

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

GUSTAVO BARRETO COSTA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE UTILIZANDO MODELOS *in vivo* E *in silico* DA NARINGENINA NANOENCAPSULADA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CAMPO MOURÃO

2022

**GUSTAVO BARRETO COSTA**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE UTILIZANDO MODELOS *in vivo* E *in silico* DA  
NARINGENINA NANOENCAPSULADA**

**Evaluation of toxicity using *in vivo* and *in silico* models of nanoencapsulated  
naringenin**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos – PPGTA – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná/UTFPR, Câmpus Campo Mourão.

Orientador: Dr. Odinei Hess Gonçalves

Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Peron

**CAMPO MOURÃO**

**2022**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite que outros remixem, adaptem e criem a partir do trabalho para fins não comerciais, desde que atribuam o devido crédito e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Campus Medianeira



GUSTAVO BARRETO COSTA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE UTILIZANDO MODELOS IN VIVO E IN SILICO DA NARINGENINA  
NANOENCAPSULADA**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Tecnologia De Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologia De Alimentos.

Data de aprovação: 25 de Abril de 2022

Odinei Hess Goncalves, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Rafaele Bonzanini Romero, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Rilton Alves De Freitas, Doutorado - Universidade Federal do Paraná (Ufpr)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 25/04/2022.

**CAMPO MOURÃO  
2022**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado tal oportunidade, e capacidade para concluir mais essa vitória em minha vida.

Agradeço em especial as três mulheres da minha vida: minha querida e amada mãe Maria Edilma da Silva Alves, minha avó Maria Edith da Silva, e minha tia madrinha Maria Moreira, e ao meu amado pai Claudiomar Paulo da Costa que sempre me incentivaram, e deram todo o apoio moral, e espiritual possíveis para que eu pudesse concluir este Mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Odinei Hess Gonçalves, pela oportunidade, e confiança, e por ser extremamente atencioso durante a condução do Mestrado. Meus sinceros agradecimentos professor!

Agradecer minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Peron, pela paciência, disponibilidade, e por seus valiosos conselhos que irei levar para a vida!

Ao Prof. Dr. Adriano Lopes Romero quem abraçou este trabalho, e permitiu que o mesmo fosse concluído. Muito obrigado professor!

A Bruna Franzon Rossi, por ter me auxiliado durante a parte experimental. Obrigado Bruna!

Agradeço a todos os professores das disciplinas que cursei e aos demais alunos e amigos do programa pela dedicação para fazer com que o PPGTA alcance cada vez patamares mais altos.

À Fundação Araucária pela bolsa de estudos durante boa parte do curso.

*Dedico este trabalho ao eterno David Barreto da Silva, meu querido e amado avô.*

## RESUMO

A naringenina é um flavonoide derivado da naringina, considerado um polifenol glicosado da classe das flavanonas presentes em plantas cítricas como a toranja (*Citrus paradisi* L.). Possui propriedades bioativas com ação anti-inflamatória, antineoplásica, antiaterogênica e antioxidante. Contudo, ela possui baixa biodisponibilidade, insolubilidade em água e instabilidade que limitam sua aplicação, dificultando sua ação e absorção no organismo. Métodos de encapsulação tem se mostrado eficazes para contornar tais pontos negativos da naringenina, como a técnica de dispersão sólida. É necessário avaliar o grau de segurança de formulações nanoencapsuladas e, nesse contexto, o tecido meristemático de raízes de *Allium cepa* L. possui características que o torna uma ferramenta teste eficiente para a avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de compostos. Estudos *in silico* se somam a tais experimentos *in vivo*, pois têm como vantagem a rapidez na sua execução, o baixo custo e a capacidade de reduzir a quantidade de ensaios de toxicidade necessária. O objetivo do presente trabalho foi avaliar potenciais efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos da naringenina, encapsulada e não encapsulada, bem como realizar estudos de propriedades farmacocinéticas e de ancoragem molecular. A naringenina livre (não encapsulada), nas condições de análises estabelecidas, não causou alteração no índice de divisão celular das células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L. nos tempos de análises considerados, bem como não induziu alterações de fuso mitótico e quebras cromossômicas nesse sistema teste. Com base nos resultados dos estudos de ancoragem molecular realizados, a naringenina se ancorou no sítio ativo da enzima catalase (CAT), e se ancorou em região distante do sítio ativo da enzima superóxido dismutase (SOD2). Os resultados obtidos nos estudos de propriedades ADMET indicaram que a naringenina possui propriedades moleculares adequadas para substâncias bioativas que são administradas oralmente, e possui relativamente baixa toxicidade, fatores que tornam a naringenina um composto promissor para o desenvolvimento de novos fármacos, e para uma melhor implementação na indústria de alimentos.

**Palavras-chave:** nanopartículas, citotoxicidade, genotoxicidade, *Allium cepa* L.; flavonoide.

## ABSTRACT

Naringenin is a flavonoid derived from naringin, considered a glycosylated polyphenol of the flavanone class present in citrus plants such as grapefruit (*Citrus paradisi* L.). It presents bioactive properties such as anti-inflammatory, antineoplastic, antiatherogenic and antioxidant activity. However, it has low bioavailability, low water solubility and instability that limit its application, hindering its action and absorption in the body. Encapsulation methods such as the solid dispersion technique may be effective in overcoming such negative points of naringenin. It is necessary to assess the degree of safety of nanoencapsulated formulations and, in this context, the meristematic tissue of *Allium cepa* L. roots presents characteristics that make it an efficient test tool for the assessment of cytotoxicity and genotoxicity of compounds. *In silico* studies are added to such *in vivo* experiments, as they have the advantage of speed in their execution, low cost and the ability to reduce the amount of toxicity tests required. The objective of the work was to evaluate the cytotoxic, genotoxic and mutagenic potential of encapsulated and free naringenin, as well as to study the pharmacokinetic and molecular docking aspects of naringenin. Free naringenin (non encapsulated), under the conditions of established analyses, did not change the cell division index of meristematic cells from *Allium cepa* L. roots, and did not induce mitotic spindle changes and chromosome breaks in this test system. Based on the results of molecular anchorage studies, naringenin was anchored in the active site of the catalase enzyme (CAT), and was anchored in a distant region of the active site of the enzyme superoxide dismutase (SOD2). The results obtained in the ADMET properties studies indicated that naringenin has adequate molecular properties for bioactive substances that are orally administered, and has relatively low toxicity, factors that make naringenin a promising compound for the development of new drugs, and for a better implementation in the food industry.

**Keywords:** nanoparticles, cytotoxicity, genotoxicity, *Allium cepa* L., flavonoid.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura básica dos flavonoides .....	14
Figura 2 - Estrutura básica das principais classes de flavonoides .....	15
Figura 3 - Estrutura química da naringenina .....	16
Figura 4 - Estrutura química do Poloxamer 407 .....	19
Figura 5 - (A) bulbos de <i>allium cepa</i> L. germinados, com descaque (círculo em vermelho) para a região meristemática; (B) Lâminas montadas segundo o método de Guerra e Souza (2002); (C) imagem do microscópio óptico na objetiva de 40x dos meristemas de <i>allium cepa</i> L. corados com orceína acética 02% .....	25
Figura 6 - Representação da cadeia A da enzima SOD2 (PDB 1LUV) com destaque para as regiões dos sítios ativos .....	34
Figura 7 - <i>Best pose</i> resultante do estudo de ancoragem molecular da naringenina frente a SOD2 (PDB 1LUV) .....	35
Figura 8 - Representação bidimensional, produzida pela ferramenta PoseView, da interação a enzima SOD2 (PDB 1LUV) e naringenina .....	36
Figura 9 - Visão estérea do sítio ativo da enzima catalase (PDB 1DGF) .....	37
Figura 10 - Representação bidimensional, produzida pela ferramenta <i>PoseView</i> , da interação a enzima catalase (PDB 1DGF) e naringenina .....	38



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Índices mitóticos (%) observados em meristemas de raízes de <i>A. cepa</i> expostos a diferentes concentrações de naringenina livre em 24 e 48 horas exposição .....	28
Tabela 2 - Índices de alterações celulares observados em meristemas radiculares de <i>A. cepa</i> expostos a diferentes concentrações de naringenina livre por 24 e 48 horas .....	28
Tabela 3 - Índices mitóticos (%) observados em meristemas de raízes de <i>A. cepa</i> expostos a diferentes concentrações de nanopartículas contendo naringenina em 24 e 48 horas exposição .....	29
Tabela 4 - Índices de alterações celulares observados em meristemas radiculares de <i>A. cepa</i> expostos a diferentes concentrações de nanopartículas contendo naringenina por 24 e 48 horas .....	29
Tabela 5 - Propriedades ADMET calculadas utilizando a ferramenta admetSAR para a naringenina .....	32

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Predição, calculados na ferramenta <i>MetaTox</i> , de metabólitos formados a partir da naringenina .....	32
--	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
2.1	Objetivo Geral .....	13
2.2	Objetivos Específicos .....	13
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>14</b>
3.1	Características gerais dos flavonoides e sua atividade antioxidante .....	14
3.2	Características gerais e estudos sobre a naringenina .....	16
3.3	Benefícios da encapsulação da naringenina .....	17
3.4	Dispersão sólida .....	18
3.5	Sistema teste de alterações cromossômicas em <i>Allium cepa</i> L. e Metilmetanosulfonato (MMS) como agente indutor de danos ao DNA .	19
3.6	Estudos <i>In silico</i> .....	21
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
4.1	Compostos testados, período e local .....	23
4.2	Produção das nanopartículas de naringenina .....	23
4.3	Análises de citotoxicidade e genotoxicidade .....	23
4.4	Estudos <i>in silico</i> .....	25
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>28</b>
5.1	Estudos <i>in vivo</i> .....	28
5.2	Estudos <i>in silico</i> .....	30
5.2.1	Avaliação de propriedades farmacocinéticas da naringenina .....	30
5.2.2	A Estudo frente a SOD2 (PDB 1LUV) .....	34
5.2.3	Estudo frente a catalase (PDB 1DGF) .....	37
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>39</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>40</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, pesquisadores ao redor do mundo tem se preocupado com a importância da alimentação na manutenção da saúde e na prevenção a doenças, podendo contribuir em benefício à saúde humana (SILVA, *et al.*, 2021).

Nesse contexto os alimentos funcionais, que são definidos como qualquer substância ou componente de um alimento que proporcione benefícios para a saúde, encontra-se a naringenina que é um polifenol da classe dos flavonoides, encontrada principalmente em frutas cítricas. Apresenta benefícios à saúde que são comuns aos polifenóis, tais como atividade antioxidante, reduzindo o estresse oxidativo e anti-inflamatório. Sendo pouco solúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos como álcool etílico, possui relativamente baixa biodisponibilidade e instabilidade que limitam sua aplicação na indústria de alimentos, dificultando sua ação e absorção no organismo. Nesse sentido, tecnologias como a nanoencapsulação da naringenina podem ser uma estratégia eficaz no aumento da sua atividade biológica (MCCLEMENTS, 2018; SUMATHI; TAMIZHARASI; SIVAKUMAR, 2015).

Os avanços tecnológicos podem facilitar o processo de planejamento de novos fármacos, e de suplementos alimentares a base de naringenina uma vez que possibilita a otimização do tempo e de custos operacionais. a citar as avaliações *in silico*, que é uma denotação para o uso de simulações computacionais que modelam um processo natural ou de laboratório. Assim, tais programas utilizam do cruzamento de informações contidas em banco de dados e das formulações e estruturas químicas das substâncias a fim de preverem as prováveis características biológicas e farmacológicas de uma molécula em um período curto de tempo (FILIMONOV *et al.*, 2014; TOROPOVA, 2017).

