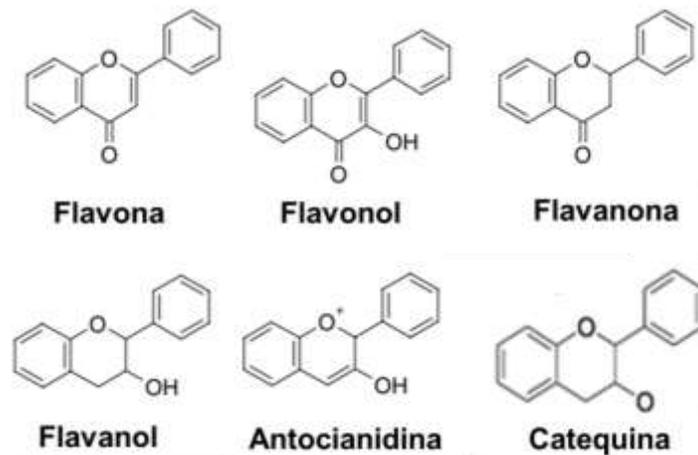


Figura 3. Estrutura química básica de diferentes flavonoides. Fonte: Adaptado de (36).

Os flavonoides são encontrados em diversos alimentos, e apresentam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas, podendo contribuir na prevenção de doenças, no combate ao envelhecimento precoce e na prevenção e/ou no reparo de danos celulares relacionados à ação de radicais livres (28,39). Isso é atribuído à proteção que oferecem ao organismo contra os radicais livres. Esses compostos são amplamente encontrados em frutas (toranja, laranjas), vegetais, nozes, sementes, flores, chás e vinhos (8). Os mais consumidos, disponíveis nos alimentos, são os glicosilados, dos grupos das antocianinas (frutas vermelhas e roxas, berinjela, jabuticaba), flavonas (apigenina - camomila, salsa, hortelã; luteolina – azeite, pimenta, aipo; tangeretina - tangerina), flavanonas (frutas cítricas), flavanois (catequinas – cacau, chá verde, chá preto) e flavonóis (miricetina, quercetina – maçã, cebola) (41).

Os flavonois são o grupo mais abundante de flavonoides, presentes em frutas e vegetais. São representados principalmente por quercetina, kaempferol e miricetina, embora o derivado metilado de quercetina, isoramnetina, seja bem comum. Podem ser encontrados em altas concentrações em morangos (*Fragaria spp.*), figo (*Ficus religiosa*), espinafre (*Spinaceae oleraceae*) e couve-flor (*Brassica oleraceae*) (42).

As flavonas representam um grupo muito semelhante ao grupo dos flavonois, exceto pela ausência de hidroxilação na posição 3 do anel C. Os principais compostos deste grupo são apigenina e luteolina. A distribuição e concentração das flavonas em alimentos não é tão abundante em comparação aos flavonois, mas podem ser

encontradas em aipo (*Apium graveolens*), salsa (*Petroselinum crispum*), e alcachofra (*Cynara scolymus*) (43,44).

As antocianinas, derivadas das antocianidinas, são flavonoides que conferem uma variedade de cores a frutas e flores, principalmente vermelho, azul e roxo. São responsáveis pela proteção das plantas contra a luz e importantes no processo de atração de insetos polinizadores. As antocianinas mais comumente encontradas nos alimentos são derivadas principalmente de seis antocianidinas: cianidina, delphinidina, petunidina, peonidina, pelargonidina e malvidina (45).

A variedade de antocianidinas é atribuída ao número e à posição dos grupos metoxilo e hidroxila no esqueleto básico da antocianidina; à identidade, número e posições nas quais moléculas de glicose se anexam; à extensão da acetilação de glicose e à identidade da acetilação (45). As frutas oxicoco (*cranberry* em inglês, *Vaccinium macrocarpon*), amora (*Rubus* spp.), mirtilo (*Vaccinium corymbosum*), groselha (*Ribes nigrum*), cereja brava (*Prunus avium*), cereja ácida (*Prunus cerasus*), ameixa (*Prunus domestica*), pêssego (*Prunus pérsica*) e romã (*Punica granatum*) são fontes de antocianinas (46).

As flavanonas são encontradas em frutas cítricas nas formas glicídicas, como por exemplo a naringina (naringenina-7-O-neohesperidosideo), presente em toranja (*Citrus paradisi*) e a narirutina (naringenina-7-O-rutinosideo), presente em laranja (*Citrus sinensis*), limão (*Citrus limon*) e lima (*Citrus aurantifolia*) (47). A maior concentração de flavanonas encontra-se nas cascas das frutas cítricas (40). O grupo das flavanonas é representado principalmente por naringenina, hesperetina e eriodictiol, tendo a naringenina destaque pelos efeitos farmacológicos benéficos no controle e manejo de doenças (48).

A naringenina (5,7,4'-trihidroxiflavanona) (Figura 4) é a flavanona mais abundante em frutas cítricas (*Citrus* sp.), sendo encontrada também em uvas (*Citrus paradisi*), em tomates (*Solanum lycopersicum*) frescos e em produtos à base de tomate (49). A ação da naringenina como composto bioativo tem sido atribuída à sua relação estrutural-atividade (50). O número de grupos substituintes hidroxila de naringenina permite doar hidrogênios para os radicais livres, estabilizando a estrutura, e permitindo a eliminação desses radicais. Tanto a naringina quanto a naringenina (forma aglicona da naringina),

possuem atividade antioxidante. Contudo, a naringina é menos potente devido à porção de glicose na estrutura, o que causa impedimento estérico do grupo de eliminação (7).

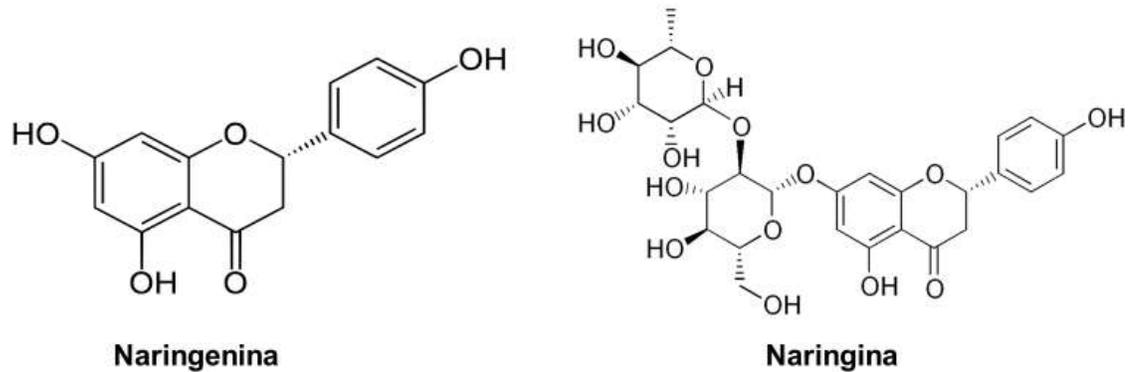


Figura 4. Estruturas moleculares da naringenina e da naringina.

Naringenina tem conhecida atividade antioxidante, que apresenta grande potencial antitumoral e neuroprotetor, atuando também diretamente no controle da resposta inflamatória (51). Evidências crescentes de estudos *in vitro* e *in vivo* reforçam vários efeitos farmacológicos da naringenina, incluindo o potencial anti-aterogênico (52), anti-inflamatório (3), anticâncer (6,53) e imunomodulador (2). Além disso, possui ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (54,55) e antiviral, contra o vírus da hepatite C (por inibição da atividade da protease NS2) e contra o vírus da dengue (8,48). Estudos também ressaltam benefícios da naringenina no manejo de doenças neurológicas (56) e metabólicas (7).

Este flavonoide também pode ser benéfico no tratamento de dermatite atópica, por atuar diretamente na resposta inflamatória (Figura 5) (4,51). Ademais, o uso de naringenina mostrou-se promissor no tratamento de acne relacionada à *Propionibacterium acnes*, por inibir de forma efetiva, a uma baixa concentração (100 a 200 ppm), o crescimento microbiano (57).

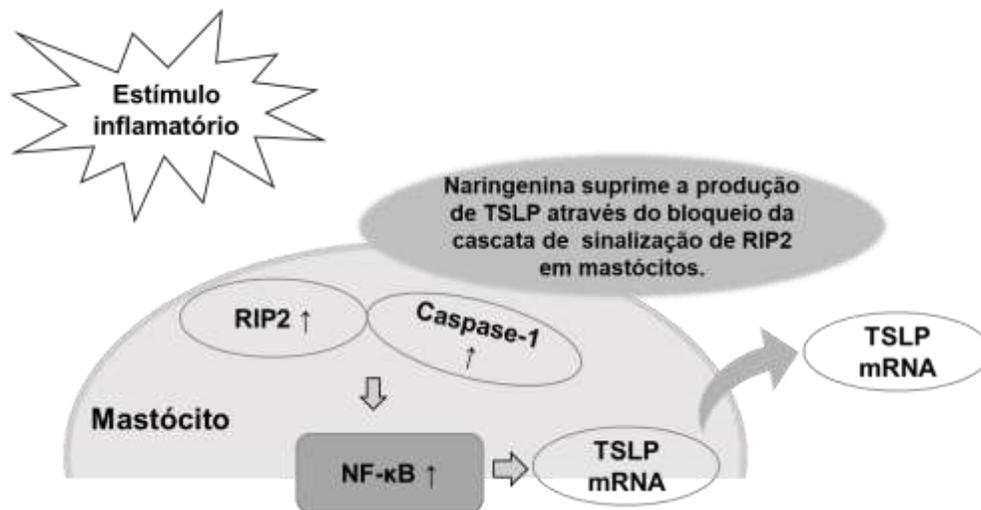


Figura 5. Diagrama esquemático da suposta regulação da linfopietina estromal do timo (TSLP) pela naringenina, em mastócitos. A partir de um estímulo pró-inflamatório, RIP2 e caspase-1 são ativados, e então a caspase-1 ativa NF-κB. O NF-κB ativado induz a expressão de TSLP mRNA, que estimula a produção de TSLP. A naringenina atua reduzindo a produção de TSLP, através do bloqueio da cascata de sinalização de RIP2 e caspase-1. TSLP - linfopietina estromal tímica; RIP2 - proteína de interação ao receptor 2; NF-κB - fator nuclear kappa beta. Adaptado de Moon *et al.* (2011).

A capacidade antioxidante da naringenina e de inúmeros polifenóis tem como resultado o retardo ou a inibição de reações que originam substâncias prejudiciais a nível biológico, como aldeídos, cetonas, álcoois e hidrocarbonetos (31). Nesse contexto, a naringenina também pode atuar como anti-inflamatório, na redução do estresse oxidativo por meio da ativação de Nrf2, gene fundamental no processo de ativação da defesa antioxidante e na manutenção do ciclo celular (58).

Apesar do grande potencial terapêutico, o metabolismo da naringenina ocorre principalmente por mecanismos intestinais e hepáticos. Isso dificulta o alcance do composto à circulação sistêmica e a outros tecidos, em concentrações que possam oferecer benefícios farmacológicos. Esse bioflavonoide tem características que dificultam a biodisponibilidade quando administrada por via oral, com cerca de 15% de absorção no trato gastrointestinal, após a ingestão (48).

Quimicamente, a naringenina possui a fórmula molecular de $C_{15}H_{12}O_5$, tem peso molecular de 272,26 Da e pode ser classificada como uma base fraca, com pKa 7,91. Possui ponto de fusão 251 °C, é praticamente insolúvel em água (0,214 mg/mL) e solúvel em solventes orgânicos, como álcool, com log P = 2,52. Como dito anteriormente, deriva

da hidrólise da forma glicona da flavanona, como naringina ou narirutina, sendo a naringina relativamente solúvel em água (1 mg/mL em água a 40 °C) (24,59).

Nesse contexto, muitos esforços tem sido empregados no intuito de melhorar a solubilidade e estabilidade por técnicas como a complexação com fosfolipídios, complexo de inclusão com β -ciclodextrinas, técnicas de condensação enzimática ou nanodispersões (60–63).

Por meio do desenvolvimento de um sistema nanocarreador à base de Soluthin® (fosfatidilcolina e maltodextrina) contendo naringenina, foi obtido um aumento de cerca de 116 vezes na biodisponibilidade oral da naringenina (60). O efeito foi observado com a administração por via oral (40 mg/kg), em ratos, da naringenina nanoencapsulada, em comparação com a administração de naringenina em suspensão em carboximetilcelulose sódica (0,3%) (AUC_{0-12h} 3487,21 \pm 62,32 ng/mL/h e AUC_{0-12h} 29,86 \pm 1,16 ng/mL/h, respectivamente).

Nanopartículas poliméricas catiônicas de naringenina, utilizando Eudragit 100 e Poloxamer 188, também já foram desenvolvidas e sua atividade comparada com naringenina em suspensão em carboximetilcelulose sódica (0,3%) (61). Após administração por via oral (40 mg/kg), em ratos, foi possível detectar naringenina com 12 h de análise. As nanopartículas demonstraram melhorar a biodisponibilidade oral de forma significativa, com AUC_{0-12h} 2877,20 \pm 62,32 ng/mL/h em relação à suspensão, com AUC_{0-12h} 29,86 \pm 1,16 ng/mL/h.

Nanopartículas contendo naringenina também foram desenvolvidas por Wang *et al.* (2014), utilizando monometoxi poli(etilenoglicol)-poli(ϵ -caprolactona) (MPEG-PCL) para incorporar em comprimidos bucais. O estudo teve como enfoque o uso de polímeros mucoadesivos, para melhorar a solubilidade da naringenina e tratar doenças inflamatórias e ulcerativas orais.

A grande vantagem dos nanocarreadores e das nanopartículas na incorporação da naringenina consiste no potencial em aumentar a solubilidade da naringenina, o que foi demonstrado nos estudos pela melhora do perfil de liberação de naringenina em testes *in vitro* e *in vivo*.

Com intuito de melhorar a dissolução e a biodisponibilidade da naringenina, Khan *et al.* (2015) desenvolveram um sistema de dispersão sólida, utilizando Soluplus® como

carreador não-iônico. O objetivo desse tipo de sistema consiste em reduzir a cristalinidade (atingindo um estado quase amorfo). O estado amorfo é mais solúvel que a fase cristalina, e pode ser estável se um carreador adequado for escolhido para o preparo do sistema de dispersão. Nesse caso, houve uma melhora expressiva no perfil de dissolução da naringenina com o uso de Soluplus®.

Outro tipo de técnica comumente empregada na indústria farmacêutica para aumentar a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade de moléculas consiste no uso de ciclodextrinas (64). Essas estruturas são carboidratos complexos, compostos por 6 a 8 unidades de monômeros D-glicose unidos por ligações do tipo α -1,4 formando uma estrutura semelhante a um cone (65).

A cavidade das ciclodextrinas é hidrofóbica, enquanto o exterior tem característica hidrofílica, o que contribui para aumentar a solubilidade em soluções aquosas. Esse efeito foi observado por Yang *et al.* (2013) (62), pela avaliação de complexos de inclusão de naringenina com β -ciclodextrinas. Além do aumento de solubilidade, as ciclodextrinas também aumentaram a estabilidade térmica da naringenina, resultados atrativos para o desenvolvimento de formulações contendo o flavonoide.

Além dessas técnicas, entre diversas possibilidades para o desenvolvimento de formulações transdérmicas, encontra-se a aplicação de adesivos, filmes e membranas preparados com polímeros. Por serem para aplicação direta na pele, o ideal para esses sistemas consiste no uso de polímeros naturais, biodegradáveis, que permitam a liberação de substâncias da matriz e também contribuam para fornecer propriedades mecânicas adequadas para os produtos (66). Como nem a este tipo de formulação e nem a via transdérmica foram propostos até o momento para a naringenina, este trabalho dedicou-se a explorar essa possibilidade.

3.3. Pele: composição, estrutura e função

A pele (Figura 6) é o maior órgão do corpo humano. Possui uma estrutura complexa, que reveste e assegura grande parte das relações entre o meio interno e o externo. Além disso, atua na defesa e colabora com outros órgãos para o bom funcionamento do organismo, como no controle da temperatura corporal e na elaboração

de metabólitos. É formada por três camadas: epiderme, derme e hipoderme, sendo a última a mais interna. A composição estrutural e localização de cada camada varia, o que garante funções específicas distintas (67).

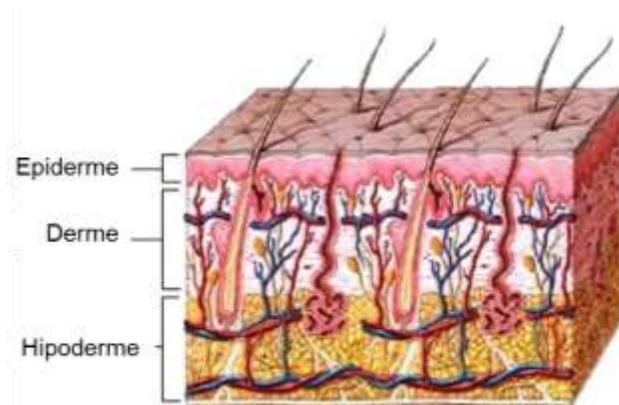


Figura 6. Camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme. Fonte: Adaptado de Khavkin *et al.* (2011) (68).

Hipoderme, ou camada subcutânea, é a camada mais profunda da pele e conecta o músculo à pele. Está localizada abaixo da derme, e consiste basicamente em tecido adiposo e uma parte de colágeno. A derme é a camada responsável pela estrutura e elasticidade da pele. É composta principalmente por fibroblastos, células responsáveis por produzir os elementos estruturais da derme, como a substância fundamental, as fibras colágenas e as elásticas. Situa-se abaixo da epiderme e nela localizam-se as glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas, folículos pilosos, músculo eretor de pelo, vasos sanguíneos, receptores sensoriais e vasos linfáticos (68).

A epiderme, camada mais externa, é constituída por 5 sub-camadas (Figura 7), oriundas de um processo de queratinização: camada basal, camada espinhosa, camada granular, camada lúcida e camada córnea.

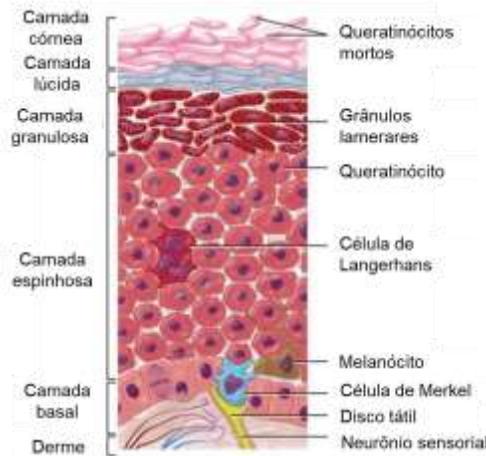


Figura 7. Camadas da epiderme. Fonte: Adaptado de Betzalel *et al.* (2017) (69).

A camada basal da epiderme é a mais interna. Responsável pelo processo de renovação do epitélio, essa camada apresenta atividade mitótica intensa e é formada por diferentes tipos de células em uma única camada. Nessa região, além dos queratinócitos, encontram-se os melanócitos, células produtoras de melanina, e as células de Merkel, relacionadas à resposta sensorial (68). Acima dela, encontra-se a camada espinhosa, formada por células que apresentam um núcleo central e formato cuboide ou ligeiramente achatado. Nessa camada, encontram-se os grânulos de melanina e as células de Langerhans, responsáveis pela produção de melanina e pela função barreira de proteção da pele, respectivamente (70).

Após a camada espinhosa, camadas de células achatadas formam a camada granulosa, caracterizada pela presença de grânulos de querato-hialina, além de um núcleo central. Com essas estruturas, inicia-se a síntese de lipídeos e a formação de queratina. A camada lúcida está logo acima da camada granulosa e caracteriza-se por apresentar filamentos de queratina, sem núcleo, orientados de forma paralela à superfície da pele (70).

A última camada, mais externa da epiderme, é a camada córnea. Essa camada, também chamada estrato córneo, é caracterizada pela presença de células achatadas, mortas, desprovidas de núcleo e de organelas chamadas corneócitos. As células mortas queratinizadas dessa camada são organizadas em estruturas lamelares, organizadas em conjunto com uma matriz lipídica. Essas características fazem da camada córnea a principal barreira à permeação de fármacos (71).

3.4. Via de administração transdérmica

A liberação de substâncias por via transdérmica é muito atrativa, mas também bastante desafiadora. Essa via de administração é mais conveniente aos pacientes, indolor para autoadministração e pode ser facilmente interrompida, se necessário. Além disso, a administração por via transdérmica possibilita manter uma concentração plasmática constante dos ativos, sem que haja picos - concentração plasmática máxima - e vales - concentração mínima terapêutica -, como ocorre com a via oral e injetável. Também tem como vantagem não permitir que o fármaco sofra efeito de primeira passagem no fígado, o que permite administrar doses menores em comparação à administração oral. Formulações para aplicação por essa via são adequadas quando é necessário tratamento por longos períodos, como por exemplo, no tratamento da dor crônica, depressão e doenças inflamatórias (14,72).

Apesar das vantagens da via transdérmica, para que formulações favoreçam a absorção dérmica, faz-se necessário o desenvolvimento de sistemas com características físico-químicas adequadas para ultrapassar a primeira e mais importante barreira, o estrato córneo (73).

O termo “absorção percutânea/dérmica” ou permeação, refere-se à passagem de compostos pela pele. Esse processo pode ser dividido em três etapas: penetração, com entrada da substância na primeira camada da pele; permeação, onde a substância passa de uma camada à outra, e finalmente, reabsorção, quando há passagem para os vasos sanguíneos (15).

A permeação através da pele da maioria dos fármacos ocorre por três vias (Figura 8): pela via intercelular, na qual a substância se difunde pelas camadas epidérmica imersa na matriz lipídica e contornando os corneócitos; pela via transcelular, na qual o fármaco atravessa diretamente os corneócitos e a matriz lipídica; ou pela via dos anexos, na qual o fármaco penetra através dos folículos pilosos, das glândulas sebáceas e sudoríparas (73–75). A contribuição da via na penetração e na permeação dependerá das características físico-químicas do fármaco e da formulação na qual está inserido.

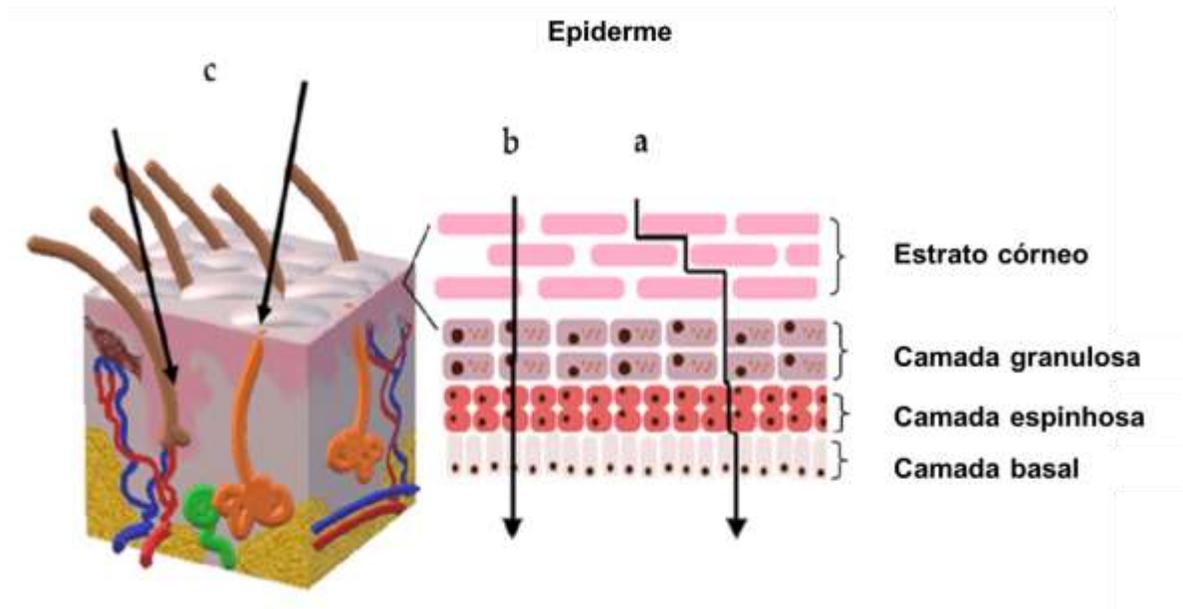


Figura 8. Estruturas das camadas da pele e rotas de penetração de substâncias: (a) intercelular; (b) transcelular e (c) via anexos, como folículo piloso e glândulas sebácea e sudorípara. Fonte: Adaptado de Zoabi *et al.* (2021) (76).

Fármacos hidrofílicos não atravessam facilmente a pele, devido à característica lipídica do estrato córneo. Uma substância hidrofóbica penetra mais facilmente, porém, pode permanecer armazenada dentro dele, pois a próxima camada da pele é mais hidrofílica. Além da solubilidade e o coeficiente de partição ($\log P$), o tamanho da molécula também influenciam o processo de permeação por impactarem diretamente a difusão do fármaco através das diferentes camadas da pele (76).

Considerando as características tanto das camadas da pele quanto dos fármacos, muitos estudos tem sido desenvolvidos com intuito de criar sistemas de permeação eficazes para fármacos pouco permeáveis (14). Esses sistemas de liberação de fármacos são interessantes devido às vantagens que apresentam sobre outras formas de administração de substâncias (72). De modo geral, os métodos para produção dividem-se em duas categorias: físicos e químicos. Os métodos físicos utilizam uma fonte de energia mecânica, elétrica, magnética ou térmica para melhorar o transporte de substâncias através da pele, promovendo uma ruptura da membrana da pele. Alguns exemplos de métodos físicos incluem microagulhas (77), ultrassom (78), radiofrequência (79), corrente elétrica (80), magnetoforese de solutos diamagnéticos (81).

