



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

ANDREANNE GOMES VASCONCELOS

**DESENVOLVIMENTO DE NANOFORMULAÇÕES CONTENDO LICOPENO
OBTIDO DA GOIABA VERMELHA (*Psidium guajava* L.): AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES ANTICÂNCER E ANTI-INFLAMATÓRIA, BIODISPONIBILIDADE E
TOXICIDADE.**

BRASÍLIA - DF

2021

ANDREANNE GOMES VASCONCELOS

**DESENVOLVIMENTO DE NANOFORMULAÇÕES CONTENDO LICOPENO
OBTIDO DA GOIABA VERMELHA (*Psidium guajava* L.): AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES ANTICÂNCER E ANTI-INFLAMATÓRIA, BIODISPONIBILIDADE E
TOXICIDADE.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas.

Orientador: Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite.

Co-orientadora: Dr^a. Selma Aparecida Souza Kuckelhaus.

BRASÍLIA - DF

2021

GV331d Gomes Vasconcelos, Andreanne
DESENVOLVIMENTO DE NANOFORMULAÇÕES CONTENDO LICOPENO
OBTIDO DA GOIABA VERMELHA (Psidium guajava L.): AVALIAÇÃO
DAS ATIVIDADES ANTICÂNCER E ANTI-INFLAMATÓRIA,
BIODISPONIBILIDADE E TOXICIDADE. / Andreanne Gomes
Vasconcelos; orientador José Roberto de Souza de Almeida
Leite; co-orientador Selma Aparecida Souza Kuckelhaus. --
Brasília, 2021.
143 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Médicas) --
Universidade de Brasília, 2021.

1. Nanotecnologia. 2. Produtos naturais. 3.
Carotenoides. 4. Câncer. 5. Inflamação aguda. I. de Souza de
Almeida Leite, José Roberto, orient. II. Souza Kuckelhaus,
Selma Aparecida, co-orient. III. Título.

ANDREANNE GOMES VASCONCELOS

DESENVOLVIMENTO DE NANOFORMULAÇÕES CONTENDO LICOPENO OBTIDO DA GOIABA VERMELHA (*Psidium guajava* L.): AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTICÂNCER E ANTI-INFLAMATÓRIA, BIODISPONIBILIDADE E TOXICIDADE.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas.

Banca Examinadora

Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite

Universidade de Brasília - UnB

(Presidente)

Dr. Antonio Macho Quirós

Universidade de Brasília – UnB

(Membro interno)

Dra. Maria Manuela Estevez Pintado

Universidade Católica Portuguesa – UCP

(Membro externo)

Dr. Valtencir Zucolotto

Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo – IFSC/USP

(Membro externo)

AGRADECIMENTOS

À Deus, abundante em minha consciência científica, por me fortalecer, guiar e validar todos os meus planos, por me agraciar com saúde e sabedoria nas minhas escolhas.

Ao Professor Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite, por fazer jus à palavra Orientador; por ensinar e promover Ciência com talento, genialidade, criatividade e obstinação e sempre buscar oferecer as condições para alcançar a excelência no trabalho; por propiciar não apenas o meu crescimento profissional, mas também pessoal.

À professora Dra. Selma Aparecida Souza Kückelhaus, pela orientação inicial e co-orientação, pelos ensinamentos e apoio dados.

À toda minha família, em especial à minha mãe Glória, meu pai Edvaldo (*in memoriam*) e meus sobrinhos Adryane e Alysson, pelo amor incomensurável, cuidado, paciência e incentivos desmedidos.

Ao David e seus pais Elisabete e Alberto, pelos incentivos nesse período.

Ao Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada (NuPMIA) da Universidade de Brasília, pelo suporte para execução do trabalho. Agradeço às pessoas que fizeram e fazem o NuPMIA, em especial a Maria da Glória, Wanessa Félix, Daniel Carneiro, Giulliano Rezende, Abimael Nunes, José Brango, Ariane Nogueira, Anderson Dematei, Martina Valim, Maíra Bernardes, Ana Luíza, Jhones Dias, estagiários, que foram colaboradores diretos e indiretos. Meus agradecimentos sobejam a gratidão científico-acadêmica, sou grata pelos vários momentos de amizade e companheirismo compartilhados.

À professora Doralina A. R. Ramos, através do Laboratório de Patologia Molecular do Câncer da Universidade de Brasília, pelos recursos para a realização do trabalho, mas principalmente pelos ensinamentos acadêmicos, pelo acompanhamento, pelo ouvir e pelas palavras de apoio.

À MEDLIG, São Paulo, na pessoa de Jacó Saraiva C. Mattos, pelo suporte financeiro ao projeto.

Aos colaboradores estrangeiros da Biopropectum Lda, Universidade do Porto e Universidade de Lisboa, Portugal, *especially to Dr. Peter Eaton, for the technical support for carrying out important project activities and for his attention.*

A todos do Laboratório de Imunologia Celular - LIC da Faculdade de Medicina/UnB e ao Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos - LTMAC da Faculdade de Ciências da Saúde/UnB, pela atenção e suporte tecnológico para realização de experimentos.

Aos laboratórios do Instituto de Química, na pessoa do professor Dr. Guilherme Dotto Brand, por todo o apoio técnico e material concedido.

Aos demais laboratórios da Faculdade de Ciências da Saúde, da Faculdade de Medicina e do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília que abriram as portas e propiciaram a realização desse trabalho.

À Dra. Adriany Amorim, iniciadora das pesquisas com o licopeno da goiaba vermelha no Piauí, que me recebeu na iniciação científica e vem contribuindo para o avanço das pesquisas até aqui. Grata pela oportunidade em trabalhar no projeto e pela constante contribuição para o meu saber.

Às amigadas de longa data, Raimunda Cardoso, Jéssica Teles e Eryka Andrades, conquistadas através do trabalho com a goiaba no Piauí e perpetuada até então, sempre com muita alegria e cumplicidade.

Aos colegas do UDF Centro Universitário, principalmente à Paula Jaramillo, Renata Feitas, Hélder Gomes e Rossana Almeida por todo o apoio e companheirismo nesse período.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior), pela concessão da bolsa e pelo suporte técnico através do Portal Periódicos.

A todos os professores que compõem o Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília e aos professores de toda a minha jornada acadêmica, que mediaram o conhecimento com idoneidade, fizeram-se exemplos de profissionais, educadores e cidadãos, por isso cheguei aqui e com isso irei mais longe.

Aos livros e artigos, “o mestre que fala mas que não responde”, fonte de meu saber e companheiro a todo instante, que faz-nos “sapatear sobre os ombros de gigantes”.

EPÍGRAFE

O que agora é provado foi uma vez apenas
imaginado.

Willian Blake – Inglês, Poeta e Pintor (1757-1827)

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver e caracterizar nanoformulações contendo licopeno da goiaba vermelha (*Psidium guajava* L.) e avaliar suas atividades biológicas. Para tanto, três formulações foram produzidas: (i) nanocápsula de poli-ε-coprolactona com núcleo lipídico contendo LEG (extrato rico em licopeno da goiaba vermelha), chamada de nanoLEG; (ii) nanoemulsão com polisorbato 80 e monoestearato de sorbitano contendo LPG (licopeno purificado da goiaba vermelha), chamada de nanoLPG; e (iii) nanoemulsão com óleo mineral contendo LPG, chamada de LN. No geral, as nanopartículas foram caracterizadas quanto às propriedades físico-químicas e atividades antioxidante, anticâncer e anti-inflamatória. NanoLEG e nanoLPG apresentaram tamanho médio em torno de 200 nm, potencial zeta negativo e formato esférico. NanoLEG apresentou pouca alteração durante período de armazenamento de 7 meses a 5°C, bem como apresentou atividade citotóxica contra células de câncer de mama humano (MCF-7), inibiu a ativação de NF-κB e a produção de EROs induzidas por LPS em células microgliais e não afetou a integridade da membrana dos eritrócitos do sangue de carneiro. NanoLPG mostrou alterações insignificantes durante os 12 meses de armazenamento a 5°C, exibiu atividade antioxidante e ausência de alterações nos parâmetros clínicos, comportamentais, hematológicos, bioquímicos e histopatológicos em camundongos tratados por via oral a 10 mg/kg por 28 dias. Além disso, nanoLPG entregou com sucesso licopeno ao fígado, rim e próstata, bem como melhorou sua citotoxicidade contra células DU-145, por via independente de necrose e apoptose clássicas. LN apresentou tamanho médio de 167,1 nm e estabilidade térmica à temperatura ambiente, bem como em concentração de licopeno quando armazenada por um ano. LN foi capaz de inibir significativamente a formação do edema de pata em camundongos, com efeito inibitório máximo na dose de 50 mg/kg, tanto por via oral quanto por via intraperitoneal, além de reduzir o infiltrado inflamatório no tecido. Estes dados demonstram que produtos com propriedades físico-químicas e biológicas satisfatórias foram desenvolvidos para aplicação como nutracêuticos baseados em nanotecnologia em prol da saúde humana.

