

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
FACULDADE DE MEDICINA - FM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS - PPGCM

MAÍRA BERNARDES ALVES

**Licopeno purificado a partir da goiaba vermelha (*Psidium guajava* L.)
e formulado em sistema autoemulsificante: atividade e mecanismo
anti-inflamatório e relação com estresse oxidativo para potencial
aplicação nutracêutica.**

Brasília, DF

2022

MAÍRA BERNARDES ALVES

**Licopeno purificado a partir da goiaba vermelha (*Psidium guajava* L.)
e formulado em sistema autoemulsificante: atividade e mecanismo
anti-inflamatório e relação com estresse oxidativo para potencial
aplicação nutracêutica.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Professor Doutor José Roberto de Souza de Almeida Leite

Brasília-DF

2022

MAÍRA BERNARDES ALVES

Licopeno purificado a partir da goiaba vermelha (*Psidium guajava* L.) e formulado em sistema autoemulsificante: atividade e mecanismo anti-inflamatório e relação com estresse oxidativo para potencial aplicação nutracêutica.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Médicas.

COMISSÃO JULGADORA

Professor Doutor José Roberto de Souza Almeida Leite, Universidade de Brasília, UnB,
Presidente da Banca e Orientador

Professor Doutor Simón Gabriel Comerma-Steffensen, Aarhus University, Dinamarca,
membro externo

Professor Dr. Francisco Leonardo Torres-Leal, Universidade Federal do Piauí, Brasil,
membro externo

Dr. Daniel Carneiro Moreira, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, UnB
Membro Suplente

Dedico este trabalho a Deus e à minha família, pelo amor incondicional e apoio.

Agradecimentos

À Deus pelo dom da minha vida e por permitir mais essa realização.

Ao meu orientador Professor Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite pela paciência, compreensão, incentivo, amizade, empenho e por ser exemplo de pessoa, professor e cientista. Sem seu apoio e orientação nada disso seria possível.

Ao meu coorientador Dr. Eder Alves Barbosa pela dedicação, apoio e companheirismo. Sem sua ajuda não teria conseguido chegar até aqui.

Aos meus filhos, Ian José e Maria Helena, por serem o principal estímulo para que eu almeje novas conquistas.

À minha família pela dedicação desmedida e por terem me dado os valores morais, éticos e pessoais que tenho.

Ao Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada– NUPMIA da Universidade de Brasília, *Campus* Darci Ribeiro, pelos subsídios imprescindíveis para a realização de importantes atividades deste trabalho.

Ao Laboratório Estudos Funcionais e Moleculares em Fisiofarmacologia – LAFMOL Departamento de Biofísica e Fisiologia/CCS- Universidade Federal do Piauí - UFPI, Brasil pela parceria nos experimentos animais.

Ao Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, Brasil pela colaboração nos experimentos com células mononucleares.

Ao Laboratório de Células Tronco do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, na pessoa da Professora Dra. Katherine Carvalho.

Ao Laboratório CESAM (Centro de Estudos do Ambiente e do Mar) do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, UA, na pessoa da pesquisadora Dra. Helena Oliveira.

À Andreeane Gomes Vasconcelos pela parceria, colaboração e empenho na realização desse trabalho.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior), pelos recursos destinados a esse projeto e pelo suporte técnico através do Portal Periódicos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	6
LISTA DE SÍMBOLOS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELA.....	11

Capítulo 1- REFERENCIAL TEÓRICO

Carotenoides.....	13
Licopeno.....	14
Licopeno da goiaba vermelha (<i>Psidium guajava</i> L.).....	22
Estresse oxidativo e inflamação.....	24
Potencial aplicação do licopeno para o controle do estresse oxidativo, inflamação e doenças crônicas.....	27
Nanoestruturação.....	29

Capítulo 2 – ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA INTERNACIONAL INDEXADA

Introdução.....	49
Materiais e métodos.....	51
Resultados.....	57
Discussão.....	66
Conclusão.....	70
Referências.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanine Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
CAR	Carotenoide
CAT	Catalase
c-DNA	DNA complementar
CoQ10	Coenzima Q 10
COX-2	Ciclo-oxigenase- 2
DCV	Doenças cardiovasculares
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DMEM/F12	Meio Eagle modificado por Dulbecco: mistura de nutrientes
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FBS	Soro fetal bovino
G3P	Gliceraldeído-3-fosfato
GGPP	Geranylgeranyl pirofosfato
GGT	Glutamyltransferase-gama
HE	Hematoxilina-eosina
IFN	Interferon do tipo I
IFN- γ	Interferon gama
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina-2
IL-6	Interleucina-6
INF- γ	Interferon-gama
IPP	Isopentenil pirofosfato
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LEG	Extrato rico em licopeno da goiaba vermelha
LIC	Licopeno
LPG	Licopeno purificado da goiaba vermelha
MDA	Malondialdeído
MEP	Metileritritol fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida

NanoLPG	Sistema autoemulsificante de entrega para licopeno purificado da goiaba vermelha
NF- κ B	Fator nuclear Kappa B
NK	Células natural Killers
Nrf2	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	Tampão fosfato-Salino
PDI	Índice de Polidispersividade
pH	Cologaritmo da atividade de íons hidrônio
PMNs	Neutrófilos Polimorfonucleares
PPAR	Receptores ativados por proliferação de peroxissoma
qPCR	Reação em cadeia da polimerase
RL	Radical livre
RNA	Ácido ribonucléico
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Rpm	Rotação por minuto
SEEDS	Sistema de autoemulsificante de entrega de drogas
SOD	Superóxido dismutase
TLPs	Toll-like receptor
<i>TNF-α</i>	Fator de necrose tumoral – α
Vit C	Vitamina C
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE SÍMBOLOS

nm	Nanômetro
α	Alfa
β	Beta
Da	Dalton
ζ	Zeta
γ	Gamma
δ	Delta
%	Por cem
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
O_2	Oxigênio molecular
$\text{O}_2^{\bullet -}$	Radical superóxido
$^3\text{O}_2$	Oxigênio tripleto
ROO^{\bullet}	Radical peroxil
ROO^-	Radical peroxil ionizado
ROOH	Hidroperóxido orgânico
$\text{CAR}^{\bullet +}$	Carotenoide ionizado com um elétron desemparelhado
$\text{LIC}^{\bullet +}$	Licopeno excitado
ONOO^-	Peroxinitrito
°C	grau Celsius
Mg	miligramas
Kg	kilogramas
μL	microlitro
μM	micromolar
μg	micrograma
nM	nanomola

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Estrutura química de um isoprenóide (isopreno).....13
- Figura 2.** Estrutura química do Licopeno.....15
- Figura 3.** Vias de síntese dos precursores biológicos dos carotenoides.....17
- Figura 4.** Visão esquemática da via de biossíntese de carotenoides pelas plantas.....18
- Figura 5.** Isômeros *cis* e *trans* da molécula de licopeno.....20
- Figura 6.** Árvore de *Psidium guajava* L. Foto: Adriany das G. N. Amorim.....23
- Figura 7.** Fruto da *P. guajava* L, a goiaba. Foto: Adriany das G. N. Amorim.....23

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Efeito do LPG, CoQ10 e VIT C na viabilidade celular de células Vero após 48 e 72 h de incubação. As colunas apresentam a média \pm desvio padrão; n = 5.....58
- Figura 2.** Análise da fluorescência de células Vero coradas com o kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity kit. (A-F) Controle; Células Vero incubadas por 48 e 72 h com diferentes concentrações (G-L) LPG, (M-R) CoQ10 e (S-X) VIT C; barra vermelha = 400 μ m.....59
- Figura 3.** Efeito causado pela administração oral do LEG nos marcadores sanguíneos de função hepática de hamsters hipercolesterolêmicos. Níveis plasmático de A) proteínas totais, B) albumina, C) fosfatase alcalina, D) GGT, E) ALT, F) AST e G) AST/ALT de hamsters hipercolesterolêmicos (induzidos por meio de dieta hipercolesterolêmica) tratados com LEG (25 e 50 mg/kg) durante 28 dias. Colunas representam média \pm desvio padrão; *p<0,05 vs grupo controle; **p<0,01 vs grupo controle; n = 7-9.....60
- Figura 4.** Efeito causado pela administração oral do LEG no peso do fígado de hamsters hipercolesterolêmicos. A) peso do fígado e B) peso relativo do fígado de hamsters

controle e hipercolesterolêmicos (induzidos por meio de dieta hipercolesterolêmica) tratados com 25 e 50 mg/kg de LEG durante 28 dias. Colunas representam média \pm desvio padrão; * $p < 0,05$ vs grupo controle; ** $p < 0,01$ vs grupo controle; $n = 7-9$61

Figura 5. Micrografias representativas das análises histopatológicas do fígado de hamsters controle e hipercolesterolêmicos (induzidos por meio de dieta hipercolesterolêmica) tratados com 25 e 50 mg/kg de LEG durante 28 dias.....62

Figura 6. Aspectos macroscópicos da nanoLPG e curva distribuição do tamanho das partículas em triplicata antes (A e B) e depois (C e D) do estresse térmico realizado a partir de alternâncias de temperatura (4 e 45 °C) d B) a cada 48 h durante 30 dias.....63

Figura 7. Efeito da nanoLPG na expressão de genes relacionados à imunidade testado em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de humanos saudáveis. Expressão relativa dos genes A) *IL-10*, B) *INF- γ* , C) *TNF- α* e D) *COX-2* em PBMC.....64

Figura 8. Efeito do LPG e da nanoLPG em células HaCat. A) Viabilidade celular após 24 h de incubação; B) Atividade de eliminação de ROS após estimulação utilizando H₂O₂ 300 μ M durante 30 min. Colunas representam média \pm desvio padrão; ** $p < 0,01$ vs grupo H₂O₂; *** $p < 0,001$ vs grupo H₂O₂; $n = 5-6$65

Figura 9. Efeito antioxidante do LPG e da nanoLPG na disfunção endotelial induzida por pirogalol em aorta torácica de rato. A) Curvas de concentração-resposta para ACh na presença de veículo, pirogalol (PYR, 3x10⁻⁵ M) e N-acetilcisteína (3x10⁻⁵ M) seguido de PYR. Efeitos de LPG; B) ou nanoLPG; C) seguido de PYR em curvas de concentração-resposta induzidas por ACh. Os pontos representam a média \pm SEM; ** $p < 0,05$ vs veículo; $n=6-7$66

LISTA DE TABELA

CAPÍTULO I

Tabela 1. Conteúdo de licopeno em algumas frutas e vegetais.....15

CAPÍTULO II

Tabela 1. Critério semiquantitativo e classificação das alterações histopatológicas.....54

Tabela 2. Efeito do estresse térmico no tamanho, PDI, potencial zeta e nos aspectos macroscópicos da nanoLPG.....63

CAPÍTULO 1

REFERENCIAL TEÓRICO

CAROTENOIDES

Os carotenoides são pigmentos naturais lipossolúveis encontrados principalmente em plantas, tais como frutas e legumes de coloração amarela, alaranjada e vermelha. Em organismos fotossintéticos, os carotenoides atuam como pigmentos acessórios na fotossíntese, pois absorvem a energia luminosa no comprimento de onda entre 450 e 570 nm e a transferem para a clorofila (de Saint Germain et al., 2013; Krinsky, 1989). Além disso, os carotenoides exercem uma proteção antioxidante às células vegetais através da proteção contra foto-oxidação em condições de alta irradiação (Alós et al., 2016). Nos organismos capazes de produzir carotenoides (cianobactérias, bactérias fotossintéticas, algas, fungos, leveduras e plantas), sua síntese se dá por meio da rota metabólica dos isoprenóides (Cheng et al., 2017). Quase 600 carotenoides foram identificados na natureza os quais exercem um amplo espectro de funções (Paliwal et al., 2016).

Com relação à estrutura química, os carotenoides são moléculas em sua maioria formadas por uma cadeia principal que possui 40 átomos de carbono distribuídos em oito unidades isoprenóides (**Figura 1**), de maneira que cada unidade é constituída por cinco átomos de carbono (Shardell et al., 2011).

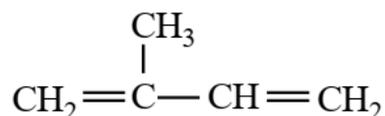


Figura 1. Estrutura química de um isoprenóide (*e.g.* isopreno).

Os carotenoides são classificados, de acordo com os seus constituintes químicos, em dois grupos: os carotenos, constituídos somente de carbonos e hidrogênios, que podem ser cíclicos ou não; e as xantinas, que são derivados oxigenados, que apresentam grupos substituintes com o oxigênio, como hidroxilas, grupo cetona e epóxido (Yaroshevich et al., 2015).

Nos vegetais, os carotenoides mais comumente encontrados são α e β -caroteno (abundantes em frutas e verduras amarelo alaranjadas), β -criptoxantina (abundantes em frutas alaranjadas), luteína (abundantes em vegetais verde escuros) e o licopeno que são abundantes em frutas vermelhas, como o tomate (*Lycopersicum esculentum*) e a goiaba,

(*Psidium guajava L.*), podendo ser detectáveis em quantidades significativas no organismo humano como consequência da alimentação (Chang et al., 2015).

Os seres humanos não são capazes de sintetizar carotenoides e, portanto, dependem da sua ingestão dietética (Jakobsen et al., 2017). Os benefícios dos carotenoides, como a luteína, a zeaxantina e o licopeno, à saúde humana podem ser explicados por seu potencial antioxidante, agindo na extinção de radicais lipossolúveis, como o oxigênio singleto (Kancheva and Kasaikina, 2013). Além disso, foi demonstrado que os carotenoides são capazes de interagir com NF- κ B (fator nuclear de transcrição kappa B) e Nrf-2 (fator nuclear de transcrição 2 relacionado ao eritroide 2).

No primeiro caso, os carotenoides atuam inibindo a translocação de NF- κ B para o núcleo, suprimindo a expressão de genes inflamatórios, o que em consequência induz uma diminuição dos níveis de certas citocinas, como *TNF- α* (fator de necrose tumoral alfa). Por outro lado, carotenoides são capazes de induzir a translocação de Nrf-2 para o núcleo, o que resulta no aumento da expressão de enzimas antioxidantes ativas, tais como catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) (Kaulmann and Bohn, 2014; Linnewiel et al., 2009; Rühl, 2007; Young and Lowe, 2001), talvez contribuindo para a redução dos marcadores de peroxidação lipídica e estresse oxidativo, como malondialdeído (MDA) e concentrações de F2-isoprostano. Outros carotenoides atuam através de mecanismos diferentes. Por exemplo, o β -caroteno, o β -criptoxantina e o α -caroteno são precursores da vitamina A e de compostos retinóides (Gurmu et al., 2014).

Além do potencial antioxidante, estudos têm demonstrado que os carotenoides podem modular o sistema imunológico, visto que são compostos lipofílicos capazes de interagir com a bicamada lipídica de membranas celulares, onde as moléculas de superfície modulam a primeira resposta imunológica e a atividade de fatores de transcrição sensíveis a redox (Garg and Aggarwal, 2002).

LICOPENO

O licopeno, pertencente à família dos carotenoides, é um hidrocarboneto linear alifático, com fórmula molecular $C_{40}H_{56}$, constituído por duas ligações duplas não conjugadas nas terminações e 11 conjugadas (**Figura 2**), com peso molecular de 536,8 Da. O licopeno é extremamente hidrofóbico e, dessa maneira, é solúvel em solventes orgânicos (clorofórmio, hexano, benzeno, metileno, cloreto e acetona), ligeiramente solúvel em metanol ou etanol e insolúvel em água (Roldán-Gutiérrez and Dolores Luque

de Castro, 2007). O licopeno é capaz de absorver a luz com máximos de comprimento de onda em 444, 470 e 502 nm (Miller et al., 1935) e sua atividade biológica está relacionada a sua estrutura (Grabowska et al., 2019).

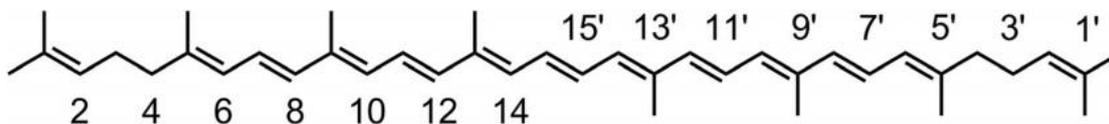


Figura 2. Estrutura química do licopeno (Grabowska et al., 2019).

Quanto a sua origem, o licopeno pode ser encontrado em frutas e vegetais vermelhos, como melancias, toranjas, damascos, goiabas vermelhas, mamão, cenoura, abóbora, batata doce e tomate (**Tabela 1**) (Kelkel et al., 2011; Przybylska, 2020). O processo de amadurecimento dos frutos está relacionado com o número e a quantidade de carotenoides, de maneira que frutos mais maduros possuem uma quantidade maior de licopeno. Além disso, tem-se demonstrado que alimentos processados, tais como o extrato ou molho de tomate, tem maior biodisponibilidade de licopeno, provavelmente pela dissociação ou enfraquecimento dos complexos proteína-carotenoides, ou à dissolução dos carotenoides cristalinos sob aquecimento (Srivastava and Srivastava, 2015).

Tabela 1. Conteúdo de licopeno em algumas frutas e vegetais (Grabowska et al., 2019).

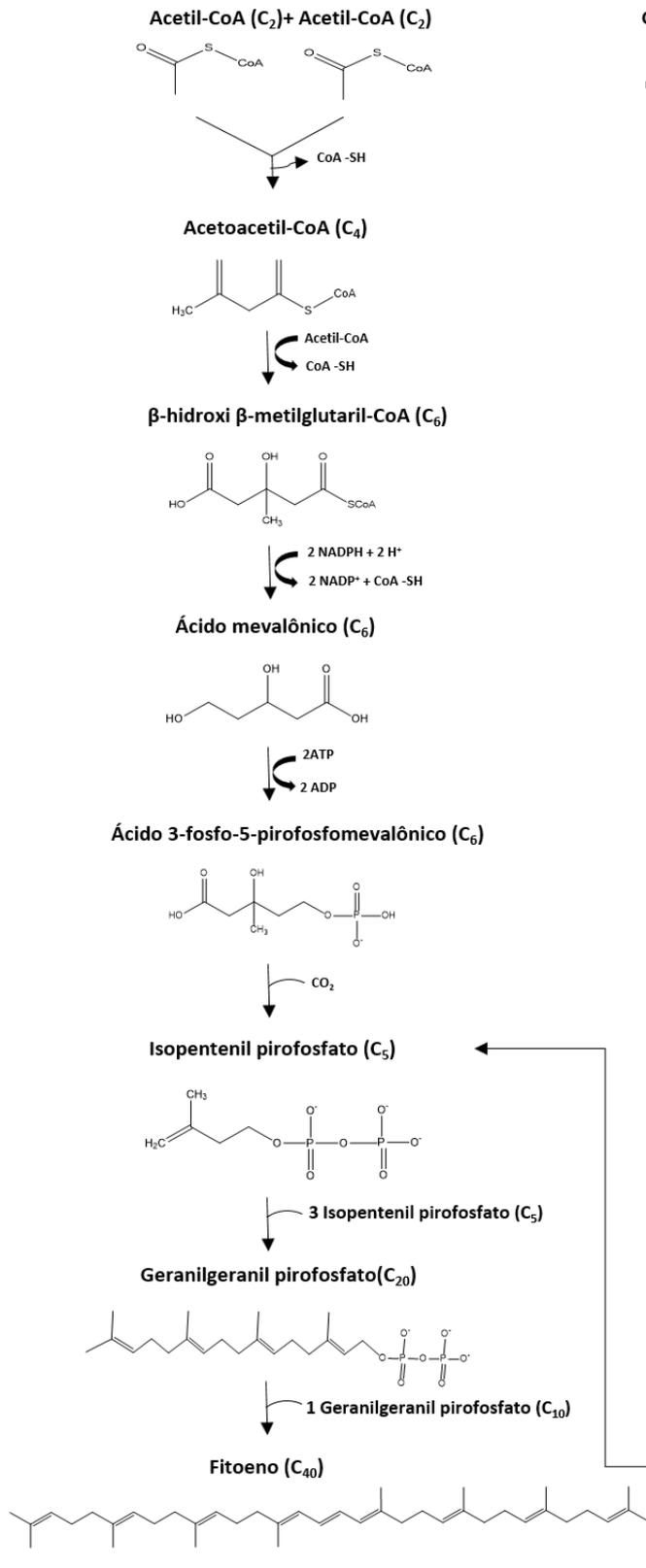
Frutas e Vegetais	Conteúdo de licopeno (mg por 100 g)
Tomate	0.72 ± 4.2
Melancia	2.3 ± 7.2
Goiaba	5.23 ± 5.5
Papaia	0.11 ± 5.3
Toranja	0.35 ± 3.36
Cenoura	0.65 ± 0.78
Batata-doce	0.02 ± 0.11
Damasco	0.01 ± 0.05
Abóbora	0.38 ± 0.46

Os carotenoides são sintetizados principalmente nos plastídeos, organelas que podem se diferenciar em cromoplastos e são encontradas em organismos fotossintéticos,

como plantas, algas, bactérias e fungos (Przybylska, 2020; Saini et al., 2015). O licopeno é sintetizado a partir de um precursor biológico isoprenóide que é constituído por duas moléculas de isopreno.

A biossíntese dos isoprenóides ocorre a partir de dois metabólitos centrais: o isopentenil pirofosfato (IPP) e o seu isômero difosfato de dimetilalilo (DMAPP) que é produzido a partir da isomerização do IPP pela enzima isopentenil-pirofosfato isomerase, sendo cada uma dessas moléculas constituídas por cinco átomos de carbono. O IPP e o DMAPP são sintetizados a partir da acetil-coenzima-A pela via do mevalonato e envolve uma série de etapas enzimáticas (Figura 3), ou ainda pela via do metileritritol fosfato (MEP) também conhecido como via do não mevalonato (Rohmer et al., 1993). A estrutura dos pigmentos carotenoides constituídos por 40 átomos de carbono (como o licopeno) é sintetizada a partir de duas moléculas de geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), que contém 20 átomos de carbono, e que por sua vez é sintetizado a partir de quatro unidades de IPP (Rogers et al., 1966) (**Figura 3**).