Embora existam estudos sobre as propriedades antioxidantes/pró-oxidante e mutagênica/antimutagênica do bioativo naringenina, estudos citogenéticos de avaliação de citotoxicidade, genotoxicidade, e avaliações *in silico* ainda são incipientes. Também não há relatos na literatura científica sobre o potencial citotóxico, genotóxico e antígenotóxico de nanopartículas de naringenina em tecidos de intensa proliferação celular, como as células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L. que é citada na literatura como um bioindicador adequado para avaliação de citogenotoxicidade de compostos químicos por ter rápida multiplicação celular, cromossomos grandes e em número reduzido (BONCIU *et al.*, 2018).

Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade e o potencial da naringenina como um composto bioativo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos, e para uma melhor implementação na indústria de alimentos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

A Dissertação de Mestrado teve como objetivo avaliar potenciais efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos da naringenina, encapsulada e não encapsulada, bem como realizar estudos de propriedades farmacocinéticas e de ancoragem molecular da naringenina.

### 2.2 Objetivos Específicos

São objetivos específicos do trabalho:

- Avaliar do potencial da naringenina livre e encapsulada em causar alterações no índice mitótico e induzir alterações de fuso mitótico e quebras cromossômicas em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L., em diferentes concentrações;
- Realizar de estudos *in silico* de propriedades farmacocinéticas e de ancoragem molecular da naringenina com as enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD2).

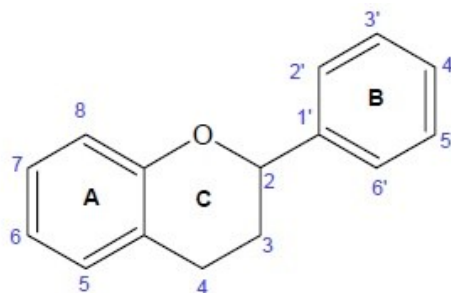
### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Características gerais dos flavonoides e sua atividade antioxidante

Os flavonoides representam um dos grupos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem vegetal e são amplamente distribuídas nesse reino. Estão presentes em abundância nas angiospermas, apresentando nesse grupo enorme diversidade estrutural. Constituindo-se, em geral, de substâncias aromáticas contendo 15 átomos de carbono em seu esqueleto básico, os flavonoides constituem uma ampla classe de compostos cuja síntese não ocorre na espécie humana (SIMÕES *et al.*, 2007).

Esses polifenóis são biossintetizados via ácido chiquímico, um importante intermediário na biossíntese de substâncias aromáticas em plantas, que tem por função originar o ácido cinâmico e seus derivados, como os ácidos cafeico, ferúlico e sináptico, com nove átomos de carbonos; e pela via do acetato que origina um tricetídeo com seis átomos de carbonos (DEWICK, 2002) A condensação de um dos derivados do ácido cinâmico com o tricetídeo gera um composto com 15 átomos de carbonos formando assim o precursor inicial de todas as classes de flavonoides. Assim, a estrutura química básica desses compostos, conhecida como *flavilium*, consiste de 15 carbonos distribuídos em dois anéis aromáticos (anéis A e B), os benzenos, interligados a uma estrutura heterocíclica central, o pirano (anel C), onde o primeiro benzeno é condensado com o sexto carbono do pirano, que na posição 2 carrega um grupo fenila (DORNAS *et al.*, 2007). A estrutura básica dos flavonoides é mostrada na Figura 1.

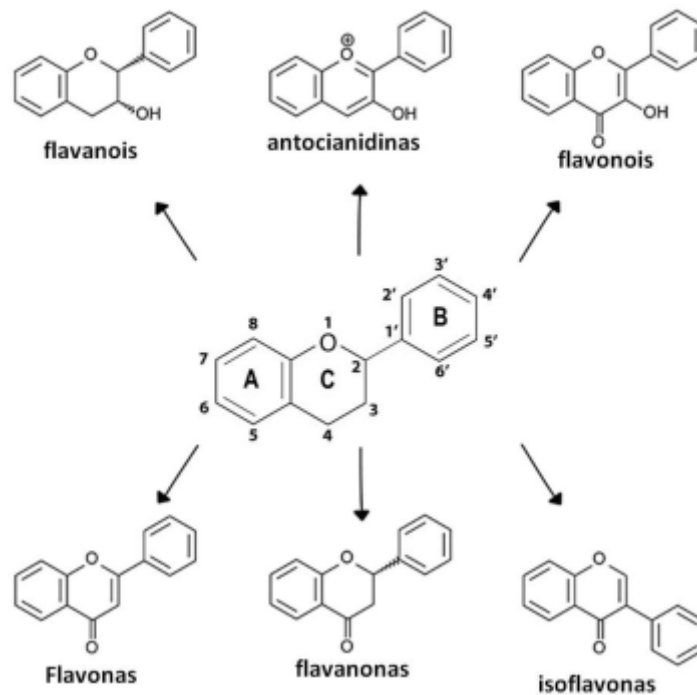
**Figura 1: Estrutura básica dos flavonoides**



Fonte: Adaptado de Dornas (2007).

A estrutura básica dos flavonoides consiste em dois anéis aromáticos (A e B) conectados por uma cadeia de três carbonos que formam um anel heterocíclico oxigenado (anel C). As principais classes de flavonoides são (Fig. 2) flavanois, flavanois flavonas, flavanonas, isoflavonas e antocianidinas (LEYVA-LÓPEZ *et al.*, 2016). Basicamente, todos os flavonoides são constituídos por três anéis, onde os seus carbonos podem sofrer variações químicas, como hidroxilação, hidrogenação, metilação e sulfonação, proporcionando a formação de mais de quatro mil compostos flavonóides, que são agrupados em classes (GEORGIEV; ANANGA; TSOLOVA, 2014).

**Figura 2: Estrutura básica das principais classes de flavonoides**



Fonte: Adaptado de Higdon (2005).

Os flavonoides são amplamente conhecidos por seu grande potencial terapêutico, como anti-inflamatórios antibacterianos, antivirais, antitumorais, antialérgicos e hepatoprotetor (JANG *et al.*, 2017). No entanto, a principal e a mais estudada atividade biológica dos flavonoides é a sua atividade antioxidante. Esses compostos atuam sobre substâncias radiculares, devido à sua habilidade em estabilizar radicais livres ou outras espécies reativas. Outro mecanismo potencial pelo qual os flavonoides atuam é a interação desses compostos com enzimas antioxidantes (CHERRAK *et al.*, 2016).

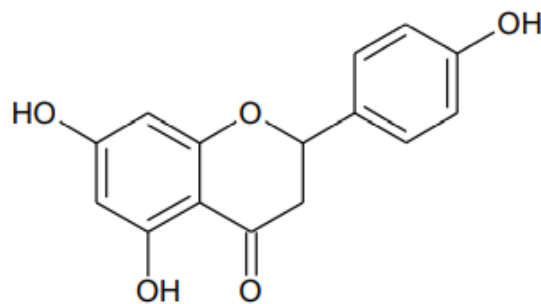


Devido ao fato de os flavonoides fazerem parte da dieta humana, é fundamental entender suas funções biológicas. A atividade antioxidante dos flavonoides depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: reatividade como agente doador de hidrogênios e elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado; reatividade em frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; QUIDEAU, 2006).

### 3.2 Características gerais e estudos sobre a naringenina

A naringenina ou 5,7,4'-triidroxiflavanona (Figura 3) é uma flavanona encontrada em frutas cítricas como laranjas e toranjas (*grapefruit*) e na casca de tomates (AKBARZADEH; PARVARESH, 2016). Possui massa molar 272,26 g/mol, é praticamente insolúvel em água e solúvel em compostos orgânicos como o etanol (SUMATHI; TAMIZHARASI; SIVAKUMAR, 2015).

**Figura 3: Estrutura química da naringenina**



Fonte: Autoria própria (2022).

Diversos efeitos farmacológicos têm sido reportados para a naringenina, tais como: anti-inflamatório, anticâncer, antiaterogênico e antioxidante (JI *et al.*, 2016). Quanto ao seu potencial antioxidante, é relatado na literatura que a naringenina tem atividade sequestrante sobre o radical ânion superóxido e o radical hidroxila (CAVIA-SAIZ *et al.*, 2010) o que se deve ao aumento da expressão de superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) por esse composto (VEZZA *et al.*, 2016); (MANCHOPE *et al.*, 2016); (MAATOUK *et al.*, 2016). Além disso tem efeito protetor contra a peroxidação lipídica (LI; YANG; WANG, 2007).

Embora Zhou *et al.* (2014) considerem que a naringenina é solúvel na composição binária água/etanol, a biodisponibilidade da naringenina é inferior a 5% quando ingerido por via oral, o que pode estar relacionado à sua baixa solubilidade em condições naturais e fácil degradação por fatores físicos e químicos como luz, calor, umidade e oxigênio. Métodos de encapsulamento são desenvolvidos com o intuito de proteger e aprimorar a atividade *in situ* desses compostos (BUDEL *et al.*, 2020; KERDUDO *et al.*, 2014).

### 3.3 Benefícios da encapsulação da naringenina

Atualmente, a nanotecnologia está presente nas atividades de pesquisa, desenvolvimento e inovação em todos os países industrializados do mundo. Ela refere-se às tecnologias em que a matéria é manipulada nas escalas atômica e molecular para criar novos materiais e processos com características funcionais diferentes dos materiais comuns (BURGESS *et al.*, 2010; BOISSEAU *et al.*, 2011).

Nanocápsulas são compostas por substâncias que funcionam como surfactantes ou polímeros que se misturam e melhoram a estabilidade de compostos e sua absorção (ALMEIDA, *et al.*, 2018). A encapsulação possibilita a preservação da atividade antioxidante de substâncias químicas, contribuindo para o consumo, aumentando a vida útil e vitando sabores desagradáveis como adstringência, amargura quando em alta concentração (KERDUDO *et al.*, 2014).

Estudos mostram que a naringenina encapsulada apresenta menor toxicidade que a sua forma livre (CHAURASIA *et al.*, 2018). As nanopartículas foram avaliadas em relação ao tamanho de partículas, potencial zeta, morfologia, além de caracterização por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC). Observou-se que, com a utilização desses encapsulantes, a solubilidade da naringenina aumentou consideravelmente. Os testes *in vivo* realizados com nanopartículas demonstraram que os nanocarreadores propostos apresentaram uma alternativa potencial para o sistema de administração de medicamentos em virtude da fácil administração, tempo prolongado de liberação do medicamento, biodisponibilidade ocular melhorada e frequência de dosagem reduzida (ZHANG *et al.*, 2016).

A solubilidade da naringenina foi avaliada com nanopartículas de síntese química. As nanopartículas usaram quitosana e alginato, bem como sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) como agentes de reticulação, o que reteve

significativamente a naringenina (cerca de 90%). A naringenina foi liberada de forma lenta, sustentada e de acordo com a sensibilidade do flavonoide ao pH. Nos estudos *in vivo*, em ratos que foram induzidos aos diabetes por estreptozotocina, observou-se uma diminuição da glicemia. As nanopartículas foram avaliadas por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier, análise de Difração de Raios-X, Espalhamento Dinâmico de Luz e Microscopia Eletrônica de Varredura (MAITY *et al.*, 2017).