Palavras-chave: carotenoides, produtos naturais, nanobiotecnologia, aplicações biomédicas.

ABSTRACT

The present work aimed to develop and characterize nanoformulations containing lycopene from red guava (*Psidium guajava* L.) and to evaluate their biological activities. For this purpose, three formulations were produced: (i) poly- ϵ -coprolactone nanocapsule with a lipid core containing LEG (lycopene-rich extract from red guava), named nanoLEG; (ii) nanoemulsion with polysorbate 80 and sorbitan monostearate containing LPG (lycopene-purified from red guava), named nanoLPG; and (iii) nanoemulsion with mineral oil containing LPG, named LN. The nanoparticles were characterized for the physicochemical properties and antioxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities. NanoLEG and nanoLPG had an average size around 200 nm, negative zeta potential and spherical shape. NanoLEG showed low variation during a storage period of 7 months at 5°C, as well as showed cytotoxic activity against human breast cancer cells (MCF-7), inhibited LPS-induced NF- κ B activation and ROS production in cells microglial and did not affect the membrane integrity of sheep blood erythrocytes. NanoLPG showed insignificant changes during 12 months of storage at 5°C, exhibited antioxidant activity and no changes in clinical, behavioral, hematological, biochemical and histopathological parameters in mice orally treated at 10 mg/kg for 28 days. Furthermore, nanoLPG successfully delivered lycopene to the liver, kidney and prostate, as well as improved its cytotoxicity against DU-145 cells, through a pathway independent of classical necrosis and apoptosis. LN had an average size of 167.1 nm and thermal stability at room temperature, as well as in lycopene concentration when stored for one year. LN was able to significantly inhibit the formation of paw edema in mice, with a maximum inhibitory effect at a dose of 50 mg/kg, both orally and intraperitoneally, in addition to reducing the inflammatory infiltrate in the tissue. These data demonstrate that products with satisfactory physicochemical and biological properties were developed for application as nutraceuticals based on nanotechnology for the benefit of human health.

Keywords: carotenoids, natural products, nanobiotechnology, biomedical applications.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Espectro UV-Vis de 600 a 300 nm (A) e cromatograma obtido por CLAE-DAD (B) mostrando as similaridades entre o LEG e o padrão de licopeno de tomate (Sigma-Aldrich) diluídos em clorofórmio:etanol (1:20)..... 41
- Figura 2.** Representação conceitual da nanocápsulas de núcleo lipídico com extrato rico em licopeno de goiaba (nanoLEG), mostrando o núcleo oleoso contendo LEG (rosa) e a parede polimérica revestida com polisorbato 80 (A); fotografias representativas das nanocápsulas (B); espectro UV-Vis da nanoLEG 0,3 (C); 1,5 (D) e 3,0 (E) antes e após ruptura com solução de clorofórmio:etanol (1:2). Espectros UV-Vis das nanoLEGs 0,3; 1,5 e 3,0 extraídos das nanocápsulas após 7 meses de armazenamento (F) e do LEG livre nas mesmas condições (G)..... 43
- Figura 3.** Diâmetro hidrodinâmico e distribuição por análise de NTA para a nano vazia (A), nanoLEG 0,3 (B); nanoLEG 1,5 (C) e nanoLEG 3,0 (D). As amostras foram diluídas 50.000 vezes e analisadas na célula de fluxo a 2 µL/minuto com captura de vídeos ao vivo, com 1 minuto de duração cada..... 46
- Figura 4.** Micrografias representativas obtidas por MFA (à esquerda) e MET (à direita) para nanoLEG 0,3 (A e B), nanoLEG 1,5 (C e D) e nanoLEG 3,0 (E e F). Todas as figuras são apresentadas com uma escala de 1 µm. A seta no painel 4C evidencia uma nanopartícula parcialmente ofuscada, conforme discutido no texto..... 48
- Figura 5.** Efeito da nanoLEG 3,0 (A) e do LEG (B) em células de câncer de mama humano (MCF-7) após 24 e 72 horas de exposição. Valores expressos em médias ± EPM. **p<0,01 e ****p<0,0001 *versus* grupo controle (DMEM).... 50
- Figura 6.** Fotomicrografias representativas das células MCF-7 tratadas com DMEM (A), H₂O₂ (B) e nanoLEG 3,0 em uma concentração de 200 µg/mL (C) por 24 horas. As células foram coradas com hematoxilina e eosina e as imagens foram capturadas em aumento de 100x..... 53
- Figura 7.** (A) Inibição da via do NF-κB em células HMC3 tratadas com nanoLEG (200 µg/mL) sob estimulação por LPS (sinais fluorescentes normalizados). Mudanças na intensidade de fluorescência de acordo com o intervalo de tempo são demonstradas para o sensor inibidor da via do NF-κB (n = 7 células). *p<0,001 *versus* grupo LPS. (B) Produção de EROs por células HMC3 tratadas com nanoLEG expressando o biossensor pFRET-HSP33 cys (biossensor HSP) sob estimulação por LPS (doador normalizado/proporções FRET). Medidas de geração de EROs de acordo com o tempo são demonstradas (n = 7-9 células). *p<0,005 *versus* grupo LPS. As imagens abaixo são representativas de células microgliciais humanas expressando o biossensor HSP..... 55

Figura 8. Efeito citotóxico da nanoLEG em eritrócitos de carneiro (A) e micrografias obtidas por Microscopia de Força Atômica para os eritrócitos de carneiro tratados com STF (Controle, B) e nanoLEG (200 µg/mL, C) Os valores estão expressos em média ± EPM. Os pequenos pontos indicados pelas setas correspondem às nanopartículas. STF = salina tamponada com fosfato..... 57

CAPÍTULO II

Figura 1. Espectro UV-Vis de 600–300 nm (A) e cromatograma por CLAE-DAD (B) do LPG e do padrão analítico de licopeno de tomate em uma concentração de 50 µg/mL..... 80

Figura 2. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico por NTA da nanoLPG (A). Fotografia da nanoemulsão e fotomicrografia da nanoLPG (seta) por Microscopia Eletrônica de Transmissão (B). Espectro FTIR-ATR do LPG e da nanoLPG (C). Conteúdo de licopeno na nanoLPG pelo período de 12 meses (D) e espectro UV-Vis do LPG extraído da nanoemulsão e do LPG livre mantidos sob as mesmas condições de armazenamento (E). Dados de média e modo do NTA expressos como média ± EPM. * $p < 0,05$ versus mês 0..... 81

Figura 3. Atividade antioxidante da nanoLPG pelo método do sequestro do radical DPPH comparada ao Trolox. Dados expressos como média ± DP..... 85