Via do mevalonato



Via do metileritritol fosfato

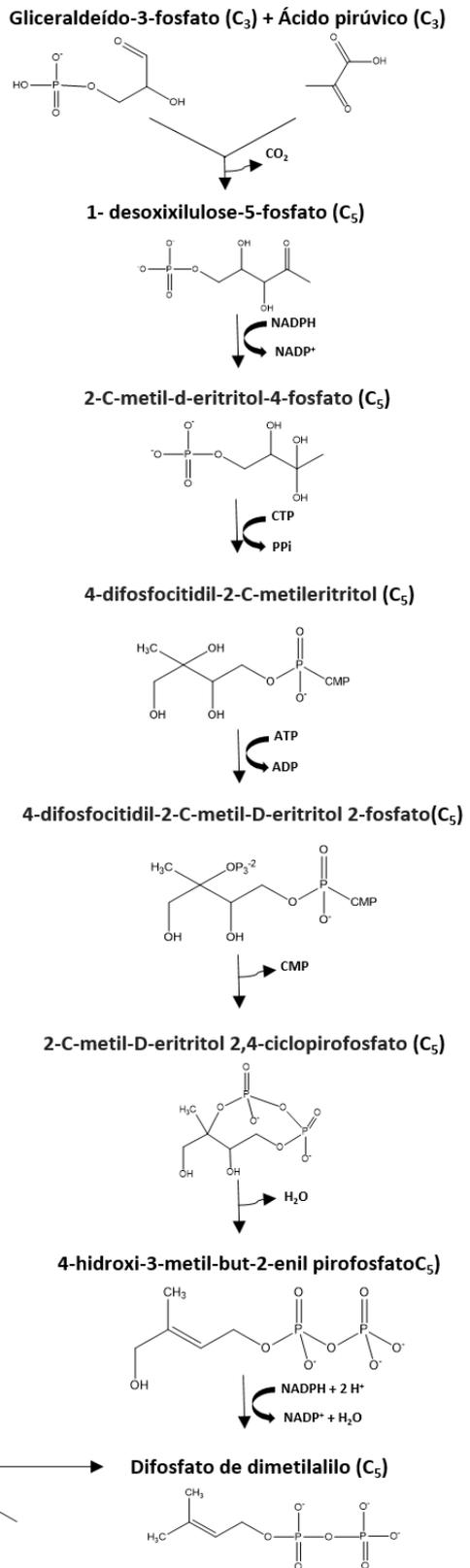


Figura 3. Vias de síntese dos precursores biológicos dos carotenoides.

A primeira molécula sintetizada contendo quarenta átomos de carbono é o fitoeno, que é então desidrogenado gradualmente em fitoflueno em uma reação catalisada pela enzima fitoeno desaturase. O fitoflueno é então desidrogenado em ζ -caroteno, neurosporeno e licopeno pela enzima ζ -caroteno desaturase (**Figura 4**) (Srivastava and Srivastava, 2015). Uma outra via de síntese de isoprenóides possui sete etapas enzimáticas nas quais o gliceraldeído-3-fosfato (G3P) e ácido pirúvico são convertidos em isoprenóide (Phulara et al., 2016).

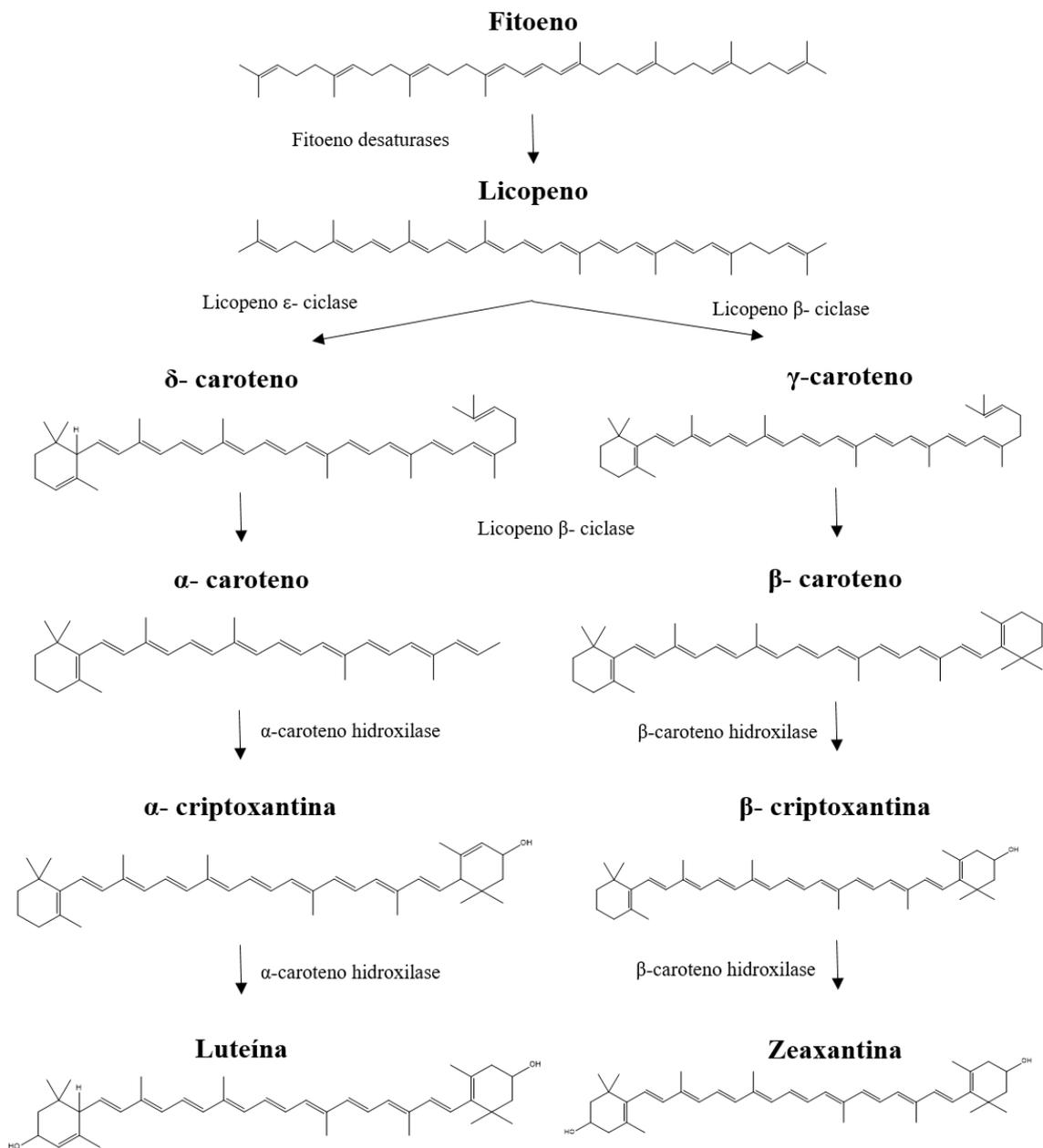


Figura 4. Visão esquemática da via de biossíntese de carotenoides pelas plantas.

Na estrutura mais abundantemente isolada do licopeno, todas as ligações covalentes realizadas entre os carbonos na molécula possuem a configuração *trans*, e por esse motivo, essa estrutura é chamada de *all-trans*. No entanto, a molécula de licopeno pode sofrer isomerização para *cis* nos carbonos 5, 9, 13 e 15 mediante exposição à luz, à alta temperatura e a substâncias químicas (**Figura 5**) (Datta et al., 2013).

A molécula de licopeno que possui configuração *all-trans* é caracterizada por possuir uma maior estabilidade termodinâmica e melhor biodisponibilidade. Essas características são atribuídas ao aumento da solubilidade nas micelas de ácidos biliares e à maior incorporação aos quilomícrons. Embora o licopeno *all-trans* seja predominante na natureza e a forma melhor absorvida, a conformação *cis* contribui, aproximadamente, com 50 % do licopeno total no soro humano (Lee and Chen, 2002; Srivastava and Srivastava, 2015).

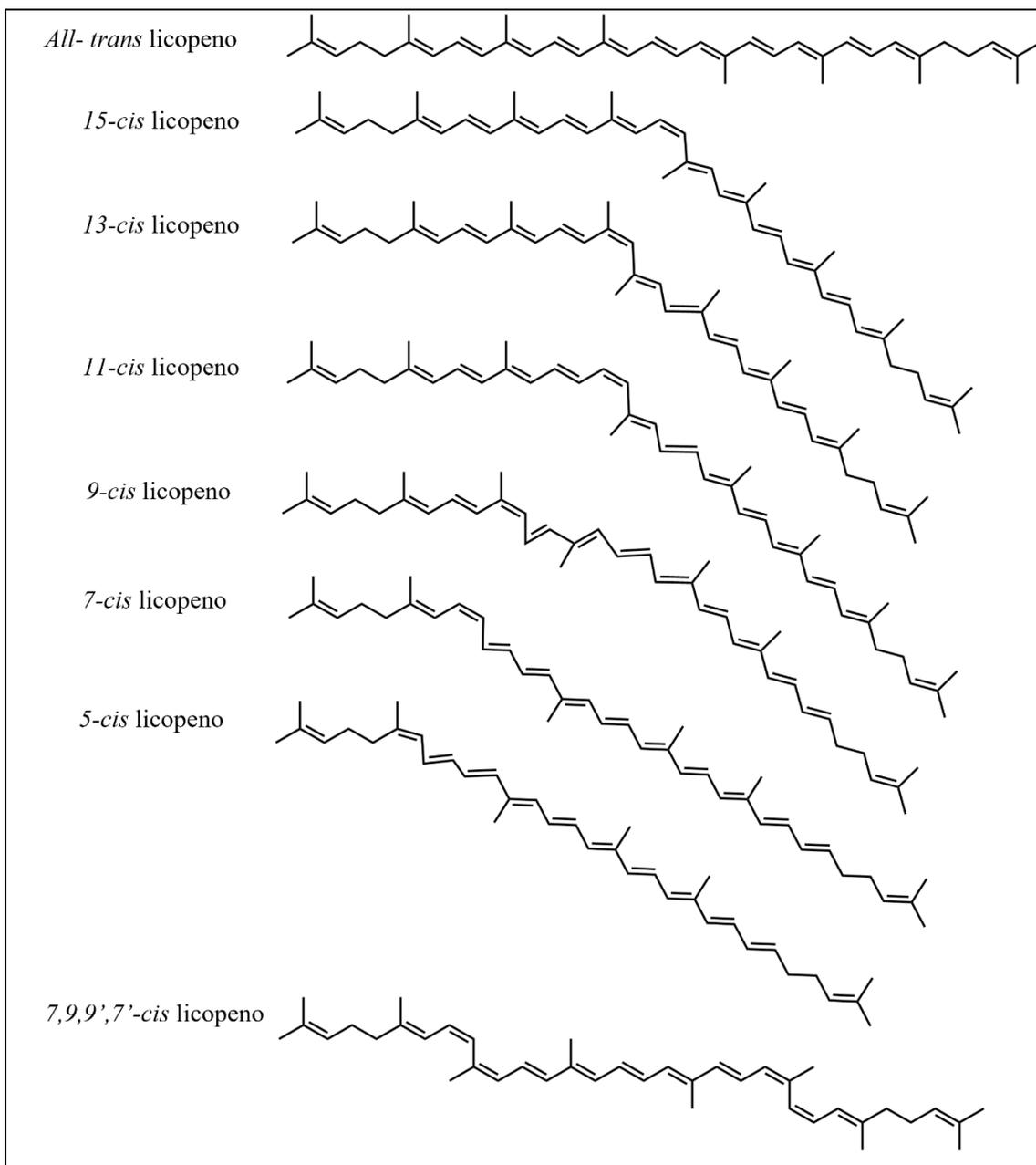


Figura 5. Isômeros *cis* e *trans* da molécula de licopeno modificado de Srivastava and Srivastava (2015).

Devido às suas propriedades lipolíticas, depois de absorvido pelo organismo, o licopeno é transportado na corrente sanguínea acoplado à parte hidrofóbica das lipoproteínas, principalmente em lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e de muito baixa densidade (VLDL) (Clinton, 1998).

O licopeno é reconhecido na literatura como um potente antioxidante e isso se deve à presença das duas ligações duplas não conjugadas, o que confere maior reatividade à molécula (Di Mascio et al., 1989; Islamian and Mehrali, 2015). O licopeno desempenha

um papel fundamental na proteção do sistema celular e na estabilização de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS). Sua eficácia na remoção de oxigênio singlete é o dobro do β -caroteno e dez vezes maior do que o do α -tocoferol (Krinsky and Johnson, 2005; Rogers et al., 1966).

Na célula, o mecanismo de extinção do oxigênio singlete ocorre quando o oxigênio do estado excitado no singlete se transforma no estado fundamental no tripleto e distribui energia, enquanto, ao mesmo tempo, o licopeno no estado fundamental absorve a energia, transformando-se em licopeno excitado. O processo de extinção envolve a troca de dois elétrons de spin diferentes provenientes do licopeno e do oxigênio singlete (Ramel et al., 2012; Zhang et al., 2016). Simultaneamente, o licopeno no estado fundamental pode absorver energia e mudar para um estado excitado seguido por dissipação de energia na forma de calor para o ambiente adjacente e retornar ao seu estado fundamental original (Ramel et al., 2012; Zhang et al., 2016).

Além de neutralizar ROS, o licopeno também ativa a expressão de genes que codificam enzimas capazes de eliminar ROS, entre outros, NADPH oxidase, ubiquinona oxidoreductase, hemoxigenase 1, glutathione redutase e glutathione S-transferases. Adicionalmente, ele modula a atividade de enzimas que contribuem para a formação de ROS, como como NADPH oxidase, ciclooxigenase-2, 5-lipoxigenase e óxido nítrico sintase induzida (Palozza et al., 2012).

Em função das suas propriedades antioxidantes, a ingestão de licopeno tem sido associada a vários efeitos benéficos para a saúde humana, conferindo proteção contra uma variedade de doenças que têm o estresse oxidativo na sua etiopatogênese, como obesidade, câncer, doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus*, Alzheimer e doenças inflamatórias (Ejike et al., 2018; Fiedor and Burda, 2014; Hedayati et al., 2019; Przybylska, 2020). A hipótese é que o licopeno pode proteger as biomoléculas, tais como lipídios, proteínas e DNA (ácido desoxirribonucleico), contra os processos de oxidação causados ROS (Rao et al., 2006). A literatura sugere também que o licopeno pode atuar em doenças como osteoporose, hipertensão arterial sistêmica, infertilidade masculina e até na prevenção da transmissão da síndrome de imunodeficiência adquirida de mães para bebês (Ahuja et al., 2006; Clinton, 1998; Weisburger, 2002). Diante de todos os benefícios do licopeno para a saúde humana, Bessler e colaboradores avaliaram o efeito *in vitro* do licopeno na produção de IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-6 e *IL-10*, bem como na produção de TNF α e IFN γ (interferon-gama) por células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e constataram que o licopeno exerceu efeito imunomodulador dose

dependente, aumentando a secreção de IL-1 β e TNF α , e diminuindo IL-2, IL-10 e IFN γ (Bessler et al., 2008).

Um estudo anterior de Watzl e colaboradores (2000) demonstrou que pessoas submetidas à uma dieta pobre em carotenoides apresentou uma supressão significativa na secreção de IL-2 e IL-4, enquanto houve um aumento significativo dessas interleucinas após o consumo diário de suco de tomate contendo 40 mg de licopeno pelo período de duas semanas. Esta observação sugere que a ingestão de licopeno afeta a função de linfócitos Th1 e Th2 que são responsáveis pela secreção de IL-2 e IL-4 respectivamente (Watzl et al., 1999). No entanto, em outro estudo, os autores mostraram que, embora o consumo prolongado de suco de tomate tenha aumentado a concentração de licopeno plasmático em idosos saudáveis, sua imunidade mediada por células não foi significativamente afetada (Watzl et al., 2000).

Em estudo realizado por Riso e colaboradores (2006), verificou-se que a ingestão de uma bebida a base de tomate foi capaz de modular a produção de TNF- α , com diminuição significativa (-34%). O TNF- α é uma citocina produzida por macrófagos e células T, as quais exercem múltiplas funções na resposta imune e estão envolvidas na inflamação sistêmica e na resposta de fase aguda (Riso et al., 2006).

LICOPENO DA GOIABA VERMELHA (*PSIDIUM GUAJAVA L.*)

A *Psidium guajava*, pertencente à família Myrtaceae, é a planta popularmente conhecida como goiabeira (**Figura 6**). É uma árvore de pequeno porte (possui 10 metros de altura em média), de casca lisa descamante, folhas aromáticas e flores brancas (Kumari et al., 2013). Trata-se de uma planta típica de regiões tropicais e subtropicais, encontrada em toda a América do Sul, Europa, Ásia e África (Gutiérrez et al., 2008).



Figura 6. Árvore de *P. guajava L.* Foto: Adriany das G. N. Amorim (2014)

Seu fruto, a goiaba (**Figura 7**), possui tamanho que varia entre 4 e 12 cm de diâmetro e tem formato arredondado ou oval. Dependendo da variedade, a casca pode ser áspera ou lisa, geralmente com um sabor amargo ou doce e pode ter espessura variável, de cor geralmente verde antes do amadurecimento, tornando-se amarela ou marrom quando madura (Kumari et al., 2013).



Figura 7. Fruto da *P. guajava L.*, a goiaba. Foto: Adriany das G. N. Amorim (2014).

A *P. guajava L.* pode ser aproveitada na alimentação de diferentes maneiras: pelo consumo da fruta *in natura* ou processada, pela decocção das folhas, das raízes e da

casca da fruta ou ainda pelo extrato aquoso ou alcóolico. Possui alto valor nutritivo, elevado potencial antioxidante e apresenta importantes propriedades medicinais, testadas por meio de diferentes ensaios biológicos, tais como anti hipertensiva, antimicrobiana, antidiarreica, analgésica e anti-inflamatória (Gutiérrez et al., 2008). Sua composição varia de acordo com o cultivo, mas geralmente possui baixo teor de carboidratos, gorduras e proteínas, e alto teor de água e fibras (Flores et al., 2015). Outros efeitos benéficos que podem ser atribuídos ao consumo do fruto e da folha são as atividades antiplasmodial, anticâncer e hepatoprotetora, avaliadas por meio de diferentes testes biológicos (Cui, 2001; Flores et al., 2015; Gutiérrez et al., 2008; Roy et al., 2006).

Nesse cenário, um conjunto de pesquisas para aproveitamento do potencial biotecnológico da goiaba vermelha vem sendo desenvolvido. A produção de dois tipos de extratos de licopeno da goiaba vermelha foi realizada: um extrato rico em licopeno, denominado LEG, obtido por metodologia de produção “limpa”, baseada no uso de solventes adequados para aplicação na indústria de alimentos (Amorim, A. G. N.; Leite, J. R. S. A.; Pintado, 2018) e um extrato mais concentrado de licopeno, denominado LPG, obtido a partir de uma etapa adicional de purificação com solvente orgânico apolar (Amorim, A. G. N.; Leite, J. R. S. A.; Ropke, 2016).

A administração intraperitoneal e oral do LEG e do LPG (50 e 12,5 mg/kg, respectivamente) inibiu inflamação aguda em camundongos Swiss induzida pela administração de carrageninas (Vasconcelos et al., 2017). Além disso, o LEG reduziu significativamente a viabilidade de células de adenocarcinoma de mama humano, bem como diminuiu os triglicérides plasmáticos e biomarcadores de peroxidação lipídica em hamsters (Brito et al., 2019; dos Santos et al., 2018). Além disso, o LPG também apresentou significativa atividade antioxidante e anti-inflamatória (Amorim et al., 2018; Vasconcelos et al., 2017).

ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO

O oxigênio molecular (O_2) exerce papel fundamental comoceptor final de elétrons na cadeia transportadora de elétrons e participa direta ou indiretamente em reações de oxidação de biomoléculas. A sua capacidade de originar radicais livres e outras espécies reativas pode comprometer a estrutura e a função de diferentes biomoléculas, podendo assim, ser tóxica ao organismo (Lehninger, A.L., D.L. Nelson, 2013). Um

radical livre (RL) é definido como uma espécie quimicamente ativa contendo um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital molecular ou atômico mais externo, característica esta que lhe confere alta reatividade (Halliwell B, Gutteridge JMC, 2015). A configuração eletrônica do O₂ no seu estado fundamental, que é o mais abundante na atmosfera, é denominada oxigênio tripleto e apresenta dois elétrons desemparelhados, sendo ele próprio classificado como um radical livre. Já o oxigênio, quando está em um estado eletrônico excitado, é denominado oxigênio singleto (¹O₂), o qual não possui elétrons desemparelhados (Turrens, 2003; Wayne, 2007). Nesse estado o oxigênio torna-se um poderoso oxidante à medida que os dois elétrons podem sofrer giros opostos e reagir rapidamente com outros pares de elétron. O ¹O₂ pode ser gerado, não fotoquimicamente, via “explosão oxidativa”, processo no qual macrófagos, neutrófilos ou monócitos produzem grandes quantidades de ROS durante a fagocitose (Chen and Junger, 2012; Slauch, 2011).

Manter níveis adequados de radicais livres é essencial para os seres vivos, pois estes regulam a expressão gênica, ativam proteínas e vias diretas de sinalização. Por outro lado, quantidades excessivas de ROS levam a efeitos devastadores, incluindo oxidação de cromossomos, de bases de DNA, de proteínas, da membrana lipídica e de lipídios de baixa densidade. Além disso, os radicais livres podem causar alterações na estrutura do citoesqueleto, inativação de enzimas, apoptose e transformação celular (Petyaev, 2016).

As mitocôndrias, nas células eucarióticas, são consideradas a principal fonte de ROS. Essas reações têm início quando há uma fuga prematura de elétrons antes deles atingirem o complexo IV da cadeia transportadora de elétrons. Quando um único elétron escapa e reage com o O₂, o radical superóxido (O₂^{-•}) é formado, que por sua vez é o precursor de outras ROS (Turrens, 2003). As ROS também podem ser geradas como resultado do estresse fisiológico (alta temperatura, radiação ultravioleta e ionizante) e do metabolismo de produtos químicos exógenos, como drogas e xenobióticos (Petyaev, 2016).

A geração de ROS é minimizada quando há um equilíbrio entre a oferta e o consumo de elétrons por seus aceptores (Lehninger, A.L., D.L. Nelson, 2013). Os mecanismos de controle das ROS são realizados por uma rede de sistemas antioxidantes, que incluem componentes enzimáticos e não enzimáticos, e que agem reduzindo os níveis de ROS (Jones, 2006).