Ferreira *et al.* (2015) compararam nanocápsulas de naringina e naringenina preparadas pela técnica de deposição interfacial de polímero pré-formado. Foram avaliadas as propriedades físico-químicas, o teor nas suspensões e a eficiência de encapsulação da naringina e da naringenina. As nanocápsulas foram submetidas a teste *in vivo* com a linhagem celular Vero. Devido às suas características lipofílicas e à baixa solubilidade em água, a naringenina apresentou menor taxa de liberação indicando afinidade pela matriz polimérica e pelas gotículas de óleo constituintes da formulação. Tais resultados denotam que diversos fatores podem afetar a liberação de fármacos como a degradação da matriz polimérica, massa molar, afinidade entre o ativo e o polímero e a estrutura química do composto.

A  $\beta$ -lactoglobulina, uma abundante proteína do soro do leite, foi avaliada para encapsulação da naringenina através de fortes ligações entre naringenina e a proteína. A formação de tais complexos permitiu a solubilização da naringenina e impediu a cristalização do flavonoide até três vezes o seu limite de solubilidade. O mesmo teste foi realizado com a naringina e não foi observada ligação entre a naringina e  $\beta$ -lactoglobulina, provavelmente devido ao tamanho maior e a natureza mais hidrofílica da naringina, que interferiu na ligação com os domínios hidrofóbicos (SHPIGELMAN *et al.*, 2014).

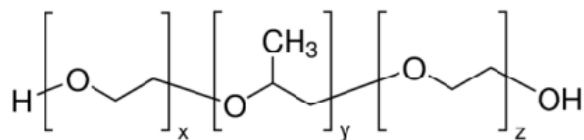
### **3.4 Dispersão sólida**

A dispersão sólida foi relatada pela primeira vez em 1961 com a formação de uma mistura eutética proposta por Keiji Sekiguchi e Norobu Obi. Tal mistura composta por um fármaco (sulfatiazol) pouco solúvel e uma matriz altamente solúvel e cristalina (ureia). A mistura foi preparada por meio do processo de fusão da mistura física do medicamento e da matriz que logo sofreu uma rápida solidificação. Outros pesquisadores relataram sobre a utilização da solução sólida na qual um

medicamento é disperso molecularmente em meio solúvel e as vantagens da mistura eutética (CHIOU; KEYPHRASES, 1971). Essa tecnologia é de grande interesse não apenas para a indústria de alimentos, mas também para o setor farmacêutico (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007).

O Poloxamer 407 (Figura 4) é um surfactante polimérico que é comumente utilizado na indústria farmacêutica para encapsulação de fármacos e consiste em um copolímero de bloco A-B-A, onde A é a cadeia hidrofílica (poli(óxido etileno)) e B a cadeia hidrofóbica (poli(óxido propileno)) (TADROS, 2003). A cadeia hidrofóbica de micelas formadas serve como um espaço de cargas para a incorporação de compostos lipofílicos, como a curcumina, enquanto a parte hidrofílica contribui para o comportamento terapêutico dessas formulações, diminuindo as interações medicamentosas indesejáveis com células e proteínas, mantendo a estabilidade (ADHIKARI *et al.*, 2016). Portanto, a incorporação de fármacos no núcleo hidrofóbico dos blocos de Poloxamer 407 resulta em um aumento da solubilidade, da estabilidade metabólica, da biodisponibilidade e do tempo de circulação (KUROIWA *et al.*, 2018).

**Figura 4: Estrutura química do Poloxamer 407**



Fonte: Autoria própria (2022).

### 3.5 Sistema teste de alterações cromossômicas em *Allium cepa* L. e Metilmetanosulfonato (MMS) como agente indutor de danos ao DNA

O tecido meristemático de raízes de *Allium cepa* L. possui características que o torna uma ferramenta teste eficiente para o *screening* da citotoxicidade e genotoxicidade de compostos químicos (BIANCHI *et al.*, 2016; HERRERO *et al.*, 2012). A eficiência desse bioensaio se dá principalmente em razão da *Allium cepa* L., apresentar um número cromossômico reduzido ( $2n=16$ ), o que permite a detecção de distúrbios no índice de proliferação celular e alterações cromossômicas e celulares (LEME; MARIN-MORALES, 2009). O sistema *Allium cepa* L. é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, WHO) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP), apresentado como instrumento eficiente para o

monitoramento *in vivo* da genotoxicidade de substâncias químicas (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999).

O ensaio de alterações cromossômicas em *Allium cepa* L. já foi utilizado para avaliar as mais variadas substâncias, como por exemplo, substâncias provenientes de plantas com potencial farmacêutico e quimiopreventivos. Das plantas estudadas são produzidos extratos, óleos essenciais, e outros derivados, ou mesmo extraídos compostos isolados, para avaliação de efeitos genotóxicos, antígenotóxicos ou ambos (DIAS *et al.*, 2019; LIMAN *et al.*, 2018; PRAJITHA; THOPPIL, 2016). Este protocolo também tem ampla utilização na área da toxicologia ambiental, com diversos trabalhos aplicados em ambientes poluídos (ar, solo ou água), contaminados por metais pesados, rejeitos industriais e outras ações antrópicas (DUTTA *et al.*, 2018; PALMIERI *et al.*, 2016; RAGAZZO *et al.*, 2017). Uma extensa variedade de defensivos agrícolas como herbicidas, pesticidas e demais químicos foram submetidos a protocolos de genotoxicidade em *Allium cepa* L., sendo reportados resultados positivos, o que chamou a atenção para a utilização destes agroquímicos e seu impacto no meio ambiente (DATTA *et al.*, 2018; FELISBINO *et al.*, 2018; KARASMAILOGLU, 2017).

Este bioensaio apresenta baixo custo, confiabilidade e equivalência com os mais conceituados testes de citogenotoxicidade, sem as preocupações éticas que afetam o uso de animais em testes e que exigem diretrizes de reprodução complexas (TEDESCO; LAUGHINGHOUSE IV, 2012). Por ser uma ótima ferramenta para investigação de danos causados ao material genético, pode ser submetido a estresses com substâncias conhecidamente danosas ao DNA, como o metilmetanossulfonato (MMS) que é um agente alquilante monofuncional, que induz diferentes tipos de adutos no DNA por reação com seus centros nucleofílicos, como os átomos de oxigênio e nitrogênio das bases (FERNANDES *et al.*, 2011; WYATT; PITTMAN, 2006).

Como controle positivo em ensaios com *Allium cepa* L., de modo geral, o MMS induz diversos danos ao material genético incluindo: quebras cromossômicas, formação de micronúcleo, ponte cromossômica, aderência cromossômica, dentre outros, resultando no aumento da frequência de alterações cromossômicas (ALMEIDA *et al.*, 2015; ANACLETO *et al.*, 2017; LIMAN *et al.*, 2019). A frequência dessas alterações serve como parâmetro e são comparadas aos tratamentos no experimento, portanto, o MMS representa um ótimo agente para controle positivo em ensaios de genotoxicidade/mutagenicidade em culturas de células e organismos teste (BIANCHI *et al.*, 2016; FAGUNDES *et al.*, 2017; ROBERTO *et al.*, 2016).

A utilização do MMS torna-se favorável nesses testes por apresentar alta genotoxicidade em pequenas concentrações, e baixa citotoxicidade, permitindo que as células continuem no ciclo celular e as alterações provocadas possam ser visualizadas em diferentes fases da divisão celular (BIANCHI *et al.*, 2015; RANK; NIELSEN, 1997)

### 3.6 Estudos *In silico*

A tecnologia computacional tem sido essencial no processo de planejamento e desenvolvimento de fármacos, uma vez que possibilita a otimização do tempo e de custos operacionais. Entretanto, mesmo com toda a tecnologia disponível, a busca por fármacos é um processo árduo e de grande complexidade. Nessa perspectiva, existem inúmeras ferramentas e métodos que agilizam e otimizam o processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, a citar as avaliações *in silico*, que além de utilizarem softwares, fazem uso de modelos matemáticos e estatísticos, com eficácia comprovada, a fim de prever as prováveis características biológicas e farmacológicas de substâncias químicas em um período curto de tempo (TOROPOVA, 2017).

'*In silico*' é um termo moderno geralmente usado para significar experimentação realizada por computador e está relacionada aos ensaios biológicos mais comumente conhecidos como *in vivo* e em *in vitro*. Os estudos *in silico* têm como vantagem a rapidez na sua execução, o baixo custo e a capacidade de reduzir o uso de animais em ensaios de toxicidade. Há vários tipos de ferramentas computacionais que permitem obter diferentes informações acerca de substâncias bioativas, tais como as propriedades farmacocinéticas, predição de receptores biológicos (*screening*) e determinação de seu mecanismo de ação (KADAM; ROY, 2007; KAZMI *et al.*, 2019; VANJARI *et al.*, 2012). Entre as propriedades farmacocinéticas, destacam-se os processos de absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade, que são limitantes ao se desenvolver uma substância bioativa que possa atuar como fármaco (CHENG *et al.*, 2013).

A biodisponibilidade está relacionada ao processo de absorção, alta biodisponibilidade oral é frequentemente uma consideração importante no desenvolvimento de substâncias bioativas como agentes terapêuticos. O candidato à fármaco deve atender a cinco parâmetros associados com a solubilidade e a

permeabilidade à barreira plasmática: peso molecular, coeficiente de partição (Log P), número de doadores de ligação hidrogênio, número de receptores de ligação hidrogênio e área topológica superficial polar. Essa condição ficou conhecida pelo mnemônico “Regra dos Cinco”, porque para cada um dos cinco parâmetros, os valores encontrados eram próximos a cinco ou múltiplos de cinco (LIPINSKI, 2004).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Compostos testados, período e local

A naringenina foi obtida da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Como corante foi utilizadaorceína acética 2% (Dinâmica), e como controle positivo foi utilizado o metanossulfonato de metila (MMS). Também foram utilizados nos experimentos acetona, álcool etílico, e ácido clorídrico (grau analítico, Synth). Bulbos de cebola da espécie *Allium cepa* L. (variedade beta cristal, formato periforme) foram obtidos de uma horta orgânica localizada em Peabiru, Paraná, Brasil.

### 4.2 Produção das nanopartículas de naringenina

As nanopartículas foram obtidas pela técnica de dispersão sólida descrita previamente por Almeida *et al.* (2018) com pequenas modificações. O encapsulante utilizado foi o surfactante Poloxamer407. A mistura de etanol (37,5g), Tween80 (0,009g) e Poloxamer407 (0,9g) pesadas num béquer foi submetida ao banho de água quente até que houvesse uma completa dissolução que resultou num aspecto transparente da solução. Posteriormente, a solução foi colocada em leve agitação magnética por aproximadamente 5 minutos, sendo então, adicionado o bioativo naringenina (0,090g) ao béquer que foi deixado por mais 10 minutos de agitação. A mistura foi submetida ao banho de ultrassom (Equipamento *Fisher Scientific*, 120W) por 3 minutos (30 segundos ligado e 10 segundos desligado). A dispersão resultante foi evaporada em estufa com circulação e renovação de ar. As amostras secas foram refrigeradas e protegidas da luz.

### 4.3 Análises de citotoxicidade e genotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade da naringenina foi realizada numa solução aquosa nas concentrações 1 e 3 % em massa (tratamentos), escolhidas com base em resultados prévios obtidos pelo grupo de pesquisa.

Os bulbos de cebola foram colocados em frascos com água destilada para obtenção de raízes de 3,0 cm de comprimento. Antes de colocar as raízes em contato com seus respectivos tratamentos ou controles, as raízes foram coletadas e fixadas



para servirem de controle do próprio bulbo, o que foi identificado como tempo de análise no tempo de 0 hora ou controle do próprio bulbo (Co - 0h). Em seguida, as demais raízes foram colocadas em seus respectivos tratamentos ou controles por 24 e 48 horas, procedimentos denominados tempos de exposição 24 e 48 horas, onde raízes foram coletadas a cada 24 horas. Para cada tratamento ou controle avaliado foram utilizados cinco bulbos de cebolas.