Figura 4. Evolução do ganho de peso corporal (A), consumo de alimento e água (B) e peso relativo dos órgãos (C) de camundongos *Swiss* do grupo controle ou tratados oralmente com a nanoLPG a 10 mg/kg por 28 dias. Dados expressos como média ± EPM. N = 9 animais por grupo..... 88

Figura 5. Fotomicrografias representativas das análises histopatológicas de diversos tecidos de camundongos *Swiss* após o tratamento oral com nanoLPG a 10 mg/kg ou com água (controle) por 28 dias. Ampliação de 100x à esquerda (exceto para aorta, cuja ampliação é de 200x) e barra de escala = 200 nm; ampliação de 400x à direita e barra de escala de 50 nm. A seta vermelha indica degeneração hidrópica nos hepatócitos. N = 5 animais por grupo..... 91

Figura 6. Biodistribuição do licopeno avaliada nos tecidos do cérebro, coração, pulmão, fígado, baço, rins e próstata de camundongos *Swiss* após tratamento oral com nanoLPG a 10 mg/kg por 28 dias. Dados expressos como média ± EPM. N = 9 animais por grupo..... 92

Figura 7. Efeito do LPG (A) e da nanoLPG (B) na viabilidade de células de carcinoma de próstata humano (DU-145) após 6, 12, 24, 48 e 72 horas de exposição. (C) Valores de CI_{50} obtidos pelo teste de viabilidade celular para DU-145. (D) Integridade de membrana celular após 24 horas de exposição.

Ver fotomicrografias representativas das células DU-145 tratadas com meio DMEM (E), nanoLPG a 6,89 µg/mL (F) e 200 µg/mL (G) por 24 horas. As células foram coradas com azul de tripan e as imagens foram capturadas em ampliação de 100x. As setas vermelhas indicam células com morfologia sugestiva de morte celular. Dados expressos como média ± EPM. *p<0,01 versus grupo controle DMEM..... 93

Figura 8. Efeito do LPG livre e da nanoLPG nos parâmetros morfológicos das células DU-145 analisadas por citometria de fluxo (20.000 eventos/amostra) após 24 horas de exposição a concentrações de 6,89 e 200 µg/mL. Média geométrica do espalhamento frontal (FSC, A) e espalhamento lateral (SSC, D). Scatter-plot dos grupos DMEM (B), DMSO 20% (C), nanoLPG a 6,89 µg/mL (E), nanoLPG a 200 µg/mL (F), LPG a 6,89 µg/mL (G) e LPG a 200 µg/mL (H)..... 96

Figura 9. Análise por citometria de fluxo (20.000 eventos/amostra) de células DU-145 tratadas com LPG livre e com nanoLPG após 24 horas de exposição a 6,89 e 200 µg/mL utilizando marcação por Anexina-V FITC/Iodeto de propídio. DMEM (A) DMSO 20% (B), nanoLPG a 6,89 µg/mL (C), nanoLPG a 200 µg/mL (D), LPG a 6,89 µg/mL (E) e LPG a 200 µg/mL (F)..... 98

Figura 10. Fotomicrografias de microscopia de fluorescência representativas para as células DU-145 tratadas com meio DMEM (A, B, C), DMSO (D, E, F), LPG a 200 µg/mL (G, H, I), e nanoLPG a 200 µg/mL (J, K, L) por 24 horas. As células foram marcadas com Anexina-V FITC/Iodeto de propídio e as imagens foram capturadas em aumento de 200x. À esquerda: imagens de contraste de fase; no meio: marcação por Anexina-V; à direita: marcação por iodeto de propídio..... 100

Figura 11. Micrografias representativas obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) para as células DU-145 tratadas com meio DMEM (A), LPG a 6,89 µg/mL (B e C) e 200 µg/mL (D), e nanoLPG a 6,89 µg/mL (E, F e G) e 200 µg/mL (H e I) por 24 horas. N = Núcleo. Cabeça de seta azul = microvilosidades, Cabeça de seta vermelha = retículo endoplasmático, seta vermelha = área de digestão, seta verde = área apoptótica, seta azul = foco necrótico e seta laranja = nanoLPG..... 102

CAPÍTULO III

Figura 1. Espectros UV-Vis do licopeno purificado da goiaba (A) e da nanoemulsão de licopeno (B)..... 118

Figura 2. Cromatogramas do padrão de licopeno (A), do licopeno purificado da goiaba – LPG (B) e da nanoemulsão de licopeno – LN (C)..... 119

Figura 3. Regressão linear para o licopeno por UV-Vis (A) e CLAE (B)..... 120

Figura 4. (A) Análise de UV-Vis para a LN. (B) Percentual de perda de licopeno e (C) Análise UV-Vis para o LPG após 1 mês a 8°C.....	121
Figura 5. Análise térmica por TGA/DSC para o licopeno purificado da goiaba (A) e para a nanoemulsão de licopeno (B).....	122
Figura 6. Perfil de distribuição de tamanho para a nanoemulsão de licopeno obtido por DLS.....	123
Figura 7. Difração de raios-X para a nanoemulsão de licopeno, licopeno purificado da goiaba e padrão de licopeno.....	124
Figura 8. Curva padrão de Trolox para o ensaio de sequestro do radical ABTS.....	125
Figura 9. Efeito da nanoemulsão de licopeno de goiaba (25, 50 ou 100 mg/kg) administrada por via oral (A) ou por via intraperitoneal (B), na formação de edema de pata induzido por carragenina, 1, 2, 3 e 4 horas após o estímulo com o agente flogístico. Indometacina (10 mg/kg) foi utilizada como fármaco de referência. Os valores foram expressos em média ± EPM. *p<0,05 versus grupo carragenina. #p<0,05 versus grupo salina. CG = Carragenina; Indo = Indometacina; LPG = Licopeno purificado da goiaba vermelha; LN = Nanoemulsão de licopeno.....	126
Figura 10. Fotomicrografias da pele da planta das patas de camundongos <i>Swiss</i> , representativas para os grupos controle salina (A) e carragenina (B) e para os grupos tratados com indometacina (D), LPG 12,5 mg/kg v.o. (E), LPG 12,5 mg/kg i.p. (F), LN 50 mg/kg v.o. (G) e LN 50 mg/kg i.p. (H). Coloração por HE (aumento de 200x para B e 400x para as demais imagens). Escala: 100 µm e 200 µm para B. Seta amarela: epiderme. Seta verde: derme reticular. Ponta de seta amarela: células inflamatórias; ponta de seta verde: presença de eritrócitos sugestiva de hemorragia.....	127
Figura 11. Número de neutrófilos presentes na derme do tecido obtido das patas dos camundongos. As células foram quantificadas em uma área de 2,25 µm ² dos cortes histológicos dos tecidos dos camundongos <i>Swiss</i> submetidos ao edema de pata induzido por carragenina, 4 horas após a indução da inflamação. Os valores estão expressos como média ± EPM. *p<0,05 versus grupo carragenina (CG).....	128

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Caracterização das nanocápsulas de núcleo lipídico (nanoLEG e nano vazia).....	45
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Caracterização da nanoLPG.....	82
---	----

Tabela 2. Estabilidade coloidal de nanoLPG diluída em meio de cultura de células.....	84
--	----

Tabela 3. Peso corporal e dos órgãos de camundongos <i>Swiss</i> tratados com dose única de LPG (2.000 mg/kg) e observados por 14 dias.....	86
--	----

Tabela 4. Efeito da nanoLPG em parâmetros clínicos e comportamentais de camundongos <i>Swiss</i>	87
---	----

Tabela 5. Efeito da nanoLPG em parâmetros hematológicos de camundongos <i>Swiss</i>	89
--	----

Tabela 6. Efeito de nanoLPG em parâmetros bioquímicos de camundongos <i>Swiss</i>	90
--	----