O excesso de ROS produzidas no metabolismo oxidativo também está associado ao desencadeamento de processo inflamatório. A resposta inflamatória é um componente

do sistema imune, sendo essencial para a defesa e manutenção da homeostase do organismo. A resposta imune inata é imediata e inespecífica, ocorrendo precocemente nos processos imunoinflamatórios, e se caracteriza pela fagocitose e apresentação dos antígenos. As principais células envolvidas nessa resposta são os neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), os macrófagos e as células dendríticas (Kawashima et al., 1996; Kopitar et al., 2006; Stashenko et al., 1998). Já a resposta imune adaptativa é antígeno-específica e funciona para aumentar os mecanismos de proteção da resposta não específica, tendo como principais células os linfócitos B e T e as células natural killers (NK) (MARTON and KISS, 1993; Takahashi, 1998).

Na resposta inata estão presentes as células mononucleares sanguíneas que são originadas na medula óssea, sendo elas: monócitos e linfócitos. São os monoblastos, os precursores mais imaturos derivados da célula progenitora pluripotente hematopoiética, que se diferenciam em pró-monócitos e monócitos. Os monócitos circulam no sangue periférico e migram para vários órgãos e sistemas, onde se diferenciam em macrófagos (Calder, 1995). Essas células são responsáveis pelo mecanismo de fagocitose, pinocitose, produção de citocinas, apresentação de antígenos e produção de radicais livres (Greenberg and Grinstein, 2002).

Os linfócitos, por sua vez, são derivados de células tronco hematopoiéticas da medula óssea e após o completo desenvolvimento migram para o sangue periférico. Os linfócitos são divididos em três principais grupos: linfócito B, linfócito T e células NK. Os linfócitos B sintetizam e secretam anticorpos na corrente sanguínea, com o propósito de identificar e neutralizar determinados patógenos. Os linfócitos T são ativados pela presença do antígeno, por exemplo, reconhecendo antígenos que são apresentados pelas células apresentadoras de antígenos. As células NK são importantes componente da resposta imune antitumoral e antiviral, constituindo aproximadamente 10 % dos linfócitos em circulação (Ikawa, 2014; Liu et al., 2014).

Células da imunidade inata e adaptativa, quando ativadas por microrganismos e seus antígenos, são capazes de produzir citocinas, que são proteínas que medeiam muitas das funções dessas células. Podem atuar sobre receptores nas células que as produzem, a chamada ação autócrina, e em outros tipos celulares como osteoblastos e osteoclastos, desenvolvendo ação parácrina e influenciando a função dessas células (Abul K. Abbas, Andrew H. H. Lichtman, 2021).

A inflamação é um mecanismo de defesa natural contra patógenos e está associada a muitas doenças como infecções microbianas e virais; exposição a alérgenos, radiação e

produtos químicos tóxicos; doenças autoimunes e crônicas, obesidade; consumo de álcool; uso de tabaco e uma dieta hipercalórica e hiperlipídica (Berlett and Stadtman, 1997). A resposta inflamatória é a ativação coordenada de vias de sinalização que regulam os níveis de mediadores inflamatórios em células dos tecidos residentes e células inflamatórias recrutadas no sangue. Embora a resposta inflamatória dependa da natureza do estímulo inicial e de sua localização no corpo (por exemplo, patógenos bacterianos ativam receptores Toll-like (TLRs) e infecções virais ativam interferons tipo I (IFN), todos eles compartilham um mecanismo que pode ser resumido da seguinte forma: (1) Os receptores de padrão de superfície celular reconhecem estímulos prejudiciais; (2) as vias inflamatórias são ativadas; (3) marcadores inflamatórios são liberados; e (4) células inflamatórias são recrutadas (L Chen et al., 2018; Medzhitov, 2010). Os estímulos inflamatórios ativam as vias de sinalização intracelular que posteriormente ativam a produção de mediadores inflamatórios. Estímulos inflamatórios primários, incluindo microrganismos e citocinas, como interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (*TNF- α*), medeiam a inflamação por meio da interação com os TLRs (L Chen et al., 2018).

A relação do estresse oxidativo e da inflamação já foi documentado por muitos autores. Evidências indicam que o estresse oxidativo desempenha um papel patogênico nas doenças crônica e inflamatórias (Kelkel et al., 2011). A produção de ROS é fundamental para a progressão de muitas doenças inflamatórias. As ROS são produzidas por células que estão envolvidas na resposta de defesa do hospedeiro, como PMNs e promovem disfunção endotelial por oxidação de proteínas de sinalização celular cruciais, como tirosina fosfatases. As ROS atuam como uma molécula de sinalização e um mediador da inflamação (Beckman, 1996).

POTENCIAL APLICAÇÃO DO LICOPENO PARA O CONTROLE DO ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E DOENÇAS CRÔNICAS

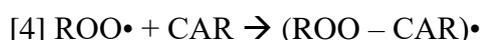
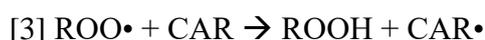
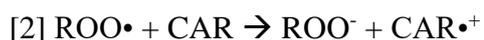
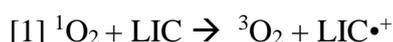
Uma alimentação saudável rica em frutas e vegetais é extremamente útil para diminuir a prevalência de inúmeras doenças crônicas, como distúrbios neurodegenerativos, diabetes *mellitus* tipo 2, doenças cardiovasculares (DCV) como aterosclerose e dislipidemias e vários tipos de câncer. Isso ocorre porque esses alimentos contêm alta conteúdo de ácido ascórbico, polifenóis, carotenoides, tocoferóis e outros fitoquímicos antioxidantes (Martí et al., 2016; Saini et al., 2015). Em geral, as doenças

crônicas estão ligadas a níveis elevados de mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas pró-inflamatórias circulantes e oxidação de proteínas, lipídios e DNA. Os carotenoides dietéticos podem diminuir potencialmente os níveis de mediadores pró-inflamatórios através da modulação do estresse oxidativo. Sua ação está relacionada à modulação de vários fatores de transcrição, incluindo fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) e receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPAR) que podem induzir a super expressão de enzimas antioxidantes e citoprotetoras de Fase II (Bohn et al., 2017).

Dentre os carotenoides, o potencial antioxidante do licopeno pode ser explicado pela alta atividade de extinção de $^1\text{O}_2$, sendo que o licopeno é o mais eficaz nessa atividade dentre os 600 carotenoides naturais já descobertos (Di Mascio et al., 1989). Sua atividade antioxidante está relacionada a sua estrutura química. A extinção do $^1\text{O}_2$ pelo licopeno ocorre por vias físicas e químicas, sendo as vias físicas predominantes (99,05%). A desativação física envolve a transferência de energia do $^1\text{O}_2$ para o licopeno, gerando $^3\text{O}_2$ e o licopeno no estado excitado ($\text{LIC}\cdot^+$) [Equação 1]. A energia absorvida pelo licopeno é dissipada por vibrações e rotações e há interações destas com o meio circundante. O licopeno permanece intacto no final do processo, estando apto para novas extinções (Krinsky, 1998).

Devido à sua natureza altamente lipofílica, o licopeno exerce sua atividade antioxidante máxima a nível de membranas celulares, interagindo com componentes lipídicos (Rao and Agarwal, 2000). Estudos indicam que o licopeno protege as membranas lipídicas do processo de oxidação induzida por dióxido de nitrogênio e a subsequente morte celular (Böhm et al., 1995; Tinkler et al., 1994).

Carotenoides em geral podem reagir com radicais livres de três maneiras principais, incluindo transferência de elétrons [Equação 2], abstração de hidrogênio [Equação 3] e adição de radicais [Equação 4] (Young and Lowe, 2001).



Galano et al. relataram que o licopeno é mais reativo que o β -caroteno em relação aos radicais peroxil ($\text{ROO}\cdot$). Esses autores identificaram que o carbono da posição 5 é o

principal local de adição do radical OOH (Galano and Francisco-Marquez, 2009). O licopeno também foi associado a neutralização do peroxinitrito (ONOO^-), um importante oxidante biológico, tanto *in vitro* quanto em cultura de células (Muzandu et al., 2006; Panasenکو et al., 2000). Além disso, sugeriu-se que o licopeno pode melhorar o sistema de defesa antioxidante celular, regenerando os antioxidantes não enzimáticos, como as vitaminas E e C. De fato, a capacidade do licopeno em reduzir o radical δ -tocoferil foi demonstrada (Bast et al., 1998; Mortensen and Skibsted, 1997).

Evidências sugerem que o licopeno pode regular positivamente o elemento de resposta antioxidante e estimular assim a produção de enzimas celulares como SOD, glutathione S-transferase e quinona redutase, os quais protegem as células contra ROS (Van Breemen & Pajkovic, 2008).

NANOESTRUTURAÇÃO

Semelhante a outros antioxidantes carotenoides naturais, o licopeno possui baixa solubilidade em água, alta instabilidade e baixa permeabilidade intestinal, limitando assim seu desenvolvimento clínico (Chernyshova et al., 2019; Rein et al., 2013; Srivastava and Srivastava, 2015). O licopeno é um carotenoide instável que pode ser facilmente isomerizado durante as etapas de extração, seja pelo uso de temperatura, que por outro lado aumenta o rendimento do processo, seja pelo uso de solventes específicos (diclorometano, clorofórmio, hexano, acetona, brometo de etila), ou ainda pela combinação deles durante a extração (Honda et al., 2015; Srivastava and Srivastava, 2015). Também, deve-se tomar cuidados com as condições de armazenamento: o licopeno necessita ser protegido da luz e do oxigênio (manter em atmosfera inerte), e ser estocado à temperatura de $-80\text{ }^\circ\text{C}$ (Amorim, 2015).

Uma alternativa descrita na literatura é encapsular compostos hidrofóbicos em polímeros formando nano-cápsulas. Nesses estudos foi visto que esse processo melhora a solubilidade, evita a degradação causada por enzimas digestivas do trato gastrointestinal (condições de baixo pH) e por altas temperaturas (Torchilin, 2014; Yao et al., 2015). Nesse contexto, a nanobiotecnologia tem se mostrado uma alternativa inovadora para melhorar a estabilidade e atividades biológicas destes compostos. Por exemplo, nano-cápsulas com uma parede de poli- ϵ -coprolactona revestida com polissorbato 80 foram eficientemente aplicadas na estabilização do licopeno da goiaba vermelha por 7 meses e

melhorou sua atividade citotóxica em células do câncer de mama (Vasconcelos et al., 2020).

Na literatura científica atual, dentre os principais nanocarreadores descritos, estão os sistemas autoemulsificante de entrega de drogas (SEDDS), um método de emulsificação espontânea que usa óleo, surfactantes e solventes (Tran and Park, 2021). Esse sistema é capaz de transportar moléculas bioativas destinadas a aplicações em alimentos, cosméticos, produtos químicos e farmacêuticos indústrias. Os SEDDS apresentam como vantagens: melhor solubilidade em água, maior estabilidade físico-química e termodinâmica e produção de fácil alcance (Kovvasu et al., 2019; Singh et al., 2020).

Vasconcelos e colaboradores (2021) desenvolveram uma formulação que utiliza substâncias autoemulsionantes na produção de um SEDDS para o licopeno purificado da goiaba vermelha, denominada nanoLPG. A nanoLPG exibiu propriedades físico-químicas satisfatórias, com tamanho em torno de 200 nm, potencial zeta negativo, morfologia esférica e estabilidade do licopeno por 10 meses a 5 °C. A nanoLPG exibiu atividade antioxidante, o que indica que a atividade do licopeno encapsulado foi preservada.

A toxicidade das nanopartículas é um fator crítico para a aplicação biológica de sistemas de liberação de drogas e precisa ser exaustivamente explorado antes de realizar estudos *in vivo* mais aprofundados. A avaliação de toxicidade aguda de camundongos Swiss tratados via oral tratados com 10 mg/kg de nanoLPG durante um período de 28 dias não evidenciou nenhuma mudança significativa nos parâmetros clínicos, comportamentais, hematológicos, bioquímicos e histopatológicos dos animais (Vasconcelos et al., 2021). O estudo mostra, ainda, uma distribuição do licopeno no fígado, rim e próstata, sugerindo que administração oral da nanoLPG foi eficiente na entrega de licopeno para os tecidos, corroborando dados da literatura (Wadie et al., 2020).

Por fim, como o licopeno se acumulou na próstata dos camundongos foi realizada uma avaliação de citotoxicidade da nanoLPG em células de câncer de próstata. Os resultados demonstram que a nanoLPG afetou significativamente a viabilidade celular após 6 h de exposição, quando testada na concentração mais baixa, no entanto, o efeito citotóxico sobre as células de câncer de próstata foi três vezes maior, sugerindo uma ação citotóxica seletiva para a linhagem testada. De maneira complementar, os dados de citometria de fluxo e microscopia eletrônica de transmissão evidenciaram alterações morfológicas expressivas nas células de câncer de próstata, sugerindo ruptura da

membrana celular e liberação de conteúdo citoplasmático. Os autores concluem que a nanoLPG é um candidato promissor e biosseguro para sistemas de entrega de licopeno, com potencial aplicação como um produto de saúde baseado em nanotecnologia (Vasconcelos et al., 2021).

Sendo assim, essa tese tem como objetivo explorar o potencial da nanoLPG em diferentes aplicações anti-inflamatórias e antioxidante através da avaliação de citotoxicidade em diferentes modelos celulares e na transcrição de genes que codificam citocinas inflamatórias.

REFERÊNCIAS

Abul K. Abbas, Andrew H. H. Lichtman SP (2021) Cellular and Molecular Immunology. Available at: <https://books.google.com.br/books?id=IcLJevp2Kx0C> (accessed 3 May 2021).

Ahuja KDK, Pittaway JK and Ball MJ (2006) Effects of olive oil and tomato lycopene combination on serum lycopene, lipid profile, and lipid oxidation. *Nutrition* 22(3): 259–265. DOI: 10.1016/j.nut.2005.07.015.

Alós E, Rodrigo MJ and Zacarias L (2016) Manipulation of carotenoid content in plants to improve human health. *Sub-Cellular Biochemistry* 79. Springer New York: 311–343. DOI: 10.1007/978-3-319-39126-7_12.

Amorim, A. G. N.; Leite, J. R. S. A.; Pintado ME (2018) Obteinement process of carotenoids concentrate rich in lycopene from red fruits and/or red fruit pulp. no EP3400812 A1.

Amorim, A. G. N.; Leite, J. R. S. A.; Ropke CD (2016) Obtenção de extrato rico em licopeno e licopeno puro de fonte natural.

Amorim AGN, Souza JMT, Santos RC, et al. (2018) HPLC-DAD, ESI-MS/MS, and NMR of Lycopene Isolated From *P. guajava* L. and Its Biotechnological Applications. *European Journal of Lipid Science and Technology* 120(3). Wiley-VCH Verlag: 1700330. DOI: 10.1002/ejlt.201700330.

Bast A, Haenen GRMM, Van Den Berg R, et al. (1998) Antioxidant effects of carotenoids. In: *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 1998, pp. 399–403. DOI: 10.1201/9780203904046.ch11.

Beckman JS (1996) Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chemical Research in Toxicology* 9(5). American Chemical Society: 836–844. DOI: 10.1021/tx9501445.

Berlett BS and Stadtman ER (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*. *J Biol Chem*. DOI: 10.1074/jbc.272.33.20313.

Bessler H, Salman H, Bergman M, et al. (2008) In vitro effect of lycopene on cytokine

production by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunological Investigations* 37(3): 183–190. DOI: 10.1080/08820130801967809.

Böhm F, Tinkler JH and Truscott TG (1995) Carotenoids protect against cell membrane damage by the nitrogen dioxide radical. *Nature Medicine*. DOI: 10.1038/nm0295-98.

Bohn T, Desmarchelier C, Dragsted LO, et al. (2017) Host-related factors explaining interindividual variability of carotenoid bioavailability and tissue concentrations in humans. *Molecular Nutrition and Food Research*. Wiley-VCH Verlag. DOI: 10.1002/mnfr.201600685.

Brito AK da S, Lima G de M, de Farias LM, et al. (2019) Lycopene-rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) decreases plasma triglycerides and improves oxidative stress biomarkers on experimentally-induced dyslipidemia in hamsters. *Nutrients* 11(2). MDPI AG: 393. DOI: 10.3390/nu11020393.

Calder PC (1995) Fuel utilization by cells of the immune system. *The Proceedings of the Nutrition Society* 54(1). *Proc Nutr Soc*: 65–82. DOI: 10.1079/PNS19950038.

Chang S, Berman J, Sheng Y, et al. (2015) Cloning and functional characterization of the maize (*Zea mays* L.) carotenoid epsilon hydroxylase gene. *PLoS ONE* 10(6). Public Library of Science. DOI: 10.1371/journal.pone.0128758.

Chen L, Deng H, Cui H, et al. (2018) Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. Impact Journals LLC. DOI: 10.18632/oncotarget.23208.

Chen Y and Junger WG (2012) Measurement of oxidative burst in neutrophils. *Methods in Molecular Biology* 844: 115–124. DOI: 10.1007/978-1-61779-527-5_8.

Cheng YS, Lu PM, Huang CY, et al. (2017) Encapsulation of lycopene with lecithin and α -tocopherol by supercritical antisolvent process for stability enhancement. *Journal of Supercritical Fluids* 130. Elsevier B.V.: 246–252. DOI: 10.1016/j.supflu.2016.12.021.

Chernyshova MP, Pristenskiy D V., Lozbiakova M V., et al. (2019) Systemic and skin-targeting beneficial effects of lycopene-enriched ice cream: A pilot study. *Journal of dairy science* 102(1). *J Dairy Sci*: 14–25. DOI: 10.3168/JDS.2018-15282.

Clinton SK (1998) Lycopene: Chemistry, Biology, and Implications for Human Health and Disease. *Nutrition Reviews* 56(2). Oxford University Press (OUP): 35–51. DOI: 10.1111/j.1753-4887.1998.tb01691.x.

Cui G (2001) Disposable amperometric glucose sensor electrode with enzyme-immobilized nitrocellulose strip. *Talanta* 54(6): 1105–1111. DOI: 10.1016/S0039-9140(01)00377-0.

Datta M, Taylor ML and Frizzell B (2013) Dietary and serum lycopene levels in prostate cancer patients undergoing intensity-modulated radiation therapy. *Journal of Medicinal Food* 16(12): 1131–1137. DOI: 10.1089/jmf.2012.0223.

de Saint Germain A, Bonhomme S, Boyer FD, et al. (2013) Novel insights into strigolactone distribution and signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 16(5): 583–589. DOI: 10.1016/J.PBI.2013.06.007.

Di Mascio P, Kaiser S and Sies H (1989) Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 274(2): 532–538. DOI: 10.1016/0003-9861(89)90467-0.

dos Santos RC, Ombredane AS, Souza JMT, et al. (2018) Lycopene-rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) displays cytotoxic effect against human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 via an apoptotic-like pathway. *Food Research International* 105. Elsevier Ltd: 184–196. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.10.045.

Ejike DE, Adam MA, Sheu OS, et al. (2018) Lycopene attenuates diabetes-induced oxidative stress in Wistar rats. *Journal of Diabetes and Endocrinology* 9(2). Academic Journals: 11–19. DOI: 10.5897/JDE2018.0118.

Fiedor J and Burda K (2014) Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients* 6(2). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI): 466–88. DOI: 10.3390/nu6020466.

Flores G, Wu SB, Negrin A, et al. (2015) Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits. *Food Chemistry* 170. Elsevier Ltd: 327–335. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.08.076.

Galano A and Francisco-Marquez M (2009) Reactions of OOH radical with β -carotene, lycopene, and torulene: Hydrogen atom transfer and adduct formation mechanisms. *Journal of Physical Chemistry B* 113(32). American Chemical Society: 11338–11345. DOI: 10.1021/jp904061q.

Garg A and Aggarwal BB (2002) Nuclear transcription factor- κ B as a target for cancer drug development. *Leukemia*. *Leukemia*. DOI: 10.1038/sj.leu.2402482.

Grabowska M, Wawrzyniak D, Rolle K, et al. (2019) Let food be your medicine: Nutraceutical properties of lycopene. *Food and Function*. Royal Society of Chemistry. DOI: 10.1039/c9fo00580c.

Greenberg S and Grinstein S (2002) Phagocytosis and innate immunity. *Current Opinion in Immunology*. Elsevier Ltd. DOI: 10.1016/S0952-7915(01)00309-0.

Gurmu F, Hussein S and Laing M (2014) The potential of orange-fleshed sweet potato to prevent vitamin A deficiency in Africa. *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition* 84(1–2): 65–78. DOI: 10.1024/0300-9831/a000194.

Gutiérrez RMP, Mitchell S and Solis RV (2008) *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. DOI: 10.1016/j.jep.2008.01.025.

Halliwell B, Gutteridge JMC (eds) (2015) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford.

Hedayati N, Naeini MB, Nezami A, et al. (2019) Protective effect of lycopene against chemical and natural toxins: A review. *BioFactors (Oxford, England)* 45(1). *Biofactors*: 5–23. DOI: 10.1002/BIOF.1458.

Honda M, Takahashi N, Kuwa T, et al. (2015) Spectral characterisation of Z-isomers of lycopene formed during heat treatment and solvent effects on the E/Z isomerisation process. *Food Chemistry* 171. Elsevier Ltd: 323–329. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.09.004.

Ikawa T (2014) Genetic and epigenetic control of early lymphocyte development. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 381. Springer Verlag. DOI: 10.1007/82_2014_370.

Islamian JP and Mehrali H (2015) Lycopene as A Carotenoid Provides Radioprotectant and Antioxidant Effects by Quenching Radiation-Induced Free Radical Singlet Oxygen: An Overview. *Cell Journal (Yakhteh)* 16(4). Royan Institute: 386. DOI: 10.22074/CELLJ.2015.485.

Jakobsen LH, Wirth R, Smoliner C, et al. (2017) Gastrointestinal tolerance and plasma status of carotenoids, EPA and DHA with a fiber-enriched tube feed in hospitalized patients initiated on tube nutrition: Randomized controlled trial. *Clinical Nutrition* 36(2). Churchill Livingstone: 380–388. DOI: 10.1016/j.clnu.2016.02.001.

Jones DP (2006) Redefining oxidative stress. *Antioxidants and Redox Signaling*. DOI: 10.1089/ars.2006.8.1865.

Kancheva V and Kasaikina O (2013) Bio-Antioxidants – A Chemical Base of Their Antioxidant Activity and Beneficial Effect on Human Health. *Current Medicinal Chemistry* 20(37). Bentham Science Publishers Ltd.: 4784–4805. DOI: 10.2174/09298673113209990161.