Foi preparado um controle positivo com metilmetanossulfonato (MMS), uma substância sabidamente citotóxica e genotóxica para a *A. cepa* na concentração de  $4.10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>, além de um controle negativo apenas com água destilada. As raízes coletadas durante o experimento foram fixadas em solução 3:1 de *Carnoy* (etanol: ácido acético) por até 24 horas.

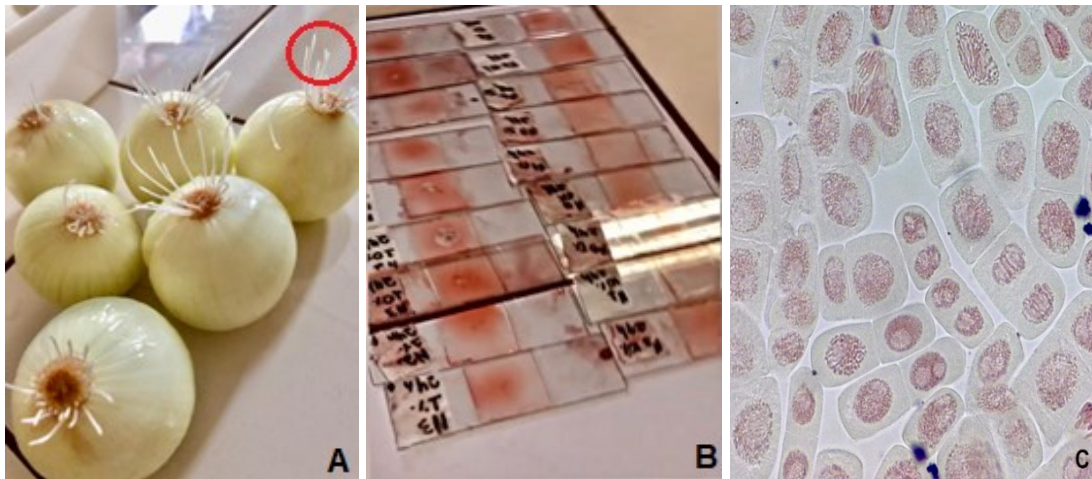
Após a fixação em Carnoy, as raízes foram hidrolizadas em HCl 1N, e suas regiões meristemáticas foram excisadas para confecção de lâminas por meio da técnica de esmagamento e coradas com orceína acética 2%, conforme protocolo de Guerra e Souza (2002), e foram analisadas em microscópio óptico (Zeiss Primo Star com câmera Axiocam 105 Color) em aumento de 400x. Para todo bulbo foram analisadas 1.000 células, totalizando 5.000 células para cada grupo controle (0 h), cada grupo tempo de exposição 24 h e cada grupo tempo de exposição 48 h, somando-se 15.000 células analisadas para cada tratamento e controle. Foram contabilizadas células em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase para a definição do índice mitótico, determinando-se assim o potencial citotóxico. O índice mitótico e o índice de divisão celular foram calculados de acordo com a Equação 1.

$$IM (\%) = 100. \frac{\text{total de células em divisão}}{\text{total de células analisadas}} \quad \text{Equação (1)}$$

O potencial genotóxico foi avaliado por meio da frequência de micronúcleos, metáfases colchícnicas, pontes anáfasicas e telofásicas, ampliações gênicas, células com aderências, brotos nucleares e anáfases multipolares. O índice de alterações celulares para cada tempo de exposição foi calculado a partir da contabilização do número de células aberrantes em 100 células analisadas por bulbo, totalizando 500 células, conforme descrito por Silveira *et al.* (2017) e Kuçuk *et al.* (2018). Para a interpretação dos resultados obtidos foi utilizado análise de variância

(ANOVA) e os valores médios foram comparados pelo teste de Scott-Knott com significância de 0,05.

**Figura 5: (A) bulbos de *allium cepa* L. germinados, com descaque (circulo em vermelho) para a região meristemática; (B) Lâminas montadas segundo o método de Guerra e Souza (2002); (C) Imagem de microscópio óptico na objetiva de 40x das células de *allium cepa* L.**



Fonte: Autoria própria (2022).

#### 4.4 Estudos *in silico*

ACD/ChemSketch: ferramenta utilizada para o desenho estrutural, geração do código SMILES (O=C2c3c(O[C@H](c1ccc(O)cc1)C2)cc(O)cc3O) e determinação tridimensional da naringenina. A estrutura molecular com arranjo tridimensional otimizado foi disposta em arquivo individual e arquivada em extensão mol. A ferramenta ACD/ChemSketch, de acesso off-line, é mantida pela empresa ACD/Labs.

Molinspiration foi a ferramenta utilizada para a predição de bioatividades (para os modelos de ligante GPCR, modulador canal iônico, inibidor quinase, ligante receptor nuclear, inibidor protease e inibidor de enzimas) e, também, na avaliação das propriedades moleculares relacionadas à biodisponibilidade oral, que foram avaliadas segundo “a regra dos cinco” de Lipinski *et al.* (1997), em que:  $miLogP$  (coeficiente de partição octanol - água)  $\leq 5,00$ ;  $TPSA$  (área de superfície polar topológica)  $\leq 140 \text{ \AA}^2$ ;  $MM$  (massa molar)  $\leq 500 \text{ g.mol}^{-1}$ ;  $nALH$  (número de aceptores de ligação de hidrogênio)  $\leq 10$ ; e  $nDLH$  (número de doadores de ligação de hidrogênio)  $\leq 5$ . A não-

violação desses parâmetros indica que o composto avaliado provavelmente apresentará boa biodisponibilidade oral. A ferramenta Molinspiration foi criada em 1986 na Universidade de Bratislava, Eslováquia, e atualmente é domínio da empresa Molinspiration Cheminformatics, que trabalha com técnicas de quimioinformática *online* (LIPINSKI *et al.*, 2001).

AdmetSAR 2.0 foi a ferramenta empregada para a predição das propriedades farmacocinéticas, tais como absorção, distribuição, metabolismo, toxicidade e excreção (ADMET). Entre os 47 modelos disponíveis foram considerados, no presente trabalho, os modelos absorção no intestino humano, Caco-2, barreira hematoencefálica, inibidor de glicoproteína-P, CYP3A4 - substrato, CYP2C9 - substrato, CYP2D6 - substrato, CYP3A4 - inibição, CYP2C9 - inibição, CYP2C19 - inibição, CYP2D6 - inibição, CYP1A2 - inibição, CYP - promiscuidade inibitória, carcinogenicidade (binária), carcinogenicidade (trinária), mutagênese segundo Ames, hepatotoxicidade e toxicidade oral aguda. A ferramenta admetSAR é mantida por pesquisadores da Universidade de Ciência e Tecnologia da China Oriental (YANG *et al.*, 2018).

*MetaTox* (ferramenta online e gratuita, <http://www.way2drug.com/mg>) foi utilizada para previsão do metabolismo de xenobióticos e cálculo da toxicidade de metabólitos com base na fórmula estrutural de produtos químicos conhecidos. *MetaTox* prevê metabólitos, que são formados por nove classes de reações (hidroxilação alifática e aromática, N- e O-glucuronidação, N-, S- e C-oxidação e N- e O-desalquilação). O cálculo da probabilidade para os metabólitos gerados é baseado em análises das relações “estrutura-biotransformação” e “estrutura modificada dos átomos” usando uma abordagem bayesiana (RUDIK *et al.*, 2017).

IGEMDOCK 2.1 foi a ferramenta utilizada no estudo de ancoragem molecular, que foi executada em sua seção *Protein Ligand Docking/Screening*, mediante preparo do sítio ativo *Prepare Binding Site* e carregamento da estrutura molecular da naringenina arquivados na ferramenta *ChemSketch*, no formato mol (utilizando a opção *Prepare Compounds*). As energias de interação da naringenina com os resíduos de aminoácidos da enzima estudada foi gerada na página *Docked poses/Post-Screening Analysis* do próprio programa (HSU *et al.*, 2011).

Chimera UCSF foi a ferramenta usada no estudo das interações da naringenina com a SOD2 (1LUV), cujos resultados foram obtidos do estudo de ancoragem

molecular. Essa ferramenta, de acesso livre, foi desenvolvida por pesquisadores da Universidade da Califórnia, em San Francisco.

A enzima superóxido dismutase (SOD2) utilizada neste estudo (PDB: 1LUV), reportada na literatura por Hearn *et al.* (2003), é constituída por duas cadeias (A e B), possui comprimento de 198 aminoácidos e de origem *homo sapiens*. O sítio ativo dessa enzima é envolto pelos resíduos de aminoácidos His26, His30, His74, His163 e Asp159, e está disponível no banco de dados *Protein Data Bank*.

A enzima catalase utilizada neste estudo (PDB: 1DGF), reportada na literatura por Putnam *et al.* (2000), é constituída por quatro cadeias (A, B, C e D), possui comprimento de 497 resíduos de aminoácidos e de origem *homo sapiens*.

*PoseView* integrada ao servidor *Proteins Plus* (ferramenta *online* e gratuita, <https://proteinsplus.zbh.uni-hamburg.de/#dogsit>), que cria automaticamente diagramas bidimensionais de complexos proteínas-ligantes de acordo com as convenções de desenho químico. A geração de diagramas de estrutura e suas modificações de *layout* são baseadas na biblioteca 2Ddraw. As interações entre as moléculas foram estimadas por um modelo de interação embutido que é baseado em tipos de átomos e critérios geométricos simples (FRICKER; GASTREICH; RAREY, 2004).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudos *in vivo*

As Tabelas 1 e 2 apresentam os resultados obtidos nos ensaios em *Allium cepa* L. exposta à naringenina livre (não encapsulada). As Tabelas 3 e 4 apresentam os resultados para as nanopartículas contendo naringenina.

**Tabela 1 - Índices mitóticos (%) observados em meristemas de raízes de *A. cepa* expostos a diferentes concentrações de naringenina livre em 24 e 48 horas exposição**

Controle positivo MMS ( $4 \times 10^{-4}$ mol/L)		IM (%) / DP		
		6,51±0,34		
	TR (%)	IM (%) / DP		
		0 h (Co)	24 h	48 h
Naringenina	1	22,0±0,70 <sup>a</sup>	27,1±1,00 <sup>a</sup>	28,4±0,84 <sup>a</sup>
	3	24,0±0,21 <sup>a</sup>	21,2±0,74 <sup>a</sup>	21,7±0,63 <sup>a</sup>
	10	23,9±0,53 <sup>a</sup>	25,6±0,74 <sup>a</sup>	9,41±1,00 <sup>b,*</sup>

Co: controle; IM: índice mitótico; TR: tratamento; h: hora. MMS: metil metano sulfonato (controle positivo). Análise de variância (ANOVA), médias observadas comparadas pelo teste de Scott-Knott a 0,05. Letras minúsculas diferentes referem-se a médias diferentes entre os tempos de exposição considerados (Co-0h, 24 h e 48 h) dentro de uma mesma concentração. DP: Desvios padrão informados para cada tempo de análise avaliado de cada concentração. \*Índice mitótico igual ao índice mitótico observado para o controle positivo. Fonte Autoria própria (2022).