CAPÍTULO III

Tabela 1. Dados quantitativos para a atividade antioxidante do licopeno purificado da goiaba e da nanoemulsão de licopeno.....	125
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABTS = 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico).
- ALP = Fosfatase alcalina.
- ALT = Alanina aminotransferase.
- ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- AST = Aspartato aminotransferase.
- BAX = *BCL2 Associated X-protein*, regulador de apoptose.
- BCL-2 = *B-cell lymphoma protein 2*.
- BHT = Butil-hidroxitolueno.
- CG = Carragenina.
- CHCM = Concentração de hemoglobina corpuscular média.
- Cl₅₀ = Concentração inibitória média.
- CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
- CONCEA = Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.
- DL₅₀ = Dose letal média.
- DLS = *Dynamic Light Scattering*, espalhamento de luz dinâmico.
- DMEM = *Dubelco's Modified Eagle's Medium*.
- DMSO = Dimetilsulfóxido.
- DNA = *Deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico.
- DP = Desvio-padrão.
- DPPH = 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil.
- DRX = Difração de raio-X.
- DSC = *Differential scanning calorimetry*, calorimetria diferencial de varredura.
- DU-145 = Linhagem de células de câncer de próstata humano.
- EDTA = *Ethylenediamine tetraacetic acid*, ácido etilenodiamino tetra-acético.
- EMAR = Espectrometria de Massas de Alta Resolução.
- EPM = Erro padrão da média.
- EPM = Erro padrão da média.
- EROs = Espécies Reativas de Oxigênio.
- FDA = *Food and Drug Administration*.
- FRET = *Fluorescence Resonance Energy Transfer*.
- FSC = *Forward Scatter*, dispersão frontal da luz.

FTIR-ATR = *Attenuated Total Reflectance - Fourier Transform Infrared*, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier – reflectância total atenuada.

HBSS = *Hanks' Balanced Salt solution*.

Indo = Indometacina.

IP = Iodeto de propídio.

IPD = Índice de polidispersão.

IRF = *Interferon regulatory factor*, fator regulador de interferon.

LEG = Extrato rico em licopeno da goiaba vermelha.

LN = Nanoemulsão de licopeno.

LPG = Licopeno purificado da goiaba vermelha.

LPS = Lipopolissacarídeo

MCF-7 = *Michigan Cancer Foundation-7*, linhagem de células de câncer de mama humano.

MET = Microscopia Eletrônica de Transmissão.

MFA = Microscopia de Força Atômica.

MTT = Brometo de 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2, 5-difenil-2H-tetrazólio.

NanoLEG = Nanocápsulas contendo extrato rico em licopeno da goiaba vermelha.

NanoLPG = Nanoemulsão contendo licopeno purificado da goiaba vermelha.

NF- κ B = Fator nuclear kappa B.

NTA = *Nanoparticle Tracking Analysis*, análise de rastreamento de nanopartículas.

OECD = *Organisation for Economic Co-operation and Development*, Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico.

ORAC = *Oxygen Radical Absorbance Capacity*, capacidade de absorção do radical oxigênio.

PCL = Poli- ϵ -caprolactona.

SEDDS = *Self-Emulsifying Drug Delivery Systems*, sistema autoemulsificante de entrega de drogas.

SFB = Soro fetal bovino.

SSC = *Side Scatter*, dispersão lateral da luz.

STF = Salina tamponada com fosfato.

TEAC = *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*, atividade antioxidante equivalente ao Trolox.

TGA = *Thermogravimetric analysis*, análises de termogravimetria.

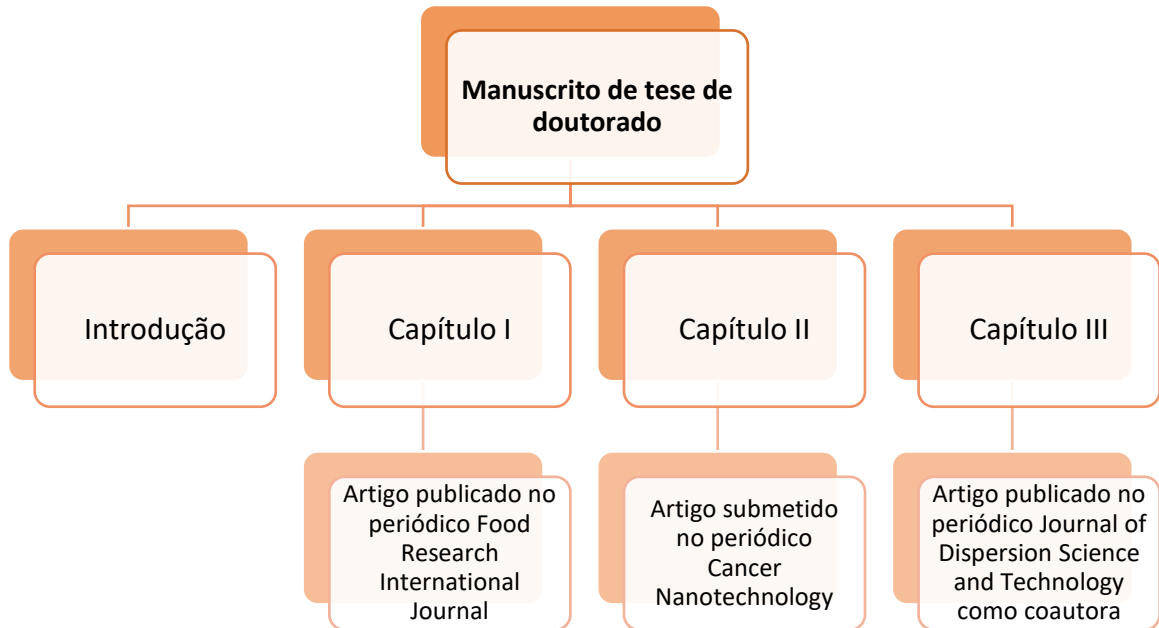
TLR = *Toll like receptors*, receptor tipo *Toll*.

TR = Tempo de retenção.

UV-Vis = Ultravioleta-visível.

VCM = Volume corpuscular médio.

SUMÁRIO ESQUEMÁTICO



SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	22
Referências bibliográficas.....	26

CAPÍTULO I

1. Introdução.....	30
2. Material e métodos.....	32
2.1. Reagentes.....	32
2.2. Produção e caracterização do extrato rico em licopeno de goiaba...	33
2.2.1. Extração e espectrofotometria UV-Visível.....	33
2.2.2. Avaliação do extrato por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR)....	33
2.3. Síntese e caracterização das nanopartículas.....	34
2.3.1. Produção das nanocápsulas com núcleo lipídico.....	34
2.3.2. Medida do potencial de hidrogênio (pH) e da eficiência de encapsulação.....	35
2.3.3. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e potencial zeta.....	35
2.3.4. Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA).....	36
2.3.5. Avaliação da morfologia das partículas por Microscopia de Força Atômica (MFA) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	36
2.4. Estudos biológicos.....	37
2.4.1. Ensaios de viabilidade celular.....	37
2.4.2. Coloração das células MCF-7 por Hematoxilina e Eosina.....	38
2.4.3. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e ativação de fator nuclear kappa-B (NF-κB) por imagem de células vivas utilizando biossensores.....	38
2.4.4. Ensaio de atividade hemolítica.....	39
2.4.5. Microscopia de Força Atômica (MFA) dos eritrócitos.....	39
2.5. Análise estatística.....	40
3. Resultados e discussão.....	40
3.1. Caracterização química do LEG.....	40
3.2. Caracterização da nanoLEG e da nano vazia.....	41
3.3. NanoLEG apresentou toxicidade contra células de câncer de mama.....	50
3.4. A nanoLEG inibiu a ativação de NF-κB e a produção de EROs induzidas por LPS em células da micrógli.....	53
3.5. A nanoLEG não apresentou atividade hemolítica.....	56
4. Conclusão.....	58
Referências bibliográficas.....	59

CAPÍTULO II

1. Introdução.....	67
2. Material e métodos.....	69
2.1. Reagentes.....	69
2.2. Produção do licopeno purificado da goiaba vermelha.....	69