Kaulmann A and Bohn T (2014) Carotenoids, inflammation, and oxidative stress-implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. *Nutrition Research*. Elsevier Inc. DOI: 10.1016/j.nutres.2014.07.010.

Kawashima N, Okiji T, Kosaka T, et al. (1996) Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: A quantitative immunohistochemical study. *Journal of Endodontics* 22(6). Lippincott Williams and Wilkins: 311–316. DOI: 10.1016/S0099-2399(96)80266-4.

Kelkel M, Schumacher M, Dicato M, et al. (2011) Antioxidant and anti-proliferative properties of lycopene. In: *Free Radical Research*, 26 August 2011, pp. 925–940. DOI: 10.3109/10715762.2011.564168.

Kopitar AN, Ihan Hren N and Ihan A (2006) Commensal oral bacteria antigens prime human dendritic cells to induce Th1, Th2 or Treg differentiation. *Oral Microbiology and*

Immunology 21(1). Oral Microbiol Immunol: 1–5. DOI: 10.1111/j.1399-302X.2005.00237.x.

Kovvasu SP, Kunamaneni P, Joshi R, et al. (2019) Self-emulsifying Drug Delivery Systems and their Marketed Products: A Review. Asian Journal of Pharmaceutics 13(2): 73. Available at: <https://www.asiapharmaceutics.info/index.php/ajp/article/view/3102> (accessed 5 May 2021).

Krinsky NI (1989) Antioxidant functions of carotenoids. Free Radical Biology and Medicine 7(6). Pergamon: 617–635. DOI: 10.1016/0891-5849(89)90143-3.

Krinsky NI (1998) The antioxidant and biological properties of the carotenoids. In: Annals of the New York Academy of Sciences, November 1998, pp. 443–447. New York Academy of Sciences. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb09923.x.

Krinsky NI and Johnson EJ (2005) Carotenoid actions and their relation to health and disease. Molecular aspects of medicine 26(6). Mol Aspects Med: 459–516. DOI: 10.1016/J.MAM.2005.10.001.

Kumari N, Gautam S and Ashutosh C (2013) Psidium guajava A Fruit or Medicine - An Overview. The Pharma Innovation: 63–67.

Lee MT and Chen BH (2002) Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. Food Chemistry 78(4): 425–432. DOI: 10.1016/S0308-8146(02)00146-2.

Lehninger, A.L., D.L. Nelson e MMC (2013) Lehninger Principles of Biochemistry.

Linnewiel K, Ernst H, Caris-Veyrat C, et al. (2009) Structure activity relationship of carotenoid derivatives in activation of the electrophile/antioxidant response element transcription system. Free Radical Biology and Medicine 47(5). Free Radic Biol Med: 659–667. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.008.

Liu H, Yang H, Chen X, et al. (2014) Cellular metabolism modulation in T lymphocyte immunity. Immunology. Wiley: n/a-n/a. DOI: 10.1111/imm.12321.

Martí R, Roselló S and Cebolla-Cornejo J (2016) Tomato as a source of carotenoids and polyphenols targeted to cancer prevention. Cancers. MDPI AG. DOI: 10.3390/cancers8060058.

MARTON IJ and KISS C (1993) Characterization of inflammatory cell infiltrate in dental periapical lesions. *International Endodontic Journal* 26(2). *Int Endod J*: 131–136. DOI: 10.1111/j.1365-2591.1993.tb00555.x.

Medzhitov R (2010) *Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame*. Cell. Elsevier B.V. DOI: 10.1016/j.cell.2010.03.006.

Miller ES, Mackinney G and Zscheile FP (1935) ABSORPTION SPECTRA OF ALPHA AND BETA CAROTENES AND LYCOPENE. *Plant Physiology* 10(2). American Society of Plant Biologists (ASPB): 375–381. DOI: 10.1104/pp.10.2.375.

Mortensen A and Skibsted LH (1997) Relative stability of carotenoid radical cations and homologue tocopheroxyl radicals. A real time kinetic study of antioxidant hierarchy. *FEBS letters* 417(3): 261–6. DOI: 10.1016/s0014-5793(97)01297-0.

Muzandu K, Ishizuka M, Sakamoto KQ, et al. (2006) Effect of lycopene and β -carotene on peroxynitrite-mediated cellular modifications. *Toxicology and Applied Pharmacology* 215(3): 330–340. DOI: 10.1016/j.taap.2006.03.006.

Paliwal C, Ghosh T, George B, et al. (2016) Microalgal carotenoids: Potential nutraceutical compounds with chemotaxonomic importance. *Algal Research* 15. Elsevier B.V.: 24–31. DOI: 10.1016/j.algal.2016.01.017.

Palozza P, Catalano A, Simone RE, et al. (2012) Effect of Lycopene and Tomato Products on Cholesterol Metabolism. *undefined* 61(2): 126–134. DOI: 10.1159/000342077.

Panasenko OM, Sharov VS, Briviba K, et al. (2000) Interaction of peroxynitrite with carotenoids in human low density lipoproteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 373(1). Academic Press Inc.: 302–305. DOI: 10.1006/abbi.1999.1424.

Petyaev IM (2016) Lycopene Deficiency in Ageing and Cardiovascular Disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016: 3218605. DOI: 10.1155/2016/3218605.

Phulara SC, Chaturvedi P and Gupta P (2016) Isoprenoid-based biofuels: Homologous expression and heterologous expression in prokaryotes. *Applied and Environmental Microbiology* Voordouw G (ed.). American Society for Microbiology. DOI: 10.1128/AEM.01192-16.

- Przybylska S (2020) Lycopene – a bioactive carotenoid offering multiple health benefits: a review. *International Journal of Food Science & Technology* 55(1). John Wiley & Sons, Ltd: 11–32. DOI: 10.1111/IJFS.14260.
- Ramel F, Birtic S, Cuiné S, et al. (2012) Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants. *Plant Physiology* 158(3). *Plant Physiol*: 1267–1278. DOI: 10.1104/pp.111.182394.
- Rao AV and Agarwal S (2000) Role of Antioxidant Lycopene in Cancer and Heart Disease. *Journal of the American College of Nutrition* 19(5): 563–569. DOI: 10.1080/07315724.2000.10718953.
- Rao AV, Ray MR and Rao LG (2006) Lycopene. *Advances in Food and Nutrition Research* 51. Academic Press: 99–164. DOI: 10.1016/S1043-4526(06)51002-2.
- Rein MJ, Renouf M, Cruz-Hernandez C, et al. (2013) Bioavailability of bioactive food compounds: A challenging journey to bioefficacy. *British Journal of Clinical Pharmacology* 75(3): 588–602. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2012.04425.x.
- Riso P, Visioli F, Grande S, et al. (2006) Effect of a tomato-based drink on markers of inflammation, immunomodulation, and oxidative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(7): 2563–2566. DOI: 10.1021/jf053033c.
- Rogers LJ, Shah SP and Goodwin TW (1966) Intracellular localization of mevalonate-activating enzymes in plant cells. *The Biochemical journal* 99(2). Portland Press Ltd: 381–388. DOI: 10.1042/bj0990381.
- Rohmer M, Knani M, Simonin P, et al. (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: A novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochemical Journal* 295(2): 517–524. DOI: 10.1042/bj2950517.
- Roldán-Gutiérrez JM and Dolores Luque de Castro M (2007) Lycopene: The need for better methods for characterization and determination. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 26(2): 163–170. DOI: 10.1016/j.trac.2006.11.013.
- Roy CK, Kamath J V. and Asad M (2006) Hepatoprotective activity of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. *Indian Journal of Experimental Biology* 44(4): 305–311.

Rühl R (2007) Effects of dietary retinoids and carotenoids on immune development: Symposium on ‘Nutritional influences on developmental immunology’. In: Proceedings of the Nutrition Society, August 2007, pp. 458–469. Cambridge University Press. DOI: 10.1017/S002966510600509X.

Saini RK, Nile SH and Park SW (2015) Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. Food Research International. Elsevier Ltd. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.07.047.

Shardell MD, Alley DE, Hicks GE, et al. (2011) Low-serum carotenoid concentrations and carotenoid interactions predict mortality in US adults: The Third National Health and Nutrition Examination Survey. Nutrition Research 31(3): 178–189. DOI: 10.1016/j.nutres.2011.03.003.

Singh S, Bajpai M and Mishra P (2020) Self-emulsifying drug delivery system (Sedds): An emerging dosage form to improve the bioavailability of poorly absorbed drugs. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 37(4). Begell House Inc.: 305–329. DOI: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2020033111.

Slauch JM (2011) How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. Molecular Microbiology 80(3): 580–583. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07612.x.

Srivastava S and Srivastava AK (2015) Lycopene; chemistry, biosynthesis, metabolism and degradation under various abiotic parameters. Journal of Food Science and Technology. Springer India. DOI: 10.1007/s13197-012-0918-2.

Stashenko P, Teles R and D’Souza R (1998) Periapical inflammatory responses and their modulation. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine. Intern. and American Associations for Dental Research. DOI: 10.1177/10454411980090040701.

Takahashi K (1998) Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. International Endodontic Journal 31(5). Blackwell Publishing Ltd: 311–325. DOI: 10.1046/j.1365-2591.1998.00171.x.

Tinkler JH, Böhm F, Schalch W, et al. (1994) Dietary carotenoids protect human cells from damage. Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology 26(3): 283–285.

DOI: 10.1016/1011-1344(94)07049-0.

Torchilin VP (2014) Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/nrd4333.

Tran P and Park JS (2021) Recent trends of self-emulsifying drug delivery system for enhancing the oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. Springer. DOI: 10.1007/s40005-021-00516-0.

Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*. DOI: 10.1113/jphysiol.2003.049478.

van Breemen RB and Pajkovic N (2008) Multitargeted therapy of cancer by lycopene. *Cancer Letters*. NIH Public Access. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.05.016.

Vasconcelos AG, Amorim A das GN, dos Santos RC, et al. (2017) Lycopene rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) displays anti-inflammatory and antioxidant profile by reducing suggestive hallmarks of acute inflammatory response in mice. *Food Research International* 99(Pt 2): 959–968. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.01.017.

Vasconcelos AG, Valim MO, Amorim AGN, et al. (2020) Cytotoxic activity of poly- ϵ -caprolactone lipid-core nanocapsules loaded with lycopene-rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) on breast cancer cells. *Food Research International* 136. Elsevier: 109548. DOI: 10.1016/J.FOODRES.2020.109548.

Vasconcelos AG, Luisa A, Barros AN, et al. (2021) Promising self-emulsifying drug delivery system loaded with lycopene from red guava (*Psidium guajava* L.): in vivo toxicity, biodistribution and cytotoxicity on DU-145 prostate cancer cells. *Cancer Nanotechnology* 2021 12:1 12(1). BioMed Central: 1–29. DOI: 10.1186/S12645-021-00103-W.

Wadie W, Mohamed AH, Masoud MA, et al. (2020) Protective impact of lycopene on ethinylestradiol-induced cholestasis in rats. *Naunyn-schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 394(3). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH: 447–455. DOI: 10.1007/S00210-020-01980-5.

Watzl B, Bub A, Brandstetter BR, et al. (1999) Modulation of human T-lymphocyte functions by the consumption of carotenoid-rich vegetables. *British Journal of Nutrition* 82(5). CAB International: 383–389. DOI: 10.1017/s0007114599001634.

Watzl B, Achim B, Blockhaus M, et al. (2000) Prolonged tomato juice consumption has no effect on cell-mediated immunity of well-nourished elderly men and women. *Journal of Nutrition* 130(7). American Institute of Nutrition: 1719–1723. DOI: 10.1093/jn/130.7.1719.

Wayne RP (2007) Singlet Molecular Oxygen., pp. 311–371. DOI: 10.1002/9780470133378.ch4.

Weisburger JH (2002) Lycopene and tomato products in health promotion. In: *Experimental Biology and Medicine*, 6 November 2002, pp. 924–927. DOI: 10.1177/153537020222701014.

Yao M, McClements DJ and Xiao H (2015) Improving oral bioavailability of nutraceuticals by engineered nanoparticle-based delivery systems. *Current Opinion in Food Science*. Elsevier Ltd. DOI: 10.1016/j.cofs.2014.12.005.

Yaroshevich IA, Krasilnikov PM and Rubin AB (2015) Functional interpretation of the role of cyclic carotenoids in photosynthetic antennas via quantum chemical calculations. *Computational and Theoretical Chemistry* 1070. Elsevier: 27–32. DOI: 10.1016/j.comptc.2015.07.016.

Young AJ and Lowe GM (2001) Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 385(1): 20–27. DOI: 10.1006/abbi.2000.2149.

Zhang Y, Liu Y and Lv Q (2016) DFT study on the quenching mechanism of singlet oxygen by lycopene. *RSC Advances* 6(100). Royal Society of Chemistry: 98498–98505. DOI: 10.1039/c6ra19639j.

OBJETIVOS

GERAL

- Analisar o potencial de um sistema autoemulsificante de entrega de drogas contendo licopeno purificado da goiaba vermelha para aplicações anti-inflamatórias e antioxidantes.

ESPECÍFICOS

- Extrair, isolar, purificar o licopeno da goiaba vermelha;
- Avaliar o efeito citotóxico do LPG em células VERO;
- Formular o sistema autoemulsificante contendo o licopeno da goiaba vermelha (nanoLPG);
- Caracterização do sistema nanoLPG;
- Avaliar a transcrição dos genes que codificam *IL-10*, *TNF- α* , *COX-2* e *INF- γ* em células mononucleares do sangue periférico de doadores saudáveis tratadas com nanoLPG;
- Avaliar o efeito citotóxico e antioxidante do LPG e da nanoLPG em queratinócitos humanos;
- Avaliar os efeitos do LPG e da nanoLPG na disfunção endotelial induzida por pirogalol em anel aórtico isolado de rato.

CAPÍTULO 2

Licopeno da goiaba vermelha (*Psidium guajava* L.): Do efeito hepatoprotetor ao seu uso em um sistema promissor de liberação de fármaco autoemulsionante para aplicações anti-inflamatórias e antioxidantes.

Maíra Bernardes Alves¹, Andreanne Gomes Vasconcelos^{1,2}, Amandda Évelin Silva de Carvalho³, Robson Camilotti Slompo⁴, Bruno Silva Sá², Maria Júlia Lima Gonçalves², Liz Nayara Ribeiro da Costa Lima Moura², Ana Karolinne da Silva Brito⁵, José Vinícius de Sousa França⁵, Maria do Carmo de Carvalho e Martins⁵, Márcia dos Santos Rizzo⁶, Susana Sores⁷, Verónica Bastos⁷, Felipe Saldanha de Araujo³, Bassam Felipe Mogharbel⁴, Katherine Athayde Teixeira de Carvalho⁴, Helena Oliveira⁷ Alexandra Plácido^{8,9}, Daniel Dias Rufino Arcanjo⁵, Eder Alves Barbosa^{1,10}, José Roberto de Souza de Almeida Leite^{1,*}

¹Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada, NuPMIA, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, Brasil;

²Centro Universitário do Distrito Federal, UDF, Brasília, Brasil;

³Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, Brasil;

⁴Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, Curitiba, PR, Brasil;

⁵Departamento de Biofísica e Fisiologia, Centro de Ciências da Saúde (DBFis/CCS), Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, PI, Brasil;

⁶ Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV) e Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde (DMOR/CCS), Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, PI, Brasil;

⁷Universidade de Aveiro, UA, Aveiro, Portugal;

⁸Departamento de Bioquímica, Faculdade de Ciências, FCUP, Universidade do Porto, UP, Porto, Portugal;

⁹*Bioprospectum*, UPTEC, Porto, Portugal;

¹⁰EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil;

RESUMO

O licopeno é um carotenoide com potencial aplicação para o tratamento de doenças crônicas. Diferentes formulações do licopeno extraído da goiaba vermelha possuem atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória, antitumoral, além de agir na diminuição de triglicerídeos plasmáticos e peroxidação lipídica. No presente trabalho, o efeito do tratamento de hamsters hipercolesterolêmicos com diferentes doses do licopeno extraído da goiaba vermelha (LEG) administrado por via oral foi avaliado quanto a função hepática dos animais. Adicionalmente, a citotoxicidade do licopeno purificado da goiaba vermelha (LPG) em células Vero foi analisada por meio do ensaio de cristal violeta e por microscopia de fluorescência. Além disso, um sistema de entrega de drogas autoemulsificante carregado com licopeno purificado da goiaba vermelha (nanoLPG) foi produzido e empregado em testes de estabilidade; o efeito de diferentes concentrações da nanoLPG na expressão de genes relacionados ao sistema imunológico (*IL-10*, *TNF- α* , *COX-2* e *INF- γ*) de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) utilizando PCR em tempo real também foi analisado. Por fim, o LPG e a nanoLPG foram testados quanto a sua capacidade antioxidante e seu efeito citotóxico em queratinócitos. Os resultados sugerem que o LEG, apesar de, nas doses testadas, não ser capaz de melhorar os marcadores sanguíneos de função hepática dos hamsters hipercolesterolêmicos, mostrou-se seguro para uso, uma vez que análises histopatológicas não evidenciaram dano hepático nos animais. Adicionalmente, o LPG não apresentou citotoxicidade em células Vero. Em relação à nanoLPG, os resultados do efeito produzido pelo estresse térmico avaliados por DLS e visualmente indicam perda de cor, mudança de textura e separação de fases após 15 dias, sem interferir no tamanho do nanoLPG, de maneira que a formulação demonstrou ser eficiente em estabilizar o licopeno encapsulado. Os resultados de expressão gênica indicam que, embora não tenha havido diferença significativa na expressão de *IL-10* e *TNF- α* , as PBMC tratadas com nanoLPG apresentaram uma redução na expressão do gene que codifica *INF- γ* e um aumento de *COX-2*. Embora o LPG e nanoLPG tenham apresentado toxicidade moderada quando testado em queratinócitos, o que pode estar relacionado às características da linhagem celular, ambos apresentaram atividade antioxidante potente. Por fim, o LPG e a nanoLPG apresentaram efeitos vasoprotetores em preparações de aorta. Assim, o trabalho adiciona evidências da segurança que o licopeno apresenta para uso em humanos e que as formulações testadas, principalmente a nanoLPG devido sua estabilidade, se destacam como produtos

promissores e biosseguros para o tratamento de doenças que possuem em sua etiopatologia o estresse oxidativo e a inflamação.

Palavras-chave: Licopeno, goiaba, autoemulsificante, antioxidante, anti-inflamatório.

ABSTRACT

Lycopene is a carotenoid with potential application for the treatment of chronic diseases. Different formulations of lycopene extracted from red guava have antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor activity, in addition to acting in the reduction of plasma triglycerides and lipid peroxidation. Here, the effects of the treatment of hypercholesterolemic hamsters with different doses of lycopene extracted from red guava (LEG) administered orally were evaluated regarding the liver function of the animals. Additionally, the cytotoxicity of lycopene purified from red guava (LPG) in Vero cells was analyzed by crystal violet assay and by fluorescence microscopy. In addition, a self-emulsifying drug delivery system loaded with purified lycopene from red guava (nanoLPG) was produced and employed in stability tests; the effect of different concentrations of nanoLPG on the expression of immune-related genes (*IL-10*, *TNF- α* , *COX-2* and *INF- γ*) from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) using real-time PCR was also analyzed. Finally, LPG and nanoLPG were tested for their antioxidant capacity and their cytotoxic effect on human keratinocytes. Results suggest that LEG, despite not being able to improve blood markers of liver function in hypercholesterolemic hamsters, proved to be safe to use, since histopathological analyzes did not show liver damage. Additionally, LPG did not show cytotoxicity in Vero cells. In relation to nanoLPG, the effects produced by heat stress evaluated by DLS and visually were loss of color, texture change and phase separation after 15 days, without interfering with the size of nanoLPG, so that the formulation proved to be efficient in stabilize the encapsulated lycopene. The gene expression assay indicates that, although there was no significant difference in the expression of *IL-10* and *TNF- α* , the PBMC treated with nanoLPG showed a reduction in transcriptional levels of *INF- γ* and an increased expression of *COX-2*. Although LPG and nanoLPG showed moderate toxicity to keratinocytes, which may be related to cell lineage characteristics, both revealed potent antioxidant activity. Lastly, LPG and nanoLPG showed vasoprotective effects in aortic preparations. Thus, the work adds evidence to the safety use of lycopene by humans and shows that tested formulations, mainly nanoLPG due to its stability, stand out as promising and biosafe products for the treatment of diseases that have oxidative stress and inflammation in their etiopathology.

Keywords: Lycopene, guava, self-emulsifying, antioxidant, anti-inflammatory.

INTRODUÇÃO

Os carotenoides são compostos bioativos derivados de plantas os quais apresentam impactos positivos na saúde. Eles exercem funções pro-vitamínicas e antioxidantes, de maneira que correspondem à principal fonte alimentar de vitamina A em humanos (Olson, 1987). Os carotenoides são usados pela indústria como alimentos especiais, aditivos para alimentação animal, nutracêuticos, corantes em cosméticos e produtos farmacêuticos (Zakynthinos and Varzakas, 2016). Além disso, estudos sugerem que carotenoides são eficazes contra condições degenerativas (Davies, 1995; Halliwell, 1996) e, embora os mecanismos não estejam totalmente compreendidos, acredita-se que essa ação pode estar ligada, ao menos em parte, à sua atividade antioxidante (Davies, 1995; Halliwell, 1996; Milani et al., 2017). Assim, alguns esforços têm sido realizados para desenvolver formulações e condições de processamento específicos para maximizar o potencial de produtos ricos em carotenoides (Mutsokoti et al., 2017).

O licopeno é um carotenoide que apresenta fórmula molecular $C_{40}H_{56}$ (Rao and Agarwal, 1999) e, dentre os carotenoides, possui a maior eficiência biológica para eliminar o oxigênio singlete (Di Mascio et al., 1989). Sua potente atividade antioxidante está associada a duas duplas ligações não conjugadas, que dão grande reatividade à molécula (Di Mascio et al., 1989; Islamian and Mehrali, 2015). Estudos apontam que o licopeno exerce um papel central no sistema de proteção celular estabilizando espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) (Krinsky and Johnson, 2005; Rogers et al., 1966). Assim, o licopeno pode ser potencialmente empregado para o tratamento de doenças crônicas que possuem o estresse oxidativo na sua etiopatogênese, como a obesidade, o câncer, as doenças cardiovasculares, o diabetes *mellitus*, a doença de Alzheimer e doenças inflamatórias (Ejike et al., 2018; Fiedor and Burda, 2014; Hedayati et al., 2019; Przybylska, 2020). Quanto a este, estudos apontam que o licopeno interfere beneficemente na expressão de genes que agem no sistema inflamatório de fase aguda através da modulação de interleucinas e na síntese de fator de necrose tumoral (*TNF- α*) por linfócitos e macrófagos, respectivamente (Riso et al., 2006; Watzl et al., 2000).