**Tabela 2 - Índices de alterações celulares observados em meristemas radiculares de *A. cepa* expostos a diferentes concentrações de naringenina livre por 24 e 48 horas**

Controle positivo MMS ( $4 \times 10^{-4}$ mol/L)		IAC (%)		
		8,95±0,98		
	TR (%)	TE/IAC (%)		
		0 h (Co)	24 h	48 h
Naringenina	1	0,10±0,10 <sup>a</sup>	0,10±0,08 <sup>a</sup>	0,10±0,08 <sup>a</sup>
	3	0,10±0,12 <sup>a</sup>	0,10±0,03 <sup>a</sup>	0,10±0,10 <sup>a</sup>
	10	0,10±0,08 <sup>a</sup>	0,10±0,07 <sup>a</sup>	0,20±0,05 <sup>a</sup>

TE: tempo de exposição; IAC: Índice de alterações cromossômicas; TR: tratamento; Co: controle; h: hora; MMS: metanossulfonato de metila (controle positivo) em 24h. Análise de variância (ANOVA), médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 0,05. Letras diferentes, na mesma linha, indicam valores médios significativamente diferentes entre os tempos de exposição considerados (Co-0h, 24h e 48h) dentro da mesma concentração. DP: Desvios padrão informados para cada tempo de análise avaliado para cada concentração. Fonte Autoria própria (2022).

**Tabela 3 - Índices mitóticos (%) observados em meristemas de raízes de *A. cepa* expostos a diferentes concentrações de nanopartículas contendo naringenina em 24 e 48 horas exposição**

Controle positivo MMS ( $4 \times 10^{-4}$ mol/L)		IM (%) / DP		
		6,51±0,34		
Nanopartículas contendo naringenina	TR (%)	IM (%) / DP		
		0 h (Co)	24 h	48 h
	1	19,8±0,50 <sup>a</sup>	18,7±0,70 <sup>a</sup>	20,9±0,30 <sup>a</sup>
	3	18,0±0,98 <sup>a</sup>	16,9±0,89 <sup>a</sup>	20,9±0,35 <sup>a</sup>

Co: controle; IM: índice mitótico; TR: tratamento; h: hora. MMS: metil metano sulfonato (controle positivo). Análise de variância (ANOVA), médias observadas comparadas pelo teste de Scott-Knott a 0,05. Letras minúsculas diferentes referem-se a médias diferentes entre os tempos de exposição considerados (Co-0h, 24 h e 48 h) dentro de uma mesma concentração. DP: Desvios padrão informados para cada tempo de análise avaliado de cada concentração. \*Índice mitótico igual ao índice mitótico observado para o controle positivo. Fonte Autoria própria (2022).

**Tabela 4 - Índices de alterações celulares observados em meristemas radiculares de *A. cepa* expostos a diferentes concentrações de nanopartículas contendo naringenina por 24 e 48 horas**

Controle positivo MMS ( $4 \times 10^{-4}$ mol/L)		IAC (%)		
		8,95±0,98		
Nanopartículas contendo naringenina	TR (%)	TE/IAC (%)		
		0 h (Co)	24 h	48 h
	1	0,20±0,1 <sup>a</sup>	0,20±0,1 <sup>a</sup>	0,60±0,2 <sup>a</sup>
	3	0,20±0,1 <sup>a</sup>	0,20±0,1 <sup>a</sup>	0,60±0,2 <sup>a</sup>

TE: tempo de exposição; IAC: Índice de alterações cromossômicas; TR: tratamento; Co: controle; h: hora; MMS: metanossulfonato de metila (controle positivo) em 24h. Análise de variância (ANOVA), médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 0,05. Letras diferentes, na

mesma linha, indicam valores médios significativamente diferentes entre os tempos de exposição. Fonte Autoria própria (2022).

A naringenina nas condições de análises estabelecidas até a concentração de 3% não causou alteração no índice de divisão celular das células meristemáticas de raízes de *A. cepa* nos dois tempos de análises considerados, bem como não induziu alterações de fuso mitótico e quebras cromossômicas nesse sistema teste. Tais resultados também sugerem que esse composto possa ser modulador de alterações celulares em tecido de intensa proliferação celular, como as células meristemáticas de *A. cepa*.

As nanopartículas contendo naringenina, nas condições de análises estabelecidas, não causaram alteração no índice de divisão celular das células meristemáticas de raízes de *A. cepa* nos dois tempos de análises considerados, bem como não induziram alterações de fuso mitótico e quebras cromossômicas nesse sistema teste.

Ganaie *et al.* (2019) elaboraram um estudo cujo objetivo foi examinar os efeitos protetores da naringenina no dano ao DNA induzido pela oxaliplatina em camundongos. A extensão da genotoxicidade foi avaliada por múltiplos ensaios de genotoxicidade (marcador 8-hidroxidesoxiguanosina, cometa, micronúcleo e ensaios de aberração cromossômica, avaliação do marcador de estresse oxidativo Glutathione), a fim de determinar diversos tipos de danos ao DNA. Os resultados indicaram que a administração de naringenina reduziu significativamente os danos ao DNA induzidos pela oxaliplatina, possivelmente devido às suas fortes propriedades antioxidantes. Os resultados sugerem que a naringenina é uma candidata potencial para desenvolvimento futuro como agente quimioprotetor contra complicações associadas à quimioterapia.

## 5.2 Estudos *in silico*

### 5.2.1 Avaliação de propriedades farmacocinéticas da naringenina

As propriedades moleculares relacionadas à biodisponibilidade oral foram determinadas utilizando a ferramenta computacional *Molinspiration*:  $\text{miLogP}$  (coeficiente de partição octanol-água) = 2,12; TPSA (área de superfície polar

topológica) = 86,99 Å<sup>2</sup>; MM (massa molar) = 230,26 g.mol<sup>-1</sup>; nALH (número de aceptores de ligação de hidrogênio) ≤ 10; e nDLH (número de doadores de ligação de hidrogênio) ≤ 5. Observa-se que nenhum dos parâmetros avaliados violam a regra dos cinco de Lipinski, indicando que a naringenina tem boa biodisponibilidade oral.

Vale ressaltar que outro parâmetro farmacocinético importante é a metabolização, cujo processo pode alterar significativamente a concentração de substâncias bioativas após o processo de absorção. Felgines *et al.* (2000), por exemplo, evidenciaram que a naringenina, administrada na dieta de ratos, é amplamente esterificada para grupos sulfato (~90%). Em menor proporção, a naringenina também foi metabolizada em ácidos fenólicos que foram detectados no plasma e na urina, principalmente na forma de glucurono- ou sulfo-conjugados.

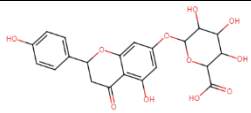
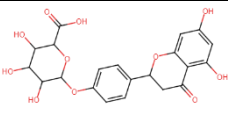
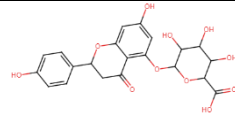
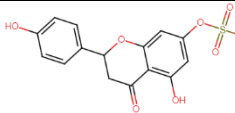
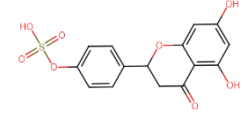
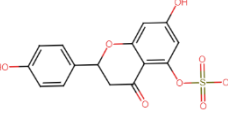
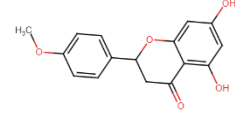
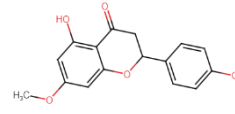
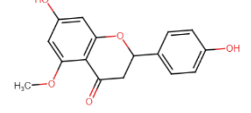
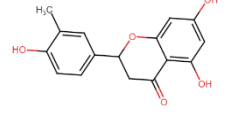
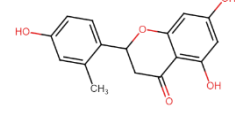
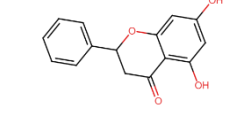
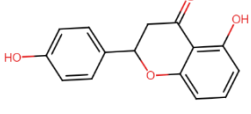
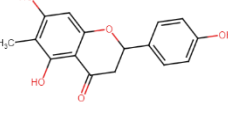
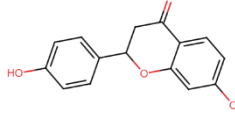
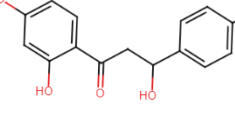
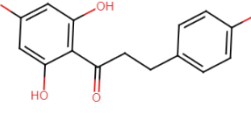
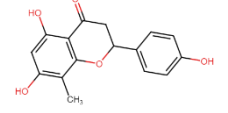
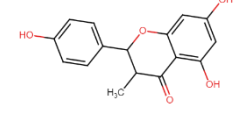
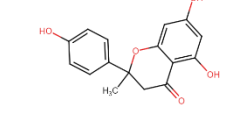
Bugianesi *et al.* (2002) realizaram experimentos para determinar se os níveis plasmáticos de naringenina eram detectáveis após o consumo de uma refeição contendo 150 mg de extrato de tomate cozido, que corresponde a 3,8 mg de naringenina. O sangue dos indivíduos em jejum foi coletado em 2, 4, 6, 8 e 24 horas após a refeição. Como resultado, os autores observaram que a naringenina não conjugada não foi detectada no plasma em nenhum momento após o consumo da refeição controle. Além da naringenina, outros polifenóis (rutina e ácido clorogênico) foram detectados no extrato de tomate, mas esses polifenóis e seus derivados (quercetina e ácido cafeico) não foram detectados no plasma em nenhum momento.

Ao relacionar os estudos de Felgines *et al.* (2000) e Bugianesi *et al.* (2002) é possível inferir que a baixa biodisponibilidade de naringenina, quando essa é administrada oralmente, no plasma é resultante da facilidade de metabolização da mesma. Salehi *et al.* (2019) em uma revisão de literatura sobre o potencial terapêutico da naringenina, pontuam que a biodisponibilidade da naringenina foi devidamente estudada em trabalhos anteriores, sugerindo um extenso metabolismo pré-sistêmico da flora intestinal, levando a um amplo padrão de produtos de degradação. Essa constatação indica ainda que as bioatividades reportadas na literatura para a naringenina são decorrentes de metabólitos produzidos, o que não invalida todo o conhecimento produzido acerca desse produto natural. No entanto, abre caminho para pesquisas que possam relacionar os efeitos terapêuticos da substância com os metabólitos produzidos na flora intestinal ou após o processo de absorção.

No Quadro 1 são apresentadas as estruturas moleculares dos possíveis metabólitos da naringenina calculadas utilizando a ferramenta *MetaTox*



**Quadro 1: Predição, calculados na ferramenta *MetaTox*, de metabólitos formados a partir da naringenina.**

			
Metabólito 1	Metabólito 2	Metabólito 3	Metabólito 4
			
Metabólito 5	Metabólito 6	Metabólito 7	Metabólito 8
			
Metabólito 9	Metabólito 10	Metabólito 11	Metabólito 12
			
Metabólito 13	Metabólito 14	Metabólito 15	Metabólito 16
			
Metabólito 17	Metabólito 18	Metabólito 19	Metabólito 20

Fonte: Autoria própria (2022).

É possível observar a predição de 20 metabólitos, indicados de acordo com a probabilidade de formação no organismo vivo, sendo os metabólitos com maior probabilidade de ocorrência oriundos de reações de glucoronidação (metabólitos 1, 2 e 3), sulfonação (metabólitos 4, 5 e 6) e hidroxilação (metabólitos 7-11). Outros parâmetros relacionados aos processos de ADMET foram estudados utilizando a ferramenta admetSAR e estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5 - Propriedades ADMET calculadas utilizando a ferramenta admetSAR para a naringenina**

Modelos avaliados	Valor	Probabilidade
Absorção no intestino humano	+	0.9936
Caco-2	+	0.5424
Mutagenese segundo Ames	-	0.8700
Hepatotoxicidade	+	0.6750
Toxicidade Oral Aguda	II	0.3682

Fonte: Autoria própria (2022).