2.3.	Avaliação do extrato de licopeno por espectrofotometria UV-Vis e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	70
2.4.	Síntese e caracterização da nanoemulsão.....	70
2.4.1.	Produção do sistema autoemulsificante de entrega de drogas contendo licopeno purificado da goiaba vermelha (nanoLPG).....	70
2.4.2.	Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e potencial zeta.....	71
2.4.3.	Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA).....	71
2.4.4.	Conteúdo de licopeno.....	72
2.4.5.	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	72
2.4.6.	Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	72
2.4.7.	Estabilidade coloidal da nanoLPG em meio biológico.....	72
2.5.	Avaliação da atividade antioxidante.....	73
2.6.	Estudos <i>in vivo</i>	73
2.6.1.	Animais e comitê de ética.....	73
2.6.2.	Toxicidade em dose única do LPG.....	74
2.6.3.	Toxicidade em doses repetidas da nanoLPG.....	74
2.6.3.1	Análise clínica e comportamental.....	74
2.6.3.2	Parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	75
2.6.3.3	Biodistribuição.....	75
2.6.3.4	Análise histopatológica.....	76
2.7.	Citotoxicidade <i>in vitro</i>	76
2.7.1.	Ensaio de viabilidade celular.....	76
2.7.2.	Ensaio de integridade de membrana celular.....	77
2.7.3.	Análises de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência.....	77
2.7.4.	Análise ultraestrutural das células cancerosas.....	77
2.8.	Análise estatística.....	78
3.	Resultados e discussão.....	79
3.1.	Caracterização do LPG e da nanoLPG.....	79
3.2.	Avaliação da atividade antioxidante.....	84
3.3.	Toxicidade do LPG e da nanoLPG <i>in vivo</i>	85
3.4.	Análise histopatológica.....	90
3.5.	Distribuição tecidual de licopeno.....	91
3.6.	Efeito citotóxico em células de câncer de próstata.....	93
4.	Conclusão.....	102
	Referências bibliográficas.....	104

CAPÍTULO III

1.	Introdução.....	111
2.	Material e métodos.....	112
2.1.	Materiais.....	112
2.2.	Animais.....	112
2.3.	Isolamento do licopeno.....	112
2.4.	Preparo da Nanoemulsão de Licopeno (LN).....	113
2.5.	Espectrofotometria UV-Vis.....	113
2.6.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	113
2.7.	Espalhamento de Luz Dinâmico e potencial zeta.....	114
2.8.	Difração de raios-X (DRX).....	114
2.9.	Análise térmica.....	115

2.10.	Avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio de ABTS.....	115
2.11.	Avaliação da atividade anti-inflamatória por edema de pata induzido por carragenina.....	116
2.12.	Análise histopatológica.....	116
2.13.	Análise estatística.....	117
3.	Resultados.....	117
3.1.	Síntese e caracterização química da LN.....	117
3.2.	Atividade antioxidante.....	124
3.3.	Efeito anti-inflamatório da nanoemulsão de licopeno (LN).....	125
3.4.	Análise histopatológica.....	126
4.	Discussão.....	129
	Referências bibliográficas.....	132
	CONCLUSÃO.....	135
	ANEXOS.....	136
	APÊNDICE A.....	142

INTRODUÇÃO

A busca de compostos bioativos a partir da biodiversidade tem ganhado cada vez mais notoriedade, possibilitando o desenvolvimento de alternativas eficazes, acessíveis e seguras para a prevenção e tratamento de diversas condições que afetam a saúde humana. Aliado a isso, o desenvolvimento da nanotecnologia tem representado um salto na ciência, trazendo benefícios como estabilização físico-química de moléculas bioativas, melhora da solubilidade e biodisponibilidade, diminuição da toxicidade, bem como potencialização de atividades biológicas, propiciando aplicações na indústria farmacêutica, de alimentos e cosmética (CHIARI-ANDRÉO *et al.*, 2019; REHMAN *et al.*, 2020).

Mais especificamente, a nanotecnologia vem impactando na medicina com avanços nas pesquisas aplicadas a diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças, levando ao surgimento de um novo campo chamado nanomedicina. Durante alguns anos, a nanomedicina era uma promessa e com perspectivas discutidas de forma controversa, mas atualmente é reconhecida como uma área bem-sucedida acadêmica e industrialmente (FREITAS, 2005; LAMMERS; FERRARI, 2020). Por exemplo, foram levantados pelo menos 51 nanomedicamentos aprovadas pela FDA e 77 produtos em fase de experimentação clínica até 2015 (BOBO *et al.*, 2016).

Esse cenário representa um esforço para o desenvolvimento de novas soluções para doenças diversas, incluindo o câncer e as doenças relacionadas a processos inflamatórios crônicos. O câncer é uma das principais causas de óbito no mundo, sendo responsável por quase 10 milhões de mortes em 2020, com destaque ao câncer de mama (2,26 milhões de casos) e câncer de próstata (1,41 milhões de casos) (WHO, 2021). Trata-se de um conjunto de doenças caracterizadas pela proliferação celular descontrolada, mesmo na ausência de sinais extracelulares, podendo afetar basicamente todos os tipos de tecidos (MARTÍNEZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2020). As células cancerosas tornam-se resistentes à apoptose, são capazes de evadir-se dos supressores de crescimento celular, iniciar invasão e metástase e induzir angiogênese, podendo ser apoiadas pela instabilidade genômica inerentes a estas células, mas também pela promoção da inflamação do tecido (MARTÍNEZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2020).

Há várias evidências que relacionam a inflamação crônica ao processo de carcinogênese, à progressão do tumor e metástase, estimando-se que cotribua para cerca de 25% dos cânceres humanos (BHATELIA; SINGH; SINGH, 2014; KAWANISHI *et al.*, 2017). Tal relação pode ser mediada pela ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e IRF através de receptores tipo *Toll* (TLR) em processos inflamatórios (BHATELIA; SINGH; SINGH, 2014).

O presente trabalho associa o desenvolvimento de produtos naturais a partir da biodiversidade brasileira ao uso de sistemas nanotecnológicos para otimização das propriedades do produto visando aplicações biomédicas, com foco em câncer e inflamação. A matéria-prima utilizada foi a goiaba vermelha, uma fruta que ocorre em abundância no Brasil, nativa da América do Sul (BARBALHO *et al.*, 2012). No projeto foram utilizadas as frutas em alto grau de maturação, especificamente aquelas destinadas ao descarte devido características organolépticas menos atraentes e baixo valor comercial. Assim, este trabalho agrega valor ao fruto, aplicando-o na geração de produtos nanobiotecnológicos, podendo contribuir para uma cadeia produtiva sustentável, para a economia e desenvolvimento regional.

A goiabeira (*Psidium guava* L.) é uma planta com histórico de aplicação com fins medicinais, sendo aproveitadas todas as suas partes (folha, caule, raiz e fruto). Seu fruto é rico em vitaminas A, C, ferro, fósforo, cálcio e minerais, contém alto teor de compostos orgânicos e inorgânicos, incluindo metabólitos secundários antioxidantes (NASEER *et al.*, 2018). Dentre estes, se encontra o licopeno, um pigmento natural da família dos carotenoides associado a vários benefícios para a saúde humana, agindo como um potente antioxidante contra a oxidação de proteínas, lipídios e DNA e melhorando o sistema de defesa antioxidante celular (CASEIRO *et al.*, 2020).

O licopeno (ψ,ψ -caroteno) é caracterizado quimicamente pela estrutura de polieno de cadeia linear, com fórmula molecular $C_{40}H_{56}$, contendo onze ligações duplas conjugadas e duas não conjugadas (PRZYBYLSKA, 2020). A estrutura é responsável pelo seu caráter lipofílico, pela cor avermelhada e pelas propriedades antioxidantes. A molécula apresenta várias formas isoméricas *cis* e *trans*. Na natureza ocorre principalmente na forma isomérica todo *trans* (*all-E*), sendo termodinamicamente mais estável, enquanto o isômero *cis* é mais biodisponível para humanos (PRZYBYLSKA, 2020). Tais características tornam o licopeno atraente para

aplicações farmacêuticas, alimentícias e cosméticas, ao tempo em que limitam sua exploração industrial.