Os métodos químicos têm como objetivo otimizar a formulação, para que haja uma interação melhor do fármaco com as camadas da pele. Nesse sentido, podem ser desenvolvidas diferentes tipos de formulações (algumas já citadas anteriormente), como formulações com promotores de absorção (82), microemulsões (83), nanoemulsões (84), nanopartículas (85), carreadores lipídicos (86), complexos com β -ciclodextrinas (87), dispositivos transdérmicos como filmes (88,89), entre outros. Em geral, as técnicas combinam fármacos com diversas substâncias como tensoativos, álcoois, ésteres, amidas, óleos e diversos tipos de polímeros (90,91).

3.5. Sistemas transdérmicos

Sistemas de liberação modificada compostos por polímeros podem funcionar como uma matriz ou como um reservatório de fármaco para aplicação transdérmica. Em sistema matricial, o fármaco contido em uma matriz polimérica é liberado por difusão ou por desintegração do sistema quando colocado em contato com a pele. Já em um sistema reservatório, a membrana polimérica envolve o fármaco, separando do meio externo, o que retarda sua liberação. A principal vantagem desse tipo de sistema de liberação é a preservação das características e propriedades farmacológicas do fármaco (92).

Ainda considerando essa forma de aplicação de substâncias, as membranas poliméricas, também chamadas filmes transdérmicos, são comumente utilizadas quando se deseja controlar a taxa de liberação de ativos. Isso se deve ao grande potencial dos polímeros em melhorar a eficácia terapêutica de inúmeros fármacos. Por isso, para o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de medicamentos, como os filmes, o uso de polímeros tem sido alvo de interesse na área tecnológica ao longo dos últimos anos (93).

A grande vantagem do uso de filmes (Figura 9) para incorporar substâncias farmacologicamente ativas é a facilidade de aplicação no local, independente da área, além da possibilidade de permanecer aplicado por um longo período, em comparação com as formulações semissólidas convencionais. Essa forma de aplicação de ativos também não é pegajosa, é flexível e facilmente removível. Ademais, a película adere à

pele, reduzindo o risco de transferência das substâncias ativas para outras pessoas ou roupas (94).

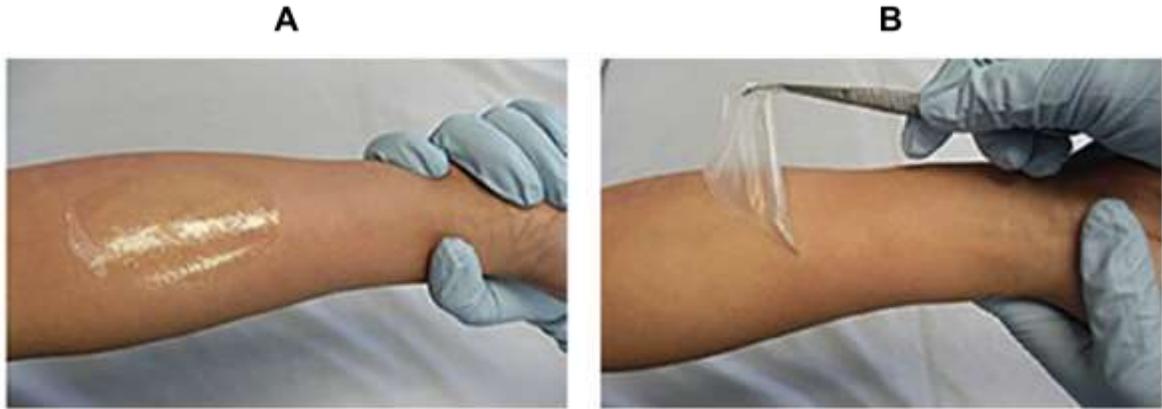


Figura 9. Aparência do sistema de aplicação de substâncias por filme: (A) Filme aplicado no antebraço; (B) Fácil remoção do filme não pegajoso, flexível, sem resíduos. Fonte: Adaptado de Kathe *et al.* (2017) (94).

Vários polímeros podem ser empregados para o desenvolvimento de filmes transdérmicos, destacando-se aqueles que são biocompatíveis. Nessa categoria estão os polissacarídeos e seus derivados, que representam um grupo de polímeros naturais muito empregados em formas farmacêuticas como filmes, por exemplo, apresentando inúmeras vantagens em relação aos polímeros sintéticos. Em geral, apresentam baixa toxicidade, baixo custo e são biodegradáveis (92). Dentre eles, encontra-se a quitosana, polímero natural amplamente estudado em sistemas de liberação transdérmica (17,19).

3.6. Filmes de quitosana

Quitosana (Figura 10) é um biopolímero catiônico, insolúvel em água e em solventes orgânicos. É solúvel em soluções preparadas com ácidos (com $\text{pH} < 6$), tais como ácido acético, clorídrico e lático, que transformam as unidades glicosaminas em formas positivamente carregadas e solúveis em água (95). A quitosana é um polissacarídeo obtido por desacetilação da quitina, naturalmente encontrada em exoesqueletos de crustáceos e outros animais marinhos, por hidrólise básica (96).

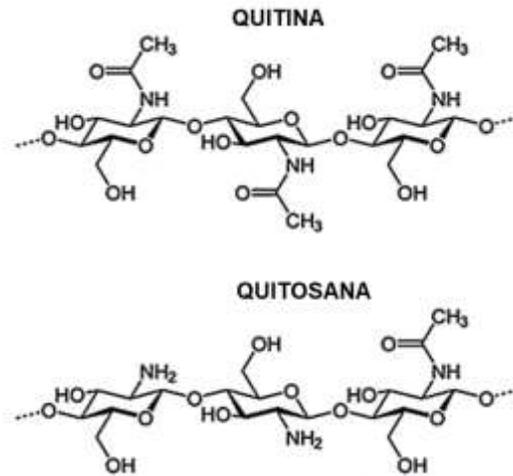


Figura 10. Estruturas químicas da quitina e quitosana. Fonte: Adaptado de (20).

A desacetilação da quitina é a etapa principal para obtenção de quitosana, visto que ela faz a transformação dos grupos acetamida (NHCOH_3), presentes em amins (NH^+), por meio de um forte ataque alcalino. O grau médio de desacetilação é definido como o número de grupos amino em relação aos grupos amida da cadeia polimérica (96).

Por apresentar propriedades biológicas importantes, o biopolímero atrai interesse de diversas áreas, como indústrias de cosméticos, medicina, agricultura, biotecnologia, indústrias farmacêuticas. As características atrativas da quitosana incluem, além do baixo custo, baixa toxicidade, biocompatibilidade, propriedades antibacterianas, também a vantagem de ser biodegradável (96). As propriedades poliméricas da quitosana possibilitam a produção de diferentes formulações e sistemas, como hidrogéis, filmes bioadesivos e membranas semipermeáveis (20,22).

Em sistemas transdérmicos, a quitosana tem como vantagem apresentar pouco ou nenhum potencial de irritação na pele, um inconveniente bastante comum. O estrato córneo, primeiro alvo de sistemas transdérmicos, possui como característica junções compactas entre as células, que apresentam cargas negativas (22,89). Nesse sentido, a propriedade bioadesiva da quitosana e o potencial de aumento da difusão de fármacos (em formulações com esse polímero) através da pele podem ser atribuídos à interação entre as cargas negativas da pele e as cargas positivas da quitosana (97).

Além disso, o caráter catiônico da quitosana favorece o aumento da permeação de substâncias pela via cutânea quando a quitosana é adicionada à formulação, uma vez

que as cargas positivas do polímero interagem com a membrana celular dos corneócitos, resultando em uma reorganização estrutural das proteínas *tight junction* (23,98).

Filmes à base de quitosana como único polímero podem ser obtidos por meio da incorporação do polímero em água acidificada (20). Uma das técnicas mais simples de preparo de filmes à base de quitosana é o preparo de uma solução ácida para incorporação do polímero, seguido de evaporação sobre uma superfície lisa/placa. Um plastificante pode ser adicionado no processo, para melhorar a flexibilidade do filme. O gel formado é vertido sobre a superfície plana e o solvente é evaporado, a uma temperatura igual ou inferior a 50 °C, até formação do filme. Os fármacos podem ser incorporados nas formulações a partir de soluções, antes da secagem do solvente (17,97,99).

Utilizando essa técnica simples, Rasool *et al.* (2011) desenvolveram filmes à base de quitosana de médio peso molecular (em ácido acético a 1 % v/v). Foram testadas as concentrações 1, 2, 3 e 4% (p/v) para incorporar cloridrato de propranolol e de acordo com as características dos filmes, a formulação com 2% de quitosana mostrou-se mais adequada para o fármaco em questão. Para os autores, além de uma proporção adequada de polímero, outros componentes, como propilenoglicol e terpenos, podem contribuir para promover a liberação do fármaco da matriz.

A depender das características do fármaco, a incorporação de fármacos pode ser realizada com uma combinação de sistemas com matriz à base de quitosana, que também representa uma alternativa interessante para proporcionar eficácia terapêutica. Nesse contexto, Thein-Han e Stevens (2004) utilizaram três tipos de quitosana (70%, 88% e 95%DD, todas com 800 kDa) para preparar um sistema combinando uma membrana (1% p/v de quitosana em ácido acético a 1% v/v) e um hidrogel (2% p/v de quitosana em ácido acético a 0,5 % v/v) contendo cloridrato de lidocaína e 10% de propilenoglicol p/v (PPG). O estudo demonstrou que houve um fluxo de liberação controlada, para fins de anestesia. Contudo, a liberação teve início apenas após 30 horas, sendo a combinação, portanto, indicada para um tratamento por tempo prolongado.

Os estudos citados referem-se a fármacos hidrofílicos. No entanto, a aplicação da quitosana como polímero para confecção de filmes também se estende aos fármacos pouco solúveis em água, como glimepirida (89) e etoricoxibe (100). Isso faz do polímero

um componente versátil para aplicação de diversos tipos de substâncias. O desempenho do sistema dependerá então das características tanto do tipo de quitosana, como também do fármaco escolhido.

O fluxo da liberação e de permeação cutânea de substâncias a partir das formulações pode variar de acordo com o grau de desacetilação da quitosana (um grau de desatilação >70% pode exercer mais controle na liberação), com o peso molecular e com a flexibilidade da cadeia de quitosana utilizada (19). Dessa forma, a padronização do método de preparo e a caracterização dos filmes, além da avaliação da liberação e permeação do(s) ativo(s) incorporados são necessários para adequar o uso do polímero.

Filmes preparados com o polímero podem atuar como alternativas terapêuticas quando se deseja melhorar a liberação do fármaco pela via transdérmica. O emprego do polímero para confecção de filmes de aplicação transdérmica contendo compostos de origem natural, como os flavonoides e outros antioxidantes, ainda é pouco explorado.

Alguns estudos apontam o uso de compostos de origem natural em filmes à base de quitosana. A quercetina, por exemplo, é um flavonoide natural que apresenta inúmeras propriedades farmacológicas, atuando principalmente como antioxidante. Estudos recentes utilizaram extratos oriundos de espécies vegetais, que apesar de pouco comuns, são ricas em bioflavonoides, como maçã do mangue (*Sonneratia caseolaris*) (101) e maqui berry (*Aristotelia chilensis*) (102). Os extratos foram incorporados em filmes à base de quitosana, para prover atividade antioxidante e antimicrobiana, demonstrando excelentes resultados.

Para aplicações não farmacológicas, estudos demonstraram que a quercetina pode ser incorporada a um filme de quitosana, tornando-se um substituto de derivados de petróleo em embalagens alimentícias (103). Há ainda na literatura, um estudo realizado com a naringina, para confecção de filmes à base de quitosana destinados à aplicação em alimentos (104). No entanto, o trabalho teve como objetivo produzir um filme com efeito protetor contra oxidação lipídica induzida por radiação UV em alimentos. Embora evidências mostrem o potencial da combinação de compostos de origem natural em filmes de quitosana, não foram encontrados estudos com fins farmacológicos, que utilizem a naringenina em matrizes de quitosana para aplicação na pele.

Considerando o potencial terapêutico da naringenina, como antioxidante e anti-inflamatório, e por ser de origem natural, o uso do polímero para confecção de filmes de aplicação transdérmica, contendo esse IFA, representa uma inovação. Espera-se que um filme à base de quitosana possa oferecer um aumento da biodisponibilidade da naringenina, que tende a ser baixa quando administrada por via oral, como dito anteriormente. Parte da proposta é atribuída à vantagem do emprego da via transdérmica, que é de fácil aplicação e ainda permite a liberação constante e/ou progressiva do ativo de interesse, facilitando atingir a concentração terapêutica ideal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

O padrão analítico de naringenina (pureza $\geq 95\%$), quitosana de baixo peso molecular (PM = 50-190 kDa, grau de desacetilação $>75\%$) e quitosana de médio peso molecular (PM = 190-310 kDa, grau de desacetilação =75-85%) utilizados neste trabalho foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Metanol e acetonitrila de grau HPLC foram obtidos da J.T. Baker (Phillipsburg, New Jersey, EUA). Etanol grau HPLC foi obtido de Merck (Algés, Portugal). Para preparação do tampão fosfato, foram utilizados fosfato de sódio nas formas monobásica e dibásica (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), cloreto de sódio (Serva, Rio de Janeiro, Brasil) e Pluronic[®] F127 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Correções de pH foram realizadas com hidróxido de sódio (Dinâmica Química Contemporânea, São Paulo, Brasil). Para preparo dos filmes, foram utilizados ácido acético, obtido de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA), propilenoglicol adquirido da Dinâmica Química Contemporânea (São Paulo, Brasil). Filtros pré-limpos, de diâmetro 25 mm e poro 0,45 μm hidrofóbicos foram adquiridos de Analítica (São Paulo, Brasil). Placas de Petri descartáveis 90 x 15 mm foram compradas da Comercio de Produtos Químicos e Laboratoriais OCS (Brasília, Brasil). Para os ensaios em células, etanol absoluto PA foi obtido de Dinâmica Química Contemporânea (São Paulo, Brasil). Histopaque, *carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE) e fitohemaglutinina (PHA) foram adquiridos de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Soro fetal bovino (SFB) foi adquirido de Vitrocell (São Paulo, Brasil). RPMI, anti-CD3 APC, Trizol, dietilpirocarbonato (DEPC), *High Capacity cDNA reverse Transcription Kit*, e Taqman foram obtidos de Thermo Fisher (Waltham, MA USA). Todas as análises foram realizadas com água tipo Milli-Q (Millipore, França).

4.2. Obtenção de pele de orelha de suínos

As peles de orelhas de suínos utilizadas em estudos de permeação foram adquiridas do frigorífico Sabugy (Goiás, Brasil). A pele de orelhas de suínos foi removida da cartilagem utilizando um bisturi conforme ilustrado na Figura 11. Em seguida, foi presa

em uma placa suporte de isopor, com alfinetes, para dermatomização. O equipamento foi ajustado de modo a se obter fragmentos de espessura aproximada de 0,5 mm. Os fragmentos de pele obtidos foram embalados em filme de PVC e papel alumínio e armazenados a -4 °C por um período máximo de 2 meses antes do uso nos experimentos de permeação.

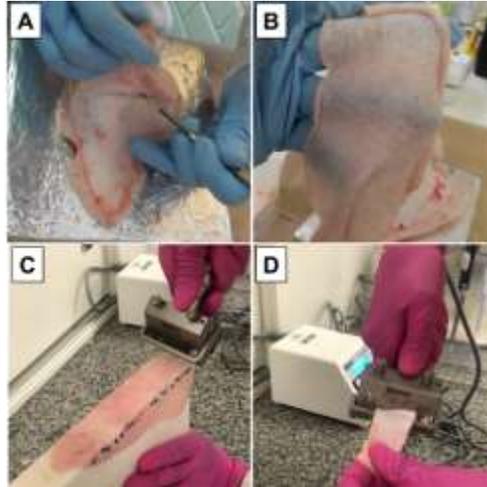


Figura 11. Preparação da pele de orelha de suínos para estudos de recuperação e permeação: (A) Retirada da pele da orelha, com bisturi; (B) pele inteira; (C) Pele fixada em placa de isopor, com alfinetes, dermatômetro; (D) Pele dermatomizada.

4.3. Desenvolvimento e validação de método analítico

O método analítico cromatográfico desenvolvido e validado neste estudo teve como ponto de partida uma pesquisa bibliográfica utilizando bancos de dados: *Google Scholar*, *Pubmed*, *Scielo* e *Science Direct*. Foram utilizados os seguintes termos na busca, com operador booleano “and”: “naringenina *and* CLAE”; “naringenin *and* HPLC”; “naringenin *and* validated HPLC method”. Após levantamento bibliográfico, foram selecionados os métodos que se aplicavam a estudos biológicos, farmacocinéticos e com determinação de teor em frutas.

Partiu-se do método validado por Bhandari *et al.* (2019) para adaptar as condições cromatográficas apontadas no estudo levando-se em consideração que o método será utilizado no presente estudo para quantificar o flavonoide extraído da pele de suínos.

Assim, a análise quantitativa da naringenina foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) modelo Shimadzu LC 20-AD equipado com um detector de arranjo de diodos (SPD-20A), uma bomba (LC-20D), um degaseificador (DGU-20A3) e um injetor automático (modelo 9SIL-20AD) e forno (modelo CTO-20AS). Uma coluna de fase reversa LUNA C₁₈ Phenomenex (300 mm × 3,9 mm, 10 µm) foi utilizada como fase estacionária. A eluição da fase móvel foi isocrática e realizada a uma vazão de 0,6 mL/min. A fase móvel foi composta por metanol e água acidificada com ácido fosfórico 0,01 mol/L a uma proporção de 65:35 (v/v). Os solventes da fase móvel foram filtrados através de membranas filtro de nylon 0,45 µm, por sistema de filtração a vácuo, e degaseificados em banho de ultrassom por 10 min. O volume de injeção das amostras foi de 10 µL e o forno foi utilizado à 40 °C. A detecção e quantificação foram realizadas pela análise da eluição a 290 nm.

O método analítico padronizado foi então validado em termos de especificidade/seletividade considerando interferentes da pele e da formulação, linearidade, precisão, exatidão, e limites de detecção e de quantificação, e robustez, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (105) e também de acordo com diretrizes preconizadas pelo *International Conference on Harmonisation* (ICH) (106).

4.3.1. Seletividade

Para a análise da seletividade do método, primeiramente foram analisadas amostras de extrato de estrato córneo e de pele remanescente (pele sem o estrato córneo), utilizando metanol como solvente para a extração do composto a partir das matrizes biológicas. Para obtenção desses extratos, o estrato córneo foi separado do restante da pele utilizando a técnica de *tape stripping* descrita mais adiante, e a cada uma das matrizes foram adicionados 5 mL de metanol e mantidas sob agitação a 500 rpm por 24 h. Os cromatogramas desses extratos separados foram comparados aos dos mesmos extratos contaminados com uma solução metanólica de naringenina, na concentração final de 4,0 µg/mL.

Foram preparadas também soluções ácidas e básicas contendo naringenina a 4,0 µg/mL, considerando um volume final de 25 mL, com 5 mL de ácido clorídrico (HCl) 1

mol/L ou 5 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L, para obtenção de produtos de degradação por hidrólise ácida e alcalina, respectivamente. Cada solução foi mantida a uma temperatura de 60 °C, por 6 h. Em seguida, 5 mL de HCl 1 mol/L foram adicionados à solução básica e 5 mL de NaOH 1 mol/L foram adicionados à solução ácida. O volume foi completado para 25 mL, com metanol (107).

Além disso, foi preparada uma solução com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 25% (v/v), para verificar possibilidade de oxidação do padrão. A partir dessa solução, foi preparada uma diluição de naringenina a 4,0 µg/mL em metanol e H₂O₂ a 1:1 (v/v).

As formulações desenvolvidas para os filmes de quitosana foram diluídas em metanol a 1:10 (p/v) de cada formulação, e acrescidas de naringenina para uma concentração final de 4,0 µg/mL.

Para cada solução, foi preparado um branco (solução sem o analito). Todas as amostras foram preparadas em triplicata, filtradas com filtro de porosidade de 0,45 µm e analisadas por CLAE, para verificar a capacidade do método de quantificar a naringenina na presença de todos esses interferentes e produtos de degradação.

4.3.2. Linearidade

Três soluções-estoque independentes de naringenina a 100 µg/mL em metanol e em uma solução de Pluronic[®] F127 2,5% (p/v) em tampão fosfato 0,01 mol/L, pH 7,4 foram preparadas. A partir delas, a linearidade do método foi avaliada pela construção de curvas analíticas seguindo diluições das soluções-estoque nas seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 µg/mL. As amostras foram preparadas em triplicata, para cada concentração, filtradas em filtro de membrana de porosidade 0,45 µm e analisadas por CLAE.

Os dados obtidos foram plotados em gráficos que relacionavam a concentração de naringenina com a área do pico fornecida pelo equipamento, após injeção das amostras. Procedeu-se com a análise estatística dos dados, utilizando método de regressão linear, que fornece uma reta no formato $y = ax + b$, onde (a) corresponde ao coeficiente angular e (b) coeficiente linear. A linearidade foi então determinada

estatisticamente por meio do coeficiente de correlação linear (r), sendo aceitáveis valores de r superiores a 0,99, de acordo com a legislação estabelecida pela Anvisa (105).

O efeito de matriz frente a solução tampão (pH 7,4 com 2,5% de Pluronic® F127) foi avaliado com as curvas obtidas. De acordo com a Anvisa (105), o paralelismo das retas é indicativo de ausência de interferência dos constituintes da matriz. A equação a seguir foi utilizada para determinar a significância do efeito (%):

$$Ef = \frac{S_{matriz} - S_{solvente}}{S_{solvente}} \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

onde: S_{matriz} é o coeficiente angular da curva de calibração do analito na matriz, e $S_{solvente}$ é o coeficiente angular da curva de calibração do analito em metanol.

4.3.3. Precisão e exatidão

A precisão do método foi avaliada em CLAE, por meio do estudo de repetibilidade (precisão intracorridas) e precisão intermediária (precisão intercorridas). A repetibilidade do método foi verificada com três determinações de três das concentrações que contemplaram o intervalo linear do método (0,5; 4,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$ de naringenina em metanol), totalizando 9 análises. A precisão foi avaliada em dois dias diferentes pelo mesmo analista (repetibilidade) e com dois analistas distintos (precisão intermediária), no mesmo equipamento. Os resultados foram expressos pelo valor do coeficiente de variação (CV%), calculado por meio da seguinte equação:

$$CV\% = (\text{Desvio Padrão}/\text{Concentração Média}) \times 100 \text{ (Equação 2)}$$

onde: CV% = coeficiente de variação; Desvio Padrão = estimativa do desvio padrão da média; Concentração Média = média das medidas, em triplicata, para cada concentração analisada.

O mesmo intervalo foi utilizado para análise da exatidão, verificada pela relação entre a média da concentração experimental mensurada e a concentração teórica

correspondente. Os resultados da análise de exatidão foram expressos em função da porcentagem do erro relativo:

$$E\% = \text{Concentração experimental} / \text{Concentração teórica} \times 100 \text{ (Equação 3)}$$

onde: E% = porcentagem de erro relativo; Concentração teórica = corresponde ao valor estabelecido como referência; Concentração experimental = corresponde ao valor obtido após a análise.

4.3.4. Estudos de recuperação da naringenina da pele

Foram utilizados dez fragmentos circulares de pele dermatomizada a aproximadamente 0,5 mm de espessura, com 2 cm de diâmetro. Cada pedaço de pele foi esticado e fixado sobre um suporte com o estrato córneo voltado para cima. Um molde de plástico, com área de exposição igual a 1 cm², foi disposto sobre a superfície. O estrato córneo foi então removido pela técnica de *tape stripping* (LADEMANN *et al.*, 2009), utilizando 15 pedaços de fita adesiva, que foram aderidas, pressionadas e removidas da pele em um único movimento. As fitas correspondentes de cada remoção foram colocadas juntas em frascos de vidro âmbar. A pele remanescente foi picotada, com auxílio de tesoura, e colocada em outro frasco de vidro âmbar. Para se obter soluções em três concentrações de naringenina da curva analítica (uma baixa: 0,5 µg/mL, outra média: 4,0 µg/mL e outra alta: 10,0 µg/mL) foram adicionados aos tubos contendo cada camada da pele respectivamente 25 µL, 200 µL e 500 µL de uma solução estoque de naringenina em metanol a 100 µg/mL.

Após evaporação do solvente, foram adicionados 5 mL de metanol a cada tubo para promover a extração da naringenina do estrato córneo e da pele remanescente. Os frascos foram vedados com *parafilm* e mantidos sob agitação magnética por 24 h. Todas as amostras foram então filtradas em membrana de porosidade 0,45 µm e seguiram para análise por CLAE.

A quantidade de naringenina recuperada foi determinada a partir da adição e recuperação das concentrações estabelecidas acima, conforme a Equação 4, expressa

anteriormente, em termos de porcentagem, por ser a eficiência de extração parte da avaliação de exatidão do método.

4.3.5. Limite de detecção e quantificação

O LD corresponde à menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessita de quantificação. Todavia, em análise por CLAE, a linha de ruído pode ser utilizada para estimar o LD, baseando-se no desvio-padrão na relação de 3 vezes o ruído da linha de base, conforme a equação:

$$LD = \frac{3,3 \times DP}{IC} \text{ (Equação 4)}$$

onde: LD = Limite de detecção; DP = Desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações da substância próximas ao suposto limite de quantificação; IC = Inclinação da curva de calibração.

A estimativa do LQ teórico foi feita com base na equação (105):

$$LQ = \frac{10 \times DP}{IC} \text{ (Equação 5)}$$

onde: LQ = Limite de quantificação; DP = Desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações da substância próximas ao suposto limite de quantificação; IC = inclinação da curva de calibração.

Após determinação dos limites teóricos, foram preparadas soluções de concentrações decrescentes de naringenina abaixo da menor concentração da curva analítica (0,1; 0,2; 0,3; 0,4, além de 0,5 µg/mL), com o intuito de verificar o menor valor quantificado com precisão e exatidão aceitáveis, confirmando o valor teórico calculado para LQ.