Para o modelo de Absorção no Intestino Humano, observou-se que a naringenina apresentou resultado positivo para esse modelo. Para o desenvolvimento do algoritmo desse modelo, Shen *et al.* (2010) utilizaram dados de 578 compostos, sendo 500 absorvidos (HIA+) e 78 não absorvidos (HIA-) pelo intestino humano. Se o HIA% calculado for inferior a 30%, o composto é rotulado como HIA-, caso contrário é rotulado como HIA+ (SHEN *et al.*, 2010).

Para o modelo de permeabilidade em células Caco-2, observou-se que a naringenina apresentou resultado positivo para esse modelo. Vale ressaltar que células Caco-2 são células utilizadas como um modelo *in vitro* da mucosa do intestino delgado humano, com o objetivo de avaliar a permeabilidade de medicamentos administrados por via oral. O algoritmo desenvolvido por The *et al.* (2011) levando em consideração valores de permeabilidade de Caco-2 de 674 substâncias semelhantes a fármacos ou fármacos comerciais. Os resultados positivos para os modelos de permeabilidade em caco-2 e de absorção no intestino humano são concordantes com o resultado positivo de biodisponibilidade oral, pois consiste na primeira etapa para substâncias bioativas administradas oralmente.

Para o modelo de hepatotoxicidade, observou-se que a naringenina apresentou resultado positivo nível II. Para desenvolver o algoritmo desse modelo, Mulliner *et al.* (2016) estudaram 3115 substâncias tóxicas e 593 substâncias não tóxicas, cujos dados foram coletados de publicações e bancos de dados como *DrugBank* (2016). Bikiaris e colaboradores (2009) utilizaram a técnica de dispersão sólida na associação do fármaco fluvastatina ao succinato de polipropileno (PPSu), que é um poliéster alifático, com o objetivo de manter a liberação deste fármaco e diminuir sua toxicidade hepática. Os ensaios de liberação *in vitro* confirmaram o controle da liberação da fluvastatina quando a associação se deu ao PPSu de maior peso molecular, pois o aumento da cadeia polimérica diminuiu os grupamentos polares e isto levou a diminuir a afinidade pela água.

Para o modelo de mutagenicidade, um dos modelos de toxicidade mais importantes, observou-se que a naringenina apresentou resultado negativo para esse modelo. O algoritmo desse modelo foi desenvolvido a partir da análise de um banco de dados abrangente contendo 7617 compostos diversos, incluindo 4252 mutagênicos e 3365 não mutagênicos (XU *et al.*, 2012).

Para o modelo de toxicidade oral aguda, observou-se que a naringenina apresentou média toxicidade ao se enquadrar na categoria II ( $50 \text{ mg/kg} < \text{LD}_{50} \leq 500$

mg/kg). Esse resultado, assim como a indicação de hepatotoxicidade, aponta para a necessidade de se avaliar a quantidade mínima de naringenina que, se administrada oralmente, garantirá as bioatividades idealizadas, assim como a quantidade máxima, respeitando o limite previsto para a toxicidade oral aguda, a fim de reduzir os efeitos adversos possíveis.

Os resultados obtidos nos estudos de propriedades ADMET indicam que a naringenina possui propriedades moleculares adequadas para substâncias bioativas que são administradas oralmente, e possui relativamente baixa toxicidade, fatores que tornam a naringenina um composto promissor para o desenvolvimento de novos fármacos, e para uma melhor implementação na indústria de alimentos.

### 5.2.2 Estudo frente à enzima superóxido dismutase (SOD2, PDB 1LUV)

Para o estudo da ação da naringenina frente a enzima superóxido dismutase (SOD2) utilizou-se a PDB 1LUV (HEARN *et al.*, 2003). Essa enzima foi escolhida devido à sua importância para o sistema antioxidante endógeno e seu papel nas alterações mutagênicas e na citotoxicidade de agentes externos. A Figura 6 apresenta a cadeia A da enzima SOD2, em destaque está a região do sítio ativo, localizada em torno dois íons  $Mn^{+2}$ .

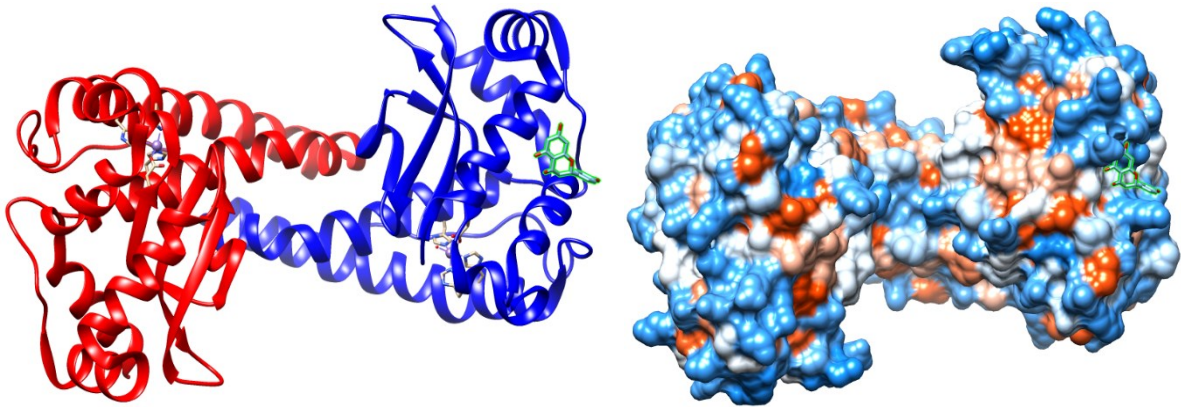
**Figura 6: Representação da cadeia A da enzima SOD2 (PDB 1LUV) com destaque (círculos vermelhos) para as regiões dos sítios ativos**



Fonte: Autoria própria (2022).

Na Figura 7 está apresentado a *best pose*, ancoragem molecular de menor energia, resultante do estudo de ancoragem molecular da naringenina frente a SOD2 (PDB 1LUV). A interação naringenina - SOD 2 (PDB 1LUV) resultou em uma energia livre de -81,42 kJ/mol, sendo -59,66 kJ/mol oriunda de interações de van der Waals e -21,76 kJ/mol de interações do tipo ligação de hidrogênio.

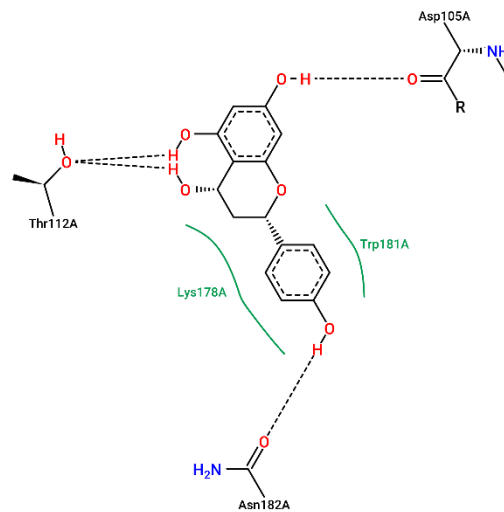
**Figura 7: *Best pose* resultante do estudo de ancoragem molecular da naringenina frente a SOD2 (PDB 1LUV)**



Fonte: Autoria própria (2022).

Ao observar a superfície hidrofóbica do complexo formado entre a enzima SOD2 e a naringenina (Figura 7, direita) observa-se que a naringenina está ancorada na superfície da enzima. Considerando que regiões vermelhas indicam hidrofobia e regiões azuis indicam hidrofilia, verifica-se que a naringenina está ancorado em uma região hidrofílica e estabelece ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Asp105, Thr112, e Asn182, e interações de van der Waals com os resíduos de aminoácidos Lys178 e Trp181 (Figura 8).

**Figura 8: Representação bidimensional, produzida pela ferramenta *PoseView*, da interação a enzima SOD2 (PDB 1LUV) e naringenina**



**Fonte: Autoria própria (2022).**

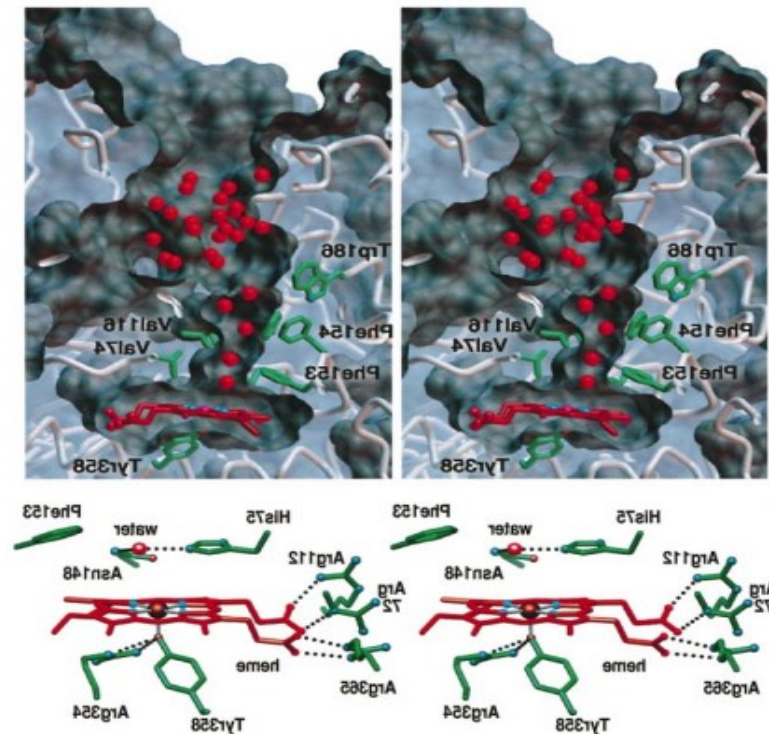
As superóxidos dismutases catalisam a decomposição do superóxido por meio de ciclos de oxidação-redução de um íon metálico, no caso da SOD2 o íon metálico é o Mn (III). A atividade catalítica dessa enzima é caracterizada por uma etapa lenta, de ordem zero em relação ao superóxido, que ocorre devido a inibição do produto pelo ânion peróxido, na qual o resíduo de aminoácido His30, que está presente no canal de acesso ao substrato e está a cerca de 5,8 Å do Mn (III), é importante para a atividade enzimática. Outros resíduos de aminoácidos, tais como His26, His74, His163 e Asp159 estão presentes no sítio ativo e são importantes para a realização da atividade catalítica da SOD2.

Em relação ao estudo de ancoragem molecular, é possível observar que a naringenina está ancorada em região distante do sítio ativo da enzima, considerando que o manganês participa e está presente no sítio ativo. Desta forma, o resultado obtido nesse estudo *in silico* precisa ser relacionado com um teste *in vitro* ou *in vivo*, uma vez que muitas substâncias bioativas podem inibir a ação de enzimas por um mecanismo não-competitivo, ou seja, atuando sobre a enzima em regiões diferentes do sítio ativo (YUNG-CHI; PRUSOFF, 1973).

### 5.2.3 Estudo frente à enzima catalase (PDB 1DGF)

Para o estudo da ação da naringenina frente a enzima catalase utilizou-se como modelo dados da enzima PDB 1DGF (PUTNAM *et al.*, 2000), cuja visão estérea do sítio ativo é apresentada na Figura 9.