Nessa perspectiva, teve início um conjunto de pesquisas para aproveitamento do potencial biotecnológico da goiaba vermelha. Resumidamente, dois tipos de extratos de licopeno da goiaba vermelha foram produzidos: um extrato de carotenoides rico em licopeno, denominado LEG, obtido por metodologia de produção “limpa”, baseada no uso de solventes adequados para aplicação na indústria de alimentos (AMORIM; LEITE; PINTADO, 2018); e um extrato mais concentrado de licopeno, denominado LPG, obtido por uma etapa adicional de purificação com solvente orgânico apolar (AMORIM; LEITE; ROPKE, 2016).

LEG apresenta significativa citotoxicidade em células de câncer de mama humano e demonstrou um efeito promissor contra a dislipidemia e o estresse oxidativo (DOS SANTOS *et al.*, 2018; DA SILVA BRITO *et al.*, 2019), e LPG apresenta significativa atividade antioxidante e anti-inflamatória (AMORIM *et al.*, 2018; VASCONCELOS *et al.*, 2017).

Considerando a instabilidade do licopeno quando exposto ao oxigênio, luz e calor (SRIVASTAVA; SRIVASTAVA, 2015), foram empregados sistemas de nanopartículas a fim de contornar tal limitação da molécula. Três nanoformulações foram produzidas, as quais são apresentadas neste trabalho de tese: (i) nanocápsula de poli- ϵ -copolactona com núcleo lipídico contendo LEG; (ii) nanoemulsão com polisorbato 80 e monoestearato de sorbitano contendo LPG; e (iii) nanoemulsão com óleo mineral contendo LPG.

Nanocápsulas poliméricas têm sido amplamente estudadas, com expressivo aumento de pesquisas voltadas para aplicações farmacêuticas nas duas últimas décadas (DENG *et al.*, 2020). Tem como principais vantagens a capacidade de carrear uma grande variedade de compostos (proteínas, peptídeos, enzimas, hormônios, metabólitos, genes e fármacos), aumento da estabilidade da molécula e liberação controlada (DENG *et al.*, 2020; ELHESAISY, SWIDAN, 2020). As nanoemulsões se diferenciam por serem misturas termodinamicamente estáveis de óleo, água e surfactantes, e tem como principal vantagem formar suspensões aquosas de compostos hidrofóbicos e aumento da biodisponibilidade (CHE MARZUKI; WAHAB; ABDUL HAMID, 2019).

Tendo em vista o potencial do licopeno da goiaba vermelha para a geração de produtos com tecnologia nacional escalonável industrialmente, com cadeia produtiva sustentável, agregação de valor ao fruto de descarte e benefícios para a saúde, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver nanoformulações para estabilizar o licopeno e aplicar contra câncer e inflamação, bem como fornecer dados científicos e tecnológicos que visam subsidiar o desenvolvimento de novos produtos nanobiotecnológicos com vantagens competitivas em prol da saúde e da qualidade de vida.

Referências bibliográficas

AMORIM, A. G. *et al.* 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**, v. 120, n. 3, p. 1700330, 2018.

AMORIM, A. G. N.; LEITE, J. R. S. A.; PINTADO, M. E. **Obtainment process of carotenoids concentrate rich in lycopene from red fruits and/or red fruit pulp.** Depositante: Universidade Católica Portuguesa. Patente nº EP3400812 A1, 2018.

AMORIM, A. G. N.; LEITE, J. R. S. A.; ROPKE, C. D. **Obtenção de extrato rico em licopeno e licopeno puro de fonte natural.** Depositante: Universidade Federal do Piauí/Phytobios Pesquisas, Desenvolvimento e Inovação Ltda. Patente nº BR102016030594-2, 2016.

BARBALHO, S. M. *et al.* *Psidium guajava* (Guava): A plant of multipurpose medicinal applications. **Med Aromat Plants**, v. 1, n. 104, p. 2167– 0412, 2012.

BHATELIA, K.; SINGH, K.; SINGH, R. TLRs: Linking inflammation and breast cancer. **Cellular Signalling**, v. 26, n. 11, p. 2350–2357, 2014.

BOBO, D. *et al.* Nanoparticle-based medicines: a review of fda-approved materials and clinical trials to date. **Pharmaceutical Research**, v. 33, n. 10, p. 2373–2387, 2016.

CASEIRO, M. *et al.* Lycopene in human health. **LWT**, v. 127, p. 109323, 2020.

CHE MARZUKI, N. H.; WAHAB, R. A.; ABDUL HAMID, M. An overview of nanoemulsion: concepts of development and cosmeceutical applications. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 33, n. 1, p. 779–797, 2019.

CHIARI-ANDRÉO, B. G. *et al.* Nanoparticles for cosmetic use and its application. In: **Nanoparticles in Pharmacotherapy.** [s.l.] Elsevier, p. 113–146, 2019.

DA SILVA BRITO, A. K. *et al.* Lycopene-rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) decreases plasma triglycerides and improves oxidative stress biomarkers on experimentally-induced dyslipidemia in hamsters. **Nutrients**, v. 11, n. 2, p. 393, 2019.

DENG, S. *et al.* Polymeric nanocapsules as nanotechnological alternative for drug delivery system: current status, challenges and opportunities. **Nanomaterials**, v. 10, n. 5, p. 847, 2020.

DOS SANTOS, R. C. *et al.* 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**, v. 105, p. 184–196, 2018.

ELHESAISY, N.; SWIDAN, S. Trazodone loaded lipid core poly-(ϵ -caprolactone) nanocapsules: development, characterization and in vivo antidepressant effect evaluation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1964, 2020.

FREITAS, R. A. What is nanomedicine? **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 1, n. 1, p. 2–9, 2005.

KAWANISHI, S. *et al.* Crosstalk between DNA damage and inflammation in the multiple steps of carcinogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1808, 2017.

LAMMERS, T.; FERRARI, M. The success of nanomedicine. **Nano Today**, v. 31, p. 100853, 2020.

MARTÍNEZ-JIMÉNEZ, F. *et al.* A compendium of mutational cancer driver genes. **Nature Reviews Cancer**, v. 20, n. 10, p. 555–572, 2020.

NASEER, S. *et al.* The phytochemistry and medicinal value of *Psidium guajava* (guava). **Clinical Phytoscience**, v. 4, n. 1, p. 32, 2018.

PRZYBYLSKA, S. Lycopene – a bioactive carotenoid offering multiple health benefits: a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 55, n. 1, p. 11–32, 2020.

REHMAN, A. *et al.* Carotenoid-loaded nanocarriers: A comprehensive review. **Advances in colloid and interface science**, v. 275, p. 102048, 2020.

SRIVASTAVA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Lycopene; chemistry, biosynthesis, metabolism and degradation under various abiotic parameters. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 41–53, 2015.

VASCONCELOS, A. G. *et al.* 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**, v. 99, p. 959–968, 2017.