O tomate é a fonte tradicional de licopeno, sendo aplicado no desenvolvimento de diversos produtos (Colle et al., 2013). Entretanto, como a demanda de licopeno é crescente, se faz necessário explorar fontes alternativas para sua obtenção. Nesse sentido, pesquisas envolvendo a goiaba vermelha (*Psidium guajava L*) como fonte de licopeno têm se mostrado uma boa opção (Kong et al., 2010), uma vez que ela é uma fonte de outros carotenoides antioxidantes como β -caroteno (El-Raey et al., 2013). Recentemente,

metodologias analíticas para a extração e isolamento de carotenoides a partir da goiaba vermelha (*P. guajava* L.) foram desenvolvidas, resultando na produção de um extrato rico em licopeno da goiaba vermelha (LEG) (Amorim, A. G. N.; Leite, J. R. S. A.; Ropke, 2016). O LEG apresentou excelente atividade antioxidante quando comparado ao licopeno isolado de outras frutas tropicais (Amorim et al., 2018). Além disso, os estudos mostraram que o LEG e o licopeno purificado da goiaba vermelha (LPG) apresentaram maior quantidade de licopeno do que o tomate, por exemplo (Amorim et al., 2018). Adicionalmente, o LEG e o LPG apresentaram atividades antimicrobiana e antioxidante (dos Santos et al., 2018), assim como, de inibição da inflamação aguda causada por carragenina em camundongos Swiss (Vasconcelos et al., 2017). O efeito benéfico do LEG contra células de adenocarcinoma (dos Santos et al., 2018) e na diminuição de triglicérides plasmáticos e peroxidação lipídica em hamsters também foram acessados (Brito et al., 2019).

Assim como outros carotenoides naturais, o licopeno possui baixa solubilidade em água, alta susceptibilidade à luz, oxigênio e auto-oxidação e baixa permeabilidade intestinal, dificultando suas aplicações clínica e alimentar (Carvalho et al., 2021; Chernyshova et al., 2019; Rein et al., 2013; Srivastava and Srivastava, 2015). Nesse cenário, aplicações nanotecnológicas surgem como uma solução promissora (Riso et al., 2006). Recentemente, Vasconcelos et al. (2021) desenvolveram uma formulação constituída de um sistema de entrega de drogas autoemulsificante carregado com o licopeno purificado da goiaba vermelha, denominada nanoLPG. A formulação apresentou atividade antioxidante *in vitro*, estabilidade por 10 meses quando estocada a 5 °C e citotoxicidade contra células de câncer de próstata em camundongos, quando administrada de forma oral.

Assim, como o estresse oxidativo e a inflamação desempenham papel crucial em doenças crônicas, é importante do ponto de vista biotecnológico investigar as atividades e os mecanismos anti-inflamatórios e antioxidantes do LEG, do LPG e da nanoLPG. Dessa maneira, o efeito do LEG na função hepática de hamsters hipercolesterolêmicos foi acessada. Adicionalmente, o LPG e a nanoLPG foram empregados em experimentos envolvendo testes *in vitro* e *in vivo* para avaliar suas atividades anti-inflamatória e antioxidante.

MATERIAL E MÉTODOS

Extrato rico em licopeno da goiaba vermelha (LEG), licopeno purificado da goiaba vermelha (LPG) e sistema de entrega de drogas autoemulsificante carregado com o licopeno purificado da goiaba vermelha (nanoLPG).

Amostras: O LEG foi produzido utilizando etanol e diclorometano, de acordo com o método detalhado na patente n° EP20180171653 20180509 de Amorim, Leite e Pintado (2018). O LPG foi produzido utilizando diclorometano de acordo com a metodologia detalhada na patente n° BR 102016030594-2 (Amorim et al. 2016). O LEG e o LPG foram obtidos a partir de frutos com alto grau de maturação provenientes de cultivo orgânico realizado na região de Tabuleiros Litorâneos do Piauí, Parnaíba, Piauí, Brasil, comprados em um comércio local. O conteúdo de licopeno do LEG e do LPG foi determinado por meio de análises espectrofotométricas, de acordo com Vasconcelos et al (2020) e Vasconcelos et al. (2021), respectivamente. As amostras foram estocadas a -80 °C. A nanoLPG foi produzida de acordo com Vasconcelos et al. (2021) utilizando monoestearato de sorbitano, óleo de coco, etanol, acetona, água destilada (pH 7,0) e polisorbato 80. A síntese foi realizada sob agitação magnética por 10 min à 40 °C e a concentração se deu sob pressão reduzida (30 mbar) à 37 °C utilizando um rotaevaporador. As amostras foram estocadas entre 5 e -8 °C.

Espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta da nanoLPG: o tamanho médio da partícula (z-average) e o índice de polidispersividade (PDI) foram mensurados por DLS utilizando um equipamento Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, UK), como descrito por Vasconcelos et al. (2021). De maneira breve, as amostras foram diluídas em água destilada ultrapura e analisadas em triplicata com um ângulo de 90 ° e tempo de equilíbrio de 60 s à 25 °C antes das mensurações. O potencial zeta foi determinado nas mesmas condições.

Estabilidade termodinâmica da nanoLPG: a nanoemulsão foi submetida a estresse físico para avaliar sua estabilidade, como descrito por Azeem et al. (2009). As amostras (2 mL) foram centrifugadas a 3500 rpm por 30 min e 15000 rpm por 15 min. Para o ensaio de estabilidade térmica, amostras (2 mL) foram aquecidas a 45 °C e resfriadas a 4 °C em intervalos de 48 h durante 30 dias. Cor, textura, separação de fase e turbidez foram avaliadas macroscopicamente. O tamanho médio da partícula, o PDI e o potencial zeta

foram mensurados de acordo com os procedimentos descritos acima. Os testes foram realizados em triplicata.

Teste de citotoxicidade em células de linhagem Vero

Linhagem de células Vero: células Vero foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (código BCRJ: 0245). As células foram removidas do nitrogênio líquido e submetidas à 37 °C por um curto período. Quando o conteúdo dos frascos começou a descongelar, ele foi transferido para um tubo de 15 mL contendo meio de cultura completo: DMEN-F12 suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS) contendo 1 % de penicilina e estreptomicina (100 U/mL e 100 µg/mL, respectivamente). O tubo foi centrifugado a 1500 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi removido e DMEN-F12 foi adicionado às células. Uma alíquota foi obtida para contagem, realizada com azul de tripan (1:1 v/v) em câmara de Neubauer. Depois da contagem, as células foram semeadas na concentração de 1×10^4 células/cm² em frascos de cultura de 75 cm². Os frascos foram mantidos em estufa a 37 °C e 5 % de CO₂. O meio de cultura foi substituído duas vezes na semana até que as células fossem subcultivadas ou utilizadas nos experimentos.

Ensaio de cristal violeta: células Vero foram semeadas em placas de 96 poços em uma concentração de 2×10^3 células/poço. Após 24 h, o meio de cultura foi substituído pelos meios de cultura contendo as moléculas testadas: LPG, coenzima Q10 (CoQ10) e ácido ascórbico (VIT C) nas concentrações de 2,5, 5 e 10 µM. Após 48 e 72 h, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas três vezes com tampão PBS (Tampão fosfato-Salino). Então, 200 µL de solução de glutaraldeído a 2,5 % foram adicionados em cada poço e as placas foram mantidas a temperatura ambiente. Após 3h, o fixativo foi removido e as células foram lavadas uma vez com tampão PBS. Então, 200 µL de cristal violeta foram adicionados em cada poço da placa contendo as células as quais foram incubadas à temperatura ambiente. Após 10 min, o cristal violeta foi removido, as células foram lavadas duas vezes com água Milli-Q e 200 µL de ácido acético glacial 33 % foram adicionados em cada poço das placas. Por fim, as placas foram agitadas por 30 min e a absorbância no comprimento de onda de 595 nm foi mensurada. Células Vero tratadas com os respectivos solventes das moléculas testadas foram submetidas aos mesmos procedimento e empregadas como controle.

Avaliação da viabilidade de células Vero utilizando o LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity kit: células Vero foram semeadas em placas de 96 poços na

concentração de 5×10^3 . Após 24 h, o meio de cultura foi substituído pelos meios de cultura contendo as moléculas testadas: LPG, CoQ10 e VIT C nas concentrações de 2,5, 5 e 10 μM . Após 48 e 72 h, as soluções Hoechst 33342, calceína-AM e homodímero-1 de etídio (Eth-1) foram adicionadas em cada poço da placa, de maneira que as concentrações finais dos reagentes foram 5 $\mu\text{g/ml}$, 0,3 nM e 0,6 nM, respectivamente. As placas foram colocadas no escuro por 30 min e analisadas utilizando um equipamento In Cell Analyzer 2000 (GE, EUA), com o qual, quatro imagens foram capturadas por poço. Células Vero tratadas com os respectivos solventes das moléculas testadas foram submetidas aos mesmos procedimentos e empregadas como controle.

Estudo histopatológico do fígado e de marcadores sanguíneos de função hepática em hamsters hipercolesterolêmicos tratados com o extrato rico em licopeno extraído da goiaba vermelha (LEG)

Aspectos éticos: todos os procedimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional para o Controle de Experimentação com Animais (CONCEA, Brasil) e pelas Leis Brasileiras (11,794, de 10.8.2008 e lei 9,605, de 02.12.98). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (CEUA-UFPI No. 197/16).

Animais: hamsters machos (*Mesocricetus auratus*, linhagem Golden Syrian) com 16 dias de vida e peso igual a $53,26 \pm 1,99$ g foram mantidos em caixas individuais, sob controle de temperatura (23 ± 2 °C), ciclo claro escuro de 12 h, e com livre disponibilidade de água e comida. A dislipidemia foi induzida utilizando uma dieta hipercolesterolêmica elaborada e descrita por Brito et al. (2019) a qual foi disponibilizada durante 21 dias para os animais de todos os grupos, exceto para o grupo controle (não hiperlipídica) os quais receberam alimentação padrão (dieta não hiperlipídica; Labina, São Paulo, SP, Brasil) até o final dos experimentos. Após esse período, os animais foram submetidos a diferentes tratamentos durante 28 dias: grupo controle (animais que receberam dieta normolipidêmica), grupo hipercolesterolêmico (animais que receberam dieta hipercolesterolêmica), LEG-25 (animais que receberam dieta hipercolesterolêmica e LEG via oral na concentração de 25 mg/kg/dia) e LEG 50 (animais que receberam dieta hipercolesterolêmica e LEG via oral na concentração de 50 g/kg/dia). Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados por meio de administração intraperitoneal de tiopental sódico (100 mg/kg por peso corporal). O sangue venoso dos animais foi coletado e centrifugado a 2500 rpm durante 15 min a 4 °C para separação do plasma sanguíneo.

Efeito do LPG nos marcadores sanguíneos de função hepática: os níveis plasmáticos albumina, proteínas totais, fostasase alcalina, glutamyltransferase-gama (GGT), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram determinados utilizando métodos enzimáticos colorimétricos em analisador automático (Labmax pleno) utilizando o kit de reagente LabTest (Minas Gerais, Brasil), de acordo com o protocolo descrito pelos fabricantes. O índice Ritis foi calculado como descrito por (De Ritis, Fernando; Mallucci Livio; Coltorti, Mario; Giusti, Giuseppe; Caldera, 1959).

Efeito da LPG na morfologia do tecido hepático: o fígado dos animais foi removido e preservado em tampão formalina 10 % durante 48 h. Os órgãos foram seccionados e submetidos a técnicas usuais histológicas embebidos em parafina. Secções com 5 µm de espessura foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e avaliadas por microscopia de luz (Olympus Microscope). As análises histopatológicas foram realizadas de maneira cega, de acordo com o critério de classificação semiquantitativa com uma escala de pontuação que variou de 0 a 4, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Critério semiquantitativo e classificação das alterações histopatológicas.

Pontuação	Alterações histopatológicas
0	Sem mudanças
1	Degeneração vacuolar e congestão passiva leve
2	Degeneração vacuolar, hepatonecrose e infiltrado inflamatório focal leve com até 10 células/campo em aumento de 400 x.
3	Necrose multifocal com presença de infiltrado inflamatório com 11 a 20 células/campo em aumento de 400 x.
4	Necrose difusa e dissociação da rede reticulina, áreas fibróticas e nódulos regenerativos, infiltrado inflamatório com ≥ 21 células/campo em aumento de 400 x.

Efeito da nanoLPG na expressão de genes relacionados a imunidade avaliado em células mononucleares do sangue periférico humano

Células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) foram incubadas com diferentes concentrações da nanoLPG e a expressão dos seguintes genes relacionados ao sistema imunológico foi avaliada por PCR em tempo real (qPCR): *IL-10*, *TNF- α* , *COX-2* e *INF- γ* . Para isso, o RNA total das células submetidas à incubação foi

extraído e submetido a síntese de cDNA. Esse cDNA foi utilizado em experimentos de qPCR utilizando oligonucleotídeos específicos.

Obtenção das PBMC: PBMC foram isoladas por meio de gradiente de densidade utilizando Ficoll-Paque (Amersham Biosciences). Amostras de sangue periférico humano foram coletadas de doadores saudáveis em tubos contendo EDTA (Certificado de apresentação de apreciação ética: 35640514.5.3001.5440). O sangue total (4 mL) e tampão PBS (4 mL) foram transferidos para tubos cônicos contendo Ficoll (3 mL) os quais foram centrifugados a 360 xg durante 25 min. O halo das células mononucleares foi coletado e lavado três vezes com tampão PBS. Logo após, os eritrócitos foram lisados com adição de 10 mL de solução de cloreto de amônio (0,8 % de NH₄Cl e 0,1 mM de EDTA). Após homogeneização por 10 min, os tubos foram centrifugados a 250 xg durante 10 min a 4 °C. Dois ciclos de lavagem com PBS contendo 2 % de soro fetal bovino (FBS) foram realizados e o precipitado resultante foi dissolvido em 1 mL de meio RPMI suplementado com 10 % de FBS. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer.

Incubação das PBMC com a nanoLPG: 1x10⁶ PBMC foram plaqueadas em meio RPMI suplementado com 10 % de FBS e tratadas com 25 µg/mL da nanoLPG. Após 24 h, as células foram recolhidas e submetidas à extração de RNA utilizando o kit GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich), seguindo as recomendações do fabricante. A quantidade e a qualidade do RNA foram verificadas utilizando o espectrofotômetro Nanodrop One (Fischer Scientific). Para a síntese de cDNA, 500 ng do RNA total foram submetidos às reações utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher), de acordo com as instruções do fabricante.

qPCR: as análises quantitativas da expressão gênica foram realizadas utilizando a metodologia TaqMan (Thermo Fisher), cujos oligossacarídeos e sondas foram adquiridos pelo sistema AssayOnDemand. O gene que codifica *GAPDH* foi utilizado como normalizador, cuja eficiência de amplificação é a mesma dos genes alvo, permitindo realizar a análise pela metodologia DDCT (Livak and Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001). Os seguintes genes foram analisados utilizando a sonda GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega): *IL-10* (Hs00961622) e *TNF-α* (Hs01113624). A metodologia SYBR Green foi aplicada para analisar a expressão dos genes *COX-2* (F-GAAGTTGGCAGCAAATTGAGC e R-TTCTCCTGTGAAGGCGATGA) e *INF-γ* (F-ACTGTGCCAGCAGCTAAAA e R-TATTGCAGGCAGGACAACCA). O

instrumento de PCR em tempo real The StepOne Plus (Thermo Fisher) foi utilizado para as análises.

Efeitos citotóxico e antioxidante do LPG e da nanoLPG em queratinócitos humanos

Cultura de células: queratinócitos humanos imortalizados (células HaCaT) foram obtidos a partir do Cell Lines Services (Eppelheim, Germany). Células HaCaT foram cultivadas em meio de cultura Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) contendo 10 % de FBS e 1 % de L-glutamina, penicilina, estreptomicina e anfotericina B (Fungizone, Life Technologies, Grand Island, NY, USA). As células foram incubadas sob atmosfera umidificada a 37 °C e 5 % de CO₂. A morfologia das células foi observada utilizando um microscópio invertido Nikon Eclipse 80i (Nikon, Tokyo, Japan).

Ensaio MTT: o efeito citotóxico do LPG e da nanoLPG foi acessado utilizando ensaio colorimétrico. Resumidamente, células HaCaT foram semeadas em placas de 96 poços e, após adesão, foram incubadas durante 24 h com diferentes concentrações de LPG e nano LPG (1,25, 2,5 e 10 µg/mL diluídos em meio de cultura DMEM) a 37 °C e 5 % de CO₂. Após a incubação, 50 µL de solução brometo de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) - 2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT; Sigma-Aldrich), na concentração de 1 mg/mL em PBS, pH 7,2, foram adicionados em cada poço da placa. Após 4 h de incubação, o meio foi substituído por DMSO (dimetilsulfóxido) para dissolver os cristais de formazan e as placas foram submetidas a agitação por um período de 2 h, protegidas da luz. A viabilidade celular foi determinada por meio da mensuração da absorbância referente ao comprimento de onda de 570 nm (MTT reduzido) utilizando um aparelho Synergy HT (BioTeK Instruments Inc., Winooski, VT, EUA). A porcentagem das células viáveis foi calculada como a razão entre os valores de comprimento de onda obtidos a partir das células tratadas *versus* células controle.

Atividade de eliminação de ROS intracelular: o ensaio de diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCF-DA) foi utilizado para detectar os níveis de ROS intracelular nas células HaCaT. Resumidamente, os queratinócitos foram semeados em placas de 12 poços e, após aderência, foram incubados com LPG e nanoLPG na concentração de 10 µg/mL durante 24 h. Após o período de incubação, as células foram incubadas com H₂O₂ 300 µM durante 30 min e com DCF-DA 10 µM por mais 30 min. Logo após, as células foram destacadas e a fluorescência do DCF-DA foi analisada durante 45 min utilizando um citômetro Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Applied

Biosystems). A formação de ROS foi estimada a partir da intensidade de fluorescência média (MFI) do DCF utilizando o programa FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR).

Efeitos do LPG e da nanoLPG na disfunção endotelial induzida por pirogalol em aorta isolada de rato

Aspectos éticos: Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, Brasil) e pelas Leis Brasileiras (11.794, de 8.10.2008 e Lei 9.605, de 12.02.98). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí, Brasil (CEUA-UFPI nº 457/18).

Animais: Ratos Wistar fêmeas, pesando entre 180–250 g e com 8–12 semanas de idade, foram obtidos do Biotério da Universidade Federal do Piauí e mantidos à 23 ± 2 °C e ciclo claro/escuro de 12/12 h durante todo o experimento. A ração e a água foram fornecidas *ad libitum* a todos os animais.

Preparação de anéis aórticos e reatividade vascular: Os preparos aórticos foram realizados conforme (Arcanjo et al., 2015). Para avaliar se o LPG e a nanoLPG são capazes de induzir efeitos antioxidantes vasculares, anéis aórticos com endotélio intacto foram incubados com o gerador de superóxido pirogalol (30 μ M) por 30 min após a pré-incubação com LPG ou nanoLPG (nas concentrações de 0,01, 0,03 e 0,10 mg/mL) ou N-acetilcisteína (NAC, 3×10^{-5} M), um antioxidante doador de sulfidrina, por 30 min. Em seguida, adicionou-se fenilefrina (3×10^{-7} M) e construíram-se curvas concentração-resposta para ACh ($10^9 - 10^5$ M) (Bangshaab et al., 2019; Lima Rocha et al., 2022) utilizando regressão não linear. Os dados foram expressos pelas médias +/- erro padrão da média do percentual de vasorrelaxamento em função do logaritmo das concentrações cumulativas de acetilcolina. As curvas foram plotadas usando regressão não-linear, e a significância estatística foi avaliada usando a análise de variância de duas vias ("two-way ANOVA") entre os grupos experimentais (veículo, LPG e nanoLPG). Para avaliar a significância entre os grupos para cada concentração cumulativa de acetilcolina, o pós-teste de comparações múltiplas de Dunnett foi empregado. A plotagem dos gráficos e análises estatísticas foram realizadas usando o aplicativo GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA). A significância estatística foi calculada por ANOVA de duas vias usando GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, EUA).

RESULTADOS

Caracterização do LEG e do LPG

O LEG e o LPG na solução clorofórmio: etanol (1:20) exibiram as três bandas de absorção esperadas em 503, 472 e 447 nm (dados não mostrados). A quantificação do equivalente de licopeno nos extratos realizada a partir da absorção em 472 nm resultou em um rendimento de 20-30 % e > 90 % de licopeno por extrato seco de LEG e LPG, respectivamente.

Citotoxicidade do LPG em células Vero

O efeito do LPG na viabilidade de células Vero foi testado por meio do ensaio de cristal violeta. As células Vero foram incubadas durante 48 e 72 h com concentrações crescentes de LPG, CoQ10 e VIT C (2.5, 5 e 10 μ M). Os resultados indicam que houve uma redução aparente da viabilidade celular apenas quando a VIT C na concentração de 5 μ M foi incubada durante 72 h, porém, sem significância estatística (Figura 1).