**Figura 9: Visão estérea do sítio ativo da enzima catalase (PDB 1DGF)**



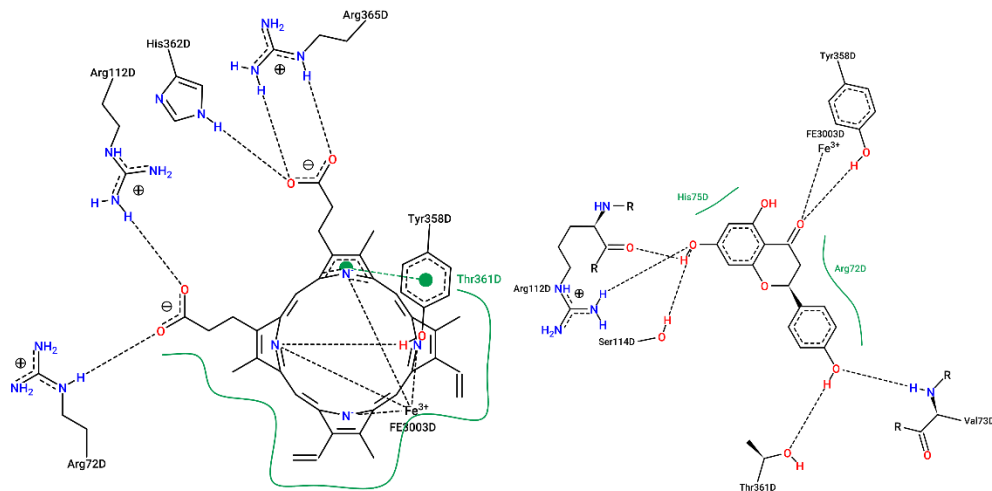
Fonte: Putnam (2000).

No sítio ativo dessa enzima, o ferro-heme pentacoordenado (vermelho) é acessível a peróxidos e pequenas moléculas no fundo de um longo canal com uma rede de moléculas de água que termina com uma molécula de água ligada pelas cadeias laterais da proteína (verde), His75 e Asn148. A reatividade do ferro heme é ajustada pela doação de elétrons pelo resíduo de aminoácido Tyr358 e pela neutralização da carga carboxilato pelos resíduos Arg72, Arg112 e Arg365. O uso do cofator heme permite que a química do grupo seja alterada por interações que não comprometam a ligação do substrato. As ligações de hidrogênio envolvem o Tyr358, Arg354, His218 e Asp348, que então se ligam a moléculas de água estruturalmente ordenadas. A retransmissão de cargas provavelmente depende da capacidade de

Arg354, His218 e Asp348 existirem em múltiplos estados de protonação para estabilizar a eletrostática gerada por diferentes estados de oxidação do ferro (PUTNAM *et al.*, 2000).

A interação naringenina-catalase (PDB 1DGF) resultou em uma energia livre de -114,587 kJ/mol, oriunda de interações do tipo *van der Waals* (-95,371 kJ/mol) e ligação de ligação de hidrogênio (-19,2166 kJ/mol). Na Figura 10 está representado as interações entre o ferro-heme e os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da catalase (lado esquerdo) e as interações entre a naringenina e os resíduos de aminoácidos presentes na região de ancoramento (lado direito).

**Figura 10: Representação bidimensional, produzida pela ferramenta PoseView, da interação a enzima catalase (PDB 1DGF) e naringenina**



Fonte: Autoria própria (2022).

É possível observar que a naringenina estabelece interações com vários dos resíduos de aminoácidos reportados como importantes para o processo catalítico da catalase, tais como: Arg72, Arg112, Thr361 e Tyr385. Dessa forma, entende-se que a naringenina pode atuar como inibidora de catalase por um mecanismo competitivo.

## 6 CONCLUSÕES

A naringenina foi avaliada em relação a possíveis efeitos sobre tecidos meristemáticos de *Allium cepa* L., utilizado neste trabalho como um modelo para citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade. Dados de propriedades farmacocinéticas e de ancoragem molecular também foram obtidos em estudos *in silico* a fim de aprofundar a discussão sobre o tema.

A naringenina tanto em sua forma livre quanto em sua forma encapsulada não causou alteração no índice de divisão celular das células meristemáticas de raízes de *A. cepa* nas condições testadas. Também não foram detectadas alterações significativas de fuso mitótico e quebras cromossômicas nesse sistema.

No estudo de ancoragem molecular naringenina-superóxido dismutase 2 (PDB 1LUV), verificou-se que a naringenina estava ancorada em uma região hidrofílica distante do sítio ativo da enzima (SOD2) e estabeleceu ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Asp105, Thr112, e Asn182, bem como interações de *van der Waals* com os resíduos de aminoácidos Lys178 e Trp18. Os resultados obtidos nos estudos de propriedades ADMET indicaram que a naringenina possui toxicidade relativamente baixa, corroborando assim os resultados *in vivo*.

Já no estudo de ancoragem molecular da interação naringenina-catalase (PDB 1DGF) resultou em uma energia livre de -114,587 kJ/mol, oriunda de interações do tipo *van der Waals* (-95,371 kJ/mol) e ligação de ligação de hidrogênio (-19,2166 kJ/mol). A naringenina estabeleceu interações com vários dos resíduos de aminoácidos reportados como importantes para o processo catalítico da catalase, tais como Arg72, Arg112, Thr361 e Tyr385. Dessa forma, entende-se que a naringenina pode atuar como inibidora de catalase por um mecanismo competitivo.

Somando os resultados obtidos a partir dos ensaios *in vivo* em tecidos meristemáticos de *Allium cepa* L., com os resultados obtidos nos estudos de propriedades ADMET, tudo indica que a naringenina possui propriedades moleculares adequadas para substâncias bioativas que são administradas oralmente, e possui relativamente baixa toxicidade, fatores que tornam a naringenina um composto promissor para o desenvolvimento de novos fármacos, e para uma melhor implementação na indústria de alimentos.



## REFERÊNCIAS

ADHIKARI, U. *et al.* Properties of poloxamer molecules and poloxamer micelles dissolved in water and next to lipid bilayers: Results from computer simulations. **Journal of Physical Chemistry B**, 2016. v. 120, n. 26, p. 5823–5830.

AJAZUDDIN; SARAF, S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. **Fitoterapia**, 2010. v. 81, n. 7, p. 680–689.

AKBARZADEH, Z.; PARVARESH, F. The effects of Naringenin on some human breast cancer cells: A systematic review. **Archives of Breast**, 2016. v. 3, n. 2, p. 34–40.

ALMEIDA, H. H. S. *et al.* Bioactive evaluation and application of different formulations of the natural colorant curcumin (E100) in a hydrophilic matrix (yogurt). **Food Chemistry**, 2018. v. 261, p. 224–232.

ALMEIDA, P. M. *et al.* Genotoxic potential of the latex from cotton-leaf physicnut (*Jatropha gossypifolia* L.). **Genetics and Molecular Biology**, v. 100, p. 93-100, 2015.

ANACLETO, L. R.; ROBERTO, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Toxicological effects of the waste of the sugarcane industry, used as agricultural fertilizer, on the test system *Allium cepa*. **Chemosphere**, v. 173, p. 31-42, 2017.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Quimica Nova**, 2006. v. 29, n. 1, p. 113–123.

BIANCHI, J.; CASIMIRO, F. T. C.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. **Chemosphere**, 1 Feb. 2016. v. 144, p. 475–483.

BIANCHI, J.; MANTOVANI, M. S.; MARIN-MORALES, M. A. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. **Journal of Environmental Sciences**, v. 36, p. 102-111, 2015.

BIKIARIS, D. N. *et al.* Novel biodegradable polyester poly(propylene succinate): Synthesis and application in the preparation of solid dispersions and nanoparticles of a water-soluble drug. **AAPS PharmSciTech**, 2009. v. 10, n. 1, p. 138–146.

BOISSEAU, P. *et al.* Nanomedicine, Nanotechnology in medicine To cite this version: HAL Id : hal-00598930 Nanomedicine , **Nanotechnology in medicine**. 2011.

BONCIU, E. *et al.* An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. **Caryologia**, 2018. v. 71, n. 3, p. 191–209.

BUDEL, R. G. *et al.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Toxicological evaluation of naringin-loaded nanocapsules in vitro and in vivo. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2020. v. 188, n. November 2019, p. 110754.

BURGESS, P. *et al.* On firm ground: IP protection of therapeutic nanoparticles. **Nature Biotechnology**, 2010. v. 28, n. 12, p. 1267–1270. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nbt1210-1267>>. Acesso em: 07 fevereiro 2022.

CABRERA, G. L.; RODRIGUEZ, D. M. G. **Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays**. **Mutation Research**. 1999. Disponível em: [www.elsevier.com/locate/molmut](http://www.elsevier.com/locate/molmut)Communityaddress:www.elsevier.com/locate/molmut. Acesso em: 03 fevereiro 2022.

CAVIA-SAIZ, M. *et al.* Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: A comparative study. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, May. 2010. v. 90, n. 7, p. 1238–1244.

CHAMPAGNE, C. P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Current Opinion in Biotechnology**, 2007. v. 18, n. 2, p. 184–190.

CHAO, C. L. *et al.* Naringenin more effectively inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in macrophages than in microglia. **Nutrition Research**, 2010. v. 30, n. 12, p. 858–864.

CHAURASIA, S. *et al.* Potential of Cationic-Polymeric Nanoparticles for Oral Delivery of Naringenin: In Vitro and In Vivo Investigations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2018. v. 107, n. 2, p. 706–716.

CHENG, F. *et al.* In Silico ADMET Prediction: Recent Advances, Current Challenges and Future Trends. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 12 Jun. 2013. v. 13, n. 11, p. 1273–1289.

CHERRAK, S. A. *et al.* In vitro antioxidant versus metal ion chelating properties of flavonoids: A structure-activity investigation. **PLoS ONE**, 2016. v. 11, n. 10, p. 1–21.

CHIOU, W. L.; KEYPHRASES, S. R. Pharmaceutical Applications of Solid Dispersion Systems Solid dispersion systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Volume 60, Issue 9, September 1971, Pages 1281-1302.

DATTA, S. *et al.* Assessment of genotoxic effects of pesticide and vermicompost treated soil with *Allium cepa* test. **Sustainable Environment Research**, 1 Jul. 2018. v. 28, n. 4, p. 171–178.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. [S.l.]: [s.n.], 2002.

DIAS, W. L. F. *et al.* Cytogenotoxic effect, phytochemical screening and antioxidant potential of *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill leaves. **South African Journal of Botany**, 1 Jul. 2019. v. 123, p. 30–35.

DORNAS, W. C. *et al.* Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmaceuticas Básica e Aplicada**, 2007. n. 31, p. 3559–1367.

DUTTA, J.; AHMAD, A.; SINGH, J. Study of industrial effluents induced genotoxicity on *Allium cepa* L. **Caryologia**, 3 Apr. 2018. v. 71, n. 2, p. 139–145.

FAGUNDES, G. E. *et al.* Effect of green juice and their bioactive compounds on genotoxicity induced by alkylating agents in mice. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, 3 Aug. 2017. v. 80, n. 13–15, p. 756–766.

FELGINES, C. *et al.* Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 279, n. 6, p. G1148-G1154, 2000.

FELISBINO, K. *et al.* Mesotrione herbicide does not cause genotoxicity, but modulates the genotoxic effects of Atrazine when assessed in mixture using a plant test system (*Allium cepa*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 1 Sep. 2018. v. 150, p. 83–88.

FERREIRA *et al.* Development, Characterisation and Evaluation of cytotoxicity of nanocapsuled naringenin and naringin. **Disciplinarum Scientia**, 2015. p. 285–299.

FILIMONOV *et al.* Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, 2014, 50 (3), 444–457. <https://doi.org/10.1007/s10593-0141496-1>.

FRICKER, P. C.; GASTREICH, M.; RAREY, M. Automated drawing of structural molecular formulas under constraints. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 44, n. 3, p. 1065-1078, 2004.