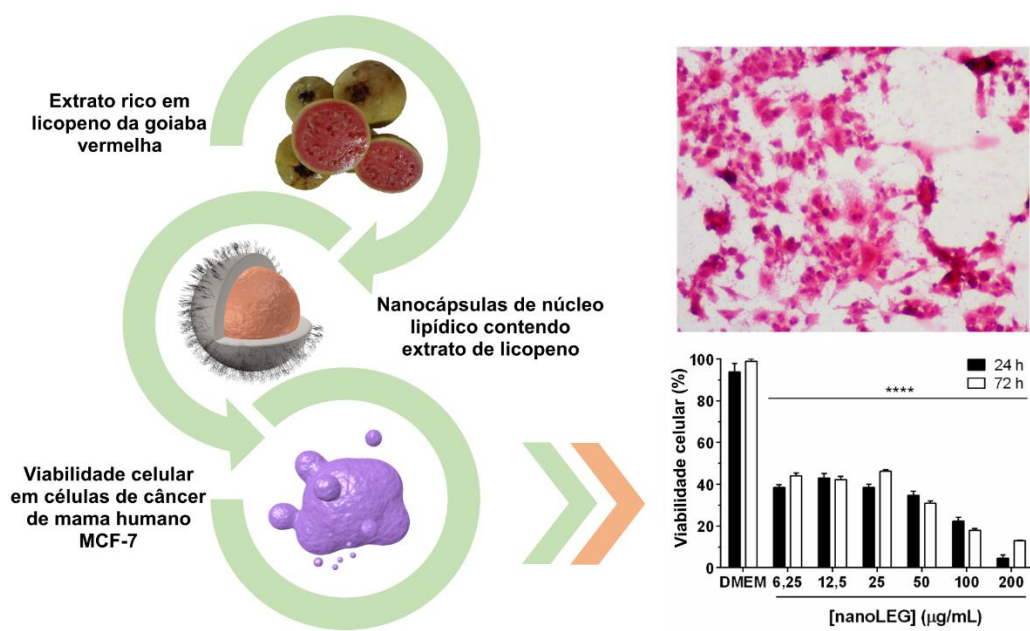
WHO. **Cancer**. [s.l.] World Health Organization, 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 2 jun. 2021.

CAPÍTULO I

Artigo publicado no periódico Food Research International em 2020.

ISSN: 0963-9969.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109548>



Atividade citotóxica de nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona com núcleo lipídico contendo extrato rico em licopeno da goiaba vermelha (*Psidium guajava* L.) em células de câncer de mama

Resumo

O objetivo deste estudo foi produzir nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona com núcleo lipídico contendo extrato rico em licopeno de goiaba vermelha (LEG), caracterizar as nanopartículas e avaliar seus efeitos citotóxicos em células de câncer de mama humano. Nanocápsulas contendo o extrato (nanoLEG) foram produzidas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado. As nanopartículas foram caracterizadas por Espalhamento de Luz Dinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, eficiência de encapsulação, Análise de Rastreamento de Nanopartículas, Microscopia de Força Atômica e Microscopia Eletrônica de Transmissão. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT em células de câncer de mama humano (MCF-7) e a inibição de EROs e NF- κ B foi avaliada em células microgliais humanas (HMC3) por microscopia de imagens de lapso de tempo. Um ensaio de atividade hemolítica foi realizado com sangue de carneiro. Os dados mostraram que o tamanho médio das nanopartículas ficou em torno de 200 nm, a concentração de nanopartículas/mL foi em torno de 0,1 μ M, potencial zeta negativo, pH < 5,0 e formato esférico, com baixa variação durante um longo período de armazenamento (7 meses) a 5°C, indicando estabilidade do sistema e proteção contra a degradação do licopeno. O percentual de encapsulamento variou de 95 a 98%. NanoLEG reduziu significativamente a viabilidade das células MCF-7 após 24 horas (61,47%) e 72 horas (55,96%) de exposição, mesmo na concentração mais baixa testada (6,25 a 200 μ g/mL) e melhorou a citotoxicidade de LEG em MCF-7. NanoLEG inibiu a ativação de NF- κ B e a produção de EROs induzidas por LPS em células microgliais. As partículas não afetaram a integridade da membrana dos eritrócitos do sangue de carneiro nas concentrações testadas (6,25 a 200 μ g/mL). Assim, a formulação de nanocápsulas de núcleo lipídico com parede de poli- ϵ -caprolactona revestida com polissorbato 80 foi aplicada de forma eficiente para estabilizar o extrato rico em licopeno de goiaba vermelha, gerando um produto com propriedades físico-químicas e biológicas

satisfatórias para aplicação como nutracêutico baseado em nanotecnologia, enfatizando seu potencial como anticâncer.

Palavras-chave: carotenoides, goiaba vermelha, nanopartículas, câncer de mama, viabilidade celular, nanomedicina.

1. Introdução

O licopeno é um hidrocarboneto alifático ($C_{40}H_{56}$) e um pigmento da família dos carotenoides, responsável pela coloração laranja-avermelhada de frutas e vegetais (ANARJAN; JOUYBAN, 2017; DOS SANTOS *et al.*, 2015; FAN *et al.*, 2011; HA *et al.*, 2015; SRIVASTAVA; SRIVASTAVA, 2015). Ele é conhecido como um poderoso supressor de radicais livres e, dentre os carotenoides, é responsável por apresentar a mais eficiente atividade no sequestro de oxigênio singleto devido à presença de duas duplas ligações não conjugadas em sua estrutura, as quais lhe conferem maior reatividade (DI MASCIO; KAISER; SIES, 1989; ISLAMIAN; MEHRALI, 2017). Devido à sua propriedade antioxidante, o licopeno tem sido associado a inúmeros benefícios à saúde humana. Estes benefícios têm sido estudados em cultura de células, ensaios em animais e por meio de investigações epidemiológicas para a prevenção do câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, doenças neurodegenerativas, inflamação, entre outras, com o potencial antioxidante e outros mecanismos intracelulares sendo frequentemente citados (EJIKE *et al.*, 2018; LEONG *et al.*, 2018; PETYAEV *et al.*, 2018; RAO; AGARWAL, 1999; SINWOO HWANG; JOO LIM; HYEYOUNG KIM, 2017).

Recentemente, o licopeno foi extraído de forma eficiente a partir da goiaba vermelha (*Psidium guajava* L.), uma fruta amplamente encontrada a nível mundial em regiões subtropicais e tropicais. O extrato rico em licopeno de goiaba (LEG) apresentou uma atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) de $2.980 \pm 34 \mu\text{M Trolox/g}$ pelo método do ABTS, sendo mais potente do que o licopeno isolado da goiaba vermelha ($1.959 \pm 51 \mu\text{M Trolox/g}$) e do extrato de tomate ($1.963 \pm 50 \mu\text{M Trolox/g}$) (AMORIM *et al.*, 2018). A atividade antioxidante obtida pelo método ORAC foi de $402,80 \pm 44,40 \mu\text{M Trolox/g}$ para o LEG, enquanto os valores encontrados para o licopeno obtido do extrato de tomate ($297,92 \pm 36,37 \mu\text{M Trolox/g}$) e o licopeno isolado obtido da goiaba vermelha ($315,39 \pm 27,98 \mu\text{M Trolox/g}$) foram

significativamente menores. A potente atividade antioxidante do LEG em comparação ao licopeno isolado e ao extrato de tomate enfatiza seu potencial de aplicação na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica.

Além disso, o extrato rico em licopeno de goiaba demonstrou efeitos benéficos em um modelo animal de inflamação aguda, proporcionando proteção contra o estresse oxidativo, regulando negativamente mediadores inflamatórios e inibindo a expressão de genes envolvidos na inflamação (VASCONCELOS *et al.*, 2017). Um estudo *in vitro* demonstrou, ainda, que o tratamento com LEG reduziu significativamente a viabilidade de células de câncer de mama da linhagem MCF-7 ($CI_{50} = 29,85$ e $5,96 \mu\text{g/mL}$ em 24 e 72 horas, respectivamente), sem afetar de forma significativa a viabilidade de células da linhagem NIH-3T3 (linhagem não-cancerosa de fibroblastos murinos) ($CI_{50} = 1.579,00$ e $911,50 \mu\text{g/mL}$ em 24 e 72 horas, respectivamente), utilizando o ensaio do MTT (SANTOS *et al.*, 2018).