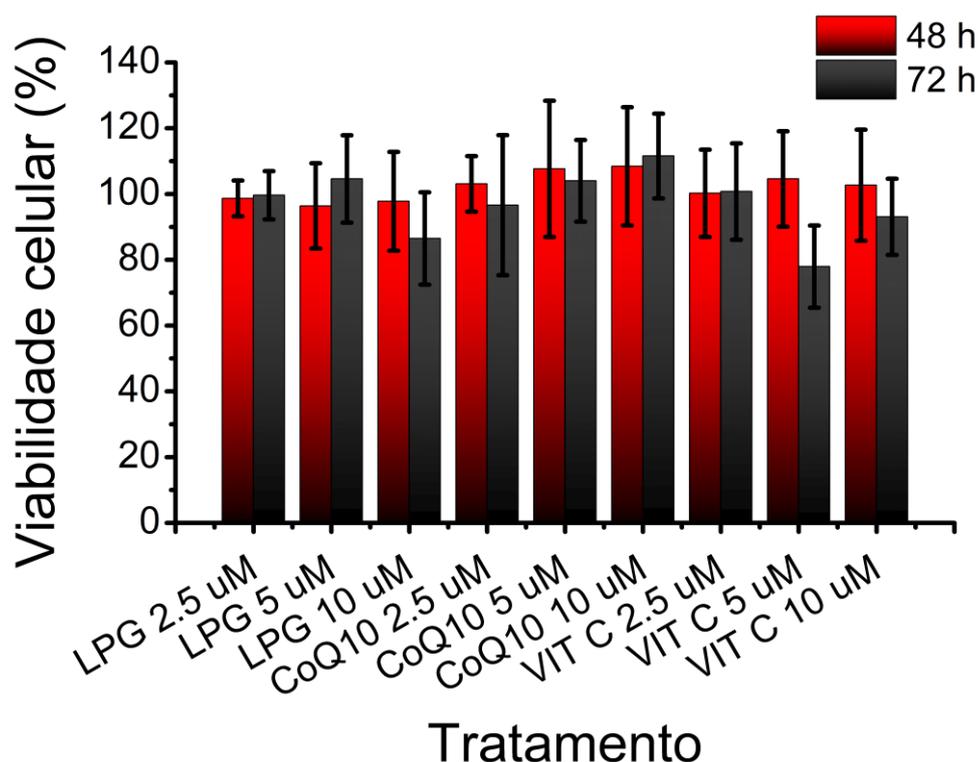


Figura 1. Efeito do LPG, CoQ10 e VIT C na viabilidade celular de células Vero após 48 e 72 h de incubação. As colunas apresentam a média \pm desvio padrão; n = 5.

A viabilidade das células Vero incubadas com LPG foi confirmada por microscopia de fluorescência. A Figura 2 mostra o perfil de coloração das células Vero

controle (Figura 2A-F) e tratadas com LPG (Figura 2G-L), CoQ10 (Figura 2M-R) e VIT C (Figura 2S-X) durante 48 e 72 h nas concentrações de 2,5, 5 e 10 μ M. De maneira geral, as células foram coradas em verde para todas as condições testadas, indicando que não houve morte celular, exceto para poucas células que coraram em vermelho (Figura 2C, H, N, R e U).

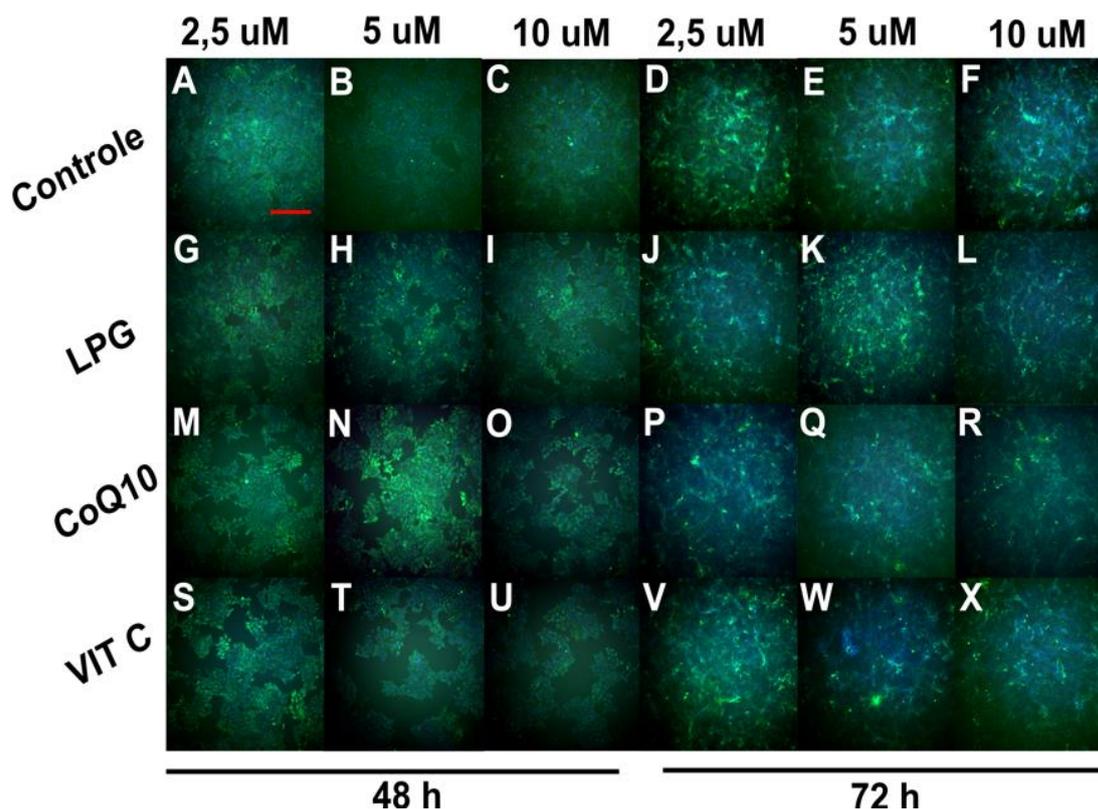


Figura 2. Análise da fluorescência de células Vero coradas com o kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity kit. (A-F) Controle; Células Vero incubadas por 48 e 72 h com diferentes concentrações (G-L) LPG, (M-R) CoQ10 e (S-X) VIT C; barra vermelha = 400 μ m.

Efeito do LEG na função hepática de hamsters hipercolesterolêmicos

Hipercolesterolemia foi induzida em hamsters utilizando uma dieta hipercolesterolêmica desenvolvida por Brito et al. (2019). O efeito causado pela administração oral do LEG a 25 mg/kg e 50 mg/kg nos marcadores sanguíneos de função hepática dos animais foi mensurado. Os resultados (Figura 3) revelam que a dieta hipercolesterolêmica diminuiu significativamente os níveis plasmáticos de GGT em relação ao grupo controle (hamsters não hipercolesterolêmicos). A administração oral do

LEG não preveniu essa diminuição dos níveis de GGT nos animais tratados (Figura 3D). Por outro lado, a administração oral do LEG na concentração de 50 mg/kg aumentou ($p>0,05$) os níveis de proteínas totais (Figura 3A) e albumina (Figura 3B), quando comparado com o grupo controle.

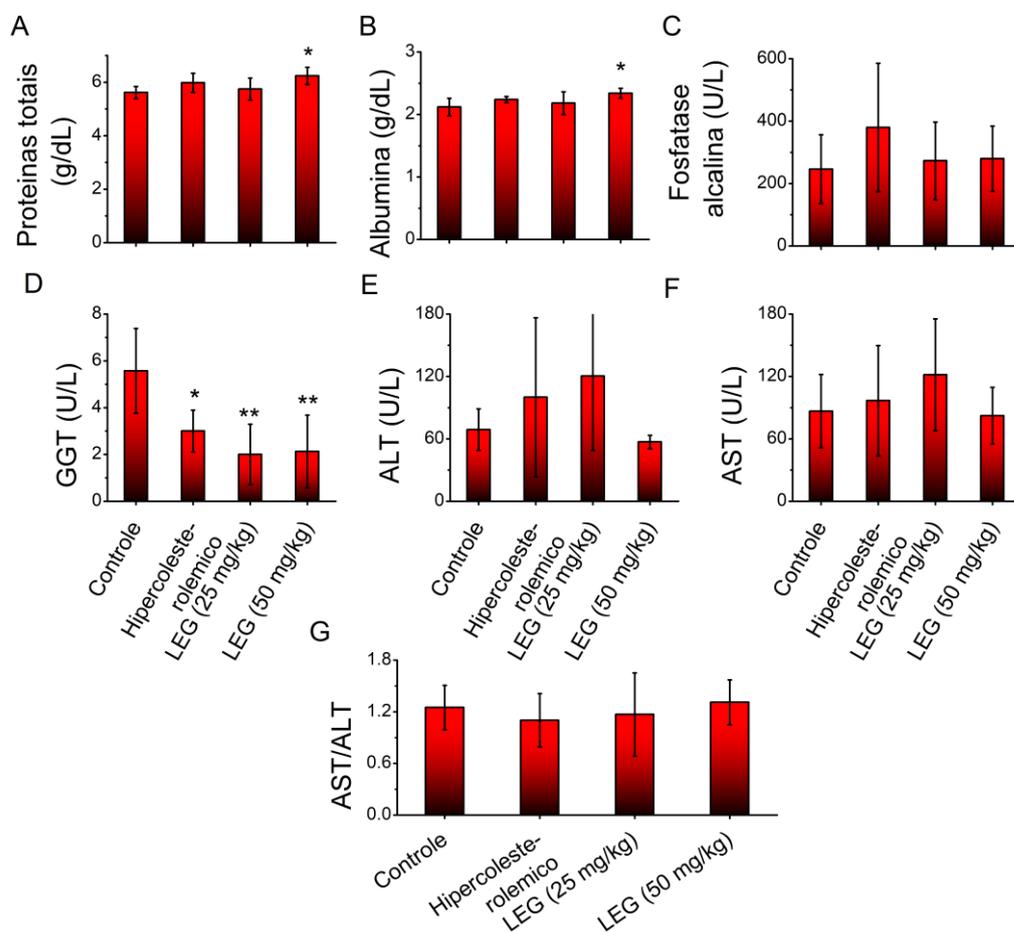


Figura 3. Efeito causado pela administração oral do LEG nos marcadores sanguíneos de função hepática de hamsters hipercolesterolêmicos. Níveis plasmático de A) proteínas totais, B) albumina, C) fosfatase alcalina, D) GGT, E) ALT, F) AST e G) AST/ALT de hamsters hipercolesterolêmicos (induzidos por meio de dieta hipercolesterolêmica) tratados com LEG (25 e 50 mg/kg) durante 28 dias. Colunas representam média \pm desvio padrão; * $p<0,05$ vs grupo controle; ** $p<0,01$ vs grupo controle; $n = 7-9$.

O efeito causado pela administração oral do LEG nas concentrações de 25 mg/kg e 50 mg/kg no peso do fígado dos animais também foi avaliado. O fígado dos animais foi isolado após eutanásia e os resultados indicam um aumento no peso dos órgãos dos animais hipercolesterolêmicos tratados e não tratados com LEG, quando comparado com

o grupo controle (Figura 4A). A razão peso fígado/peso corporal dos animais indicam um resultado similar (Figura 4B)

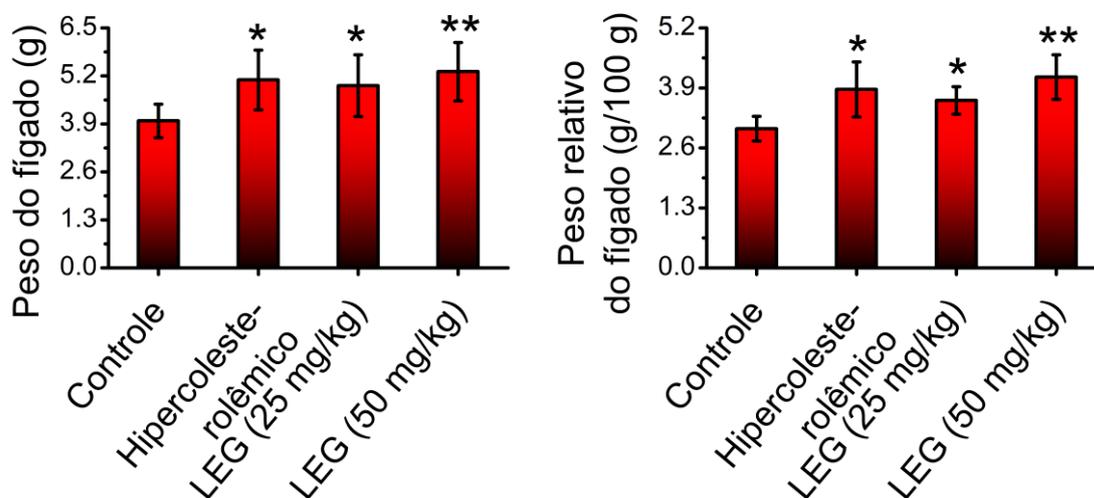


Figura 4. Efeito causado pela administração oral do LEG no peso do fígado de hamsters hipercolesterolêmicos. A) peso do fígado e B) peso relativo do fígado de hamsters controle e hipercolesterolêmicos (induzidos por meio de dieta hipercolesterolêmica) tratados com 25 e 50 mg/kg de LEG durante 28 dias. Colunas representam média \pm desvio padrão; * $p < 0,05$ vs grupo controle; ** $p < 0,01$ vs grupo controle; $n = 7-9$.

As análises histopatológicas indicam que a dieta hipercolesterolêmica induziu hepatonecrose multifocal rodeada por células inflamatórias mononucleares e hiperplasia moderada das células de Kupffer. Adicionalmente, observa-se algumas gotas lipídicas no interior de alguns hepatócitos (esteatose microvesicular). Esses dados são compatíveis com o escore 3 das análises semiquantitativas (Figura 5). A administração oral do LEG nas concentrações de 25 e 50 mg/kg/dia durante 28 dias reduziu significativamente as mudanças hepáticas degenerativas (escore entre 1 e 2). Esses resultados são consistentes com estudos anteriores que demonstraram que o licopeno da goiaba vermelha não causa toxicidade sistêmica aguda em camundongos (Vasconcelos et al., 2021) e apresentam efeitos contra dislipidemia e estresse oxidativo (Brito et al., 2019).

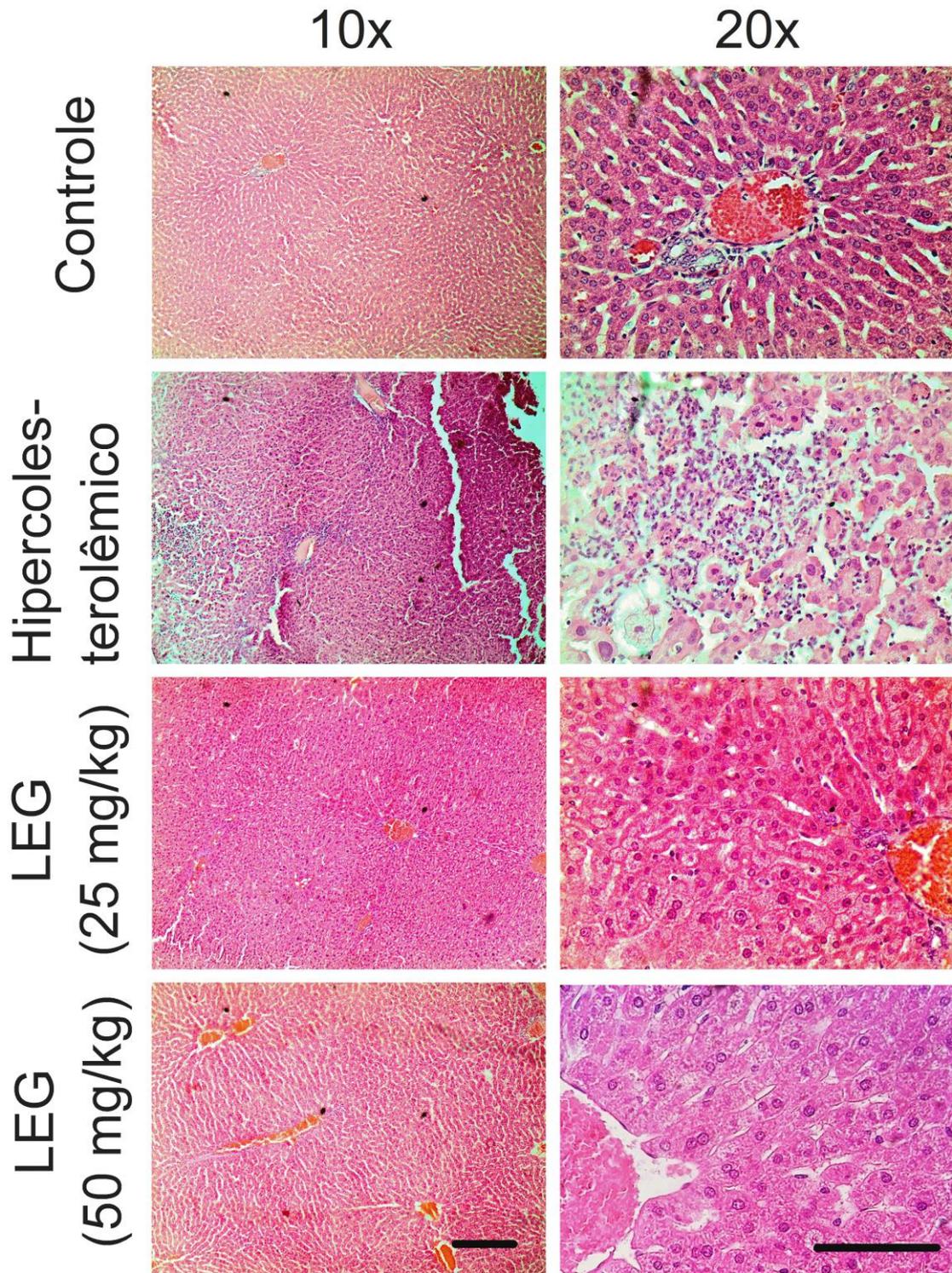


Figura 5. Fotomicrografias do tecido hepático de hamsters controle e hipercolesterolêmicos (induzidos por meio de dieta hipercolesterolêmica) tratados com 25 e 50 mg/kg de LEG durante 28 dias. Coloração de hematoxilina-eosina (H.E.). Barra de escala: 100 μ m

Estabilidade termodinâmica da nanoLPG

A nanoLPG foi submetida ao estresse físico e sua estabilidade foi avaliada por DLS e inspeção visual. Os efeitos do estresse térmico no tamanho, PDI, potencial zeta e nos aspectos macroscópicos do nanoLPG estão demonstrados na Tabela 2. Os resultados indicam que após 15 dias de tratamento foram observados apenas perda de cor (Figura A e C), mudança de textura (líquido leitoso a cremoso) e separação de fase após centrifugação, sem interferência no tamanho da nanoLPG (Figura 6B e D).

Tabela 2. Efeito do estresse térmico no tamanho, PDI, potencial zeta e nos aspectos macroscópicos da nanoLPG.

Parâmetros	Sem estresse (dia 0)	Sem estresse (60 dias)	Estresse térmico (30 dias)
Tamanho (nm)	258,60 ± 4,65	263,00 ± 5,76	243,30 ± 3,51
PDI	0,22 ± 0,00	0,23 ± 0,01	0,19 ± 0,02
Potencial zeta (mV)	-39.20 ± 1.46	-34.10 ± 1.27	- 37,60 ± 1,27
Aspectos macroscópicos	Líquido alaranjado intenso, turvo, leitoso, homogêneo	Líquido de cor laranja intenso, turvo, leitoso homogêneo	Cor mais fraca, turva, cremosa, separação de fases

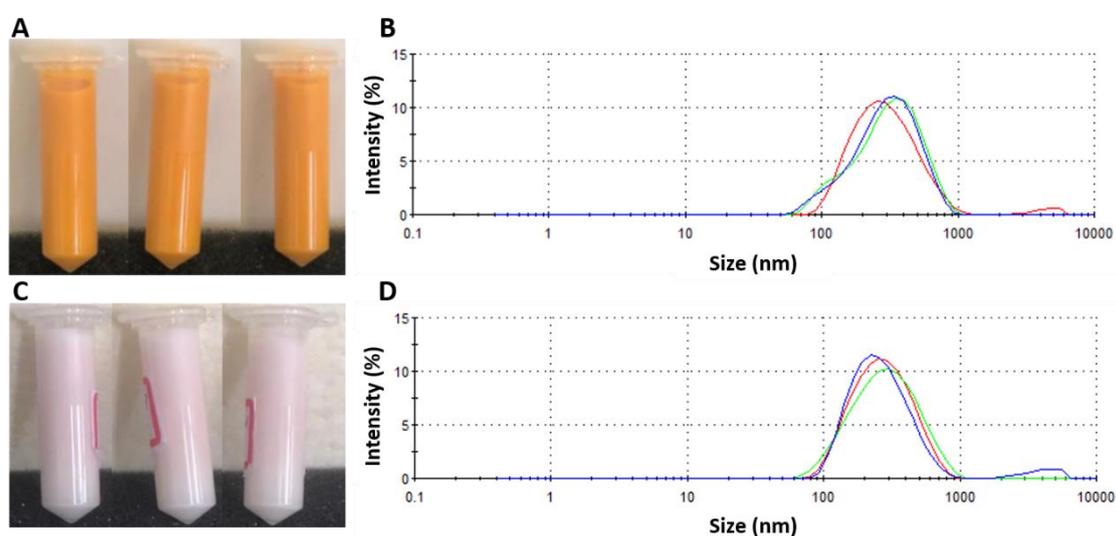


Figura 6. Estabilidade termodinâmica da nanoLPG. Aspectos macroscópicos da nanoLPG e curva distribuição do tamanho das partículas em triplicata antes (A e B) e depois (C e D) do estresse térmico realizado a partir de alternâncias de temperatura (4 e 45 °C) a cada 48 h durante 30 dias.

Efeito da nanoLPG na expressão de genes relacionados a imunidade testado em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de humanos saudáveis

O sangue periférico de doadores saudáveis foi submetido a procedimentos de gradiente de densidade para o isolamento das PBMC. O RNA total das PBMC tratadas e não tratadas com 25 $\mu\text{g/mL}$ de nanoLPG foi extraído e submetido a síntese reversa. O cDNA obtido foi utilizado como *template* em reações de qPCR para quantificar a expressão de genes de interesse utilizando o gene *GAPDH* como normalizador. Os resultados indicam que, enquanto não houve diferença significativa na expressão de *IL-10* (Figura 7A) e *TNF- α* (Figura 7C), as PBMC de doadores saudáveis tratadas com nanoLPG apresentaram uma redução na expressão dos genes que codificam *INF- γ* (Figura 7B) e um aumento na expressão de *COX-2* (Figura 7D).