GANAI, M. A. *et al.* The protective effect of naringenin on oxaliplatin-induced genotoxicity in mice. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 2019. v. 67, n. 5, p. 433–438.

GEORGE, D.; MAHESWARI, P. U.; BEGUM, K. M. M. S. Cysteine conjugated chitosan based green nanohybrid hydrogel embedded with zinc oxide nanoparticles towards enhanced therapeutic potential of naringenin. **Reactive and Functional Polymers**, 2020. v. 148, p. 104480.

GEORGIEV, V.; ANANGA, A.; TSOLOVA, V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. **Nutrients**, 2014. v. 6, n. 1, p. 391–415.

HEARN, A. S. *et al.* Catalytic and structural effects of amino acid substitution at histidine 30 in human manganese superoxide dismutase: Insertion of valine Cy into

the substrate access channel. **Biochemistry**, 18 Mar. 2003. v. 42, n. 10, p. 2781–2789.

HERRERO, O. *et al.* Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 18 Mar. 2012. v. 743, n. 1–2, p. 20–24.

HIGDON, J. Flavonoids. Linus Pauling Institute. Oregon State University, 2005.

HSU, K. C. *et al.* Igemdock: A graphical environment of enhancing gemdock using pharmacological interactions and post-screening analysis. **BMC Bioinformatics**, 15 Feb. 2011. v. 12, n. SUPPL. 1.

JANG, H. S. *et al.* The protective mechanism of QGC in feline esophageal epithelial cells by interleukin-1 $\beta$  treatment. **Archives of Pharmacal Research**, 2017. v. 40, n. 2, p. 204–213.

Jl, P. *et al.* Naringenin-loaded solid lipid nanoparticles: Preparation, controlled delivery, cellular uptake, and pulmonary pharmacokinetics. **Drug Design, Development and Therapy**, 2016. v. 10, p. 911–925.

KADAM, R.; ROY, N. **Recent trends in drug-likeness prediction: A comprehensive review of in silico methods.** **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences.** Medknow Publications and Media Pvt. Ltd.

KARAISSMAILOGLU, M. C. Assessments on the potential genotoxic effects of fipronil insecticide on *Allium cepa* somatic cells. **Caryologia**, 2 Oct. 2017. v. 70, n. 4, p. 378–384.

KARIM, N. *et al.* A recent review of citrus flavanone naringenin on metabolic diseases and its potential sources for high yield-production. **Trends in Food Science and Technology.** 2018, v. 79, p. 35-54.

KAZMI, S. R. *et al.* **In silico approaches and tools for the prediction of drug metabolism and fate: A review.** **Computers in Biology and Medicine.** Elsevier Ltd.

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

KUÇUK, D. *et al.* “Efeitos citogenéticos de 2/clorofenol em células de meristema de raiz de *Allium cepa* L. **Pesquisa em Ciência Ambiental e Poluição** 25.36 (2018): 36117-36123.

KUROIWA, Y. *et al.* Nano-scale and molecular-level understanding of wet-milled indomethacin/poloxamer 407 nanosuspension with TEM, suspended-state NMR, and Raman measurements. **International Journal of Pharmaceutics**, 2018. v. 537, n. 1–2, p. 30–39.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LEYVA-LÓPEZ, N. *et al.* Flavonoids as cytokine modulators: A possible therapy for inflammation-related diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, 2016. v. 17, n. 6.

LI, T. R.; YANG, Z. Y.; WANG, B. D. Synthesis, characterization and antioxidant activity of naringenin schiff base and its Cu(II), Ni(II), Zn(II) complexes. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 2007. v. 55, n. 1, p. 26–28.

LIMAN, R.; ACIKBAS, Y.; CIĞERCI, İ. H. Cytotoxicity and genotoxicity of cerium oxide micro and nanoparticles by Allium and Comet tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 168, p. 408-414, 2019.

LIMAN, R.; CIĞERCI, İ. H.; GÖKÇE, S. Cytogenetic and genotoxic effects of Rosmaniric Acid on Allium cepa L. root meristem cells. **Food and Chemical Toxicology**, 1 Nov. 2018. v. 121, p. 444–449.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development q settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**. [2001. Disponível em: <[www.elsevier.com/locate/drugdeliv](http://www.elsevier.com/locate/drugdeliv)>.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*. **Drug Discovery Today**, 2004 Dec;1(4):337-341. doi: 10.1016/j.ddtec.2004.11.007.

LIU, X. *et al.* The citrus flavonoid naringenin confers protection in a murine endotoxaemia model through AMPK-ATF3-dependent negative regulation of the TLR4 signalling pathway. **Scientific Reports**, 2016. v. 6, n. August, p. 1–14.

LIU, Y. *et al.* Naringin inhibits chemokine production in an LPS-induced RAW 264.7 macrophage cell line. **Molecular Medicine Reports**, 2012. v. 6, n. 6, p. 1343–1350.

MAATOUK, M. *et al.* Effect of heated naringenin on immunomodulatory properties and cellular antioxidant activity. **Cell Stress and Chaperones**, 2016. v. 21, n. 6, p. 1101–1109.

MAITY, S. *et al.* Alginate coated chitosan core-shell nanoparticles for efficient oral delivery of naringenin in diabetic animals—An in vitro and in vivo approach. **Carbohydrate Polymers**, 2017. v. 170, p. 124–132.

MANCHOPE, M. F. *et al.* Naringenin inhibits superoxide anion-induced inflammatory pain: Role of oxidative stress, cytokines, Nrf-2 and the no-cGMP-PKG-KATP channel signaling pathway. **PLoS ONE**, 2016. v. 11, n. 4, p. 1–20.

MARTIN, Y. C. A bioavailability score. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2005. v.

48, n. 9, p. 3164–3170.

MCCLEMENTS, D.J. Recent developments in encapsulation and release of functional food ingredients: delivery by design. **Current opinion in Food Science**. 23(1).2018

MULLINER, D. *et al.* Computational Models for Human and Animal Hepatotoxicity with a Global Application Scope. **Chemical Research in Toxicology**, 16 May. 2016. v. 29, n. 5, p. 757–767.

PALMIERI, M. J. *et al.* Cytogenotoxic Effects of Spent Pot Liner (SPL) and Its Main Components on Human Leukocytes and Meristematic Cells of *Allium cepa*. **Water, Air, and Soil Pollution**, 1 May. 2016. v. 227, n. 5.

PINHO-RIBEIRO, F. A. *et al.* The citrus flavonone naringenin reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and leukocyte recruitment by inhibiting NF- $\kappa$ B activation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 2016. v. 33, p. 8–14.

PRAJITHA, V.; THOPPIL, J. E. Genotoxic and antigenotoxic potential of the aqueous leaf extracts of *Amaranthus spinosus* Linn. using *Allium cepa* assay. **South African Journal of Botany**, v. 102, p. 18-25, 2016.

PUTNAM, Christopher D. *et al.* Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. **Journal of Molecular Biology**, v. 296, n. 1, p. 295-309, 2000.

QUIDEAU, S. Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications. Edited by Øyvind M. Andersen and Kenneth R. Markham. **Angewandte Chemie International Edition**, 2006. v. 45, n. 41, p. 6786–6787.

RAGAZZO, P. *et al.* Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity, and apoptosis of wastewater before and after disinfection with performic acid. **Water Research**, 2017. v. 116, p. 44–52.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research**, v. 390, n. 1-2, p. 121-127, 1997.

ROBERTO, M. M. *et al.* Evaluation of the genotoxicity/mutagenicity and antigenotoxicity/antimutagenicity induced by propolis and *Baccharis dracunculifolia*, by in vitro study with HTC cells. **Toxicology in Vitro**, 1 Jun. 2016. v. 33, p. 9–15.

RUDIĆ, A. V. *et al.* MetaTox: Web Application for Predicting Structure and Toxicity of Xenobiotics' Metabolites. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2017. v. 57, n. 4, p. 638–642.

RUDKE, A. R. *et al.* Microencapsulation of ergosterol and *Agaricus bisporus* L. extracts by complex coacervation using whey protein and chitosan: Optimization study using response surface methodology. **Lwt**, 2019. v. 103, p. 228–237.

SERAJUDDLIN, A. T. M. Solid dispersion of poorly water-soluble drugs: Early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 1999. v. 88, n. 10, p. 1058–1066.

SHPIGELMAN, A. *et al.*  $\beta$ -Lactoglobulin-naringenin complexes: Nano-vehicles for the delivery of a hydrophobic nutraceutical. **Food Hydrocolloids**, 2014. v. 40, p. 214–224.

SILVA, S. P. *et al.* Determinação de polifenóis totais e flavonoides em *Eugenia uniflora* L. (PITANGA): fruto in natura, polpa congelada e geleia / Determination of total polyphenols and flavonoids in *Eugenia uniflora* L. (surinam cherry): fresh fruit, frozen pulp and jelly. **Brazilian Journal of Health Review**, 20 Dec. 2021. v. 4, n. 6, p. 28471–28483.

SILVEIRA, G. L. *et al.* Efeitos tóxicos de poluentes ambientais: investigação comparativa usando *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa*. **Quimiosfera** 178 (2017); 359-367.

SIMÕES, C. *et al.* **farmacognosia-da-planta-ao-medicamento\_compress**. 6. ed. Florianópolis: Ed. Universidade /UFRGS/ Ed. Universidade/ UFSC, 2007.

SUMATHI, R.; TAMIZHARASI, S.; SIVAKUMAR, T. Bio-Dynamic Activity of Naringenin. **a Review**. 2015. v. 4, n. 8, p. 234–236.

TADROS, T. F. **Applied Surfactants: Principles and Applications**. [S.l.]: Wiley-VCH, 2003.

TEDESCO, S. B.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. **Environmental Contamination**, 2012.

THE, H. P. *et al.* In silico prediction of caco-2 cell permeability by a classification QSAR approach. **Molecular Informatics**, 18 Apr. 2011. v. 30, n. 4, p. 376–385.

TOROPOVA, M. A. Drug metabolism as an object of computational analysis by the Monte Carlo method. **Current Drug Metabolism**, 2017. v. 18, n. 12.

VAFEIADOU, K. *et al.* The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 2009. v. 484, n. 1, p. 100–109.

VANJARI, S. *et al.* Corresponding author A REVIEW ON IN SILICO APPROACH IN PHARMACOLOGY. **ARPB**, 2012. v. 2. Disponível em: <www.arpb.info>.

VENTURA-CAMARGO, B. De C. *et al.* The use of the Cytogenetic to Identify Mechanisms of Action of an Azo Dye in *Allium Cepa* Meristematic Cells. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**, 2011. v. 01, n. 02.

VEZZA, T. *et al.* Flavonoids in inflammatory bowel disease: A review. **Nutrients**, 2016. v. 8, n. 4.

WYATT, M. D.; PITTMAN, D. L. Methylating agents and DNA repair responses: methylated bases and sources of strand breaks. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, n. 12, p.1580-1594, 2006.

XU, C. *et al.* In silico prediction of chemical ames mutagenicity. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 26 Nov. 2012. v. 52, n. 11, p. 2840–2847.

YANG, H. *et al.* admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. **Bioinformatics**, 1 Aug. 2018. v. 33, n. 16, p. 1–7.

YILMA, A. N. *et al.* Flavonoid naringenin: A potential immunomodulator for *Chlamydia trachomatis* inflammation. **Mediators of Inflammation**, 2013. v. 2013.

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

ZHOU, L. *et al.* Solubility of chrysin in ethanol and water mixtures. **Journal of Chemical and Engineering Data**, 2014. v. 59, n. 7, p. 2215–2220.