4.3.6. Robustez

A robustez do método foi avaliada utilizando-se um desenho fatorial (2^3), variando-se três parâmetros: temperatura do forno da coluna (T), porcentagem de água na fase móvel (W) e vazão da fase móvel (V), como indicado na Tabela 1. O nível (-1) foi estabelecido como sendo -5% em relação aos parâmetros do método desenvolvido e o nível (+1) estabelecido como sendo +5%, com T de 40°C, P de 35% e V de 0,6 mL/min. Os estudos foram realizados com base na estimativa da variância dos efeitos, em triplicata. Os efeitos avaliados foram área do pico, fator de cauda e tempo de retenção.

Tabela 1. Desenho fatorial para análise de robustez do método desenvolvido para quantificação da naringenina.

Teste	Níveis codificados			Níveis decodificados		
	T	V	W	T (°C)	V (mL/min)	P (%)
1	-1	-1	-1	38	0,57	39
2	-1	-1	1	38	0,57	32
3	-1	1	-1	38	0,63	39
4	-1	1	1	38	0,63	32
5	1	-1	-1	42	0,57	39
6	1	-1	1	42	0,57	32
7	1	1	-1	42	0,63	39
8	1	1	1	42	0,63	32

T: temperatura do forno; V: vazão da fase móvel; P: porcentagem de água na fase móvel.

Os resultados de cada resposta obtida foram analisados utilizando uma equação preditiva, por meio de análise de regressão múltipla. O modelo foi validado por análise de variância (ANOVA) com um nível de significância fixado em 5%.

4.4. Avaliação *in vitro* do potencial anti-inflamatório da naringenina

4.4.1. Isolamento das células mononucleares de sangue periférico (CMSPs)

As células mononucleares de sangue periférico (CMSPs) foram isoladas por meio do gradiente de densidade Histopaque a partir de amostras de sangue periférico coletadas de três doadores saudáveis em tubos contendo anticoagulante EDTA.

Em suma, tubos cônicos de 15 mL foram preenchidos com 3 mL de Histopaque, e 8 mL de sangue total diluído 1:2 em solução tampão salina-fosfato (PBS). Esses tubos

foram então centrifugados a 1100 *g* por 25 min para permitir a formação do halo de células mononucleares. Após a centrifugação, o halo de CMSPs foi recolhido com auxílio de uma pipeta p1000 e transferido para um novo tubo cônico de 50 mL e lavado três vezes com PBS. Por fim, o *pellet* celular foi ressuscitado em 1 mL de meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) com 10% de Soro fetal bovino (SFB) e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer.

4.4.2. Marcação das CMSPs com carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)

Para viabilizar a análise de proliferação, 1×10^7 CMSPs foram marcadas com 2,5 $\mu\text{mol/mL}$ de *carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE). Para isso, as células foram incubadas com CFSE por 7,5 min a 37 °C em banho-maria e, após esse período, a marcação foi interrompida com 10 mL de RPMI gelado contendo 10% de SBF e mantendo-se a amostra refrigerada a 4 °C por 5 min. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com PBS, utilizando centrifugação a 1200 *g* por 10 min. Por fim, o *pellet* celular obtido das lavagens foi ressuscitado em 1 mL de meio RPMI suplementado com 10% de SBF. Essas células foram contadas com o auxílio da Câmara de Neubauer e utilizadas para o ensaio de proliferação, como detalhado a seguir.

4.4.3. Ensaio de proliferação de linfócitos T

Para analisar o efeito da naringenina sobre a capacidade proliferativa de linfócitos T, foram plaqueadas 2.5×10^5 de CMSPs de três doares diferentes previamente marcadas com CFSE por poço e ativadas com 5,0 $\mu\text{g/mL}$ de fitohemaglutinina (PHA). Essas células foram então tratadas com concentrações crescentes de naringenina (0,1; 0,5; 1,0; 10,0; e 20,0 $\mu\text{g/mL}$) paralelamente a um grupo tratado com o volume máximo de etanol.

As placas foram envolvidas em papel alumínio e cultivadas em estufa incubadora a 37 °C, com atmosfera de 5% de CO₂ por 72 h. Findado esse período, as células foram recolhidas, transferidas para microtubos de 1,5 mL previamente identificados e centrifugadas a 2000 *g* por 5 min para obtenção do *pellet* celular. Para proceder com a

avaliação de linfócitos T, o *pellet* celular foi ressuspendido em 30 μ L de PBS, homogeneizado e as células foram marcadas com anti-CD3 APC conforme instruções do fabricante. Após o período de incubação, a suspensão celular foi lavada com 500 μ L de PBS para retirada do excesso de anticorpos.

As amostras foram ressuspendidas em 400 μ L de PBS e a proliferação celular foi analisada no Citômetro FACSCalibur (BD Bioscience) do Laboratório de Hematologia e Células-Tronco (LHCT) – FS/UnB. Foram adquiridos 10.000 eventos utilizando os canais FL-1 e FL-4 para leitura do CFSE e anti-CD3 APC, respectivamente. A análise dos dados foi feita com o auxílio do software FlowJO 10.0.7 (FlowJo LLC, Williamson Way Ashland, OR, USA).

4.4.4. Extração de RNA e transcrição do cDNA

O RNA das CMSPs foi extraído utilizando o reagente TRIzol LS. Após as células terem sido recolhidas dos poços, transferidas para tubos de 1,5 mL RNase Free e centrifugadas a 2000 *g* por 5 min, o *pellet* celular foi ressuspendido em 250 μ L de PBS. Em seguida foram adicionados 750 μ L de Trizol gelado e as amostras foram homogeneizadas com auxílio de uma pipeta p1000 com movimentos *up/down*.

Após o período de incubação de 5 min em temperatura ambiente, 200 μ L de clorofórmio foram acrescentados aos tubos. Esse material foi então centrifugado por 15 min a 12000 *g*, a 4 °C. Findado esse processo, foram obtidas três fases. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL, onde foram adicionados 50 μ L de isopropanol gelado para precipitação do RNA. As amostras foram então centrifugadas por 10 min a 12000 *g* a 4 °C. Finalizado esse processo foi adicionado 1 mL de etanol 75% gelado.

Por fim, a mistura foi centrifugada por 5 min a 7500 *g*, a 4 °C, o etanol descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 20 μ L de água DEPC (Dietilpirocarbonato). Após obtenção do RNA, a quantidade e a pureza desse material foram analisadas por meio do espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado usando 500 ng do total de RNA pelo Kit de transcrição reversa *High Capacity cDNA reverse Transcription Kit*, seguindo as instruções do fabricante.

4.4.5. PCR em tempo real

O perfil de expressão de genes relacionados à resposta imune foi avaliado por PCR em tempo real utilizando a metodologia Taqman, cujos *primers* e sondas foram adquiridos pelo sistema AssayOnDemand. O gene calibrador utilizado foi o GAPDH (Hs02786624), cuja eficiência de amplificação é a mesma dos genes alvo, o que possibilitou a análise pela metodologia de DDct (108). Analisou-se a expressão dos seguintes genes: GAPDH (Hs02786624), TGF- β 1 (Hs00998133), IL-10 (Hs00961622) e IL-1 β (Hs00174097).

4.5. Análise de compatibilidade entre naringenina e quitosana

Foram realizadas análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e de termogravimetria (TG), utilizando um DSC-60 e um DTG-60H, respectivamente (Shimadzu®, Japão) para análise da compatibilidade entre a naringenina e a quitosana, selecionada para o preparo dos filmes transdérmicos. O aquecimento das amostras foi realizado a uma taxa de 10°C/min, no intervalo de aquecimento de 30 a 300°C para o DSC, e de 30 a 500 °C para o TG, sob atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL/min. Para estes experimentos, foi utilizada massa de amostra de 3,0 mg. A composição das amostras analisadas está descrita na Tabela 2, a seguir.

Tabela 2. Amostras preparadas para análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG).

AMOSTRAS	Naringenina (%)	Quitosana* > 75% DD (%)
1	100	-
2	-	100
3	50	50

*Quitosana de médio peso molecular.

As amostras foram preparadas para análise imediata ou foram expostas a um tratamento térmico a uma temperatura de 60 °C, por um período de 12 h, para simular a

condição de preparo dos filmes. O teor de amostras de naringenina (em triplicata) foi determinado antes e após o tratamento térmico utilizando o método analítico por CLAE descrito anteriormente.

4.6. Desenvolvimento dos filmes de quitosana

Foram testados diferentes dois tipos de quitosana: quitosana de baixo peso molecular (PM = 50-190 kDa, grau de desacetilação = 75-85%) e quitosana de médio peso molecular (PM = 190-310 kDa; grau de desacetilação = 75-85%), nas concentrações de 2,0%; 1,5% e 1,0% em solução com ácido acético a 2% (v/v) e também em solução contendo ácido acético e ácido láctico 1:1 (v/v) a 2%.

Para o preparo de filmes de quitosana, utilizou-se o método de evaporação de solvente. O polímero (Tabela 3), foi dissolvido em uma solução ácida sob agitação constante a 500 rpm, até que fosse observada a formação de um gel. As formulações foram então mantidas em repouso em temperatura ambiente por 12 h, para garantir a hidratação completa do polímero e a eliminação de bolhas formadas durante a agitação.

Após esse período, 0,5% de naringenina (p/p) foi dissolvida em etanol a 10% (v/p). Ao gel de quitosana, foi adicionado propilenoglicol (5% p/p). A solução etanólica de naringenina foi incorporada ao gel e a formulação foi mantida sob agitação novamente, até a formação de uma mistura homogênea. Também foi preparada uma formulação sem etanol, dispersando a naringenina diretamente em propilenoglicol. A formulação foi mantida em repouso por mais 2 h para eliminação das bolhas formadas. Em seguida, o pH foi aferido.

Uma massa de 20 g de formulação foi espalhada sobre placas de Petri de plástico (90 x 15 mm). As placas foram mantidas na estufa a 50 °C, por 12 h. Após esse período, os filmes foram levados ao dessecador até resfriarem e posteriormente retirados das placas, embalados em filme de PVC e papel alumínio, e armazenados ao abrigo de luz, em temperatura ambiente.

Tabela 3. Componentes da formulação dos filmes de quitosana contendo naringenina.

Componentes da formulação	A	B	C	D	E
Quitosana DD>75% (%)	2,0	2,0	1,5	1,5	1,5
Solução de ácido acético e ácido láctico 1:1 a 2% (v/v) (%)			QSP 100,0	-	-
Solução de ácido acético a 2% (v/v) (%)	QSP 100,0	QSP 100,0	-	QSP 100,0	QSP 100,0
Propilenoglicol (%)	-	20	20	20	5
Etanol (%)	-	10	10	10	10
Naringenina (%)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

4.7. Caracterização dos filmes de quitosana

Os filmes C, D e E (Tabela 3) foram selecionados para caracterização por demonstrarem características organolépticas de aspecto, maleabilidade e homogeneidade mais adequados. A caracterização envolveu determinação da espessura dos filmes, propriedades mecânicas, capacidade de hidratação, teor de naringenina e homogeneidade, como descrito a seguir.

4.7.1. Espessura

A espessura dos filmes foi medida em três diferentes pontos, usando um paquímetro digital (Mitutoyo Sul Americana, São Paulo, Brasil).

4.7.2. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram avaliadas por meio de ensaios de tração, para identificar a força de fratura. Todas as análises foram realizadas em uma Máquina Universal de Ensaio (Shimadzu EZ test, Tóquio, Japão) equipada com uma célula de carga de 5 kN usando garras tipo cunha que se movem horizontalmente para

apertar a garra no filme verticalmente (antes das análises) para realizar o teste de alongamento. A célula se moveu a uma velocidade constante de 10 mm/min. O tamanho de cada filme foi de 50 mm, o espaço entre as células foi de 25 mm e a força inicial foi de 1 N (109).

4.7.3. Capacidade de hidratação (absorção de água)

Um fragmento de 1 cm² de área do filme foi pesado e colocado em uma placa de Petri (9 cm de diâmetro) contendo aproximadamente 10 mL de água. O filme foi hidratado e nos tempos de 1, 5, 10, 20 e 30 min, o filme foi retirado, seco com papel filtro e pesado, até peso constante. O ensaio foi realizado em triplicata, para as formulações. A porcentagem de água absorvida foi calculada, conforme a equação:

$$\text{Água absorvida (\%)} = (\text{Filme hidratado (g)} - \text{Filme seco (g)}) \times 100 \text{ (Equação 6)}$$

4.7.4. Teor de naringenina dos filmes e homogeneidade

Para quantificar a naringenina nos filmes de quitosana, foram cortados pedaços circulares de 1,5 cm de diâmetro. Em seguida, cada pedaço foi pesado e dissolvido em uma solução de ácido acético e água a 1:1 (v/v), completando volume para 10 mL, em balão volumétrico. A solução permaneceu sob agitação por 30 min. Uma amostra de 100 µL foi diluída em 5 mL de metanol, filtrada em membrana de porosidade de 0,45 µm e quantificada por CLAE. As análises foram realizadas em triplicata, e o teor de naringenina foi calculado. A homogeneidade do IFA no filme foi calculada pela determinação da média de três pedaços, de locais diferentes do mesmo filme, e cálculo do CV (Equação 3).

4.8. Estudos de estabilidade acelerada dos filmes de quitosana contendo naringenina

Os estudos de estabilidade das formulações foram conduzidos em conformidade com as diretrizes estabelecidas pela Anvisa, por meio dos critérios para a realização de Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto

biológicos, publicado pela RE n° 318, de 6 de novembro de 2019 (110) e pelas diretrizes preconizadas pelo *International Conference on Harmonisation* (ICH) (111).

Amostras de filmes com 3 cm de diâmetro foram acondicionadas em filme plástico e sachês aluminizados, selados, para evitar contato com o meio externo, conforme ilustrado na Figura 12. Os filmes foram armazenados em três diferentes condições de temperatura, por um período de 90 dias: ambiente, a $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$; câmara climática a $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ e geladeira, a $4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. As análises de teor de naringenina foram realizadas, em triplicata, nos tempos 0, 7, 15, 30, 60 e 90 dias. Todas as amostras foram analisadas por CLAE, utilizando método validado descrito acima.



Figura 12. Filme acondicionado em filme plástico e sachê aluminizado.

4.9. Solubilidade da naringenina

Para determinar o meio adequado para ser usado como solução receptora nos próximos experimentos que envolvem difusão do flavonoide, foram realizados ensaios de solubilidade da naringenina em diferentes solventes e sistemas de solventes. Em temperatura ambiente, uma quantidade em excesso de naringenina (aproximadamente 3 g) foi adicionada a frascos contendo 5 mL dos seguintes meios: acetona, metanol, acetonitrila, etanol, etanol 50% (v/v), álcool isopropílico, Polissorbato 80 (Tween® 80) nas concentrações 0,25; 0,5 e 1% (p/v), tampão fosfato 0,01 mol/L (pH 7,4) contendo ou não: propilenoglicol a 20%, 40% e 60% (p/v) e Pluronic® F127 a 2,5% (p/v). O experimento foi realizado em triplicata para cada meio testado.

Os frascos foram fechados e deixados sob agitação magnética a 500 rpm por 12 h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a $2150 \times g$ por 30 min para a sedimentação do excesso de naringenina, o sobrenadante foi filtrado e a solução obtida foi levada ao CLAE para quantificação.

4.10. Ensaios *in vitro* de liberação

Os estudos de liberação *in vitro* foram realizados em células de difusão verticais do tipo Franz (Figura 13), com área de difusão de $1,5 \text{ cm}^2$, montadas com os filmes de quitosana, contendo 0,5% (p/p) de naringenina. Cada filme foi aplicado diretamente sobre o compartimento receptor e vedado com filme plástico tipo *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 isotonzado e fisiológico (pH 7,4). Durante os ensaios, as células foram mantidas sob agitação a 500 rpm, em banho-maria, a uma temperatura de $32 \pm 2^\circ\text{C}$.

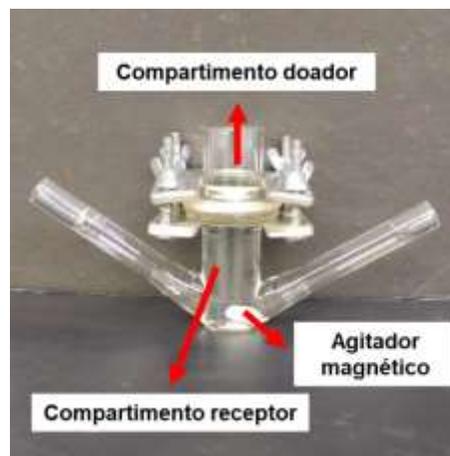


Figura 13. Célula de difusão do tipo Franz modificada, com filme entre os compartimentos doador e receptor.

Os estudos foram conduzidos por 72 h, realizando-se coletas de 1 mL do meio receptor nos seguintes intervalos de tempo: 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h, 9 h, 10 h, 11 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h e 72 h. O volume retirado da solução receptora a cada coleta foi sendo repostado com o meio receptor novo. As alíquotas coletadas do compartimento

receptor foram filtradas com membranas de porosidade de 0,45 μm e levadas ao CLAE para análise de naringenina. Esses experimentos foram conduzidos com 4 replicatas.

A quantidade liberada acumulada de naringenina a cada hora ao longo das 72 h de experimento foi calculada considerando as diluições do meio receptor após as coletas de acordo com a equação:

$$Q_{\text{real}, t} = C_{\text{mensurada}, t} \cdot V_r + V_a \cdot \sum^{n-1} C_a \text{ (Equação 7)}$$

onde: $Q_{\text{real}, t}$ = quantidade real liberada acumulada no tempo t

$C_{\text{mensurada}, t}$ = concentração mensurada da amostra no tempo t

V_r = volume do receptor (15 mL)

V_a = volume de amostra coletada (1 mL)

C_a = concentração de amostra coletada

Dessa forma, a quantidade real de naringenina liberada, acumulada em um determinado tempo t, é igual à quantidade medida no tempo t, somada à quantidade total coletada do compartimento receptor para quantificação das amostras em tempos anteriores.

A quantidade de naringenina liberada foi calculada nos intervalos de tempo estabelecidos, considerando o teor médio total de naringenina contido no filme, antes do experimento, conforme a seguinte equação:

$$\text{Porcentagem de naringenina liberada (\%)} = \text{QNL} / \text{QNF} \times 100 \text{ (Equação 8)}$$

onde: QNP = Quantidade de naringenina liberada (mg); QNF = Quantidade de naringenina quantificada no filme inicialmente (mg), que corresponde a 3 mg.

A cinética de liberação do IFA a partir do filme foi estimada aplicando os seguintes modelos cinéticos (Tabela 4): porcentagem acumulada de naringenina liberada vs. tempo (modelo de ordem zero), log da porcentagem acumulada de naringenina liberado vs. tempo (modelo de primeira ordem), porcentagem acumulada de naringenina liberado vs.

raiz quadrada do tempo (modelo de Higuchi), raiz cúbica da porcentagem de naringenina remanescente no filme vs. tempo (modelo de Hixson-Crowell) e porcentagem acumulada de naringenina liberada vs. log do tempo (modelo de Korsmeyer-Peppas). O maior valor do coeficiente de regressão (R^2) calculado para curva obtida indica a melhor linearidade e correlação e, portanto, o modelo cinético de liberação seguido pelo IFA incorporado ao filme.

Tabela 4. Modelos matemáticos aplicados ao estudo cinético de liberação de naringenina do filme. Adaptado de ZHANG *et al.* (2015).

Modelo Cinético	Equação
Ordem zero	$F = k_0 \cdot t$
Primeira ordem	$F = 100 \cdot (1 - e^{-k_1 t})$
Higuchi	$F = k_H \cdot t^{1/2}$
Hixson Crowell	$F = 100 [1 - (1 - k_\beta \cdot t)^3]$
Korsmeyer- Peppas	$F = k_{KP} \cdot t^n$

F = à quantidade (%) de naringenina liberada no tempo t ; k = constante de velocidade liberação; t = tempo do ensaio; k_H = constante de liberação de Higuchi; n = número de replicatas.

4.11. Estudos *in vitro* de permeação e retenção cutânea

Antes do início dos experimentos, a pele foi deixada por 30 min em contato com tampão fosfato para hidratação e o filme foi hidratado durante 1 min antes de ser aplicado sobre a pele.

As células de *Franz* foram então montadas com a pele de porco colocada entre os seus compartimentos doador e receptor. Os filmes de quitosana hidratados foram então 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 todo o tempo de experimento. O compartimento receptor 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). Durante os ensaios, as células foram mantidas sob agitação a 500 rpm, em banho-maria, a uma temperatura de $32 \pm 2^\circ\text{C}$.

Como solução controle, naringenina foi diluída na solução do meio receptor, a uma concentração de 1 mg/mL. A concentração foi definida de forma que se aproximasse da concentração contida na área do filme que ficou em contato direto com a pele. Para os

ensaios, 1 mL dessa solução foi colocado sobre a pele de porco, em cada compartimento doador.

Os ensaios foram conduzidos em quintuplicata para cada formulação, por um período de 72 h. Amostras da solução receptora foram coletadas nos seguintes intervalos de tempo: 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h e 72 h. Essas amostras foram filtradas em membranas de 0,45 μm e levadas para quantificação em CLAE.

As quantidades de naringenina permeada em função do tempo foram plotadas em um gráfico. O fluxo de permeação (J , $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) foi calculado a partir da inclinação da porção linear da quantidade cumulativa permeada por unidade de área *versus* tempo. O coeficiente de permeabilidade (K_p) foi calculado a partir de J , usando a seguinte equação (113):

$$K_p (\text{cm}/\text{h}) = J/C \text{ (Equação 9)}$$

onde: C corresponde à concentração de naringenina no compartimento doador.

Como dito anteriormente, as quantidades de naringenina foram plotadas em um gráfico com o tempo de liberação (t) e a quantidade acumulada liberada (C) por unidade de área de filme como função do tempo. Dessa forma, o equilíbrio é verificado quando o gráfico se torna linear. Os dados da porção linear podem então ser extrapolados, de modo a obter o intercepto da curva quando a quantidade acumulada liberada (C) por unidade de área de filme = 0, fornecendo o *lag time* - tempo que leva para começar a ocorrer a liberação.

Ao final do experimento de permeação, a pele foi retirada da célula de difusão, lavada com água e o estrato córneo foi então removido pela técnica de *tape stripping* (114), conforme descrito anteriormente no item 4.2.4. A pele remanescente foi picotada, com auxílio de tesoura, e colocada em frasco de vidro âmbar. Os pedaços de cada amostra de pele foram colocados, e foram adicionados 5 mL de metanol. Todos os frascos foram fechados com *parafilm* e deixados sob agitação por 24 h, a 500 rpm. As amostras foram filtradas em membranas de porosidade de 0,45 μm e quantificadas por CLAE.

4.12. Análise Estatística

Para as análises estatísticas dos dados foi utilizado o software GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk. Após confirmação da distribuição Gaussiana, foi aplicado o teste *t de Student* para comparação entre os grupos independentes em relação ao controle. Os resultados foram expressos como média \pm DP. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Padronização e validação do método analítico

A busca e análise bibliográfica permitiu encontrar 11 artigos científicos publicados em que se usa a cromatografia para detecção e quantificação de naringenina em diferentes matrizes, como plasma humano e de animais, sucos e sistemas nanoestruturados (Tabela 5). Contudo, nenhum estudo analítico publicado até o momento avaliou o biocomposto extraído de amostras de pele. Tendo em vista que a pele é uma matriz biológica complexa que apresenta inúmeros interferentes capazes de eluir junto com a substância de interesse, no presente trabalho buscou-se desenvolver e validar um método que permitisse quantificar de maneira seletiva e exata a naringenina extraída da pele para dar suporte a ensaios de permeação e penetração cutânea.

O método proposto neste trabalho baseou-se em metodologia validada por Bhandari *et al.* (2019), com modificações como composição da fase móvel, volume de injeção e vazão, para adequação à quantificação seletiva do analito de interesse (Tabela 6). Uma vez que o critério mais relevante para o método proposto é a resolução do pico referente à naringenina, a adaptação do método foi realizada a fim de isolar a eluição do pico do analito dos interferentes advindos da pele. Os parâmetros ajustados foram analisados por CLAE.

Tabela 5. Métodos analíticos publicados para determinação de naringenina em diferentes matrizes utilizando cromatografia.

Referências	Analitos	Deteção	Matriz
Bugianesi <i>et al.</i> (2002) (116)	Naringenina	Coulometria (900 mV)	Plasma humano
Kanaze <i>et al.</i> (2004) (117)	Naringenina e Hesperetina	UV (288 nm)	Plasma humano
Elgin, Konyalioglu e Kilinc (2009) (118)	Luteolina, Naringenina e Isoquercitrina	UV (230 nm) e Fluorescência (250 nm/ 450 nm)	Deteção em <i>Hypericum sp.</i>
Ribeiro e Ribeiro (2008) (119)	Naringina e Naringenina	UV (280 nm)	Sucos de laranja e toranja, naturais e industrializados.
Wan <i>et al.</i> (2011) (120)	Enantiômeros (R/S epímero) de Naringenina	UV (288 nm)	Plasma de ratos
Xiong <i>et al.</i> (2014) (121)	Naringina e Naringenina	LC-MS/MS	Plasma humano
Cerqueira e Silva (2014) (122)	Hesperidina, Naringenina, Naringina, e Poncirina	UV (240 e 280 nm)	Flavanonas em diferentes tipos de suco
Cordenonsi (2016) (123)	Naringina e Naringenina	UV (285 nm)	Nanopartículas, método indicativo de estabilidade e fotodegradação
Baranowska, Hejniak e Magiera (2016) (124)	Naringenina e Hesperetina	LC-MS/MS	Separação de enantiômeros.
Ni <i>et al.</i> (2016) (125)	Naringenina e Quercetina	LC-MS/MS	Plasma
Bhandari <i>et al.</i> (2019) (115)	Naringenina	UV (289 nm)	Nanocarreadores poliméricos e amostras biológicas (plasma e cérebro)

Tabela 6. Condições analíticas da metodologia proposta para quantificar naringenina nas formulações e em após experimentos *in vitro* de liberação e de permeação cutânea em comparação a uma metodologia previamente validada.