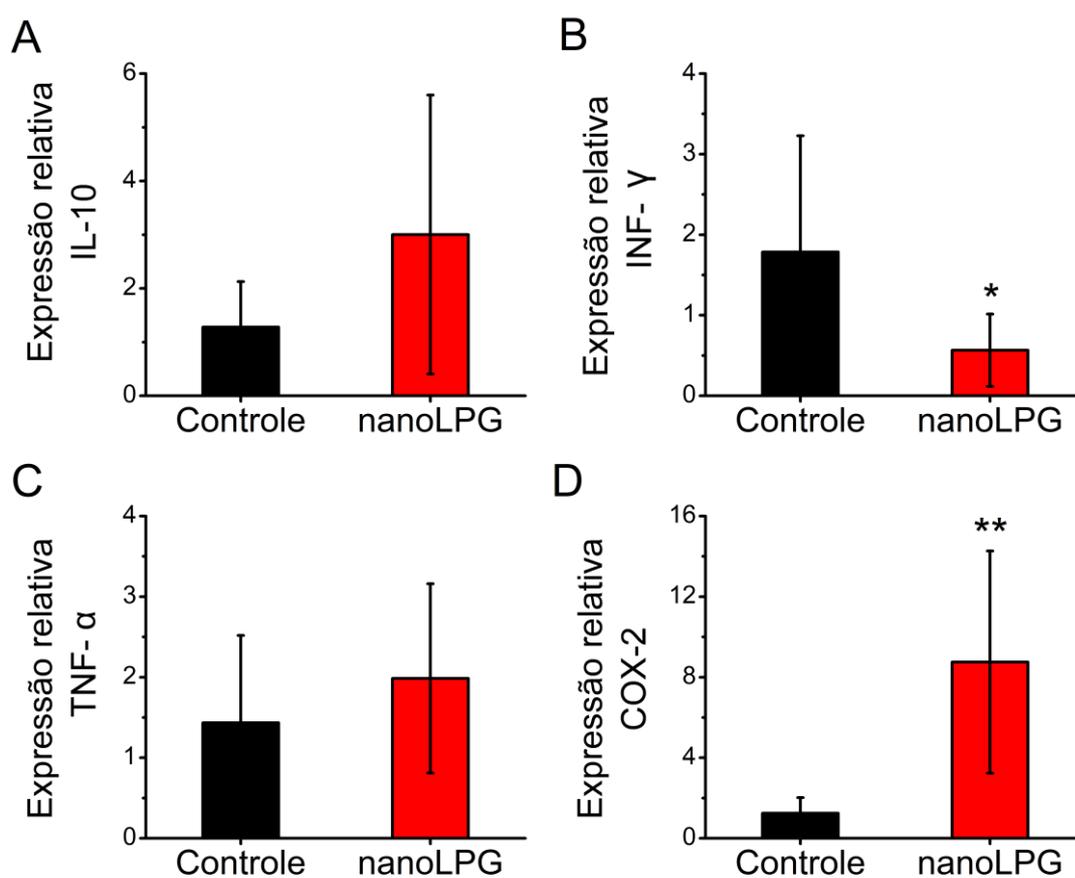


Figura 7. Efeito da nanoLPG na expressão de genes relacionados à imunidade testado em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de humanos saudáveis. Expressão relativa dos genes A) *IL-10*, B) *INF- γ* , C) *TNF- α* e D) *COX-2* em PBMC tratadas com nanoLPG (25 $\mu\text{g/mL}$), comparada com a de células não tratadas. Colunas representam média \pm desvio padrão; * $p < 0,05$ vs grupo controle; ** $p < 0,005$ vs grupo controle; $n = 3$.

Efeito citotóxico e antioxidante do LPG e da nanoLPG em queratinócitos humanos

O efeito citotóxico do LPG e da nanoLPG em diferentes concentrações foi testado em células HaCaT empregando o ensaio de MTT. Os resultados indicam uma redução de $17,9 \pm 9,7 \%$ e $25,8 \pm 4,3 \%$ na viabilidade dos queratinócitos quando as menores concentrações do LPG e da nanoLPG foram testados ($1,25 \mu\text{g/mL}$), respectivamente (Figura 8A). No entanto, observa-se que, mesmo quando os testes foram realizados empregando a concentração de $10 \mu\text{g/mL}$, não foi observada uma redução mais acentuada na viabilidade celular, de maneira que os valores de redução obtidos foram $23,5 \pm 3,2 \%$ e $28,7 \pm 6,9 \%$ para LPG e a nanoLPG, respectivamente.

A habilidade do LPG da nanoLPG em eliminar ROS intracelular induzido por H_2O_2 foi testada nas células HaCaT. Os resultados indicam que na concentração de $10 \mu\text{g/mL}$, ambas as formulações, LPG e nanoLPG, inibiram a formação de ROS, de maneira que não houve diferença significativa quando comparadas aos valores de ROS presentes no controle negativo (Figura 8B).

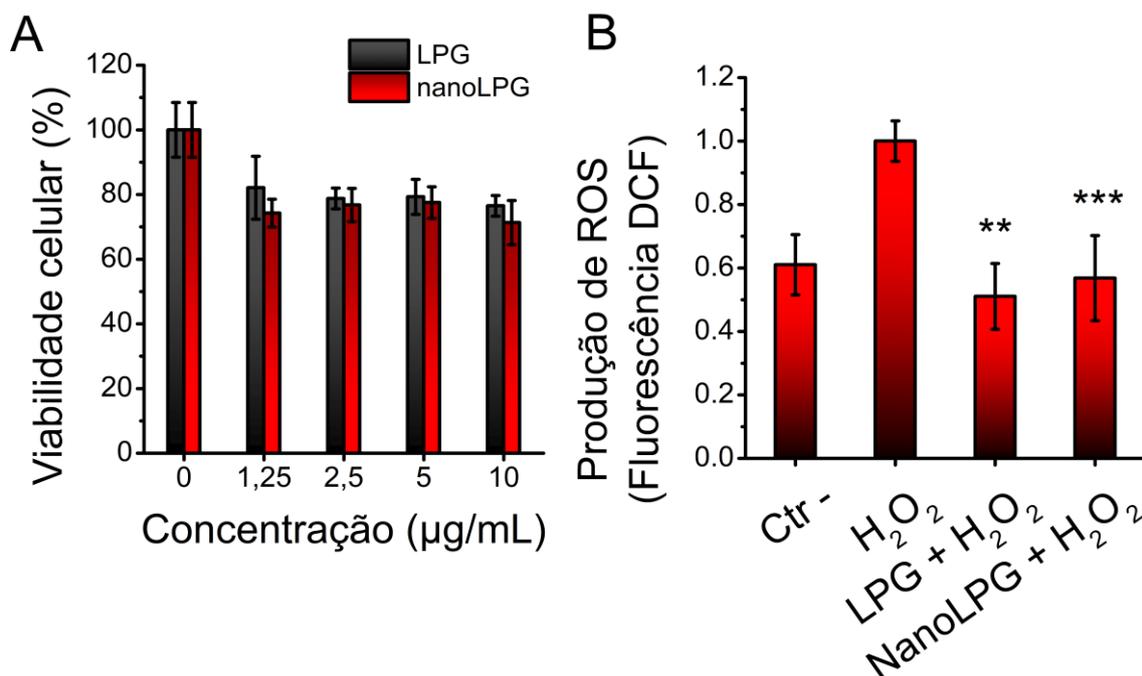


Figura 8. Efeito do LPG e da nanoLPG em células HaCaT. A) Viabilidade celular após 24 h de incubação; B) Atividade de eliminação de ROS após estimulação utilizando H_2O_2 $300 \mu\text{M}$ durante 30 min. Colunas representam média \pm desvio padrão; ** $p < 0,01$ vs grupo H_2O_2 ; *** $p < 0,001$ vs grupo H_2O_2 ; $n = 5-6$.

Efeito antioxidante vascular do LPG e da nanoLPG na disfunção endotelial induzida por pirogalol em aorta isolada de rato

As atividades antioxidantes do LPG e do nanoLPG foram testadas em anéis aórticos com endotélio intacto incubados com o gerador de superóxido pirogalol. Na presença de pirogalol, a resposta vaso-relaxante induzida por ACh foi marcadamente abolida. Por outro lado, a pré-incubação com N-acetilcisteína foi capaz de inibir parcialmente a disfunção endotelial induzida pelo pirogalol. Em outro conjunto de experimentos, a pré-incubação do LPG a 100 µg/mL foi capaz de induzir proteção vascular completa contra os efeitos do pirogalol, enquanto concentrações de 10 e 30 µg/mL promoveram proteção parcial semelhante à observada para N-acetilcisteína. Além disso, a nanoLPG foi capaz de promover proteção vascular semelhante à N-acetilcisteína apenas na concentração de 30 µg/mL, e somente na concentração mais alta de ACh para a concentração de 10 µg/mL. Nenhum efeito foi observado quando a nanoLPG foi testada na concentração de 100 µg/mL.

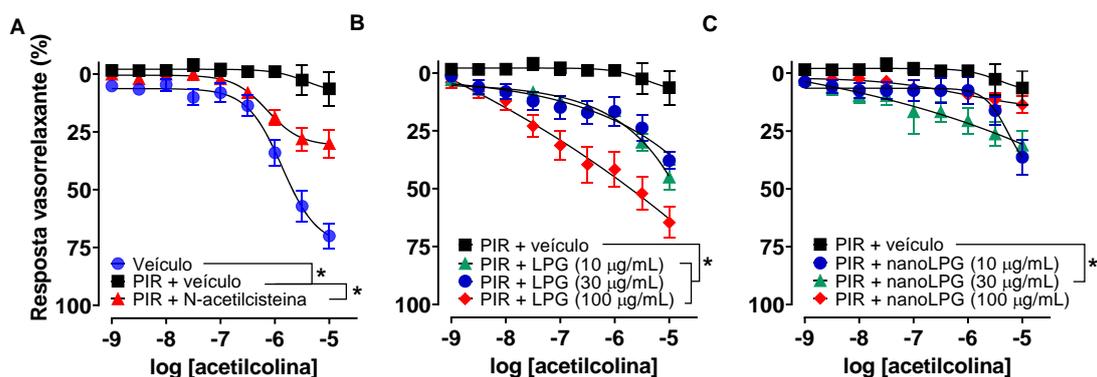


Figura 9. Efeito antioxidante do LPG e da nanoLPG na disfunção endotelial induzida por pirogalol em aorta torácica de ratos. A) Curvas de concentração-resposta para ACh na presença de veículo, pirogalol (PYR, 3×10^{-5} M) e N-acetilcisteína (3×10^{-5} M) seguido de PYR. Efeitos de LPG B) ou nanoLPG C) seguido de PYR em curvas de concentração-resposta induzidas por ACh. Os pontos representam a média \pm SEM; ** $p < 0,05$ vs veículo; $n = 6-7$.

DISCUSSÃO

Nesse trabalho, foram realizados experimentos para avaliar o papel do licopeno contido nas formulações LEG, LPG e nanoLPG quando testado em modelos de inflamação e estresse oxidativo envolvendo ensaios *in vivo* e *in vitro*. A produção das

formulações foi realizada como esperado, de maneira que o LEG e o LPG exibiram bandas de absorção máximas nos valores que correspondem à presença do licopeno nos extratos (Vasconcelos et al., 2020, 2021). A quantificação dos equivalentes de licopeno nos extratos, realizada espectrofotometricamente em 472 nm, retornou resultados equivalentes àqueles já descritos, o que indica que os experimentos de extração foram realizados com sucesso (Vasconcelos et al., 2020, 2021).

Nos testes de estabilidade termodinâmica realizados com a nanoLPG é possível observar que houve perda de cor, mudança de textura e separação de fase após centrifugação. Apesar de a perda de cor poder estar relacionada à degradação do licopeno, isso ocorreu após submeter a formulação ao estresse térmico (45 °C) durante 15 dias. Assim, o licopeno presente na formulação permaneceu estável durante 14 dias, ao passo que a literatura aponta que o licopeno não encapsulado degrada após 12 h de incubação a 50 °C (Lee and Chen, 2002). O aspecto cremoso observado pode estar relacionado à perda de água por evaporação, o que levaria a um aumento da concentração dos surfactantes presentes na formulação. Já a separação de fase é geralmente causada por processos como agregação, formação de nata, coalescência e floculação (Klang and Valenta, 2011). No entanto, a ocorrência de tais processos não foi evidenciada a partir dos resultados obtidos nos ensaios de DLS. Adicionalmente, a homogeneidade das amostras que apresentaram separação de fase foi prontamente restaurada após poucos segundos de agitação. Assim, de maneira geral, a nanoLPG demonstrou ser estável durante os testes, corroborando o potencial da formulação em aumentar a estabilidade do licopeno (Vasconcelos et al., 2021).

O uso do licopeno tem demonstrado ser seguro para humanos e outros animais, mesmo em doses elevadas (Medicine, 2000; Micronutrients, 2001). No entanto, a formulação contendo o licopeno purificado da goiaba vermelha (LPG) apresentou, durante os experimentos realizados no presente trabalho, toxicidade em doses relativamente baixas quando testada em queratinócitos (células HaCaT). Apesar da diminuição da viabilidade celular ter sido de aproximadamente 20 %, observa-se nos resultados que esse valor permaneceu constante quando concentrações maiores do LPG foram testadas. Além disso, a utilização de uma linhagem celular primária pode ter influenciado nos resultados, uma vez que a viabilidade das células Vero não foi afetada pela presença do LPG. Apesar de o tratamento com LEG não ter sido capaz de reverter os efeitos causados pela administração da dieta hipercolesterolêmica nos hamsters, esse

experimento indica que a formulação apresenta baixa toxicidade, uma vez que os animais tratados durante 28 dias não apresentaram dano hepático. Ainda que tenham sido observadas alterações no peso do fígado, nas proteínas totais e albumina plasmáticas nos hamsters tratados com a dose de 50 mg/kg durante os 28 dias, essas alterações por si só não indicam função hepática prejudicada. Adicionalmente, não foram observadas alterações nos níveis plasmáticos da fosfatase alcalina, ALT e AST, marcadores sanguíneos de função hepática, mesmo quando o LEG foi testado na dose mais alta. Por outro lado, Lee et al. (2015) reportaram que hamsters hipercolesterolêmicos tratados com suco de tomate processado de um produto comercializado (Kagome Ltd.) apresentaram uma diminuição no peso do fígado e nos níveis plasmáticos de AST e ALT, assim como, uma redução do acúmulo de triglicerídeos e colesterol nos hepatócitos. Provavelmente, a discrepância observada entre os resultados apresentados aqui e os observados por Lee et al. (2015) pode ser explicada, ao menos em parte, pela via de administração escolhida e pela duração do experimento. Enquanto aqui o LEG foi administrado por via oral durante 28 dias, os outros autores optaram pela administração oral via gavagem durante 42 dias. Assim, a execução dos experimentos cujos resultados estão sendo apresentados aqui por um período maior poderia produzir resultados semelhantes, uma vez que o LEG administrado na concentração de 25 mg/kg durante 28 dias é capaz de diminuir os níveis plasmáticos de triglicerídeos e de marcadores de peroxidação lipídica (Brito et al., 2019). Por fim, os resultados apresentados aqui estão de acordo com os achados de Vasconcelos et al. (2021) os quais demonstraram que o LPG e nanoLPG não apresentaram toxicidade em camundongos Swiss tratados por via oral com dose de 2000 mg/kg em dose única e 10 mg/kg durante 28 dias, respectivamente.

Em adição ao uso seguro, diversos estudos têm demonstrado um efeito protetivo do licopeno contra células tumorais, provavelmente por interromper a proliferação celular e/ou reduzir a apoptose (Marzocco et al., 2021; Nishino et al., 2000), mas agindo de uma maneira célula específica e dependente do tempo (Teodoro et al., 2012). De fato, o LEG foi capaz de diminuir a proliferação de células do adenocarcinoma de mama humano (células MCF-7) induzindo a parada do ciclo celular, modificações no potencial da membrana mitocondrial, fragmentação de DNA, e modificações morfológicas relacionadas à rugosidade e ao tamanho (dos Santos et al., 2018). Além disso, Vasconcelos et al. (2021) demonstraram que o LPG e a nanoLPG afetaram a viabilidade

de células do adenocarcinoma de próstata humano (DU-145) mesmo quando testados nas concentrações mais baixas (3,125 µg/mL).

No presente estudo, foi demonstrado que a nanoLPG modulou a expressão de genes em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humano induzindo uma diminuição da expressão do gene que codifica *INF-γ* e um aumento da expressão do gene que codifica *COX-2*. Os efeitos imunomoduladores do licopeno nas PBMC de indivíduos saudáveis que não foram submetidas a qualquer estímulo (Bergman et al., 2010; Bessler et al., 2008; Huang et al., 2013) e em diferentes tipos celulares com estado pro inflamatório induzido por LPS, principalmente, têm sido descritos na literatura (Bonvissuto et al., 2011; Cha et al., 2017; Dong et al., 2019; Hazewind et al., 2014; Makon-Sébastien et al., 2014; Marcotorchino et al., 2012; Rafi et al., 2007). No presente trabalho, foram realizados experimentos em células isoladas de doadores saudáveis sem tratamento prévio. Apesar de os efeitos da nanoLPG na expressão de *INF-γ* estar em concordância com a literatura (Bergman et al., 2010; Bessler et al., 2008), células induzidas com LPS e tratadas com licopeno geralmente respondem com uma diminuição da expressão do gene que codifica *COX-2* (Bonvissuto et al., 2011; Dong et al., 2019; Lin et al., 2014). É importante mencionar que uma ampla gama de variações relacionadas ao efeito do licopeno na produção de mediadores inflamatórios tem sido reportada (Bergman et al., 2010; Bessler et al., 2008; Bonvissuto et al., 2011; Cha et al., 2017; Dong et al., 2019; Hazewind et al., 2014; Makon-Sébastien et al., 2014; Marcotorchino et al., 2012; Rafi et al., 2007). Embora o aumento observado na expressão de *COX-2* tenha sido surpreendente, é importante destacar que o mecanismo imunomodulador do nanoLPG parece envolver mediadores clássicos da resposta Th1 ao inibir a transcrição do *IFN-γ*, além de aumentar os níveis transcricionais do fator anti-inflamatório *IL-10*. No entanto, o aumento da expressão do gene que codifica *COX-2* em PBMC não tratadas promovido pela nanoLPG necessita de estudos mais aprofundados, incluindo testes realizados com diferentes concentrações, uma vez que, estudos demonstram que o licopeno é capaz de induzir um estado anti-inflamatório ou pro inflamatório em células do adenocarcinoma colorretal humano (células CaCo-2) dependendo da concentração testada (Makon-Sébastien et al., 2014).

As atividades antioxidantes do LPG e da nanoLPG avaliadas por meio dos ensaios de eliminação de radicais ABTS e de sequestro de radicais livres DPPH, respectivamente, foram determinadas previamente (Adriany et al., 2020; Vasconcelos et al., 2021). No

presente trabalho, o LPG e a nanoLPG também apresentaram atividade antioxidante potente, prevenindo a formação de ROS intracelular em queratinócitos estimulados com H₂O₂. É estabelecido na literatura que ROS induz apoptose (Baba et al., 1996; Henseleit et al., 1996; Kannan and Jain, 2000) e que antioxidantes podem interromper a apoptose em queratinócitos induzidos com H₂O₂ (Chang et al., 2003). De fato, os efeitos protetores do licopeno em células da pele têm sido reportados (Ascenso et al., 2014; P Chen et al., 2018; Chernyshova et al., 2019; Cooperstone et al., 2017; Koul et al., 2020). Assim, as formulações testadas, principalmente a nanoLPG, devido sua estabilidade, apresenta alto potencial para uso como produto de proteção para a pele.

Os efeitos benéficos do licopeno no sistema cardiovascular têm sido bastante reportados. Uma diminuição da mortalidade relacionada a doenças coronarianas e cerebrovasculares, assim como aterosclerose e insuficiência cardíaca congestiva tem sido associadas com uma suplementação baseada em licopeno (Cheng et al., 2019; Li et al., 2021). Nesse contexto, o licopeno tem sido apontado com um vasoprotetor, promovendo uma melhora da função endotelial e uma redução das placas ateroscleróticas e da demência vascular. Mecanismos antioxidantes e anti-inflamatórios subjacentes a esses efeitos endoteliais protetores foram demonstrados (Duan et al., 2021; Mozos et al., 2018; Zhu et al., 2020). No presente estudo, o LPG foi capaz de promover um efeito vasoprotetor acentuado que resultou na melhora do efeito vasorrelaxante induzido pela acetilcolina em preparações aórticas com disfunção endotelial oxidativa induzida por pirogalol. Embora a nanoLPG tenha apresentado um efeito menor quando comparado ao LPG, esse efeito foi ainda semelhante ao da N-acetilcisteína, um conhecido doador antioxidante de sulfidrilas. Nesse sentido, tanto o LPG quanto o nanoLPG foram capazes de promover efeito vasoprotetor contra o dano endotelial oxidativo.

Conclusão

Embora, o LEG não tenha sido capaz de melhorar os marcadores sanguíneos de função hepática dos hamsters hipercolesterolêmicos, ele mostrou-se seguro para uso, uma vez que não causou danos hepáticos nos animais, assim como, o LPG, que não apresentou citotoxicidade quando incubado com células Vero. A nanoLPG apresentou estabilidade termodinâmica, sendo eficiente na sua função de estabilizar o licopeno encapsulado e permitir que esse licopeno mantenha suas propriedades físico-químicas responsáveis pelas atividades biológicas já conhecidas, seja por meio da modulação do sistema imunológico, demonstrado pela capacidade de alterar os níveis de expressão dos genes que

codificam *INF-γ* e *COX-2*; seja por meio da atividade antioxidante, evidenciada pela capacidade da nanoLPG em inibir a formação de ROS intracelular quando queratinócitos são induzidos com H₂O₂. Dessa maneira, os resultados apresentados aqui corroboram para o uso seguro do licopeno em humanos e animais. Os efeitos vasoprotetores do LPG e da nanoLPG nas preparações aórticas na presença de um gerador de superóxido possivelmente pressupõe seus mecanismos antioxidantes. As formulações testadas, em especial a nanoLPG, devido sua capacidade de estabilizar o licopeno, aliada a sua baixa citotoxicidade quando comparada com o LPG, se destacam como ferramentas biosseguras e promissoras para o tratamento de doenças que possuem em sua etiopatologia o estresse oxidativo e a inflamação, incluindo o tratamento de doenças cardiovasculares e outras disfunções relacionadas ao endotélio.

Referências

Adriany A, Jéssica S, Ana O, et al. (2020) Anti-inflammatory and antioxidant activity improvement of lycopene from guava on nanoemulsifying system.

<https://doi.org/10.1080/01932691.2020.1728300> 42(5). Taylor & Francis: 760–770. DOI: 10.1080/01932691.2020.1728300.