Condição	Metodologia validada por Bhandari <i>et al.</i> (2019) (115)	Método proposto
Coluna	Sunfire [®] , C ₁₈ (250 mm × 4,6 mm, 5 μm).	LUNA C ₁₈ Phenomenex (300 mm × 3,9 mm, 10 μm).
Fase móvel (v/v)	Metanol:ácido fosfórico 0,5% (70:30 v/v)	Metanol:Ácido fosfórico 0,01 mol/L (65:35 v/v)
Vazão (mL/min)	1,0	0,6
Volume de injeção (μL)	20	10
Comprimento de onda (nm)	289	290
Temperatura do forno (°C)	30	40

O método proposto demonstrou um número de pratos teóricos de $3503 \pm 22,18$, estando de acordo com o valor recomendado pelo FDA (126), que deve ser acima de 2000.

Outro parâmetro avaliado foi o fator de cauda, que diz respeito ao formato do pico no cromatograma, uma vez que fatores de cauda elevados dificultam a determinação da área do pico, podendo comprometer a integração e quantificação do analito. O fator de cauda idealmente deve estar em torno de 1,0 (126), e desse modo, o método mostrou-se adequado para determinação de naringenina, com fator de cauda de aproximadamente 1,2. A metodologia final possibilitou uma corrida de 10 min, com tempo de retenção da naringenina em 7,2 min, conforme mostrado na Figura 14.

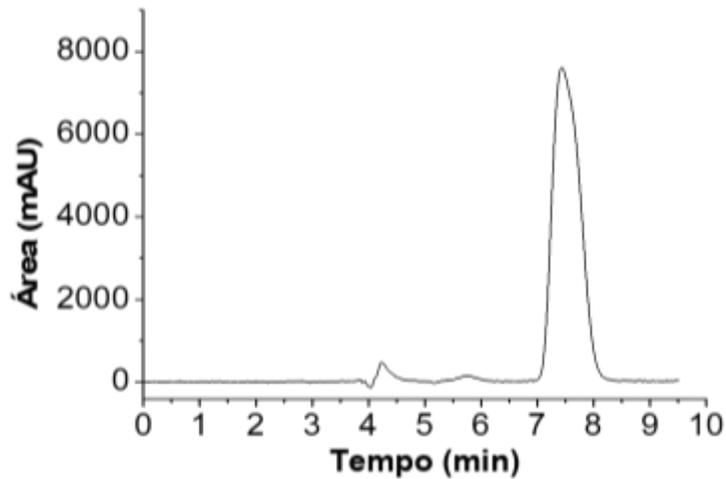


Figura 14. Cromatograma representativo de naringenina a 4 µg/mL dissolvida em metanol, com tempo de retenção da naringenina em 7,2 min. O método fez uso de uma coluna LUNA C₁₈ Phenomenex (300 mm x 3,9 mm, 10 µm) como fase estacionária. Fase móvel composta por metanol:ácido fosfórico 0,01 mol/L (65:35 v/v), vazão de 0,6 mL/min, temperatura de 40°C, volume de injeção de 10 µL e detecção a 290 nm.

5.1.1. Seletividade

Para que um método seja considerado seletivo, deve possuir a capacidade de medir exatamente um composto na presença de outras substâncias, como impurezas, produtos oriundos de degradação e compostos da matriz. A seletividade corresponde então à determinação de analito(s) em uma mistura complexa, sem interferência de compostos da mistura (105,127).

Os cromatogramas apresentados nas Figura 15 e Figura 16 demonstram que, após extração, todos os interferentes da pele apresentaram tempos de retenção diferentes do tempo de retenção da naringenina.

O procedimento de extração de naringenina, a partir do estrato córneo e pele remanescente, mostrou-se adequado. Consistiu em utilizar agitação magnética, por 24 h, utilizando metanol como solvente extrator. Esse método apresentou cromatogramas com poucos interferentes, e sem alterar a área de doseamento da naringenina, como pode ser observado na Figura 15.

O método proposto demonstrou eficiência na separação do pico de naringenina das matrizes biológicas, estrato córneo e pele de orelha de suínos, com tempo de retenção de 7,2 minutos (Figura 15). A resolução entre o pico de naringenina e o

interferente mais próximo foi de 2,7, apresentando-se em conformidade com o valor >2,0 esperado (126).

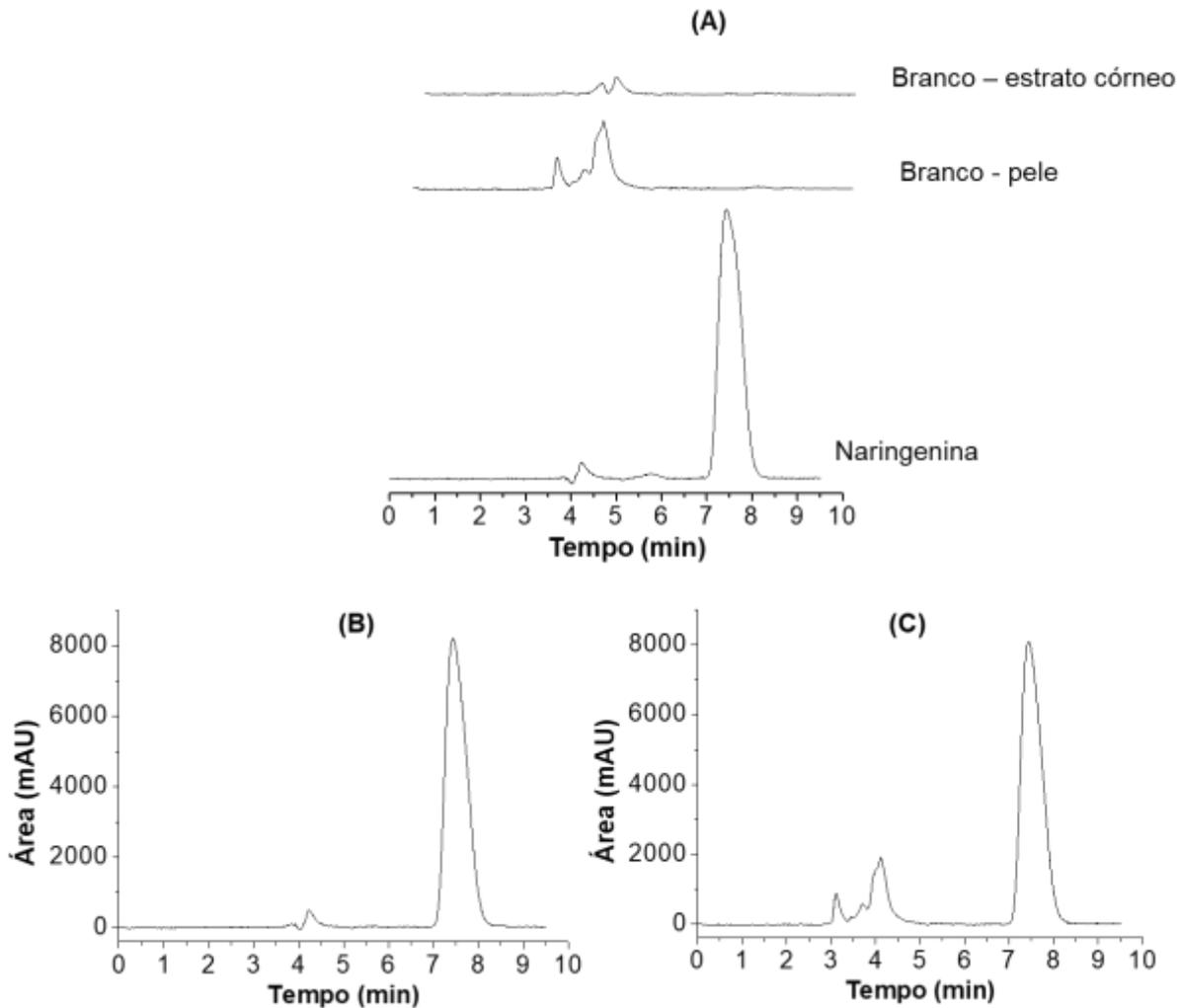


Figura 15. Cromatogramas representativos de naringenina: (A) Sobreposição dos cromatogramas de naringenina a 4,0 µg/mL, Brancos - extratos de estrato córneo e de pele de orelha suína, em metanol; (B) Naringenina com extrato metanólico de estrato córneo; (C) Naringenina com extrato metanólico de pele. Método de CLAE: coluna LUNA C₁₈ phenomenex (300 mm x 3,9 mm, 10 µm). Fase móvel composta por metanol:ácido fosfórico 0,01 mol/L (65:35, v/v), vazão de 0,6 mL/min, temperatura de 40 °C, volume de injeção de 10 µL e detecção a 290 nm.

A Figura 16 apresenta os cromatogramas referentes à injeção e leitura por CLAE de soluções de metanol, Pluronic® F127 (2,5% p/v) em tampão fosfato 0,01 mol/L (pH 7,4), solução preparada a partir do filme à base de quitosana obtido para incorporar a naringenina. A concentração teórica de naringenina para doseamento foi de 4,0 µg/mL.

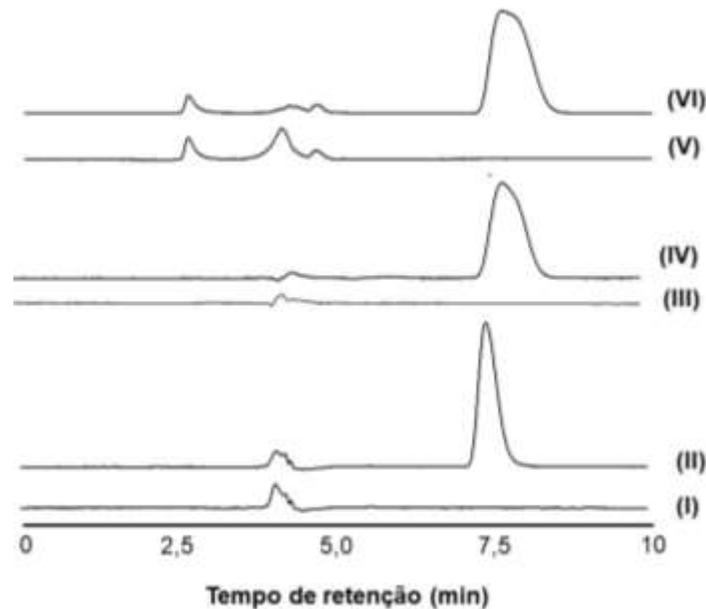


Figura 16. Cromatogramas (CLAE) referentes à injeções de soluções de: (I) Branco - Metanol grau HPLC; (II) Naringenina a 4,0 µg/mL, em metanol; (III) Branco tampão - Pluronic® F127 2,5% (p/v) em tampão fosfato (pH 7,4); (IV) Naringenina em solução de Pluronic® F127 2,5% (p/v) em tampão fosfato (pH 7,4); (V) Solução em metanol 1:5 (v/v) preparada a partir de filme de quitosana diluído em ácido acético e água 1:1 (v/v) na proporção 1:5 (p/v); (VI) Naringenina em filme de quitosana diluído na solução preparada em (V). Condições: coluna C18; fase móvel Metanol/Ácido fosfórico 0,01 mol/L 65:35 (v/v); 40 °C; vazão de 0,6 mL/min e injeção 10 µL; $\lambda = 290$ nm.

Conforme observado nos resultados obtidos, não houve qualquer interferência de nenhuma das substâncias da solução tampão (Figura 16 - III e IV) ou do filme de quitosana (Figura 16 - V e VI) no doseamento de naringenina (Figura 16 - I e II). Assim, o método cromatográfico pode ser utilizado para quantificação de naringenina, tanto nos filmes de quitosana desenvolvidos, quanto nos ensaios de liberação e permeação cutânea.

Além disso, o doseamento de naringenina nas soluções preparadas (Tabela 7) demonstrou que não houve alteração significativa de teor ($p < 0,05$), com exceção da solução preparada de Pluronic® F127 a 2,5% (p/v) em tampão fosfato (pH 7,4), considerando o limite de variação de 20% em relação à concentração teórica, valor preconizado tanto pelo ICH (127) quanto pela Anvisa (105). A diferença detectada no teor de naringenina na solução tampão deve-se ao efeito matriz dessa, que será discutido mais adiante.

Tabela 7. Teor de naringenina obtido após preparo de soluções a 4,0 µg/mL, por CLAE.

Soluções contendo naringenina a 4,0 µg/mL	Teor (%)
Metanol	99,06 ± 0,66
Extrato metanólico de estrato córneo	102,87 ± 0,53
Extrato metanólico de pele	101,57 ± 0,10
Solução de Pluronic® F127 (2,5% p/v) em tampão fosfato 0,01 mol/L (pH 7,4)	83,89 ± 1,13
Extrato metanólico do filme à base de quitosana	98,40 ± 0,24

Os dados são representativos da média de 3 determinações ± desvio-padrão.

A Figura 17 apresenta os cromatogramas referentes à análise por CLAE de soluções de hidrólise ácida e básica da naringenina, com peróxido de hidrogênio como potencial diluente de oxidação, e uma solução metanólica de naringenina a 4,0 µg/mL, utilizada para fins comparativos.

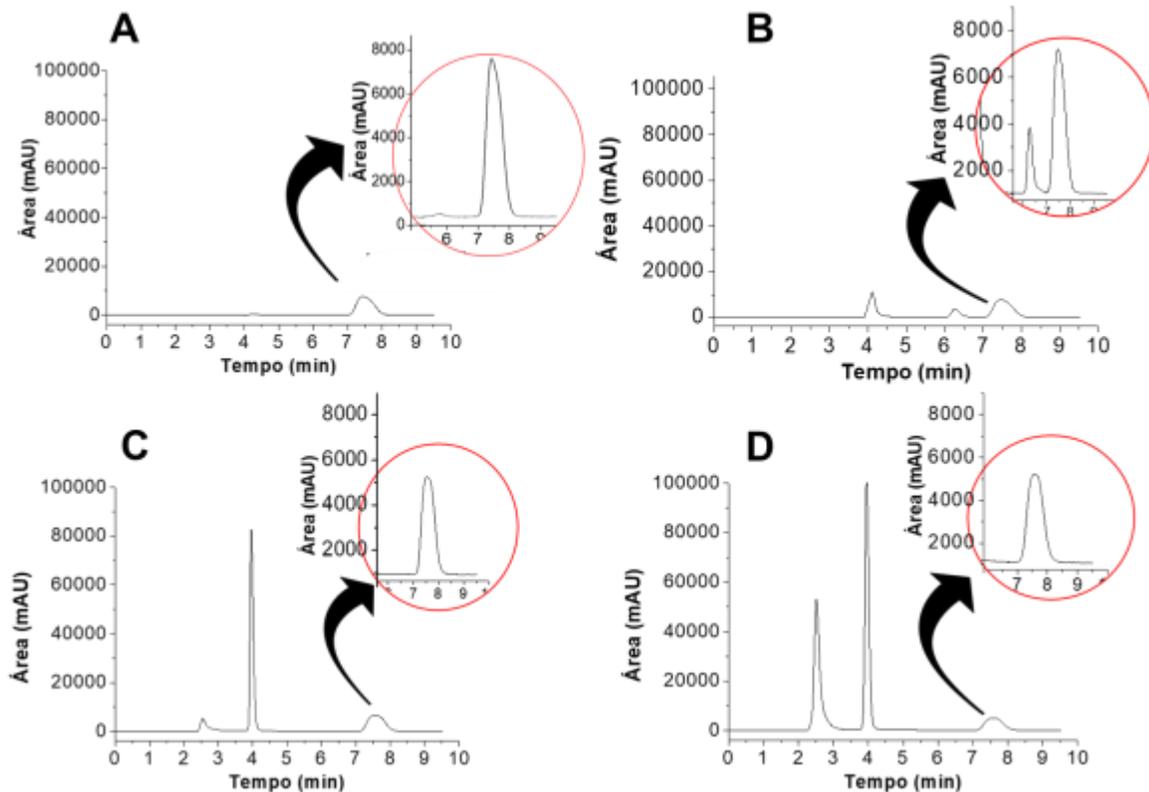


Figura 17. Cromatogramas (CLAE) referentes à injeções de soluções de: (A) Naringenina a 4,0 µg/mL; (B) Naringenina a 4,0 µg/mL diluída em peróxido de hidrogênio 25% (v/v); (C) Naringenina a 4,0 µg/mL após hidrólise ácida com HCl 1 mol/L; (D) Naringenina a 4,0 µg/mL após hidrólise básica com NaOH 1 mol/L. As setas representam a região de eluição da naringenina, com aumento das regiões indicadas, para melhor visualização. Condições cromatográficas: coluna C₁₈; fase móvel: metanol/ácido fosfórico 0,01 mol/L 65:35 (v/v); temperatura da coluna: 40 °C; vazão da fase móvel: 0,6 mL/min e volume de injeção: 10 µL; detecção a 290 nm.

Na solução de peróxido de hidrogênio a 25% (v/v) (Figura 17B), não houve redução significativa no teor de naringenina. O teor de naringenina correspondeu a 99,5% na solução de peróxido de hidrogênio e de 99,0% em metanol em relação à concentração teórica inicial, de 4,0 µg/mL (Figura 17A).

Com a hidrólise ácida (Figura 17C) em HCl 1 mol/L durante 6 h (60 °C) o teor de naringenina obtido foi de aproximadamente 87,10 % em relação à concentração teórica inicial (4,0 µg/mL). Foi possível observar formação de prováveis produtos de degradação (Figura 17), de características mais polares que a naringenina, surgindo no início da eluição, nos tempos de retenção 2,3 minutos e 3,9 minutos.

Sob condições de hidrólise alcalina (Figura 17D), em NaOH 1 mol/L, houve formação de prováveis produtos de degradação detectáveis, e que podem ser observados na Figura 17. Apresentam características mais polares que a naringenina e aparecem em tempo de retenção em torno de 2,5 minutos e 4,0 minutos. O teor de naringenina foi de aproximadamente 62,74% em relação ao padrão (concentração teórica inicial de 4,0 µg/mL). Na análise de hidrólise alcalina, após a adição da solução de NaOH 1 mol/L, houve mudança de coloração da solução de incolor para amarela, sem ocorrência de precipitação.

Considerando as duas condições de hidrólise, o decaimento de teor de naringenina foi mais significativo ($p < 0,05$, teste t de *Student*) em condições de exposição ao NaOH 1 mol/L do que ao ácido HCl 1 mol/L. Tendo em vista que o pK_a da naringenina é de 7,9, em meio alcalino ela estará na forma não-ionizada, o que pode expor a molécula a uma maior degradação. Contudo, não houve interferência dos prováveis produtos de degradação ácida e básica no tempo de retenção da naringenina.

Os resultados obtidos, após exposição da naringenina aos compostos acima, indicaram que o método foi seletivo e capaz de detectar e quantificar o analito, sem interferência dos produtos de degradação oriundos das soluções preparadas.

A análise de hidrólise, tanto ácida quanto básica, demonstra a necessidade de atenção ao pH no preparo de formulações contendo naringenina. O teor de naringenina foi reduzido, cerca de 20%, quando em pH básico. Entretanto, o método permitiu quantificar a naringenina mesmo na presença de produtos de degradação, pois não foram observadas interferências dos produtos gerados no tempo de eluição do flavonoide.

5.1.2. Linearidade

As curvas analíticas obtidas para naringenina dissolvidas nos dois meios testados estão representadas na Figura 18. A faixa de concentração de naringenina nas curvas foi de 0,5 a 10,0 µg/mL, utilizando tanto metanol como uma solução de tampão fosfato (pH 7,4) com 2,5% de Pluronic® F127 (p/v) como diluentes.

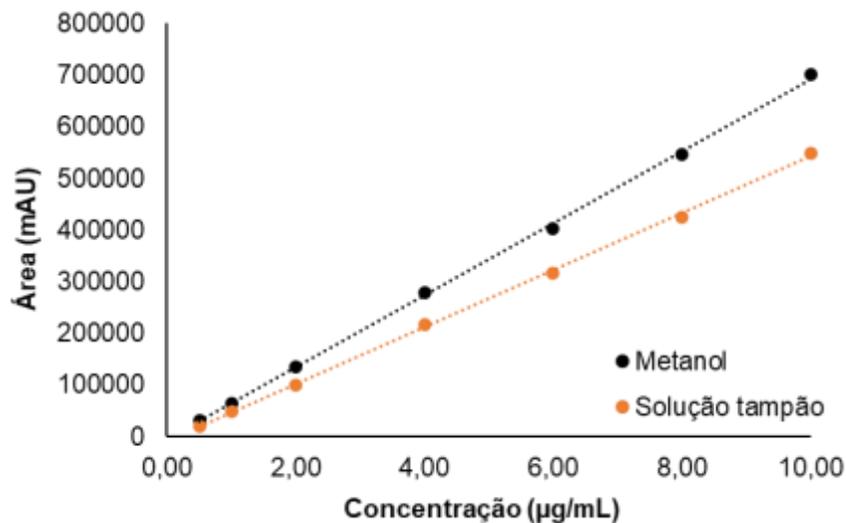


Figura 18. Representação gráfica da correspondência entre as curvas analíticas obtidas por CLAE, para naringenina. Concentrações diluídas em: Metanol grau HPLC. Equação da reta: $y = 69788x - 5504,3$ e coeficiente de correlação linear: $r = 0,9994$; Solução de tampão fosfato (pH 7,4) com 2,5% de Pluronic® F127® (p/v). Equação da reta: $y = 54980x - 7357,7$ e coeficiente de correlação linear: $r = 0,9993$.

Foi verificado efeito matriz da solução tampão na detecção do analito de interesse. A variação analisada foi de -21,21%, portanto, abaixo do limite aceito pela Anvisa (105) que é de 20%. Neste caso, foi verificada uma supressão de sinal significativa ($p < 0,05$), decorrente da interferência dos constituintes da solução tampão. Considerando essa variação, foram utilizadas duas curvas analíticas para a quantificação da naringenina nos experimentos *in vitro*: a metanólica para os ensaios de doseamento de naringenina na formulação ou em ensaios de retenção cutânea, e a curva em solução tampão fosfato para ensaios de liberação em membrana e de permeação cutânea.

Os resultados indicaram que houve correlação linear entre as áreas obtidas e a concentração de naringenina padrão, considerando tanto o metanol quanto o tampão

fosfato (pH 7,4) com Pluronic® F127® como diluentes. Por meio do estudo de regressão linear, foi obtida a equação de reta $y = 69788x - 5504,3$ com metanol como solvente, com coeficiente de correlação linear (r^2) = 0,9994 e $y = 54980x - 7357,7$, com solução de Pluronic® F127 a 2,5% (p/v) em tampão fosfato (pH 7,4) como diluente, com coeficiente de correlação linear (r^2) = 0,9993. De acordo com a inclinação das retas, pode-se afirmar que o método apresentou alta sensibilidade. A regressão linear foi significativa, de acordo com análise estatística realizada por meio de teste ANOVA ($p < 0,05$) e com desvio de linearidade não significativo.

Portanto, é possível verificar que o método apresentou linearidade na faixa de concentração entre 0,5 µg/mL e 10,0 µg/mL, tanto em metanol quanto em solução tampão, em conformidade com as normas estabelecidas pela Anvisa (105) e pelo ICH (127).

5.1.3. Precisão e exatidão

A precisão do método foi avaliada por meio do estudo de repetibilidade (precisão intracorridas) e precisão intermediária (precisão intercorridas). A tabela a seguir apresenta os valores de precisão obtidos para a naringenina em metanol na faixa de concentração de 0,5; 4,0 e 10,0 µg/mL.

Tabela 8. Análise da precisão e da exatidão intracorrida e intercorrida do método de quantificação para a naringenina diluída em metanol.

Concentração Teórica Naringenina ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração Experimental ($\mu\text{g/mL}$)		CV (%)	Exatidão (%)
Repetibilidade				
0,50	0,52 \pm 0,07		1,69	103,33
4,00	4,04 \pm 0,09		0,82	101,06
10,00	9,74 \pm 0,15		1,62	97,45
Precisão intermediária - analista 1				
	Dia 1	Dia 2		
0,50	0,51 \pm 0,07	0,51 \pm 0,07	1,27	101,29
4,00	3,94 \pm 0,10	3,82 \pm 0,09	1,30	96,82
10,00	9,71 \pm 0,11	9,77 \pm 0,14	1,14	97,70
Precisão intermediária - analista 2				
	Dia 1	Dia 2		
0,50	0,50 \pm 0,07	0,51 \pm 0,07	1,04	100,49
4,00	3,84 \pm 0,09	3,93 \pm 0,11	1,54	97,12
10,00	9,79 \pm 0,10	9,80 \pm 0,10	0,62	97,97

Os dados são as médias de 9 determinações \pm desvio padrão. CV: Coeficiente de variação, precisão.

Os valores de coeficiente de variação da análise de repetibilidade do método foram adequados. O método demonstrou alto grau de concordância entre os resultados, quando realizados sob as mesmas condições experimentais, com os coeficientes de variação abaixo de 2%. Quanto à variação da exatidão - que avalia a proximidade dos resultados experimentais em relação aos valores teóricos - os resultados também demonstraram concordância satisfatória, dentro do valor preconizado, de 95 a 105% (105,127).

Uma vez que as amostras para avaliação da precisão intermediária foram preparadas por um analista diferente, as amostras também mostraram precisão e exatidão conforme os critérios determinados.

5.1.4. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Com as curvas de calibração obtidas, calculou-se o valor do desvio padrão dos coeficientes lineares e a média dos coeficientes angulares respectivos, de modo que se

pôde calcular o LD da naringenina como sendo 0,16 µg/mL e o LQ, que foi igual a 0,49 µg/mL.

A partir dos valores calculados dos limites, foram preparadas soluções de naringenina em concentrações abaixo e acima dos LD e LQ teóricos. Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Demonstração experimental dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método cromatográfico para análise de naringenina.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)
0,10	0,13	8,40	124,83
0,20	0,20	2,55	99,57
0,30	0,30	1,39	99,96
0,40	0,44	0,40	110,99
0,50	0,52	1,29	103,72

Valores correspondem a média de 3 determinações.

Conforme pode ser observado na tabela acima, o LD experimental foi de 0,10 µg/mL o que difere pouco do valor calculado, que foi 0,13 µg/mL. Já o LQ experimental para a naringenina, com valores adequados de precisão (<2%) e exatidão (95-105%) (105,127), foi de 0,50 µg/mL, valor extremamente próximo ao calculado teoricamente. Valores abaixo dessa concentração não demonstraram quantificação exata de pico característico do analito.

Os resultados demonstraram que a partir de 0,50 µg/mL, houve aproximadamente 103% de concordância entre as amostras. Dessa forma, para doseamento de naringenina na formulação dos filmes e nos experimentos de liberação e de permeação, os limites são satisfatórios.

5.1.5. Estudos de recuperação da naringenina da pele

A porcentagem de recuperação de naringenina da pele foi avaliada, como forma de determinação da exatidão do método (105,127). Na Tabela 10 estão apresentados os

resultados da porcentagem recuperada de naringenina, após processo remoção do estrato córneo da pele dermatomizada de suínos.

Tabela 10. Porcentagem de recuperação de naringenina do estrato córneo e da pele dermatomizada, utilizando metanol como solvente extrator.

[] teórica (µg/mL)	Estrato córneo			Pele remanescente		
	[] experimental (µg/mL)	Recuperação (%)	CV (%)	[] experimental (µg/mL)	Recuperação (%)	CV (%)
0,5	0,56 ± 0,08	102,96	2,44	0,44 ± 0,08	88,68	2,81
4,0	3,81 ± 0,09	95,18	0,86	3,59 ± 0,10	89,82	2,48
10,0	9,53 ± 0,20	95,27	1,47	8,64 ± 0,18	86,43	2,46

Os dados são médias de 3 determinações ± desvio padrão. []: Concentração de naringenina; CV: Coeficiente de variação, precisão.

Os coeficientes de variação estão de acordo com as recomendações para métodos bioanalíticos (128,129), ou seja, abaixo de 15% em todas as camadas e concentrações analisadas. A porcentagem de recuperação de naringenina obtida foi acima de 86%, estando em conformidade com a literatura, em que são aceitáveis valores acima de 70% para ensaios de recuperação cutânea (130,131).

Em concordância com as normas preconizadas pela Anvisa (105) e pelo ICH (127), contanto que os parâmetros de precisão, linearidade e especificidade sejam bem estabelecidos, a exatidão pode ser inferida. Considerando os resultados obtidos até aqui, é possível afirmar que o método proposto se mostrou linear, seletivo, sensível, preciso e exato.

5.1.6. Robustez

Para simular variações operacionais mínimas, que podem acontecer durante análises de rotina, os parâmetros de temperatura, vazão e proporção de fase móvel, foram avaliados, por CLAE, em um desenho fatorial (2³), conforme descrito na Tabela 11. A resposta foi obtida em termos de área de pico, tempo de retenção e resolução da naringenina.

Tabela 11. Resumo estatístico da análise do desenho fatorial (2³) para análise de robustez do método de quantificação da naringenina.

Parâmetros	Respostas		
	Área	TR	Fator de cauda
Média	239289,00	7,695275	1,2900
T	-375,83	-1,92*	0,0400*
VF	-24259,50*	-0,81*	0,0020*
P	-1792,66	-0,384*	-0,0130

A média representa um conjunto de 8 variâncias da análise de naringenina a 4,0 µg/mL. T: temperatura do forno, em °C; VF: vazão da fase móvel, em mL/min; P: porcentagem de água na fase móvel, expressa em % (v/v). O asterisco indica valor de p significativo, com 5% de nível de significância.

Os resultados demonstram que a área do pico da naringenina sofreu influência apenas da vazão da fase móvel, de forma significativa ($p < 0,05$). Assim, quando ocorre aumento da vazão, a área diminui consideravelmente.

O tempo de retenção foi afetado de forma significativa pelas três variáveis. O aumento da temperatura do forno e da vazão da fase móvel influenciaram negativamente a resposta ($p < 0,05$), reduzindo o tempo de retenção. A redução da proporção de água na mistura de fase móvel também provocou uma redução do tempo de retenção. Essas variações eram previstas, tendo em vista que a naringenina é lipossolúvel, tendo uma facilidade de eluição maior com solventes orgânicos, como o metanol (59).

Modificações tanto na temperatura do forno quanto na vazão da fase móvel alteraram significativamente a resposta da resolução, que é um parâmetro que avalia a assimetria do pico. Com a redução da temperatura do forno e com a redução da vazão da fase móvel, foi observado um aumento do fator de cauda.

Os efeitos de interação secundárias e terciárias não foram significativos. Apesar da alteração de alguns parâmetros, principalmente em relação ao tempo de retenção, o método mostrou-se robusto, permitindo determinar quantitativamente o IFA. Nesse sentido, o teste demonstrou que, no método desenvolvido para quantificação da naringenina, pequenas alterações não devem comprometer a seletividade do método.

5.2. Avaliação *in vitro* do potencial anti-inflamatório da naringenina

A naringenina possui um grupo hidroxila no anel B (49-OH), o que pode estar relacionado com o potencial antioxidante e anti-inflamatório do flavonoide (132). Não há um consenso acerca da quantidade mínima de naringenina necessária para promover redução da inflamação. No entanto, já foi demonstrado que a naringenina é capaz de promover inibição da expressão de fatores inflamatórios, como TNF- α , na faixa de concentração de 3–30 $\mu\text{mol/L}$ (IC_{50} de 14,41 $\mu\text{mol/L}$), que corresponde a 0,82-8,28 $\mu\text{g/mL}$ (133).

Uma das formas de avaliar o potencial anti-inflamatório de uma substância consiste em verificar o efeito *in vitro*, na proliferação de linfócitos T. Um decréscimo na proliferação dessas células indica que o tratamento em estudo provoca um efeito supressor de inflamação (134). Nesse sentido, o tratamento com a naringenina provocou um efeito anti-inflamatório, fenômeno que pode ser observado por meio do decréscimo da proliferação demonstrado na Figura 19.

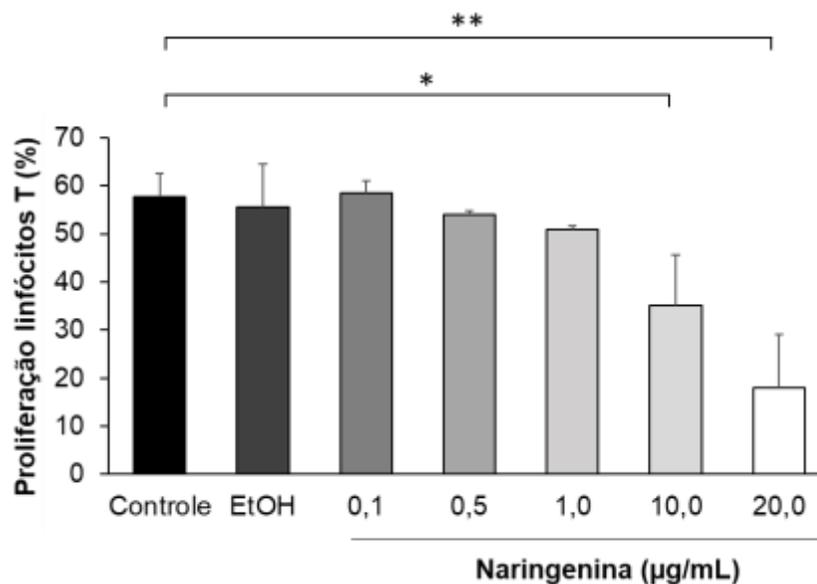


Figura 19. Avaliação da proliferação de células T em células mononucleares de sangue periférico, estimuladas por 72 h com diferentes concentrações de naringenina. Cada barra representa uma média de 3 determinações \pm DP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Controle – células sem tratamentos; EtOH – etanol.

Os linfócitos T são produzidos pela ativação do sistema imune inato, por um patógeno ou por alguma lesão celular ou tecidual, e desempenham um papel crucial no processo de inflamação, principalmente pela produção de citocinas. As citocinas e quimiocinas produzidas por essas células T efetoras recrutam e ativam uma variedade de células, que incluem macrófagos, iniciando reações inflamatórias. Portanto, a proliferação de células T é importante para fornecer uma resposta imune adequada (135).

A naringenina não inibiu a proliferação das células a 0,1 µg/mL e 0,5 µg/mL. Contudo, houve uma inibição significativa na proliferação de células T com 10,0 µg/mL, 36 µmol/L ($35,16 \pm 10,39\%$, $p < 0,05$), e 20,0 µg/mL, correspondendo a 73 µmol/L ($18,06 \pm 11,08$, $p < 0,01$) em relação ao controle. Resultados semelhantes foram observados em outro estudo (136), em que a naringenina reduziu a proliferação de linfócitos T em concentrações superiores a 25 µmol/L.

Para comprovar uma ação anti-inflamatória, espera-se uma redução da proliferação de linfócitos e de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 1-β (IL-1β). Além disso, a capacidade de estimular fator de crescimento transformador beta 1 (TGF-β1) e a interleucina-10 (IL-10) também demonstra um efeito anti-inflamatório. As citocinas desempenham papel crucial em reações inflamatórias. Elas são produzidas por vários tipos de células, como leucócitos que regulam a imunidade, a inflamação e a hematopoiese (137). A IL-10 é produzida por células *treg* tipo 1 (Tr1) e Tr3, e esta produz preferencialmente TGF-β1 e IL-10 em menor proporção (138).

O TGF-β1 também está envolvido no processo inflamatório. É produzido por vários leucócitos, incluindo linfócitos, macrófagos e células dendríticas, e sua expressão se dá de modo autócrino e parácrino, para controlar a diferenciação, proliferação e estado de ativação das células imunológicas (137). O TGF-β exerce um duplo papel, atuando como agente modulador de resposta inflamatória (139).

O TGF-β pode modular a expressão de moléculas de adesão tanto ao fornecer um gradiente quimiotático para leucócitos e outras células, participando da resposta inflamatória, quanto ao inibi-las assim que forem ativadas (137). Similarmente, a IL-10 é uma citocina pleiotrópica que também tem um duplo papel. Ela pode regular positivamente a expressão da citocina anti-inflamatória IL-1ra e também suprimir as

funções pró-inflamatórias de citocinas como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 (140). Dessa forma, essa citocina desempenha um importante papel na limitação da resposta imunitária (141).

Em contraposição à atuação da IL-10 e do TGF- β 1, um mediador que apresenta papel importante em reações inflamatórias é a IL-1 β , uma interleucina produzida por macrófagos, que atua como uma citocina pró-inflamatória (142).

Ao avaliar o efeito da naringenina em IL-1 β (Figura 20), observou-se que o tratamento com 1,0 μ g/mL (3,67 μ mol/L) foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,05$) a expressão de IL-1 β em aproximadamente 0,5x em relação ao grupo controle, o que não se manteve com uma concentração maior (10,0 μ g/mL ou 36,73 μ mol/L).

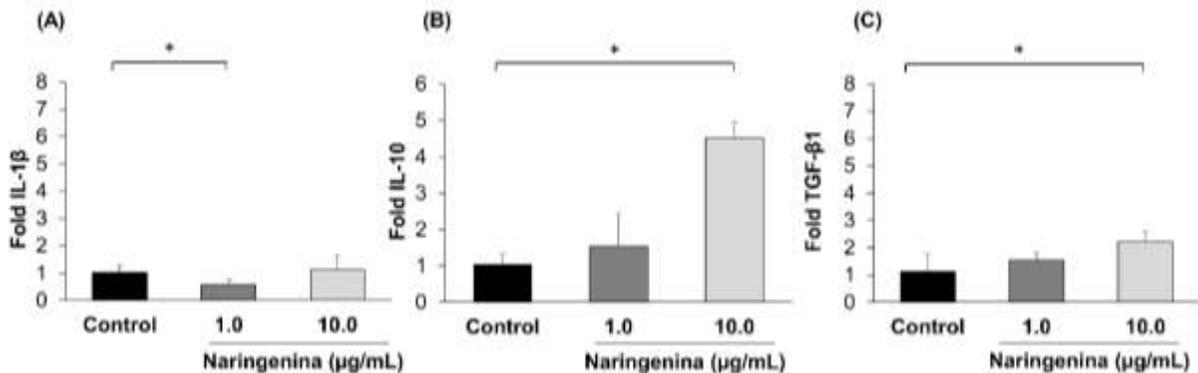


Figura 20. Efeito da naringenina na expressão de citocinas em células mononucleares de sangue periférico, após 72 h: IL-10, TGF- β 1 e IL-1 β . Cada barra representa uma média de 3 determinações \pm DP. * $p < 0,05$; Controle – células sem tratamentos.

Diferentes estudos demonstraram o potencial anti-inflamatório da naringenina, em experimentos *in vitro* e (143–145) e *ex vivo* (146). Apesar das diferenças nos mecanismos de ação, o efeito está associado à supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , o que corrobora com os resultados obtidos.

Houve aumento da expressão de IL-10 quando as células mononucleares foram tratadas com naringenina. Tal aumento não foi significativo ($p > 0,05$) para a menor concentração do naringenina (1 μ g/mL), mas significativo ($p < 0,05$) e de 4 vezes em relação ao grupo controle para o grupo tratado com 10,0 μ g/mL de naringenina. Da mesma forma, a expressão de TGF- β 1 foi aumentada em 2 vezes ($p < 0,05$) quando as células foram tratadas com 10,0 μ g/mL de naringenina, em relação ao controle. Os

grupos de CMSPs tratados com 1,0 µg/mL de naringenina, no entanto, não demonstraram aumento significativo ($p > 0,05$) na expressão dessas citocinas. Esses resultados sugerem que o efeito da naringenina na estimulação de citocinas anti-inflamatórias pode ser dose-dependente.

Assim, a análise conjunta dos dados apresentados na Figura 20 indica que, em maior concentração, a naringenina exerce seu efeito imunomodulador principalmente por meio da produção de fatores anti-inflamatórios, enquanto que, em menor concentração, exerce efeito anti-inflamatório por inibição de mediadores pró-inflamatórios, como a IL-1 β . Ressalta-se que os efeitos observados condizem com a resposta de células de três indivíduos diferentes, o que reforça a capacidade que o flavonoide apresenta no controle da inflamação.

5.3. Análise de compatibilidade IFA/excipientes

Os ensaios de compatibilidade entre a naringenina e a quitosana foram realizados colocando em contato os dois compostos a duas temperaturas distintas e realizando ensaios de análise térmica, com o intuito de prever qualquer instabilidade resultante dessa mistura ou tratamento. O objetivo principal era verificar se seria possível obter uma formulação contendo ambas as substâncias sem que haja perda de estabilidade principalmente por parte do flavonoide.

A naringenina é uma flavanona de estrutura cristalina, que apresenta ponto de fusão em torno de 255 °C (147,148). Na análise por DSC da naringenina (Figura 21-I), foi evidenciado um evento endotérmico a 253,7 °C, que corresponde, portanto, ao seu ponto de fusão. Esse pico não sofreu alteração com o tratamento térmico de 12 h a 60 °C implementado na amostra (Figura 21-II), uma vez que o pico de fusão se manteve a 253,4 °C após o tratamento.

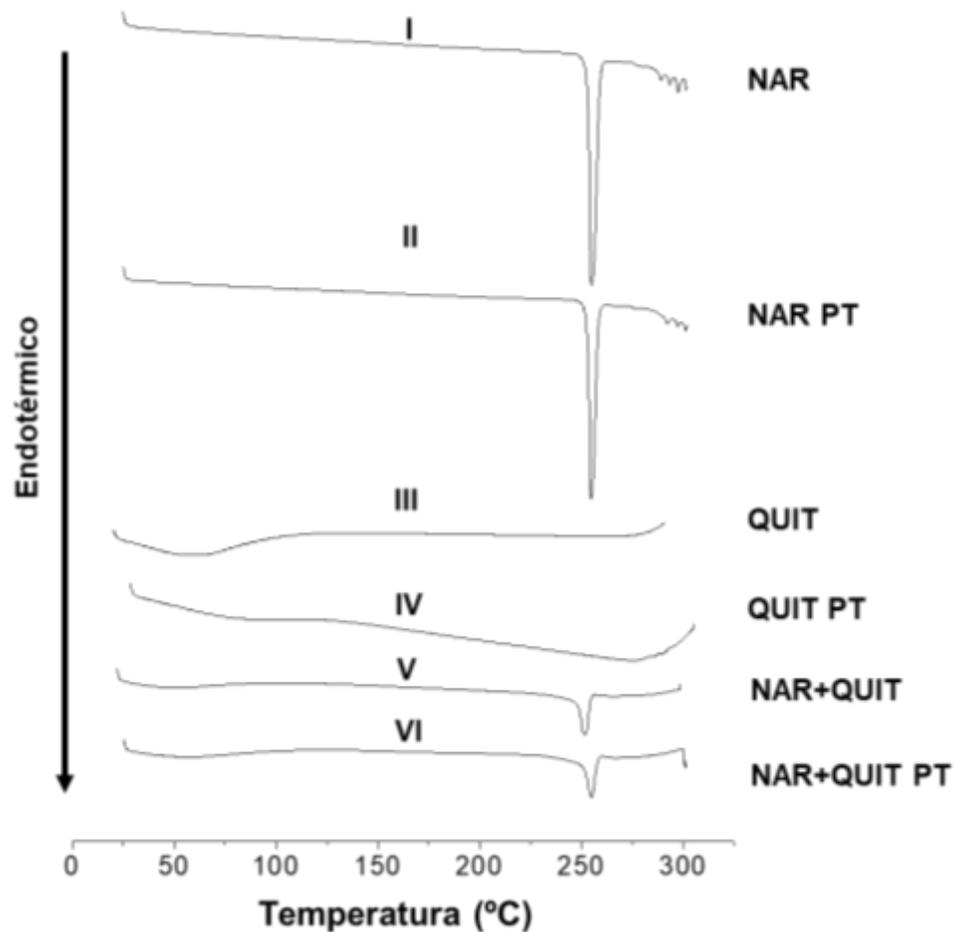


Figura 21. Análises de DSC de antes do tratamento térmico: I, III e V; após tratamento térmico: III, IV e VI. NAR: Naringenina; QUIT: Quitosana; NAR + QUIT: Mistura física de naringenina e quitosana 50:50 (p/p); PT: pós-tratamento térmico a 60 °C por 12 h.

Para a quitosana pura (Figura 21-III), um primeiro pico foi observado em torno de 59,23 °C e o segundo em 264,38 °C na amostra sem tratamento térmico e em 43,34°C (primeiro pico) e 272,27 °C (segundo pico) na amostra que passou pelo tratamento (Figura 21-IV). O primeiro evento térmico da quitosana é atribuído a uma perda de conteúdo de água (149). Pela grande quantidade de pontes de hidrogênio intra e intermoleculares em sua cadeia, a quitosana não apresenta ponto de fusão (150). Dessa forma, é possível inferir que o segundo pico pode ser atribuído ao início de degradação do polímero (151), que parece ter sido abreviado quando a amostra foi submetida ao tratamento térmico.

A análise de DSC da mistura física (Figura 21-V) demonstrou haver pouca interação entre o flavonoide e o polímero, já que o pico de fusão da naringenina sofreu pouco deslocamento, tendo sido detectado pico endotérmico a 251,09 °C na amostra sem tratamento térmico, e a 250,61 °C na amostra submetida ao tratamento (Figura 21-VI).

Com relação à temperatura de transição vítrea da quitosana, diferentes valores foram relatados na literatura, variando de -23 °C a cerca de 220 °C (152–155). A variação nos valores provavelmente se deve à dificuldade em identificá-la, por ser a quitosana semicristalina (149) e também pela grande quantidade de pontes de hidrogênio intra e intermoleculares em sua cadeia, (150). Além disso, por ser um polissacarídeo natural, a fonte e o método de preparação e purificação da quitosana podem influenciar na análise (153).

De acordo com as análises de TG (Figura 22), as amostras apresentaram padrão de degradação em uma etapa principal. A naringenina isolada sofreu perda de massa de 58,09% entre 215 °C e 446 °C, com uma perda inicial de aproximadamente 3,03%, na região entre 100 °C e 242 °C, redução que pode ser atribuída à evaporação de uma pequena parte de água durante o aquecimento. A perda de massa da amostra que passou pelo tratamento térmico foi de 56,87%, e a região inicial onde houve perda de massa de 3,03% tornou-se praticamente imperceptível após o tratamento térmico, o que reafirma a visão de que a amostra não era anidra.

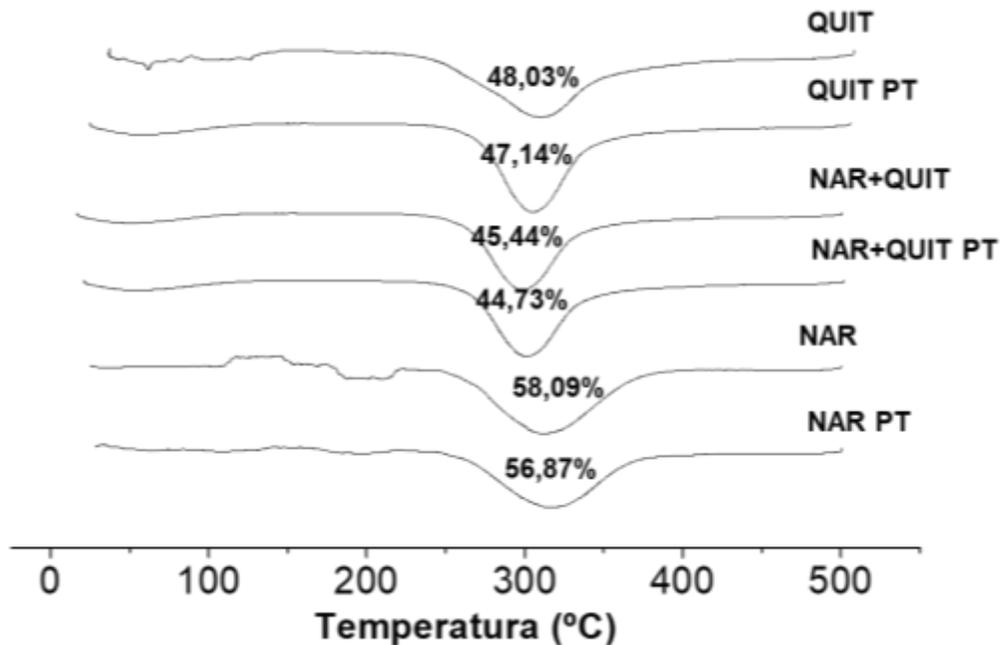


Figura 22. Primeira derivada de análise termogravimétrica (DrTG) da naringenina, da quitosana e da mistura física preparada com os dois compostos 1:1. Cada evento de perda de peso está indicado nas figuras como porcentagem (%). QUIT: Quitosana; PT: pós-tratamento térmico a 60 °C por 12 horas; NAR: Naringenina.

Para a quitosana isolada, as amostras sem tratamento e após tratamento mostraram perda de 48,03% a 195-468 °C e 47,14% na faixa de 191-448 °C, respectivamente.

A decomposição da mistura, por sua vez, ocorreu nas faixas entre 194-456 °C e 234-460 °C, considerando as amostras sem e após tratamento térmico, respectivamente. O padrão das análises demonstrou que não houve mudança significativa no perfil de degradação, sem separação de fases de decomposição das amostras. Tendo em vista que incompatibilidades entre ativos e excipientes podem comprometer a estabilidade, eficácia e segurança de um produto (156), os resultados aqui apresentados mostraram-se positivos. Os componentes analisados, IFA e polímero, parecem ser compatíveis entre si, o que favorece a estabilidade de formulações desenvolvidas.

O teor de naringenina foi determinado antes e após o tratamento térmico (Tabela 12).

Tabela 12. Doseamento de naringenina por CLAE, antes e após o tratamento térmico, a 60° por 12 horas. Concentração teórica a 4,0 (µg/mL).

Amostra de naringenina	Concentração experimental (µg/mL)
Sem tratamento	4,14 ± 0,09
Pós-tratamento (60 °C por 12 h)	4,04 ± 0,12

Os dados representam média uma triplicata ± desvio-padrão.

A análise comparativa demonstrou que o tratamento térmico não afetou o doseamento do flavonoide, conforme dados mostrados na Tabela 12. De fato, em estudo semelhante (157) foi demonstrado que o tratamento térmico da naringenina submetida a uma temperatura mais alta (130 °C) por um período mais curto (2 h) não apenas manteve as propriedades farmacológicas, como a atividade anti-inflamatória *in vitro*. Além disso, aumentou a capacidade antioxidante do flavonoide em esplenócitos, efeito que os autores atribuíram à geração de novos compostos (não identificados) resultantes do tratamento térmico.

5.4. Desenvolvimento de filmes à base de quitosana

A quitosana foi o polímero escolhido para o desenvolvimento dos filmes, por todas as características de biocompatibilidade, atoxicidade, estabilidade química e por ter se mostrado compatível com diferentes tipos de fármacos (98). De fato, os ensaios térmicos apresentados anteriormente demonstraram compatibilidade química entre a quitosana e a naringenina. Além disso, vários estudos têm mostrado que a quitosana atua como um promotor de absorção de fármacos na pele (17,21,22). Por fim, as cargas positivas do polímero garantem certa bioadesividade à quitosana, o que deve auxiliar na aderência na superfície da pele, característica altamente desejável para um filme de aplicação cutânea com efeito transdérmico.

Pelo grau de desacetilação maior que 75%, a quitosana escolhida tem a propriedade de favorecer uma liberação mais lenta, controlada e prolongada de fármacos associados a ela (19). Foram realizados testes com quitosana de médio peso molecular, utilizando os mesmos componentes citados. Contudo, não houve formação de filme íntegro, e por essa razão, os resultados não constam na Tabela 13.