Amorim, A. G. N.; Leite, J. R. S. A.; Ropke CD (2016) *Obtenção de extrato rico em licopeno e licopeno puro de fonte natural*.

Amorim AGN, Souza JMT, Santos RC, et al. (2018) HPLC-DAD, ESI-MS/MS, and NMR of Lycopene Isolated From *P. guajava* L. and Its Biotechnological Applications. *European Journal of Lipid Science and Technology* 120(3). Wiley-VCH Verlag: 1700330. DOI: 10.1002/ejlt.201700330.

Arcanjo DDR, Vasconcelos AG, Comerma-Steffensen SG, et al. (2015) A Novel Vasoactive Proline-Rich Oligopeptide from the Skin Secretion of the Frog *Brachycephalus ephippium*. *PLOS ONE* 10(12). Public Library of Science: e0145071. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0145071.

Ascenso A, Ribeiro H, Marques HC, et al. (2014) Chemoprevention of photocarcinogenesis by lycopene. *Experimental dermatology* 23(12). *Exp Dermatol*: 874–878. DOI: 10.1111/EXD.12491.

Azeem A, Rizwan M, Ahmad FJ, et al. (2009) Nanoemulsion Components Screening and Selection: a Technical Note. *AAPS PharmSciTech* 2009 10:1 10(1). Springer:

- 69–76. DOI: 10.1208/S12249-008-9178-X.
- Baba T, Hanada K and Hashimoto I (1996) The study of ultraviolet B-induced apoptosis in cultured mouse keratinocytes and in mouse skin. *Journal of dermatological science* 12(1). *J Dermatol Sci*: 18–23. DOI: 10.1016/0923-1811(95)00452-1.
- Bangshaab M, Gutierrez A, Huynh KD, et al. (2019) Different mechanisms involved in liraglutide and glucagon-like peptide-1 vasodilatation in rat mesenteric small arteries. *British Journal of Pharmacology* 176(3). Wiley-Blackwell: 386. DOI: 10.1111/BPH.14534.
- Bergman M, Djaldetti M, Salman H, et al. (2010) On the combined effect of statins and lycopene on cytokine production by human peripheral blood cells. *Heart and vessels* 25(5). *Heart Vessels*: 426–431. DOI: 10.1007/S00380-009-1204-8.
- Bessler H, Salman H, Bergman M, et al. (2008) In vitro effect of lycopene on cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunological Investigations* 37(3): 183–190. DOI: 10.1080/08820130801967809.
- Bonvissuto G, Minutoli L, Morgia G, et al. (2011) Effect of *Serenoa repens*, lycopene, and selenium on proinflammatory phenotype activation: an in vitro and in vivo comparison study. *Urology* 77(1). *Urology*: 248.e9-248.e16. DOI: 10.1016/J.UROLOGY.2010.07.514.
- Brito AK da S, Lima G de M, de Farias LM, et al. (2019) Lycopene-rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) decreases plasma triglycerides and improves oxidative stress biomarkers on experimentally-induced dyslipidemia in hamsters. *Nutrients* 11(2). MDPI AG: 393. DOI: 10.3390/nu11020393.
- Carvalho GC, Sábio RM and Chorilli M (2021) An Overview of Properties and Analytical Methods for Lycopene in Organic Nanocarriers. *Critical reviews in analytical chemistry* 51(7). *Crit Rev Anal Chem*: 674–686. DOI: 10.1080/10408347.2020.1763774.
- Cha JH, Kim WK, Ha AW, et al. (2017) Anti-inflammatory effect of lycopene in SW480 human colorectal cancer cells. *Nutrition research and practice* 11(2). *Nutr Res Pract*: 90–96. DOI: 10.4162/NRP.2017.11.2.90.
- Chang H, Oehrl W, Elsner P, et al. (2003) The role of H₂O₂ as a mediator of UVB-

- induced apoptosis in keratinocytes. *Free radical research* 37(6). Free Radic Res: 655–663. DOI: 10.1080/1071576031000094907.
- Chen P, Xu S and Qu J (2018) Lycopene Protects Keratinocytes Against UVB Radiation-Induced Carcinogenesis via Negative Regulation of FOXO3a Through the mTORC2/AKT Signaling Pathway. *Journal of cellular biochemistry* 119(1). J Cell Biochem: 366–377. DOI: 10.1002/JCB.26189.
- Cheng HM, Koutsidis G, Lodge JK, et al. (2019) Lycopene and tomato and risk of cardiovascular diseases: A systematic review and meta-analysis of epidemiological evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59(1). Taylor and Francis Inc.: 141–158. DOI: 10.1080/10408398.2017.1362630.
- Chernyshova MP, Pristenskiy D V., Lozbiakova M V., et al. (2019) Systemic and skin-targeting beneficial effects of lycopene-enriched ice cream: A pilot study. *Journal of dairy science* 102(1). J Dairy Sci: 14–25. DOI: 10.3168/JDS.2018-15282.
- Colle IJP, Lemmens L, Van Buggenhout S, et al. (2013) Processing tomato pulp in the presence of lipids: The impact on lycopene bioaccessibility. *Food Research International* 51(1): 32–38. DOI: 10.1016/j.foodres.2012.11.024.
- Cooperstone JL, Tober KL, Riedl KM, et al. (2017) Tomatoes protect against development of UV-induced keratinocyte carcinoma via metabolomic alterations. *Scientific reports* 7(1). Sci Rep. DOI: 10.1038/S41598-017-05568-7.
- Davies KJ (1995) Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society symposium* 61. Biochem Soc Symp: 1–31. DOI: 10.1042/BSS0610001.
- De Ritis, Fernando; Mallucci Livio; Coltorti, Mario; Giusti, Giuseppe; Caldera M (1959) ANICTERIC VIRUS HEPATITIS IN A CLOSED ENVIRONMENT AS SHOWN BY SERUM TRANSAMINASE ACTIVITY. In: *Institute of Medical Pathology and Clinical Methodology, University of Naples, Italy*, pp. 589–602.
- Di Mascio P, Kaiser S and Sies H (1989) Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 274(2): 532–538. DOI: 10.1016/0003-9861(89)90467-0.
- Dong J, Li W, Cheng L-M, et al. (2019) Lycopene attenuates LPS-induced liver injury by inactivation of NF- κ B/COX-2 signaling. *International Journal of Clinical and*

Experimental Pathology 12(3). e-Century Publishing Corporation: 817.

dos Santos RC, Ombredane AS, Souza JMT, et al. (2018) Lycopene-rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) displays cytotoxic effect against human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 via an apoptotic-like pathway. *Food Research International* 105. Elsevier Ltd: 184–196. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.10.045.

Duan H, Zhang Q, Liu J, et al. (2021) Suppression of apoptosis in vascular endothelial cell, the promising way for natural medicines to treat atherosclerosis. *Pharmacological Research* 168. Academic Press. DOI: 10.1016/J.PHRS.2021.105599.

Ejike DE, Adam MA, Sheu OS, et al. (2018) Lycopene attenuates diabetes-induced oxidative stress in Wistar rats. *Journal of Diabetes and Endocrinology* 9(2). Academic Journals: 11–19. DOI: 10.5897/JDE2018.0118.

El-Raey MA, Ibrahim GE and Eldahshan OA (2013) Lycopene and Lutein; A review for their Chemistry and Medicinal Uses. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2(1). Available at: www.phytojournal.com (accessed 7 April 2020).

Fiedor J and Burda K (2014) Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients* 6(2). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI): 466–88. DOI: 10.3390/nu6020466.

Halliwell B (1996) Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free radical research* 25(1). Free Radic Res: 57–74. DOI: 10.3109/10715769609145656.

Hazewind M, Haenen GRMM, Weseler AR, et al. (2014) Protection against chemotaxis in the anti-inflammatory effect of bioactives from tomato ketchup. *PLoS ONE* 9(12). Public Library of Science: e114387. DOI: 10.1371/journal.pone.0114387.

Hedayati N, Naeini MB, Nezami A, et al. (2019) Protective effect of lycopene against chemical and natural toxins: A review. *BioFactors (Oxford, England)* 45(1). Biofactors: 5–23. DOI: 10.1002/BIOF.1458.

Henseleit U, Rosenbach T and Kolde G (1996) Induction of apoptosis in human HaCaT keratinocytes. *Archives of dermatological research* 288(11). Arch Dermatol Res:

676–683. DOI: 10.1007/BF02505277.

Huang CS, Chuang CH, Lo TF, et al. (2013) Anti-angiogenic effects of lycopene through immunomodulation of cytokine secretion in human peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of nutritional biochemistry* 24(2). J Nutr Biochem: 428–434. DOI: 10.1016/J.JNUTBIO.2012.01.003.

Islamian JP and Mehrali H (2015) Lycopene as A Carotenoid Provides Radioprotectant and Antioxidant Effects by Quenching Radiation-Induced Free Radical Singlet Oxygen: An Overview. *Cell Journal (Yakhteh)* 16(4). Royan Institute: 386. DOI: 10.22074/CELLJ.2015.485.

Kannan K and Jain SK (2000) Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology* 7(3). Pathophysiology: 153–163. DOI: 10.1016/S0928-4680(00)00053-5.

Klang V and Valenta C (2011) Lecithin-based nanoemulsions. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 21(1). Elsevier: 55–76. DOI: 10.1016/S1773-2247(11)50006-1.

Kong KW, Rajab NF, Nagendra Prasad K, et al. (2010) Lycopene-rich fractions derived from pink guava by-product and their potential activity towards hydrogen peroxide-induced cellular and DNA damage. *Food Chemistry* 123(4): 1142–1148. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.05.077.

Koul A, Bansal MP, Aniq A, et al. (2020) Lycopene enriched tomato extract suppresses chemically induced skin tumorigenesis in mice. *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift fur Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition* 90(5–6). Int J Vitam Nutr Res: 493–513. DOI: 10.1024/0300-9831/A000597.

Krinsky NI and Johnson EJ (2005) Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular aspects of medicine* 26(6). Mol Aspects Med: 459–516. DOI: 10.1016/J.MAM.2005.10.001.

Lee LC, Wei L, Huang WC, et al. (2015) Hypolipidemic Effect of Tomato Juice in Hamsters in High Cholesterol Diet-Induced Hyperlipidemia. *Nutrients* 7(12). Nutrients: 10525–10537. DOI: 10.3390/NU7125552.

- Lee MT and Chen BH (2002) Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. *Food Chemistry* 78(4): 425–432. DOI: 10.1016/S0308-8146(02)00146-2.
- Li N, Wu X, Zhuang W, et al. (2021) Tomato and lycopene and multiple health outcomes: Umbrella review. *Food Chemistry* 343. Elsevier Ltd. DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2020.128396.
- Lima Rocha M;, Da JÉ;, Mendes S, et al. (2022) Effects of ω -3 PUFA-Rich Oil Supplementation on Cardiovascular Morphology and Aortic Vascular Reactivity of Adult Male Rats Submitted to an Hypercholesterolemic Diet. *Biology* 11(2). MDPI: 202–202. DOI: 10.3390/BIOLOGY11020202.
- Lin HY, Huang BR, Yeh WL, et al. (2014) Antineuroinflammatory effects of lycopene via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase- α 1/heme oxygenase-1 pathways. *Neurobiology of aging* 35(1). Neurobiol Aging: 191–202. DOI: 10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2013.06.020.
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25(4). Methods: 402–408. DOI: 10.1006/METH.2001.1262.
- Makon-Sébastien N, Francis F, Eric S, et al. (2014) Lycopene Modulates THP1 and Caco2 Cells Inflammatory State through Transcriptional and Nontranscriptional Processes. *Mediators of Inflammation* 2014. Hindawi Limited. DOI: 10.1155/2014/507272.
- Marcotorchino J, Romier B, Gouranton E, et al. (2012) Lycopene attenuates LPS-induced TNF- α secretion in macrophages and inflammatory markers in adipocytes exposed to macrophage-conditioned media. *Molecular Nutrition and Food Research* 56(5): 725–732. DOI: 10.1002/mnfr.201100623.
- Marzocco S, Singla RK and Capasso A (2021) Multifaceted Effects of Lycopene: A Boulevard to the Multitarget-Based Treatment for Cancer. *Molecules (Basel, Switzerland)* 26(17). Molecules. DOI: 10.3390/MOLECULES26175333.
- Medicine I of (2000) Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*. National Academies Press. DOI: 10.17226/9810.

- Micronutrients I of M (US) P on (2001) Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*. National Academies Press (US). DOI: 10.17226/10026.
- Milani A, Basirnejad M, Shahbazi S, et al. (2017) Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. *British journal of pharmacology* 174(11). Br J Pharmacol: 1290–1324. DOI: 10.1111/BPH.13625.
- Mozos I, Stoian D, Caraba A, et al. (2018) Lycopene and Vascular Health. *Frontiers in pharmacology* 9(MAY). Front Pharmacol. DOI: 10.3389/FPHAR.2018.00521.
- Mutsokoti L, Panozzo A, Tongonya J, et al. (2017) Carotenoid stability and lipid oxidation during storage of low-fat carrot and tomato based systems. *LWT - Food Science and Technology* 80. Academic Press: 470–478. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.03.021.
- Nishino H, Tokuda H, Murakoshi M, et al. (2000) Cancer prevention by natural carotenoids. *BioFactors* 13(1–4). John Wiley & Sons, Ltd: 89–94. DOI: 10.1002/BIOF.5520130115.
- Olson JA (1987) Recommended dietary intakes (RDI) of vitamin A in humans1. *Am J Cuin Nut, ' 1987* 45: 704–710.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29(9). Nucleic Acids Res: E45. DOI: 10.1093/NAR/29.9.E45.
- Przybylska S (2020) Lycopene – a bioactive carotenoid offering multiple health benefits: a review. *International Journal of Food Science & Technology* 55(1). John Wiley & Sons, Ltd: 11–32. DOI: 10.1111/IJFS.14260.
- Rafi MM, Yadav PN and Reyes M (2007) Lycopene inhibits LPS-induced proinflammatory mediator inducible nitric oxide synthase in mouse macrophage cells. *Journal of food science* 72(1). J Food Sci: S069–S074. DOI: 10.1111/J.1750-3841.2006.00219.X.

- Rao A V. and Agarwal S (1999) Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: A review. *Nutrition Research* 19(2). Elsevier: 305–323. DOI: 10.1016/S0271-5317(98)00193-6.
- Rein MJ, Renouf M, Cruz-Hernandez C, et al. (2013) Bioavailability of bioactive food compounds: A challenging journey to bioefficacy. *British Journal of Clinical Pharmacology* 75(3): 588–602. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2012.04425.x.
- Riso P, Visioli F, Grande S, et al. (2006) Effect of a tomato-based drink on markers of inflammation, immunomodulation, and oxidative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(7): 2563–2566. DOI: 10.1021/jf053033c.
- Rogers LJ, Shah SP and Goodwin TW (1966) Intracellular localization of mevalonate-activating enzymes in plant cells. *The Biochemical journal* 99(2). Portland Press Ltd: 381–388. DOI: 10.1042/bj0990381.
- Srivastava S and Srivastava AK (2015) Lycopene; chemistry, biosynthesis, metabolism and degradation under various abiotic parameters. *Journal of Food Science and Technology*. Springer India. DOI: 10.1007/s13197-012-0918-2.
- Teodoro AJ, Oliveira FL, Martins NB, et al. (2012) Effect of lycopene on cell viability and cell cycle progression in human cancer cell lines. *Cancer Cell International* 12(1). BioMed Central: 1–9. DOI: 10.1186/1475-2867-12-36/FIGURES/3.
- Vasconcelos AG, Amorim A das GN, dos Santos RC, et al. (2017) Lycopene rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) displays anti-inflammatory and antioxidant profile by reducing suggestive hallmarks of acute inflammatory response in mice. *Food Research International* 99(Pt 2): 959–968. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.01.017.
- Vasconcelos AG, Valim MO, Amorim AGN, et al. (2020) Cytotoxic activity of poly- ϵ -caprolactone lipid-core nanocapsules loaded with lycopene-rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) on breast cancer cells. *Food Research International* 136. Elsevier: 109548. DOI: 10.1016/J.FOODRES.2020.109548.
- Vasconcelos AG, Luisa A, Barros AN, et al. (2021) Promising self-emulsifying drug delivery system loaded with lycopene from red guava (*Psidium guajava* L.): in vivo toxicity, biodistribution and cytotoxicity on DU-145 prostate cancer cells. *Cancer Nanotechnology* 2021 12:1 12(1). BioMed Central: 1–29. DOI:

10.1186/S12645-021-00103-W.

Watzl B, Achim B, Blockhaus M, et al. (2000) Prolonged tomato juice consumption has no effect on cell-mediated immunity of well-nourished elderly men and women. *Journal of Nutrition* 130(7). American Institute of Nutrition: 1719–1723. DOI: 10.1093/jn/130.7.1719.

Zakynthinos G and Varzakas T (2016) Carotenoids: From plants to food industry. *Current Research in Nutrition and Food Science* 4(SpecialIssue1). Enviro Research Publishers: 38–51. DOI: 10.12944/CRNFSJ.4.SPECIAL-ISSUE1.04.

Zhu NW, Yin XL, Lin R, et al. (2020) Possible mechanisms of lycopene amelioration of learning and memory impairment in rats with vascular dementia. *Neural Regeneration Research* 15(2). Wolters Kluwer Medknow Publications: 332–341. DOI: 10.4103/1673-5374.265565.

Anexo I

Oxidative Medicine and Cellular Longevity is a unique peer-reviewed journal that publishes original research and review articles dealing with the cellular and molecular pathophysiological mechanisms of oxidants in health and disease (<https://www.hindawi.com/journals/omcl>).



José R

← BACK DASHBOARD / ARTICLE DETAILS Updated on 2022-07-12 Version 1

Lycopene from red guava (*Psidium guajava*): From hepatoprotective effect to its use as promising self-emulsifying drug delivery system for anti-inflammatory and antioxidant applications SUBMITTED

Maíra Oliveira¹, Andreanne Vasconcelos¹, Amandda Carvalho¹, Robson Slompo², Bruno Sá³, Maria Júlia Gonçalves³, Liz Nayara Moura³, Ana Karolinne Brito⁴, José Vinícius França⁴, Maria do Carmo Martins⁴, Márcia Rizzo⁴, Susana Soares⁵, Verónica Bastos⁵, Felipe Araujo¹, Bassam Mogharbel², Katherine Carvalho², Helena Oliveira⁵, Alexandra Plácido⁶, Daniel Dias Rufino Arcanjo⁷, Eder Barbosa⁸, José Roberto Leite¹ — [Hide Affiliations](#)

University of Brasília, Brasília¹
Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, Curitiba²
Centro Universitário do Distrito Federal, Brasília³
Federal University of Piauí, Teresina⁴
University of Aveiro, Aveiro⁵
University of Porto, Porto⁶
Department of Biophysics and Physiology, Federal University of Piauí⁷
Embrapa⁸

Article Type
Research Article

Journal
Oxidative Medicine and Cellular Longevity

Special Issue CLOSING DATE: 2022-10-13
Characterization of Food Varieties Bioactive Compounds and their Health Promisi...

Lead Guest Editor Unassigned **Guest Editor** Unassigned Submitted on 2022-07-12 (10 hours ago)

Impact Factor: 7.310

Anexo II

Acesse <https://doity.com.br/validar-certificado> para verificar se este certificado é válido. Código de validação: 9MB9MR1P



CERTIFICADO

Certificamos que **MAÍRA BERNARDES ALVES** participou do IV Simpósio Latino-Americano de Biotecnologia (IV SLAB) realizado em Parnaíba-PI, Brasil, durante o período de 11 a 13 de março de 2022, com carga horária de 20 horas.

Parnaíba-PI, 14 de março de 2022.

Dra. Durcilene Alves da Silva
Coordenadora do CBAB/CABBIO
2022 BR 02

Dr. José Roberto S. A. Leite
Presidente da Comissão Científica
do IV SLAB

ORGANIZAÇÃO



Anexo III

Acesse <https://doi.org/10.21969/doi.2022.11R01Z-A> para verificar se este certificado é válido. Código de validação: 11R01Z-A



Certificamos que o trabalho intitulado **Licopeno de goiaba vermelha (Psidium guajava): o uso de um promissor sistema de liberação de drogas autoemulsificante para aplicações anti-inflamatórias e antioxidantes** de autoria de **MAÍRA BERNARDES ALVES, ANDREANNE GOMES VASCONCELOS, AMANDDA ÉVELIN SILVA DE CARVALHO BRUNO SILVA SÁ, BRUNO SILVA SÁ, MARIA JÚLIA LIMA GONÇALVES, LIZ NAYARA RIBEIRO DA COSTA LIMA MOURA, FELIPE SALDANHA ARAÚJO, EDER ALVES BARBOSA, JOSÉ ROBERTO DE SOUZA DE ALMEIDA LEITE** foi apresentado na modalidade oral no IV Simpósio Latino-Americano de Biotecnologia (IV SLAB) realizado em Parnaíba-PI, Brasil, no período de 11 a 13 de março de 2022.

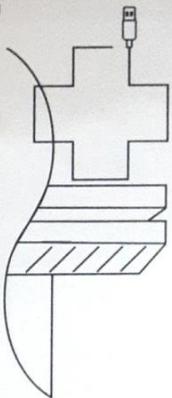
Parnaíba-PI, 14 de março de 2022.

Dra. Durcilene Alves da Silva
Coordenadora do CBAB/CABBIO
2022 BR 02

Dr. José Roberto S. A. Leite
Presidente da Comissão Científica
do IV SLAB

ORGANIZAÇÃO





II Encontro Internacional de Inovação em Saúde do Distrito Federal
Promoção da qualidade de vida através da ciência e tecnologia

CERTIFICAMOS QUE:

Maira Bernardes Alves

Dr. José Roberto S.A. Leite
Coordenador Técnico do II INOVATEC
Sub-Coordenador do NuPMIA

Dra. Selma A. S. Kuckelhaus
Coordenadora Geral do II INOVATEC
Coordenadora do NuPMIA

CERTIFICADO

Participou da Comissão organizadora do “II Encontro Internacional de Inovação em Saúde do Distrito Federal” que ocorreu entre 6 a 8 de março de 2020 organizado pelo Núcleo de Morfologia e Imunologia Aplicada (NuPMIA) da Faculdade de Medicina da UNB em parceria com *Biopropectum*, Lda.
Carga horária: 60 horas.

Brasília, 08 de Março de 2020.

Organização