Ao longo do desenvolvimento dos filmes à base de quitosana, diferentes testes foram conduzidos, introduzindo à formulação componentes já descritos na literatura (17–19,97). A natureza da quitosana permite a solubilidade em solução aquosa, pela facilidade de formação de grupos amina catiônicos (NH_3^+). Entretanto, para que isso aconteça, é necessário utilizar um meio ácido, que irá promover redução do pH da solução (158). Dessa forma, foram escolhidos ácido acético e ácido láctico no desenvolvimento das formulações. O propilenoglicol foi o componente da formulação escolhido por sua função plastificante, o que torna o filme mais flexível. Este componente também pode, assim como a quitosana, atuar como promotor de absorção de fármacos, por ser um agente solubilizante (18).

A Tabela 13 mostra as cinco composições testadas para preparo dos filmes a base de quitosana (>75% DD) acompanhadas de imagem dos filmes obtidos para cada uma dessas composições.

Tabela 13. Formulações testadas durante o desenvolvimento dos filmes de quitosana contendo naringenina.

	Quitosana >75% DD (%)	Ácido acético 2% (%)	Ácido lático e ácido acético 1:1 (v/v) a 2% (%)	PPG (%)	EtOH (%)	NAR (%)	Imagem
A	2,0	QSP	-	-	-	0,5	
B	2,0	QSP	-	20	10	0,5	
C	1,5	-	QSP	20	10	0,5	
D	1,5	QSP	-	20	10	0,5	
E	1,5	QSP	-	5	10	0,5	

PPG: Propilenoglicol; EtOH: Etanol; NAR: Naringenina.

Os dois primeiros testes de formulações (A e B) foram realizados dispersando 2% de quitosana em ácido acético a 2% (v/v), em que houve formação de um hidrogel.

As duas primeiras formulações (A e B) foram preparadas dispersando 2% de quitosana em acético 2% (v/v), mas na formulação B foi adicionado 20% (p/p) de propilenoglicol e 10% (v/p) de etanol com 0,5% (v/v) de naringenina, enquanto na formulação A, naringenina foi incorporada sem os álcoois. A dispersão direta da naringenina causou a formação de um filme heterogêneo (formulação A), o que pode ser atribuído à baixa solubilidade do flavonoide na formulação, enquanto a formulação B produziu um filme homogêneo e translúcido. De fato, a escolha pelo etanol foi baseada na alta solubilidade do flavonoide ($51,7 \pm 5,8 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 16) e considerando a menor toxicidade em comparação ao metanol (159).

No entanto, houve formação persistente de bolhas no filme obtido pela secagem da formulação B. Por isso, foi testada uma redução na concentração de quitosana para 1,5% em vez de 2% (formulações C, D e E). A diferença entre as formulações C, D e E foi a utilização de 1% de ácido láctico e 1% de ácido acético (formulação C) ao invés de apenas 2% de ácido acético (formulações D e E).

A proporção de quitosana de 1% (p/v) também foi testada, mas não foi possível observar, nesse caso, a formação de filme. Por isso, 1,5% (p/v) de quitosana foi a proporção escolhida, demonstrando formação de filmes íntegros (Tabela 13, Imagens C-E).

As formulações C, D e E apresentaram características organolépticas adequadas e, portanto, foram escolhidas para os ensaios de caracterização. Após esses estudos, observou-se que o propilenoglicol na concentração de 20% (p/p) nas formulações C e D dificultou a padronização das amostras dos filmes para posterior quantificação de naringenina, o que pode ser atribuído a um aumento da capacidade umectante do solvente quando utilizado acima de 10% (p/p) (160). Por esta razão, decidiu-se reduzir a proporção de propilenoglicol para 5% (p/p) – formulação E.

5.5. Caracterização dos filmes

Os filmes selecionados (Figura 23) foram caracterizados avaliando-se a espessura, força de rompimento, doseamento de naringenina e capacidade de hidratação.

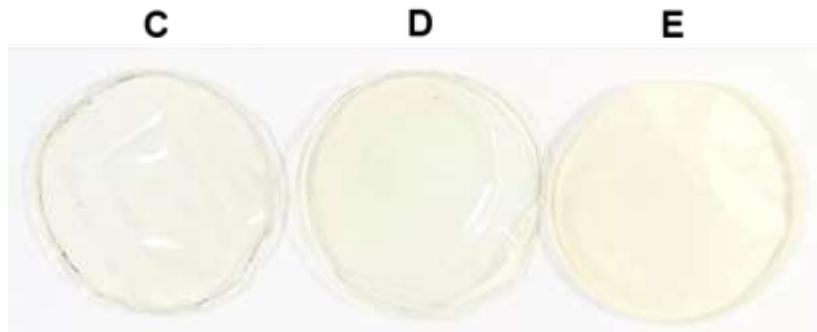


Figura 23. Filmes de quitosana >75% DD contendo naringenina (0,5% p/p). C – Filme de quitosana a 1,5% (p/p) preparado com 20% de propilenoglicol (p/p), 10% de etanol (v/v) em meio de ácido acético a 2% (v/v); D – Filmes de quitosana a 1,5% (p/p) preparados com 20% de propilenoglicol (p/p), 10% de etanol (v/v) em meio de ácido acético e ácido láctico 1:1 a 2% (v/v); E – Filmes de quitosana a 1,5% (p/p) preparados com 5% de propilenoglicol (p/p), 10% de etanol (v/v) em meio de ácido acético a 2% (v/v) QSP.

A formulação E permitiu a formação de um filme íntegro e opaco, diferente das formulações C e E. Além disso, o filme E apresentou-se mais seco ao toque, o que facilitou o manuseio para a realização dos ensaios de caracterização. Para que o filme de quitosana seja aplicado na pele, algumas características são importantes. Por exemplo, deve ser durável, resistente ao estresse, flexível e maleável. Além disso, o filme deve ser de fácil aplicação e remoção (161).

Todos os filmes apresentaram espessura uniforme (Tabela 14). A escolha do ácido acético como solvente para a quitosana pode promover uma maior força de integridade ao filme (89), além de contribuir para a uniformidade. No entanto, a contribuição do solvente depende dos outros componentes da formulação.

Com relação à força necessária para romper os filmes, que foi avaliada para medir sua resistência, o filme E apresentou a maior resistência ao rompimento ($8,81 \pm 0,18$ N), resultado que não foi significativamente ($p > 0,05$) diferente do filme D, enquanto o filme C apresentou a menor resistência à ruptura ($5,58 \pm 0,49$ N). Como a diferença de composição entre a formulação D e as demais consistiu no uso de ácido láctico para a dispersão do polímero de quitosana antes da secagem, conclui-se que o ácido acético foi mais eficiente nesse processo de dispersão para a formação de uma rede polimérica mais rígida para compor o filme.

Os filmes obtidos das formulações C e E demonstraram a maior homogeneidade na quantificação da naringenina, com $CV < 2\%$ (Tabela 14), enquanto o filme D

apresentou CV > 10% no doseamento de naringenina, o que denota possível problema de homogeneização do IFA no hidrogel durante o processo de secagem.

Tabela 14. Caracterização dos filmes quanto à espessura e teor de naringenina.

Filme	Espessura (mm)	Força de rompimento (N)	Teor (%)
C	0,06 ± 0,01	5,58 ± 0,49	107,76 ± 1,78
D	0,05 ± 0,01	8,14 ± 0,62	99,89 ± 10,43
E	0,04 ± 0,01	8,81 ± 0,18	98,29 ± 1,56

Valores correspondem à média de 3 determinações ± desvio-padrão.

Considerando a necessidade de bioadesão do filme com a pele, a capacidade de absorver água pode auxiliar nesse processo, melhorando a interação com o estrato córneo (158). Assim, a capacidade de cada filme em reter água foi avaliada por 20 min e os dados são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Capacidade de hidratação (%) dos filmes de quitosana, contendo naringenina.

Tempo	Filme		
	C	D	E
1 min	8,40 ± 1,60	5,63 ± 1,49	16,65 ± 0,52
5 min	15,33 ± 3,12	7,73 ± 1,74	23,97 ± 0,55
10 min	17,15 ± 3,66	8,44 ± 1,66	26,18 ± 0,49
15 min	18,14 ± 4,33	8,99 ± 1,76	27,04 ± 0,05
20 min	19,01 ± 4,56	10,01 ± 0,82	27,32 ± 0,18
30 min	19,15 ± 4,43	10,09 ± 0,81	27,48 ± 0,17

Valores correspondem à média de 3 determinações ± desvio-padrão.

Todos os filmes foram capazes de absorver água cada vez mais ao longo do tempo, mas a formulação E apresentou a maior capacidade total de intumescimento (121,15 ± 0,23%), enquanto a formulação D apresentou a menor (40,79 ± 0,39%). Os resultados sugerem que a presença de maiores concentrações de propilenoglicol no filme, que possui uma conhecida propriedade higroscópica, parece ter de alguma forma competido com a quitosana pela captação de água, reduzindo significativamente a formação de ligações intermoleculares entre a quitosana e as moléculas de água.

Assim, considerando principalmente parâmetros de resistência e doseamento (161), que são necessários para um dispositivo de aplicação transdérmica, além de sua

superior capacidade de retenção de água, o filme E foi selecionado para estudos posteriores.

Considerando que a adesão é necessária para que o filme seja bem aplicado na pele, nos estudos de permeação cutânea *in vitro*, o tempo de hidratação do filme foi definido em 1 minuto. Desta forma, a absorção de água da pele previamente hidratada deve proporcionar uma melhor adesão, tendo em vista que a partir de 5 minutos, o filme chega próximo de sua capacidade de absorção máxima.

5.5.1. Características organolépticas após 15 dias de acondicionamento

O uso de ácido láctico permitiu a formação de filmes mais translúcidos, de característica homogênea, com mínima formação de bolhas (Tabela 13, Imagem D, e Figura 24-C1). No entanto, após armazenamento por um período de 15 dias ao abrigo de luz e calor (Figura 24), observou-se alteração no aspecto tanto do filme preparado com solução de ácido acético, quanto do filme preparado com a mistura de ácido láctico e ácido acético. Os filmes apresentaram escurecimento, formação de regiões esbranquiçadas e enrijecimento (Figura 24-C1). Além disso, observou-se uma mudança significativa na coloração dos filmes e perda da maleabilidade.

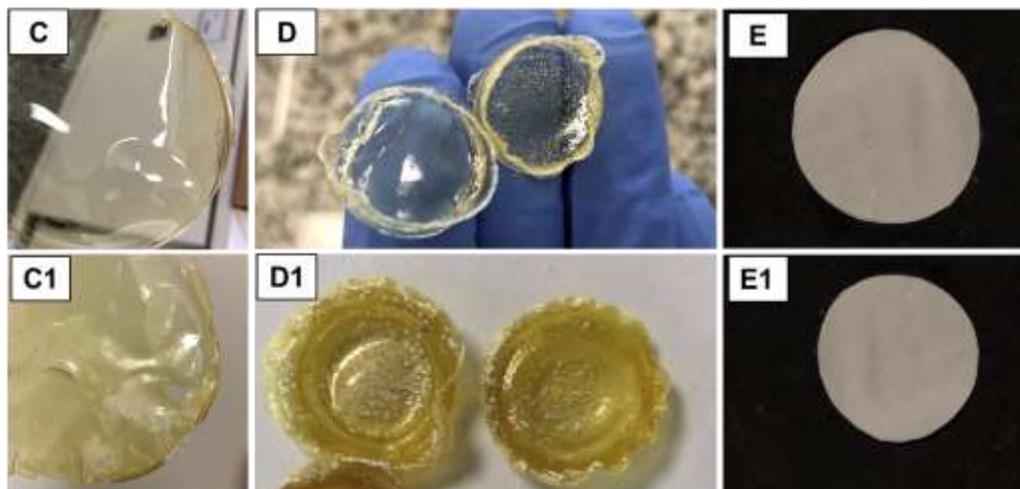


Figura 24. Filmes de quitosana >75% DD C, D e E, contendo naringenina (0,5% p/p). C1, D1 e E1 – Filmes após acondicionamento de 15 dias, ao abrigo de luz e calor.

As modificações das características dos filmes C e D da Figura 24 podem ser atribuídas a um teor maior de umidade captada, decorrente da proporção de propilenoglicol na formulação. Essa propriedade pode contribuir para uma liberação mais rápida do flavonoide do filme, por permitir que uma maior quantidade de água seja absorvida pelo filme (17).

Contudo, a concentração é um fator importante, pois a capacidade umectante do solvente aumenta a viscosidade da formulação quando em concentrações acima de 10% (p/p), o que pode resultar em um retardo na liberação das substâncias (160).

Adicionalmente, observou-se uma maior dificuldade na padronização de amostras dos filmes para posterior quantificação da naringenina. Por essas razões, optou-se por reduzir a proporção de propilenoglicol para 5% (p/p).

Por fim, a imagem E da Figura 24 corresponde ao filme formado com 5% de propilenoglicol. Ao contrário de todos os outros testados, o filme formado apresentou-se na coloração amarela clara e permitiu quantificar a naringenina de forma mais padronizada, pois foi possível pesar amostras de regiões diferentes para avaliar homogeneidade. Após 30 dias de acondicionamento, não houve mudança de coloração ou maleabilidade ao tato (Figura 24-E1). Também foi testado o uso da solução de ácido acético e ácido láctico a 1:1 a 2% (v/v), mas os filmes obtidos não permaneceram estáveis. Foi observada mudança de coloração, com escurecimento, e todos – inicialmente retos – enrolaram-se como um papiro, sugerindo um aumento da umidade.

O filme da imagem E da Tabela 13 possui marcações circulares, para demonstrar que também foi possível delimitar a área equivalente da célula de difusão do tipo Franz, para análise mais precisa do teor de naringenina aplicado em ensaios *in vitro* de liberação e permeação.

Dessa forma, a formulação que se mostrou mais adequada consistiu em: 1,5% de quitosana >75% DD dispersa em solução de ácido acético a 2% (v/v), em uma quantidade de 85% da formulação total. Foi adicionado 5% de propilenoglicol e 0,5% de naringenina diluída EtOH, de modo que a quantidade do solvente equivalesse a 10% (v/p).

5.6. Estudos de estabilidade química dos filmes de quitosana contendo naringenina

A avaliação de teor de naringenina contida nos filmes de quitosana foi conduzida ao longo de 90 dias de estudo de estabilidade acelerada, por meio de quantificação de amostras por CLAE, para verificação da estabilidade química das formulações.

Os resultados obtidos a partir das análises realizadas no estudo, nas três condições de temperatura: ambiente ($25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$), câmara climática ($40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$), e refrigeração ($4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$) encontram-se dispostos na Figura 25. As amostras foram analisadas em porcentagem de decaimento de teor, e por isso, partiu-se de 100% no tempo 0 dias.

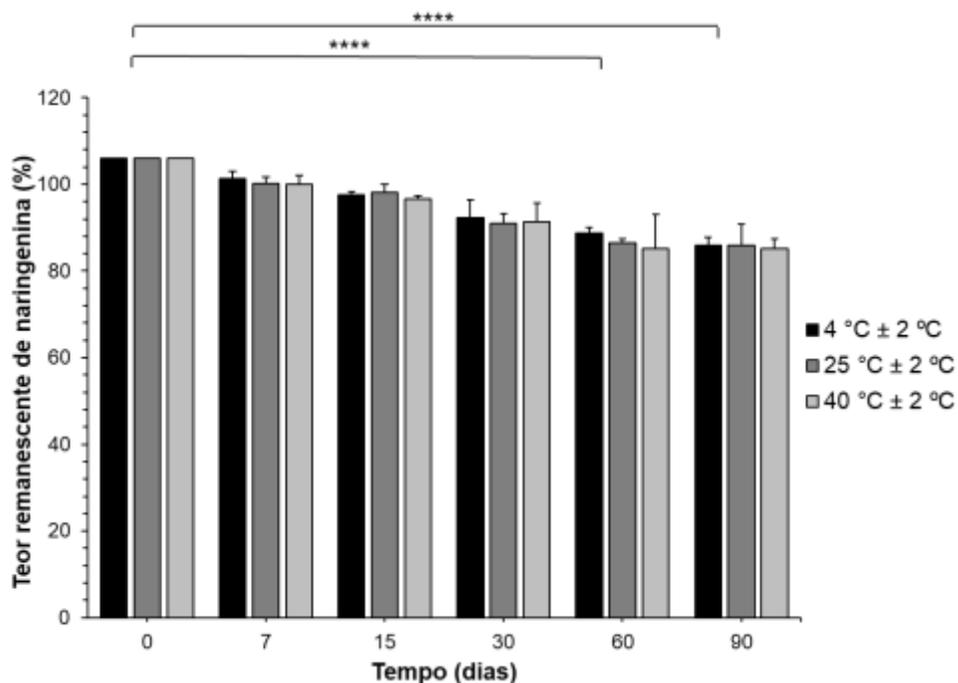


Figura 25. Avaliação do teor de naringenina contida nos filmes de quitosana ao longo do período do estudo de estabilidade acelerada (90 dias) em 3 condições de temperatura: ambiente ($25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$), câmara climática ($40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$), e refrigeração ($4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$). Cada barra representa uma média de 3 determinações \pm DP. **** $p < 0.0001$.

De acordo com a literatura, o teor pode sofrer uma variação durante o período de estabilidade de até 10% em relação à concentração inicial (111,162,163). Dessa forma, considera-se que a formulação permanece estável durante o período no qual o doseamento é equivalente ou superior a 90%.

Entre as três condições de temperatura, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) no doseamento de naringenina ao longo dos 90 dias. Os resultados sugerem, portanto, que a condição de temperatura de armazenamento não afeta de forma tão significativa a estabilidade do flavonoide. O tempo de armazenamento, no entanto, demonstra que ocorre um decaimento progressivo no teor.

A partir de 60 dias, foi observado um decaimento significativo no teor de naringenina, nas condições de armazenamento a 4 °C, 25 °C e 40 °C, com valores aproximados de 88,6%, 86,4% e 85,1%, respectivamente.

Com base nos dados, pode-se afirmar que a estabilidade química das formulações pode ser garantida por um período de 30 dias, independente da condição de temperatura de armazenamento. Entretanto, mesmo após 90 dias de armazenamento, o doseamento de naringenina demonstrou um decaimento de cerca de 15%, uma perda pequena ao levar em consideração que compostos de origem natural tendem a sofrer uma maior degradação quando isolados na formulação, pela maior exposição molecular ao ambiente externo (83).

As características organolépticas, como cor, aspecto e maleabilidade ao tato também foram avaliadas ao longo do tempo de estudo (Figura 26). Os filmes armazenados na geladeira não demonstraram alteração de cor, flexibilidade ou aspecto. O armazenamento à temperatura ambiente promoveu um leve escurecimento dos filmes, a partir de 30 dias, alteração condizente com o início de decaimento significativo ($p < 0,05$) de teor de naringenina. Já a condição de armazenamento a 40 °C provocou alterações significativas, com escurecimento a partir de 7 dias, além de crescente rigidez dos filmes ao longo do período de armazenamento. Essas alterações também foram observadas com os filmes preparados sem naringenina, sob as mesmas condições de armazenamento (Figura 27).

Tempo (dias)	Condição		
	Refrigeração	Ambiente	Câmara climática
0			
7			
15			
30			
60			
90			

Figura 26. Fotos de filmes à base de quitosana, preparados com 0,5% (p/p) de naringenina, ao longo de 90 dias de armazenamento, em três condições de temperatura: refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e câmara climática ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Para comparação, foram preparados filmes com a mesma formulação, mas sem naringenina (Figura 27). Observou-se o mesmo padrão de alteração de coloração, além de enrijecimento dos filmes. Comparando os filmes contendo a naringenina, é possível observar que as alterações podem indicar uma instabilidade conferida pela quitosana, quando há exposição por período prolongado em altas temperaturas.

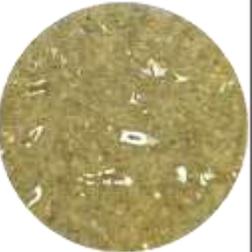
Tempo (dias)	Condição		
	Refrigeração	Ambiente	Câmara climática
0			
90			

Figura 27. Fotos de filmes à base de quitosana, preparados sem naringenina, antes e após 90 dias de armazenamento em três condições de temperatura: refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e câmara climática ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Biopolímeros, como a quitosana, são atrativos por serem atóxicos, biocompatíveis, biodegradáveis e muitas vezes, apresentarem baixo custo. Contudo, apresentam algumas desvantagens em relação a polímeros sintéticos, especialmente no que diz respeito à sensibilidade à água e propriedades mecânicas que conferem menos resistência, menos flexibilidade e elasticidade. Além disso, podem ser menos estáveis (164).

Essa pode ser uma das justificativas para a carência de estudos de estabilidade com filmes à base de quitosana, mesmo em trabalhos que realizam ensaios minuciosos de caracterização dos filmes (89,165). Além disso, o trabalho de Nguyen *et al.* (2020)

(101), por exemplo, é um dos poucos que apresenta fotos dos filmes produzidos, notavelmente translúcidos, porém, de coloração amarelada intensa, - característica não explorada pelos autores - que também foi observada durante o período de armazenamento dos filmes desenvolvidos neste trabalho.

Apesar das desvantagens, de acordo com a literatura, as dificuldades de trabalhar com biopolímeros podem ser superadas ou melhoradas pela formação de associações intermoleculares por técnicas de reticulação enzimática, física e química. A reticulação (irradiação de polímeros com consequente aumento do peso molecular) pode ser usada para aumentar a resistência mecânica e a estabilidade química, controlar a permeabilidade e solubilidade aquosas, reduzindo as características de intumescimento aquoso de matrizes à base de quitosana (166).

Outra opção viável para melhorar as características da matriz à base de quitosana e promover aumento da estabilidade compreende o uso combinado com outros polímeros, como o poli(ácido 3-hidroxi-butírico) (PHB) e o poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (167). Seriam necessários testes adicionais para verificar se a adição de outro tipo de polímero na matriz poderia prolongar o tempo de estabilidade da naringenina, tendo em vista que a condição de temperatura de armazenamento não afetou o teor, mas comprometeu as características organolépticas dos filmes. Isso sugere que a estabilidade pode ter sido comprometida pela quitosana.

Apesar de demonstrar estabilidade por 30 dias, salienta-se que a formulação não apresenta nenhum tipo de conservante ou antioxidante sintético, como por exemplo, o hidroxitolueno butilado (BHT), comumente utilizado para retardar a perda de eficiência de antioxidantes naturais em produtos cosméticos e farmacêuticos (168). Considerando a naringenina uma substância de origem natural, com característica antioxidante e que demonstrou ação anti-inflamatória, os resultados apontam que pode haver necessidade de combinar técnicas adicionais no preparo e de incorporar outras substâncias que prolonguem o tempo de estabilidade do flavonoide nos filmes desenvolvidos.

Ressalta-se ainda que, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um filme à base de quitosana, contendo um flavonoide. Nesse sentido, as condições de armazenamento do estudo de estabilidade são extremas, e servem para investigar

possíveis alterações que o filme possa apresentar ao longo do tempo. Dessa maneira, é possível propor ajustes na formulação, com o intuito de aprimorar o desempenho do filme.

5.6.1. Solubilidade da naringenina

Em ensaios *in vitro* que envolvem difusão, como é o caso dos ensaios de liberação e de permeação cutânea *in vitro*, é importante assegurar a ocorrência em condições *sink*. Isso significa que a concentração da substância na solução receptora desses experimentos não deve ultrapassar 10% da sua solubilidade no meio (169). Essa condição deve ser mantida durante todo o experimento, para garantir, portanto, a difusão da substância sem saturação do meio receptor.

Assim, a solubilidade da naringenina foi determinada em 13 solventes ou meios aquosos diferentes e os resultados estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Solubilidade de Naringenina (mg/mL) em diferentes solventes e meios testados.

Solvente / Meio	Solubilidade (g/L)
Acetona	123,63 ± 6,46
Acetonitrila	13,90 ± 3,08
Álcool isopropílico	44,28 ± 2,03
Etanol 50%	5,17 ± 2,31
Etanol 100%	51,74 ± 5,37
Metanol	45,70 ± 1,13
Tampão fosfato + 0,25% de Tween 80	0,06 ± 0,02
Tampão fosfato + 0,5% de Tween 80	0,19 ± 0,14
Tampão fosfato + 1,0% de Tween 80	0,32 ± 0,14
Tampão fosfato + 20% de propilenoglicol	0,16 ± 0,01
Tampão fosfato + 40% de propilenoglicol	0,57 ± 0,02
Tampão fosfato + 60% de propilenoglicol	1,07 ± 0,20
Tampão fosfato + 2,5% de Pluronic® F127	10,14 ± 0,16

Todas as soluções foram diluídas em metanol (1:1000 v/v) para análise em HPLC. Os dados são médias de 3 repetições ± desvio padrão.

Pode-se observar que os solventes orgânicos, como acetona, etanol e metanol, foram os que melhor solubilizaram o IFA, o que era esperado tendo em vista a característica apolar da molécula da naringenina (Log P = 2,52) (24).

O uso de tensoativos em um meio receptor pode contribuir para aumentar a solubilidade de substâncias. O mecanismo de ação consiste basicamente na formação de micelas, que aumentam a solubilização dos ativos à medida que a concentração de tensoativos aumenta (170). Isso porque abaixo da concentração micelar crítica (CMC), o tensoativo adicionado à solução permanece na forma de monômero ou adsorve na superfície da solução, mas acima da CMC, a quantidade adicional forma as micelas (171).

A ação de tensoativos da solução receptora não deve comprometer a integridade da membrana (172). Nesse sentido, tensoativos não-iônicos, como Tween® e Pluronic® F127 mostram-se adequados, sendo menos tóxicos e menos irritantes para aplicação em formulações tópicas (170).

Dos tensoativos analisados nesse ensaio de solubilidade, Pluronic® F127 demonstrou solubilizar cerca de 10 mg/mL de naringenina, aproximadamente 10 vezes mais em relação às soluções contendo Tween® em diferentes proporções.

Além dos tensoativos, a solubilidade da naringenina em soluções diferentes proporções de propilenoglicol em tampão fosfato foram testadas. O propilenoglicol foi testado devido ao efeito conhecido como agente solubilizante (160,173). Sabe-se que em altas concentrações, pode também mudar o coeficiente de partição (estrato córneo:veículo) de um fármaco (75). Contudo, mesmo em alta concentração (60%), a solubilidade da naringenina foi baixa, em comparação à solução contendo Pluronic® F127.

O filme preparado para aplicação na área de difusão da célula (1,76 cm²) possui, em média, 1 mg de naringenina. Assim, com o intuito de garantir as condições *sink* nos ensaios *in vitro* de liberação e permeação cutânea, considerando que o volume total de solução receptora utilizada em cada célula é de 15 mL, a solução Pluronic® F127 mostrou-se mais apropriada.

5.6.2. Estudos de liberação *in vitro*

O estudo do perfil de liberação da naringenina foi realizado para se verificar a interação que o controle e o filme de quitosana exercem sobre a liberação da naringenina em meio fisiológico. Dessa forma, o perfil de liberação da naringenina em função do tempo em um intervalo de 72 h está apresentado na Figura 28.

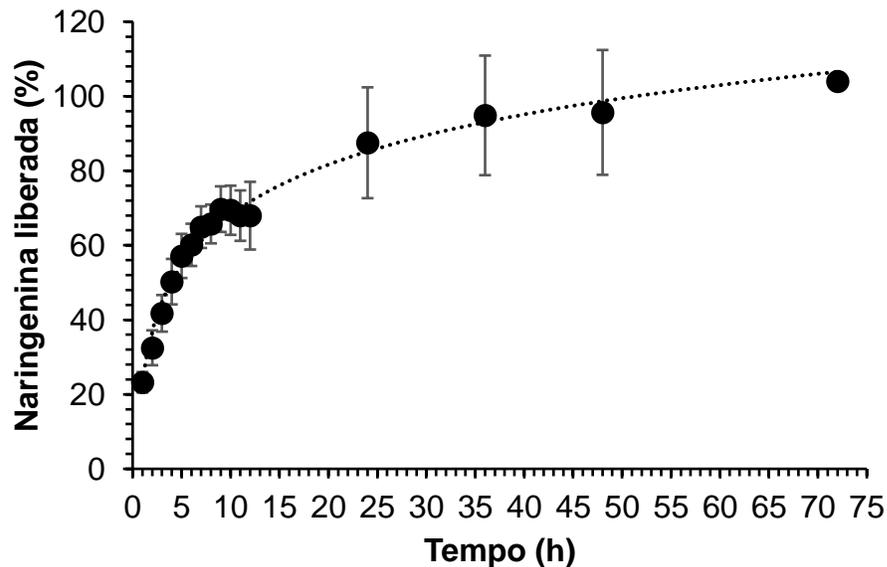


Figura 28. Perfil de liberação (72 h) da naringenina a 0,5% (p/p) do filme de quitosana >75% DD, em solução tampão fosfato 0,01 mol/L (pH 7,4) com 2,5% (p/v) de Pluronic® F127. Resultados correspondem à média \pm desvio-padrão; n = 4.

O perfil obtido mostra 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 sendo sustentada até o final do experimento, quando houve a liberação de 100% do IFA.

Este efeito inicial de liberação acelerada (*burst*) é importante em um sistema transdérmico para garantir que um depósito do flavonoide seja rapidamente formado no estrato córneo, garantindo que um gradiente de concentração se forme e se estabeleça um fluxo de naringenina 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 flavonoide ao longo desse tempo (17).

Para se compreender o mecanismo pelo qual o IFA era liberado do filme, o perfil de liberação da naringenina foi analisado segundo vários modelos cinéticos, e os gráficos obtidos, bem como os coeficientes de correlação lineares estão apresentados na Tabela 17 e na Figura 29.

Tabela 17. Modelos cinéticos aplicados para o perfil de liberação da naringenina a partir do filme de quitosana e respectivos coeficientes de correlação obtidos para as curvas.

Modelos	Correlação (R²)
Ordem zero	0,69
Primeira ordem	0,97
Higuchi	0,86
Korsmeyer-Peppas	0,91
Hixson-Crowel	0,84

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 (174). 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 (93).

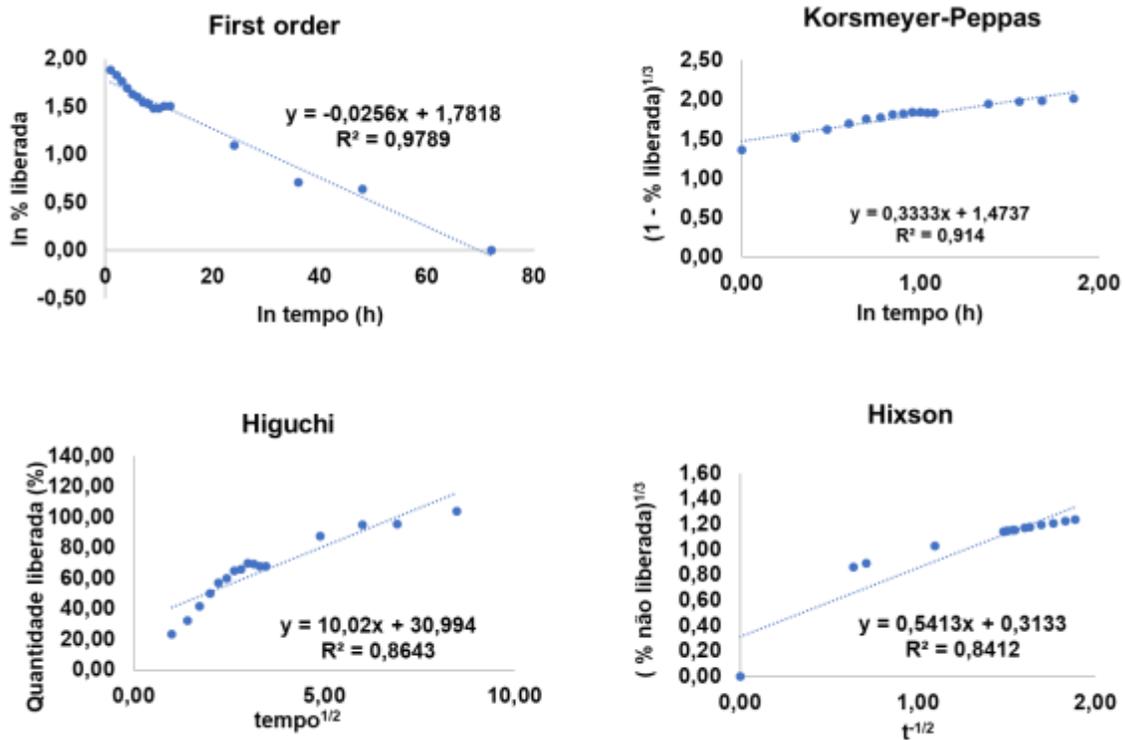


Figura 29. Análise de correlação por cinética de liberação de naringenina com aplicação nos modelos de primeira ordem, Kormeyer-Peppas, Higuchi e Hixson. t: tempo.

A aplicação do modelo Korsmeyer-Peppas correlaciona a difusão do fármaco e o inchamento/relaxamento da rede polimérica, além da transferência de massa conforme as características estruturais e geométricas da forma farmacêutica. Esse modelo é muito utilizado em estudos de matrizes poliméricas (93).

O valor do coeficiente 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 (Figura 29) sugerem, portanto, um mecanismo de transporte que combina a difusão do IFA (transporte Fickiano, primeira ordem) e transporte anômalo (não-Fickiano), em que ocorre, ao mesmo tempo, difusão pela matriz e relaxamento das cadeias poliméricas (174).

5.6.3. Estudos de permeação cutânea *in vitro*

Os estudos *in vitro* de permeação da naringenina através da pele de orelha de suínos foram realizados por um período de 72 horas tanto com o filme de quitosana quanto com um controle do IFA disperso em solução tampão fosfato 0,01 mol/L, pH 7,4, com 2,5% (p/v) de Pluronic® F127. O perfil de permeação pode ser observado na Figura 30.

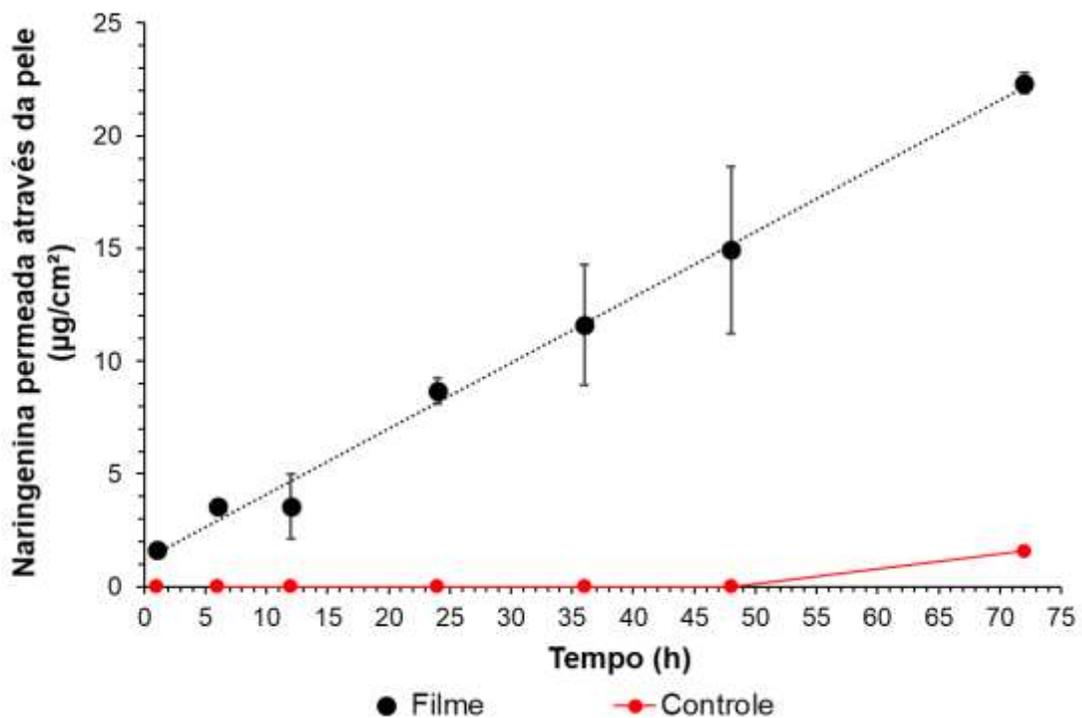


Figura 30. Perfil de permeação (72 h) da naringenina a 0,5% (p/p) do filme de quitosana >75% DD, e da Solução Controle - naringenina (1 mg/mL) preparada na solução do meio receptor (solução tampão fosfato 0,01 mol/L, pH 7,4, com 2,5% (p/v) de Pluronic® F127). Resultados correspondem à média \pm desvio-padrão; n = 5.

O filme foi capaz de promover permeação da naringenina progressivamente a partir de 4,35 h de experimento (*lag time*), em que o sistema mantém 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 (173,175,176), com valores de *lag time* para início da permeação constante dos fármacos sempre menores que 5 h.

Com o controle, no entanto, somente em 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 ($22,33 \pm 0,46 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) no mesmo tempo. Após 72 h, a quantidade total de naringenina que permeou a pele foi de aproximadamente 39,06 μg .

Ao final do período de estudo, a quantidade de naringenina que permeou a pele representa cerca de 4% do total contido no filme aplicado sobre a pele. De forma diferente dos estudos de liberação *in vitro* - onde o filme está em contato direto com o meio receptor -, na permeação *in vitro* a pele representa uma barreira mais complexa à passagem da naringenina. Esse controle de difusão da naringenina através da pele, exercido pelo filme, confere uma grande vantagem do sistema para aplicação a longo prazo, pois, como demonstrado, o uso terapêutico pode ser prolongado uma vez que o efeito platô não foi alcançado.

O perfil de permeação da naringenina demonstra que a formulação desenvolvida foi capaz de aumentar de forma expressiva a difusão do fitoquímico através da pele. Isso pode ser atribuído à característica catiônica da quitosana que atua na permeabilização da pele, 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, os resultados indicam que o polímero pode ser o principal responsável pelo aumento da permeação (23).

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 (177). 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 promover a permeação (72).

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 $3,28 \times 10^{-4} \text{ cm}/\text{h}$. Thein-Han *et al.* (2004) (19) 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.* (2006) (173), 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 compõe o filme de quitosana e deve ter exercido efeito promotor complementar à quitosana.

Após o término do tratamento da pele com o filme, a quantidade de naringenina que ficou retida no estrato córneo e que penetrou a pele foi recuperada e quantificada. Os resultados estão representados na Figura 31.

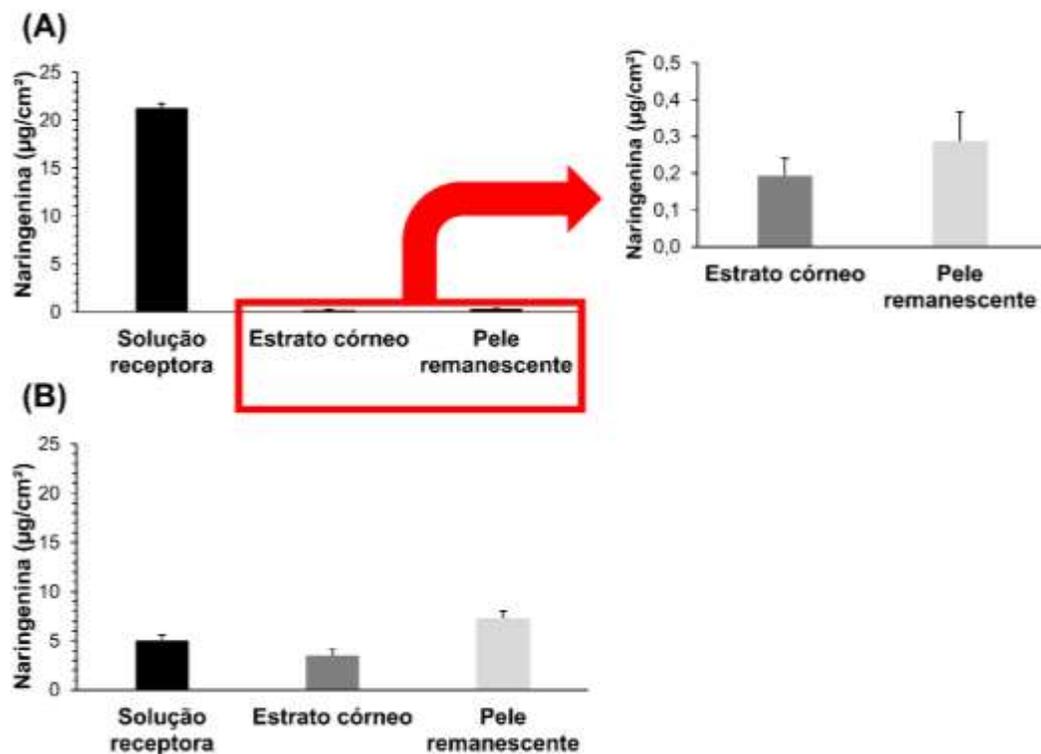


Figura 31. Naringenina quantificada na solução receptora, na recuperação do estrato córneo e da pele remanescente, após estudos de permeação de 72 horas com (A) Filme à base de quitosana e (B) Solução de naringenina (1 mg/mL) preparada na solução do meio receptor. Solução receptora: tampão fosfato 0,01 mol/L, pH 7,4, com 2,5% (p/v) de Pluronic® F127. Resultados correspondem à média \pm desvio-padrão; n = 5.

A naringenina tem uma característica apolar ($\text{Log } P = 2,52$), propriedade que confere às substâncias boa interação com o estrato córneo. Apresenta um peso

molecular baixo (272,26 Da) (24), o que pode contribuir para um coeficiente de difusão facilitado através da pele.

A retenção de naringenina na pele foi cerca de 24 vezes maior ($7,37 \pm 0,69 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) com a aplicação da solução controle, em relação ao filme ($0,29 \pm 0,08 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), como demonstrado na Figura 31. O mesmo padrão também foi observado com a retenção do fitoquímico no estrato córneo, pois houve uma retenção de naringenina cerca de 17 vezes maior com a solução de naringenina ($3,49 \pm 0,61 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) quando comparada ao filme de quitosana ($0,19 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

A pele pode atuar como reservatório de substâncias lipofílicas (169), como foi observado a partir dos dados, onde quando em solução, a naringenina ficou bastante retida nas camadas da pele, limitando sua a passagem e melhor difusão do ativo. Por outro lado, a aplicação do filme de quitosana, que atua aumentando a permeabilidade do estrato córneo, favoreceu muito a difusão do IFA através da pele, o que deve facilitar sua absorção pelos capilares sanguíneos presentes na derme, contribuindo para uma atividade terapêutica sistêmica eficiente.

6. CONCLUSÃO

A naringenina demonstrou um efeito anti-inflamatório em ensaios com células mononucleares, estimulando aumento dos marcadores anti-inflamatórios IL-10 e TGF- β 1. Também foi capaz de reduzir a proliferação de linfócitos T e a expressão de IL-1 β , que tem papel pró-inflamatório.

Com base na compatibilidade entre naringenina e quitosana observado por meio de ensaios técnicos, foi desenvolvido então com sucesso um filme de quitosana contendo o flavonoide. O filme demonstrou perfil de liberação no qual o flavonoide foi liberado de forma proporcional à quantidade restante no interior da matriz. A liberação de mais da metade contida no filme ocorreu já nas primeiras horas de experimento, com liberação da quantidade total de naringenina ao final do tempo de estudo.

Nos estudos de permeação cutânea realizados *in vitro*, foi possível observar que o filme permitiu a difusão constante e progressiva da naringenina e liberação através da pele, o que possibilita um efeito terapêutico a longo prazo. Assim, a formulação transdérmica desenvolvida representa uma alternativa promissora para tratamento de condições inflamatórias utilizando o produto natural.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 2009;3:73–80.
2. Zeng W, Jin L, Zhang F, Zhang C, Liang W. Naringenin as a potential immunomodulator in therapeutics. *Pharmacol Res [Internet].* 2018;135:122–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.08.002>
3. Hirai S, Kim YI, Goto T, Kang MS, Yoshimura M, Obata A, et al. Inhibitory effect of naringenin chalcone on inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Life Sci.* 2007;81(16):1272–9.
4. Kim TH, Kim GD, Ahn HJ, Cho JJ, Park YS, Park CS. The inhibitory effect of naringenin on atopic dermatitis induced by DNFB in NC/Nga mice. *Life Sci [Internet].* 2013;93(15):516–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2013.07.027>
5. Chtourou Y, Fetoui H, Gdoura R. Protective effects of naringenin on iron-overload-induced cerebral cortex neurotoxicity correlated with oxidative stress. *Biol Trace Elem Res.* 2014;158(3):376–83.
6. Kanno SI, Tomizawa A, Hiura T, Osanai Y, Shouji A, Ujibe M, et al. Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180-implanted mice. *Biol Pharm Bull.* 2005;28(3):527–30.
7. Alam MA, Subhan N, Rahman MM, Uddin SJ, Reza HM, Sarker SD. Effect of Citrus flavonoids , naringin and naringenin , on metabolic syndrome and their mechanisms of action. *Am Soc Nutr.* 2014;5:404–17.
8. Frabasile S, Koishi AC, Kuczera D, Silveira GF, Verri WA, Dos Santos CND, et al. The citrus flavanone naringenin impairs dengue virus replication in human cells. *Sci Rep.* 2017;7(February).
9. Kanaze FI, Kokkalou E, Niopas I, Barmplexis P, Georgarakis E, Bikiaris D. Dissolution rate and stability study of flavanone aglycones, naringenin and hesperetin, by drug delivery systems based on polyvinylpyrrolidone (PVP) nanodispersions. *Drug Dev Ind Pharm.* 2010;36(3):292–301.
10. Kanaze FI, Bounartzi MI, Georgarakis M, Niopas I. Pharmacokinetics of the citrus

- flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *Eur J Clin Nutr.* 2007;61:472–7.
11. Hsiu SL, Huang TY, Hou YC, Chin DH, Chao PDL. Comparison of metabolic pharmacokinetics of naringin and naringenin in rabbits. *Life Sci.* 2002;70(13):1481–9.
 12. Maity S, Mukhopadhyay P, Kundu PP, Chakraborti AS. Alginate coated chitosan core-shell nanoparticles for efficient oral delivery of naringenin in diabetic animals—An in vitro and in vivo approach. *Carbohydr Polym [Internet].* 2017;170:124–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.066>
 13. Park SHN, Shin HS, Park SHN. A novel pH-responsive hydrogel based on carboxymethyl cellulose/2-hydroxyethyl acrylate for transdermal delivery of naringenin. *Carbohydr Polym [Internet].* 2018;200(March):341–52. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.011>
 14. Prausnitz MR, Langer R. Transdermal drug delivery. 2009;26(11):1261–8.
 15. SCCS. Scientific committee on consumer safety, SCCS. Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. 2010.
 16. Wokovich AM, Prodduturi S, Doub WH, Hussain AS, Buhse LF. Transdermal drug delivery system (TDDS) adhesion as a critical safety, efficacy and quality attribute. *Eur J Pharm Biopharm.* 2006;64:1–8.
 17. Rasool BKA, Aziz US, Sarheed O, Rasool AAA. Design and evaluation of a bioadhesive film for transdermal delivery of propranolol hydrochloride. *Acta Pharm.* 2011;61:271–82.
 18. Escobar-Chávez JJ, Merino V, Díez-Sales O, Náchter-Alonso A, Ganem-Quintanar A, Herráez M, et al. Transdermal nortriptyline hydrochloride patch formulated within a chitosan matrix intended to be used for smoking cessation. *Pharm Dev Technol.* 2011;16:162–9.
 19. Thein-Han WW, Stevens WF. Transdermal delivery controlled by a chitosan membrane. *Drug Dev Ind Pharm.* 2004;30(4):397–404.
 20. Van Den Broek LAM, Knoop RJI, Kappen FHJ, Boeriu CG. Chitosan films and blends for packaging material. *Carbohydr Polym [Internet].* 2015;116:237–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.039>

21. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2010;75(1):1–18.
22. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2010;62:83–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19799949>
23. Smith J, Wood E, Dornish M. Effect of Chitosan on Epithelial Cell Tight Junctions. *Pharm Res*. 2004;21:43–9.
24. Wilcox LJ, Borradaile NM, Huff MW. Antiatherogenic properties of naringenin, a citrus flavonoid. *Cardiovasc Drug Rev*. 1999;17:160–78.
25. Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature*. 2004;3:205–14.
26. Ullah A. Diabetes mellitus and oxidative stress — A concise review. *Saudi Pharm J* [Internet]. 2016;24(5):547–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.013>
27. Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MCB, Rahu N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1–9.
28. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*. 2000;63(7):1035–42.
29. Yen F, Wu T, Lin L, Cham T, Lin C. Naringenin-Loaded Nanoparticles Improve the Physicochemical Properties and the Hepatoprotective Effects of Naringenin in Orally-Administered Rats with CCl₄-Induced Acute Liver Failure. *Pharm Res*. 2008;26:893–902.
30. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. 1994;344:721–4.
31. Ramalho VC, Jorge N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quim Nova*. 2006;29(4):755–60.
32. Finley JW, Kong AN, Hintze KJ, Jeffery EH, Ji LL, Lei XG. Antioxidants in foods: State of the science important to the food industry. *J Agric Food Chem*. 2011;59(13):6837–46.
33. Cardozo LFMF, Pedruzzi LM, Stenvinkel P, Stockler-Pinto MB, Daleprane JB, Leite M, et al. Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress

- pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2. *Biochimie* [Internet]. 2013;95:1525–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.04.012>
34. Martinez RM, Pinho-Ribeiro FA, Steffen VS, Silva TCC, Caviglione C V., Bottura C, et al. Topical formulation containing naringenin: Efficacy against ultraviolet B irradiation-induced skin inflammation and oxidative stress in mice. *PLoS One*. 2016;11:1–21.
 35. Pool-Zobel B, Veeriah S, Böhmer FD. Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens - Focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*. 2005;591:74–92.
 36. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem*. 2006;99(1):191–203.
 37. Guven H, Arici A, Simsek O. Flavonoids in Our Foods: A Short Review. *J Basic Clin Heal Sci*. 2019;(January).
 38. Shebis Y, Iluz D, Kinel-Tahan Y, Dubinsky Z, Yehoshua Y. Natural Antioxidants: Function and Sources. *Food Nutr Sci*. 2013;04:643–9.
 39. Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB, Dromhout D. Articles Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease : the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 1993;342:1007–11.
 40. Peterson J, Dwyer J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr Res*. 1998;18(12):1995–2018.
 41. Tanwar B, Modgil R. Flavonoids: Dietary Occurrence and Health Benefits. *Spat DD - Peer Rev J Complement Med Drug Discov*. 2012;2:59.
 42. Sultana B, Anwar F. Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food Chem*. 2008;108(3):879–84.
 43. Di Carlo G, Mascolo N, Angelo A, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. 1999;65(4):337–53.
 44. Sarawek S, Feistel B, Pischel I, Butterweck V. Flavonoids of *Cynara scolymus* possess potent xanthinoxidase inhibitory activity in vitro but are devoid of hypouricemic effects in rats after oral application. *Planta Med*. 2008;74(3):221–7.

45. Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *J Agric Food Chem.* 2006;54(11):4069–75.
46. Clifford MN. Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* 2000;80:1063–72.
47. Tomás-Barberán, Clifford MN. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives - nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* 2000;80(7):1118–25.
48. Salehi B, Fokou PVT, Sharifi-Rad M, Zucca P, Pezzani R, Martins N, et al. The therapeutic potential of naringenin: A review of clinical trials. *Pharmaceuticals.* 2019;12.
49. Krause M, Galensa R. Bestimmung von Naringenin und Naringenin-Chalkon in Tomatenschalen mit RP-HPLC nach Festphasenextraktion. *Z Leb Unters Forsch.* 1995;142(5):29–32.
50. Heo HJ, Kim DO, Shin SC, Kim MJ, Kim BG, Shin DH. Effect of Antioxidant Flavanone, Naringenin, from *Citrus junos* on Neuroprotection. *J Agric Food Chem.* 2004;52:1520–5.
51. Moon PD, Choi IH, Kim HM. Naringenin suppresses the production of thymic stromal lymphopoietin through the blockade of RIP2 and caspase-1 signal cascade in mast cells. *Eur J Pharmacol [Internet].* 2011;671:128–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.09.163>
52. Gao Y, Wang Z, Zhang Y, Liu Y, Wang S, Sun W, et al. Naringenin inhibits ng-nitro-l-arginine methyl ester-induced hypertensive left ventricular hypertrophy by decreasing angiotensin-converting enzyme 1 expression. *Exp Ther Med.* 2018;16(2):867–73.
53. Galluzzo P, Ascenzi P, Bulzomi P, Marino M. The nutritional flavanone naringenin triggers antiestrogenic effects by regulating estrogen receptor α -palmitoylation. *Endocrinology.* 2008;149:2567–75.
54. Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M. HL-60 differentiating activity and flavonoid content of the readily extractable fraction prepared from Citrus juices. *J Agric Food Chem.* 1999;47(1):128–35.
55. Karuppagounder V, Arumugam S, Thandavarayan RA, Sreedhar R, Giridharan V

- V., Pitchaimani V, et al. Naringenin ameliorates skin inflammation and accelerates phenotypic reprogramming from M1 to M2 macrophage polarization in atopic dermatitis NC/Nga mouse model. *Exp Dermatol*. 2016;25(5):404–7.
56. Nouri Z, Fakhri S, El-senduny FF, Sanadgol N. On the Neuroprotective Effects of Naringenin: Pharmacological Targets, Signaling Pathways, Molecular Mechanisms, and Clinical Perspective. *Biomolecules*. 2009;9:1–28.
57. Frazier SE, Fla. O. United States Patent (19). 1981. p. 1–5.
58. Pinho-Ribeiro FA, Zarpelon AC, Fattori V, Manchope MF, Mizokami SS, Casagrande R, et al. Naringenin reduces inflammatory pain in mice. *Neuropharmacology* [Internet]. 2016;105:508–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.02.019>
59. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, et al. DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res*. 2018;46:1074–82.
60. Chaurasia S, Patel RR, Vure P, Mishra B. Oral naringenin nanocarriers: Fabrication, optimization, pharmacokinetic and chemotherapeutic efficacy assessments. *Nanomedicine*. 2017;12:1243–60.
61. Chaurasia S, Patel RR, Vure P, Mishra B. Potential of Cationic-Polymeric Nanoparticles for Oral Delivery of Naringenin: In Vitro and In Vivo Investigations. *J Pharm Sci* [Internet]. 2018;107:706–16. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.10.006>
62. Yang LJ, Ma SX, Zhou SY, Chen W, Yuan MW, Yin YQ, et al. Preparation and characterization of inclusion complexes of naringenin with β -cyclodextrin or its derivative. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2013;98:861–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.07.010>
63. Oliveira MA, Heimfarth L, Passos FRS, Miguel-dos-Santos R, Mingori MR, Moreira JCF, et al. Naringenin complexed with hydroxypropyl- β -cyclodextrin improves the sciatic nerve regeneration through inhibition of p75NTR and JNK pathway. *Life Sci* [Internet]. 2020;241:1–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117102>
64. Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future. *Nat Rev*. 2004;3:1023–35.

65. Pinho E, Grootveld M, Soares G, Henriques M. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. Vol. 101, Carbohydrate Polymers. 2014. p. 121–35.
66. Banerjee S, Chattopadhyay P, Ghosh A, Datta P, Veer V. Aspect of adhesives in transdermal drug delivery systems. *Int J Adhes Adhes* [Internet]. 2014;50:70–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2014.01.001>
67. Menon GK, Cleary GW, Lane ME. The structure and function of the stratum corneum. *Int J Pharm* [Internet]. 2012;435(1):3–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.005>
68. Khavkin J, Ellis DAF. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2011;19:229–34.
69. Betzalel N, Feldman Y, Ishai P Ben. The Modeling of the Absorbance of Sub-THz Radiation by Human Skin. *IEE Trans Terahertz Sci Technol*. 2017;7:521–8.
70. Baroni A, Buommino E, Gregorio V De, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol*. 2012;30:257–62.
71. Pham QD, Björklund S, Engblom J, Topgaard D, Sparr E. Chemical penetration enhancers in stratum corneum - Relation between molecular effects and barrier function. *J Control Release* [Internet]. 2016;232:175–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.04.030>
72. Paudel KS, Milewski M, Swadley CL, Brogden NK, Stinchcomb AL. Challenges and opportunities in dermal/transdermal delivery. *Ther Deliv*. 2010;1(1):109–31.
73. Hansen S, Lehr C-M, Schaefer UF. Improved input parameters for diffusion models of skin absorption. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013 Feb;65(2):251–64.
74. Alexander A, Dwivedi S, Ajazuddin, Giri TK, Saraf SS, Saraf SS, et al. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. *J Control Release* [Internet]. 2012;164(1):26–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.09.017>
75. Barry BW. Mode of action of penetration enhancers in human skin. *J Control Release*. 1987;6:85–97.
76. Zoabi A, Touitou E, Margulis K. Recent Advances in Nanomaterials for Dermal and

- Transdermal Applications. *Colloids and interfaces*. 2021;5:1–69.
77. Xie Y, Xu B, Gao Y. Controlled transdermal delivery of model drug compounds by MEMS microneedle array. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2005;1(2):184–90.
 78. Tezel A, Dokka S, Kelly S, Hardee GE, Mitragotri S. Topical Delivery of Anti-sense Oligonucleotides Using Low-Frequency Sonophoresis. *Pharm Res*. 2004;21:2219–25.
 79. Sintov AC, Krymberk I, Daniel D, Hannan T, Levin G. Radiofrequency-driven skin microchanneling as a new way for electrically assisted transdermal delivery of hydrophilic drugs. 2003;89:311–20.
 80. Gratieri T, Pujol-bello E, Gelfuso GM, Souza JG De, Lopez RF V, Kalia YN. Iontophoretic transport kinetics of ketorolac in vitro and in vivo: Demonstrating local enhanced topical drug delivery to muscle. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2014;86:219–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.06.009>
 81. Murthy SN, Sammeta SM, Bower C. Magnetophoresis for enhancing transdermal drug delivery: Mechanistic studies and patch design. *J Control Release*. 2010;148:197–203.
 82. Quintão W de SC, Matos BN, Reis TA, Barreto LC de S, Gratieri T, Gelfuso GM. Influence of monoolein on progesterone transdermal delivery. *Brazilian J Pharm Sci*. 2015;51:923–9.
 83. Ferreira-Nunes R, Silva SMM da, Souza PEN de, Magalhães P de O, Cunha-Filho M, Gratieri T, et al. Incorporation of *Eugenia dysenterica* extract in microemulsions preserves stability, antioxidant effect and provides enhanced cutaneous permeation. *J Mol Liq* [Internet]. 2018;265:408–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.06.023>
 84. Đorđević SM, Santrač A, Cekić ND, Marković BD, Divović B, Ilić TM, et al. Parenteral nanoemulsions of risperidone for enhanced brain delivery in acute psychosis: Physicochemical and in vivo performances. *Int J Pharm*. 2017;533(2):421–30.
 85. Tolentino S, Pereira MN, Cunha-filho M, Gratieri T, Gelfuso GM. Targeted clindamycin delivery to pilosebaceous units by chitosan or hyaluronic acid

- nanoparticles for improved topical treatment of acne vulgaris. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2021;253:1–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117295>
86. Doppalapudi S, Jain A, Chopra DK, Khan W. Psoralen loaded liposomal nanocarriers for improved skin penetration and efficacy of topical PUVA in psoriasis. *Eur J Pharm Sci*. 2017;96:515–29.
87. Gratieri T, Pinho LAG, Oliveira MA, Sa-Barreto LL, Marreto RN, Silva IC, et al. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin-complexed naringenin by solvent change precipitation for improving anti-inflammatory effect in vivo. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2020;231:1–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115769>
88. Nair RS, Ling TN, Abdul Shukkoor MS, Manickam B. Matrix type transdermal patches of captopril: Ex vivo permeation studies through excised rat skin. *J Pharm Res* [Internet]. 2013;6(7):774–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jopr.2013.07.003>
89. Ammar HO, Salama HA, El-Nahhas SA, Elmotasem H. Design and evaluation of chitosan films for transdermal delivery of glimepiride. *Curr Drug Deliv* [Internet]. 2008;5:290–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18855598>
90. Karande P, Mitragotri S. Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2009;1788(11):2362–73.
91. Münch S, Wohlrab J, Neubert RHH. Dermal and transdermal delivery of pharmaceutically relevant macromolecules. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2017;119:235–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.06.019>
92. Siddaramaiah, Kumar P, Divya KH, Mhemavathi BT, Manjula DS. Chitosan/HPMC polymer blends for developing transdermal drug delivery systems. *J Macromol Sci - Pure Appl Chem*. 2006;43(3):601–7.
93. Lopes CM, Lobo JMS, Costa P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: Polímeros hidrofílicos. *Rev Bras Ciências Farm J Pharm Sci*. 2005;41(2):143–54.
94. Kathe K, Kathpalia H. Film forming systems for topical and transdermal drug delivery. *Asian J Pharm Sci* [Internet]. 2017;12:487–97. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.07.004>

95. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci.* 2006;31:603–32.
96. Alishahi A, Aider M. Applications of Chitosan in the Seafood Industry and Aquaculture: A Review. *Food Bioprocess Technol.* 2012;5:817–30.
97. Can AS, Erdal MS, Güngör S, Özsoy Y. Optimization and characterization of chitosan films for transdermal delivery of ondansetron. *Molecules.* 2013;18(5):5455–71.
98. Bernkop-schnürch A, Dünnhaupt S. Chitosan-based drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012;81:463–9.
99. Hemant KSY, Shivakumar HG. Development of chitosan acetate films for transdermal delivery of propranolol hydrochloride. *Trop J Pharm Res.* 2010;9:197–203.
100. Wahid A, Sridhar B, Shivakumar S. Preparation and evaluation of transdermal drug delivery system of etoricoxib using modified chitosan. *Indian J Pharm Sci.* 2009;70:455.
101. Nguyen TT, Dao UTT, Bui QPT, Bach, Giang Long G, Thuc CNH, Thuc HH. Enhanced antimicrobial activities and physicochemical properties of edible film based on chitosan incorporated with *Sonneratia caseolaris* (L.) Engl. leaf extract. *Prog Org Coatings* [Internet]. 2020;140:1–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2019.105487>
102. Genskowsky E, Puente L, Pérez-Álvarez J, Fernandez-Lopez J, Muñoz L, Viudamartos M. Assessment of antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with maqui berry (*Aristotelia chilensis*). *Food Sci Technol.* 2015;64:1057–62.
103. Yadav S, Mehrotra GK, Bhartiya P, Singh A, Dutta PK. Preparation, physicochemical and biological evaluation of quercetin based chitosan-gelatin film for food packaging. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2020;227:1–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115348>
104. Iturriaga L, Olabarrieta I, Castellan A, Gardrat C, Coma V. Active naringin-chitosan films: Impact of UV irradiation. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2014;110:374–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.062>

105. Anvisa M da S. RDC N° 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. [Internet]. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. 2017. p. 1–22. Available from: <https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>
106. ICH. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. Guid Ind. 2015;(July):1–15.
107. Ferreira-Nunes R, Ferreira LA, Gratieri T, Cunha-Filho M, Gelfuso GM. Stability-indicating analytical method of quantifying spironolactone and canrenone in dermatological formulations and iontophoretic skin permeation experiments. Biomed Chromatogr. 2019;33(11):1–10.
108. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. Methods. 2001;25:402–8.
109. Lima AL, Pires FQ, Hilgert LA, Sa-barreto LL, Gratieri T, Gelfuso GM, et al. Oscillatory shear rheology as an in-process control tool for 3D printing medicines production by fused deposition modeling. J Manuf Process [Internet]. 2022;76:850–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmapro.2022.03.001>
110. Anvisa. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 318, de 6 de novembro de 2019 [Internet]. 2019. p. 1–33. Available from: https://www.bertelsmannstiftung.de/fileadmin/files/BSt/Publikationen/GrauePublikationen/MT_Globalization_Report_2018.pdfhttp://eprints.lse.ac.uk/43447/1/India_globalisation%2C_society_and_inequalities%28Isero%29.pdf<https://www.quora.com/What-is-the>
111. ICH Expert Working Group. ICH Guideline Q1A (R2). Stability Testing of New Drug Substances and Products. International Conference on Harmonization. 2003. p. 1–17.
112. Zhang L, Song L, Zhang P, Liu T, Zhou L, Yang G, et al. Solubilities of naringin and naringenin in different solvents and dissociation constants of naringenin. J Chem Eng Data. 2015;60(3):932–40.
113. Parhi R, Padilam S. In vitro permeation and stability studies on developed drug-in-adhesive transdermal patch of simvastatin. Bull Fac Pharmacy, Cairo Univ [Internet]. 2018;56(1):26–33. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2018.04.001>

114. Lademann J, Jacobi U, Surber C, Weigmann H, Fluhr JW. The tape stripping procedure – evaluation of some critical parameters. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2009;72(2):317–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.08.008>
115. Bhandari R, Kuhad A, Paliwal JK, Kuhad A. Development of a new, sensitive, and robust analytical and bio-analytical RP-HPLC method for in-vitro and in-vivo quantification of naringenin in polymeric nanocarriers. *J Anal Sci Technol*. 2019;10(1):1–14.
116. Bugianesi R, Catasta G, Spigno P, D'Uva A, Maiani G. Naringenin from cooked tomato paste is bioavailable in men. *J Nutr*. 2002;132(11):3349–52.
117. Kanaze FI, Kokkalou E, Georgarakis M, Niopas I. A validated solid-phase extraction HPLC method for the simultaneous determination of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin in urine. *J Pharm Biomed Anal*. 2004;36(1):175–81.
118. Elgin G, Konyalioglu S, Kilinc E. Development and validation of a multidetector HPLC method for the determination of antioxidant flavonoids of some *Hypericum L.* species. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 2009;32(3):432–48.
119. Ribeiro IA, Ribeiro MHL. Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method. *Food Control*. 2008;19(4):432–8.
120. Wan L, Sun X, Wang X, Liu Y, Yu Q, Guo C. A stereospecific HPLC method and its application in determination of pharmacokinetics profile of two enantiomers of naringenin in rats. *J Chromatogr Sci*. 2011;49(4):316–20.
121. Xiong X, Jiang J, Duan J, Xie Y, Wang J, Zhai S. Development and validation of a sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of naringin and its metabolite, naringenin, in Human Plasma. *J Chromatogr Sci*. 2014;52(7):654–60.
122. Cerqueira E Silva LCR, David JM, Borges RDSQ, Ferreira SLC, David JP, Reis PSD, et al. Determination of flavanones in orange juices obtained from different sources by HPLC/DAD. *J Anal Methods Chem*. 2014;2014:13–8.
123. Cordenonsi LM, Bromberger NG, Raffin RP, Scherman EE. Simultaneous separation and sensitive detection of naringin and naringenin in nanoparticles by chromatographic method indicating stability and photodegradation kinetics. *Biomed*

- Chromatogr. 2016;30(2):155–62.
124. Baranowska I, Hejniak J, Magiera S. Development and validation of a RP-UHPLC-ESI-MS/MS method for the chiral separation and determination of flavanone, naringenin and hesperetin enantiomers. *Talanta* [Internet]. 2016;159:181–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.06.020>
 125. Ni B, Cao S, Feng L, Yin X, Wang W, Zhang X, et al. Simultaneous Analysis of Quercetin and Naringenin in Rat Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Application to a Pharmacokinetic Study after Oral Administration. *J Chromatogr Sci*. 2016;54(8):1359–64.
 126. FDA USF and DA. Validation of chromatographic methods. Reviewer guidance. 1994. p. 1–30.
 127. ICH. ICH Harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1). 2005. p. 1–13.
 128. Shah VP, Midha K, Findlay JWA, Hill HM, Hulse JD, Mcgilveray IJ, et al. Bioanalytical Method Validation — A Revisit with a Decade of Progress. *Pharm Res*. 2000;17(January):1551–6.
 129. Bansal S, DeStefano A. Key Elements of Bioanalytical Method Validation for Small Molecules. *AAPS J*. 2007;9:109–14.
 130. De Paula D, Martins CA, Bentley MVLB. Development and validation of HPLC method for imiquimod determination in skin penetration studies. *Biomed Chromatogr*. 2008;22:1416–23.
 131. Campos PM, Silva F, Prac G, Vitória M, Badra L. Quantification of lipoic acid from skin samples by HPLC using ultraviolet, electrochemical and evaporative light scattering detectors. 2016;1019:66–71.
 132. Muriel P. Naringenin and the Liver. In: *Liver pathophysiology*. 2017. p. 633–51.
 133. Herath MT, Takano-Ishikawa Y, Yamaki K. Inhibitory Effect of Some Flavonoids on Tumor Necrosis Factor- α Production in Lipopolysaccharide-Stimulated Mouse Macrophage Cell Line J774.1. *J Med Food*. 2003;6:365–70.
 134. Lü L, Zhang L, Wai MSM, Yew DTW, Xu J. Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. *Toxicol Vitro*. 2012;26(4):636–44.
 135. Moro-García MA, Mayo JC, Sainz RM, Alonso-Arias R. Influence of inflammation in

- the process of T lymphocyte differentiation: Proliferative, metabolic, and oxidative changes. *Front Immunol.* 2018;9:1–18.
136. Fang F, Tang Y, Gao Z, Xu Q. A novel regulatory mechanism of naringenin through inhibition of T lymphocyte function in contact hypersensitivity suppression. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2010;397:163–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.05.065>
 137. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-B. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:137–61.
 138. Gulati K, Guhathakurta S, Joshi J, Rai N, Ray A. Cytokines and their Role in Health and Disease: A Brief Overview. *MOJ Immunol.* 2016;4:1–9.
 139. Razavi AS, Mohtashami M, Razi S, Rezaei N. TGF- β signaling and the interaction between platelets and T-cells in tumor microenvironment: Foes or friends? *Cytokine* [Internet]. 2022;150:1–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155772>
 140. Chung F. Anti-inflammatory cytokines in asthma and allergy: interleukin-10 , interleukin-12, interferon-g. *Mediators Inflamm.* 2001;10:51–9.
 141. Rogero MM, Calder PC. Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. *Nutrients.* 2018;10:1–19.
 142. Lyons CL, Kennedy EB, Roche HM. Metabolic inflammation-differential modulation by dietary constituents. *Nutrients.* 2016;8:1–21.
 143. Al-Roujayee AS. Naringenin improves the healing process of thermally-induced skin damage in rats. *J Int Med Res.* 2017;45(2):570–82.
 144. Jin ML, Park SY, Kim YH, Park G, Son HJ, Lee SJ. Suppression of α -MSH and IBMX-induced melanogenesis by cordycepin via inhibition of CREB and MITF, and activation of PI3K/Akt and ERK-dependent mechanisms. *Int J Mol Med.* 2012;29:119–24.
 145. Xue N, Wu X, Wu L, Li L, Wang F. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of Naringenin in different nociceptive and inflammatory mice models. *Life Sci.* 2019;217:148–54.
 146. Bodet C, La VD, Epifano F, Grenier D. Naringenin has anti-inflammatory properties in macrophage and ex vivo human whole-blood models. *J Periodontal Res.* 2008;43:400–7.

147. Kanaze FI, Kokkalou E, Niopas I, Georgarakis M, Stergiou A, Bikiaris D. Thermal analysis study of flavonoid solid dispersions having enhanced solubility. *J Therm Anal Calorim.* 2006;83(2):283–90.
148. Wang K, Liu T, Lin R, Liu B, Yang G, Bu X, et al. Preparation and in vitro release of buccal tablets of naringenin-loaded MPEG-PCL nanoparticles. *RSC Adv [Internet].* 2014;4:33672–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C4RA04920A>
149. Chen C, Wang F, Mao C, Liao W, Hsieh C. Studies of chitosan: II. Preparation and characterization of chitosan/poly (vinyl alcohol)/gelatin ternary blend films. *Int J Biol Macromol.* 2008;43:37–42.
150. Cai Z, Kim J. Characterization and electromechanical performance of cellulose – chitosan blend electro-active paper. *Smart Mater Struct.* 2008;17:1–8.
151. Acharyulu SR, Sudha PN, Renganathan NG. Separation of chromium and copper from wastewater using poly acrylonitrile blended chitosan. *Der Pharma Chem.* 2013;5:28–40.
152. Sakurai K, Maegawa T, Takahashi T. Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly (N-vinyl pyrrolidone) blends. *Polymer (Guildf).* 2000;41:7051–6.
153. Neto CGT, Giacometti JA, Job AE, Ferreira FC, Fonseca JLC, Pereira MR. Thermal Analysis of Chitosan Based Networks. 2005;62:97–103.
154. Cheung MK, Wan KPY, Yu PH. Miscibility and Morphology of Chiral Semicrystalline Poly- (R) - (3-hydroxybutyrate)/ Chitosan and Poly- (R) - (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/Chitosan Blends Studied with DSC , H T 1 and T 1 CRAMPS. *J Appl Polym Sci.* 2002;86:1253–8.
155. Pestov A V, Koryakova O V, Leonidov II, Yatluk YG. Gel-Synthesis , Structure , and Properties of Sulfur-containing Chitosan Derivatives. *Russ J Appl Chem.* 2010;83:787–94.
156. Dourado D. Thermal Analysis as a Useful Tool in Drug-Excipient Compatibility Studies: The Impact in Pharmaceuticals Products. *J Sci Tech Res.* 2019;22:16634–6.
157. Maatouk M, Elgueder D, Mustapha N, Chaaban H, Bzéouich IM, Loannou I, et al. Effect of heated naringenin on immunomodulatory properties and cellular

- antioxidant activity. *Cell Stress Chaperones* [Internet]. 2016;21:1101–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12192-016-0734-0>
158. Denkbaş EB, Ottenbrite RM. Perspectives on: Chitosan drug delivery systems based on their geometries. *J Bioact Compat Polym*. 2006;21:351–68.
159. Church AS, Witting MD. Laboratory testing in ethanol, methanol, ethylene glycol, and isopropanol toxicities. *J Emerg Med*. 1997;15(October):687–92.
160. Vanin FM, Sobral PJA, Menegalli FC, Carvalho RA, Habitante AMQB. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. 2005;19:899–907.
161. Khan TA, Peh KK, Ch'ng HS. Mechanical, Bioadhesive Strength and Biological Evaluations of Chitosan films for Wound Dressing. *J Pharm Pharm Sci*. 1999;3:303–11.
162. Anvisa. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Vol. 1. 2004. p. 52.
163. Bajaj S, Sakhuja N, Singla D, Bajaj Principal S. Stability Testing of Pharmaceutical Products. *J Appl Pharm Sci*. 2012;02(2012):129–38.
164. Sundaramurthi D, Krishnan UM, Sethuraman S. Electrospun Nanofibers as Scaffolds for Skin Tissue Engineering. *Polym Rev*. 2014;54:348–76.
165. Bigucci F, Abruzzo A, Saladini B, Gallucci MC, Cerchiara T, Luppi B. Development and characterization of chitosan/hyaluronan film for transdermal delivery of thiocolchicoside. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2015;130:32–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.067>
166. Moura MJ, Figueiredo MM, Gil MH. Rheological Study of Genipin Cross-Linked Chitosan Hydrogels. *Biomacromolecules*. 2007;8:3823–9.
167. Suyatma NE, Copinet A, Tighzert L, Coma V. Mechanical and Barrier Properties of Biodegradable Films Made from Chitosan and Poly (Lactic Acid) Blends. *J Polym Environ*. 2004;12:2–4.
168. Yehye WA, Rahman NA, Ariffin A, Abd Hamid SB, Alhadi AA, Kadir FA, et al. Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. *Eur J Med Chem*. 2015;101:295–312.
169. WHO. Dermal absorption. *World Heal Organ*. 2006;235:1–197.

170. Lémery E, Briançon S, Chevalier Y, Bordes C, Oddos T, Gohier A, et al. Skin toxicity of surfactants: Structure/toxicity relationships. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2015;469:166–79.
171. Wang Z-W, Huang D-Y, Gong S-P, Li G-Z. Prediction on Critical Micelle Concentration of Nonionic Surfactants in Aqueous Solution: Quantitative Structure-Property Relationship Approach. *Chinese J Chem.* 2003;21:1573–9.
172. Ruela ALM, Perissinato AG, Lino ME de S, Mudrik PS, Pereira GR. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. *Brazilian J Pharm Sci.* 2016;52(3):527–43.
173. Chen H, Chang X, Du D, Li J, Xu H, Yang X. Microemulsion-based hydrogel formulation of ibuprofen for topical delivery. *Int J Pharm.* 2006;315(1–2):52–8.
174. Hayashi T, Kanbe H, Okada M, Suzuki M. Formulation study and drug release mechanism of a new theophylline sustained-release preparation. *Int J Pharm.* 2005;304:91–101.
175. Kiptoo PK, Paudel KS, Hammell DC, Pinninti RR, Chen J, Crooks PA, et al. Transdermal delivery of bupropion and its active metabolite, hydroxybupropion: A prodrug strategy as an alternative approach. *J Pharm Sci.* 2009;98(2):583–94.
176. Rhee YS, Kwon SY, Park CW, Choi NY, Byun WJ, Chi SC, et al. Characterization of monolithic matrix patch system containing tulobuterol. *Arch Pharm Res.* 2008;31(8):1029–34.
177. Puttipatkhachorn S, Nunthanid J, Yamamoto K, Peck GE. Drug physical state and drug-polymer interaction on drug release from chitosan matrix films. *J Control Release.* 2001;75:143–53.