Entretanto, o licopeno é sensível à luz, à presença de oxigênio e a variações de temperaturas, o que pode levar a isomerização ou degradação completa quando exposto a condições adversas (SRIVASTAVA; SRIVASTAVA, 2015; ZUORRO *et al.*, 2018). Estes fatores somados à baixa biodisponibilidade e solubilidade limitam sua aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêutica (REHMAN *et al.*, 2020). Portanto, a nanoencapsulação de produtos baseados em carotenoides é uma estratégia inovadora, capaz de melhorar a estabilidade química destes produtos, bem como sua solubilidade em água, além de aumentar sua biodisponibilidade e potencializar sua atividade antioxidante (ANARJAN; JOUYBAN, 2017; HA *et al.*, 2015; REZAEI *et al.*, 2019; ZARE *et al.*, 2021).

Existem diversos nanocarreadores para carotenoides, como nanopartículas biopoliméricas, à base de polissacarídeos, proteínas ou lipídeos, inorgânicas e híbridas (REHMAN *et al.*, 2020; ROSTAMABADI; FALSAFI; JAFARI, 2019; ZARE *et al.*, 2021). Dentre os nanocarreadores desenvolvidos para aplicações na saúde humana, as nanocápsulas com núcleo lipídico constituem um importante modelo. Elas correspondem a vesículas compostas por um revestimento polimérico e um núcleo oleoso, capaz de encapsular e liberar uma variedade de substâncias bioativas (ELHESAISY; SWIDAN, 2020; TORGE *et al.*, 2017; VENTURINI *et al.*, 2011). A parede é comumente composta por polímeros biocompatíveis e biodegradáveis, como o ácido polilático (PLA), poli-lactídeo-co-glicolídeo (PLGA), quitosana e poli- ϵ -

caprolactona (PCL) (ELHESAISY; SWIDAN, 2020; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010). PCL é um polímero hidrofílico, que, no corpo humano, é degradado por hidrólise em condições fisiológicas. Além disso, não apresenta toxicidade e é apropriado para a entrega de moléculas bioativas (DA SILVA *et al.*, 2019; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

Uma das maiores vantagens de nanocápsulas com núcleo lipídico consiste na sua capacidade de aumentar a estabilidade química dos compostos encapsulados, alta capacidade de encapsulação e liberação controlada (ELHESAISY, SWIDAN, 2020). As nanocápsulas de núcleo lipídico têm sido utilizadas para melhorar a estabilidade de moléculas bioativas, mostrando resultados promissores na terapia do câncer e em testes de segurança. Granata e colaboradores (2018) utilizaram nanocápsulas com núcleo lipídico para a aplicação nutracêutica de ácidos hidroxicinâmicos, polifenóis bioativos bastante comuns no reino vegetal, presentes na alimentação humana e que possuem atividade anticâncer. Nanocápsulas com núcleo lipídico carregadas com curcumina (1,5 mg/kg/dia) reduziram o tamanho e a malignidade do tumor, além de prolongar a sobrevivência dos animais quando comparadas à mesma dose do composto não encapsulado, administrado a ratos inoculados com células C6 de glioma (ZANOTTO-FILHO *et al.*, 2013). Além disso, nanocápsulas com núcleo lipídico melhoraram a segurança gastrointestinal quando comparadas à administração de *trans*-resveratrol livre (FROZZA *et al.*, 2010).

Portanto, o presente estudo teve como objetivo produzir nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona com núcleo lipídico contendo extrato rico em licopeno da goiaba (*Psidium guajava* L.), caracterizá-las e avaliar seu efeito citotóxico em células de câncer de mama humano e em eritrócitos de carneiro para uma possível aplicação como um nutracêutico baseado em nanotecnologia para a promoção de saúde.

2. Material e métodos

2.1. Reagentes

Etanol (Dinâmica), acetona (Dinâmica) e diclorometano (Sharlab S. L.) de grau analítico, bem como acetonitrila (Merck), metanol (Merck), N-hexano (Tedia) e acetato de amônio (J.T. Baker) grau cromatográfico foram adquiridos. Clorofórmio, polisorbato

80 (Tween® 80), monosterato de sorbitano (Span® 60) e poli- ϵ -coprolactona (Mn = 80.000) foram adquiridos da Sigma Aldrich Chemical Co. O óleo de coco natural extravirgem (*Cocos nucifera* L., Copra) foi comprado em uma loja especializada em óleos no mercado local em Brasília-DF, Brasil.

2.2. Produção e caracterização do extrato rico em licopeno de goiaba

2.2.1. Extração e espectrofotometria UV-Visível

O extrato rico em licopeno de goiaba (LEG) foi produzido de acordo com o método detalhado na patente nº EP3400812 A1 de Amorim, Leite e Pintado (2018). Goiabas vermelhas (*Psidium guajava* L.) em alto grau de maturação foram adquiridas em um mercado local na cidade de Parnaíba, Estado do Piauí, Brasil. As frutas foram submetidas a tratamento térmico e a extração foi realizada com etanol, sob agitação em ultrassom, até que a fruta estivesse despigmentada. Posteriormente, o extrato foi filtrado com o auxílio de papel filtro quantitativo e seco sob pressão reduzida (50 mbar), à temperatura ambiente, em um rota-evaporador R-215 (Buchi, Suíça), sob baixa luminosidade.

A análise por espectrofotometria UV-Vis foi realizada para quantificação do licopeno extraído, utilizando um espectrofotômetro UV-1280 (Shimadzu, Japão). O LEG diluído em clorofórmio:etanol (1:20) foi submetido a varredura na região de 600 a 300 nm, em cubetas de quartzo (1 mL). Uma solução de clorofórmio:etanol foi utilizada como branco. A quantificação foi realizada com base na absorbância obtida em 472 nm, comprimento de onda de máxima absorbância observado. Para a quantificação, utilizou-se uma curva de calibração construída com um padrão de licopeno de tomate (Sigma-Aldrich) em concentrações de 1 a 10 $\mu\text{g/mL}$.

2.2.2 Avaliação do extrato por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR)

A técnica de CLAE foi utilizada para determinar o perfil do extrato e o conteúdo de licopeno, conforme descrito previamente (AMORIM *et al.*, 2018). A análise foi realizada em um cromatógrafo líquido (Shimadzu, Japão), equipado com um sistema

de bombas binário (LC-20AR), um detector de arranjo de fotodiodos (DAD, SPD-M20A), um autoinjeter (SIL-10AF) e um *software* de análise e processamento de dados LabSolutions versão 5.92. O LEG foi diluído em clorofórmio:etanol (1:20), filtrado em filtro de seringa PTFE de 0,45 µm e injetado (20 µL) para separação, utilizando uma coluna RPAQUEOUS Develosil C30 (4,6 × 150 mm, 5 µm).

A fase móvel foi composta por acetonitrila, metanol, hexano, diclorometano e acetato de amônio (55:22:11.5:11.5:0,02, v:v:v:v:m), com fluxo de 1 mL/minuto de 0 a 20 minutos. A detecção foi realizada no intervalo de 800 a 200 nm, a 1,2 nm/s, com monitoramento em 472 nm. O padrão de licopeno de tomate foi analisado nas mesmas condições, numa concentração de 50 µg/mL (clorofórmio:etanol, 1:20). A análise foi realizada em triplicata e a fração majoritária foi coletada manualmente para avaliação por EMAR.

Os dados de EMAR foram adquiridos em modo positivo, em um espectrômetro de massas AB Sciex Triplo TOF 5600 (Canadá), com uma fonte de íons electrospray (ESI), acoplado a um cromatógrafo Eksigent Ekspert™ UltraLC 100-XL (AB Sciex, EUA). A amostra foi injetada sob fluxo de 0,3 mL/minuto e a fase móvel utilizada para CLAE foi utilizada como branco. A análise abrangeu um intervalo de m/z de 100-1.000 Da, utilizando calibração externa. Os dados foram analisados utilizando o software PeakView v2.1.

2.3. Síntese e caracterização das nanopartículas

2.3.1. Produção das nanocápsulas com núcleo lipídico

As nanocápsulas com núcleo lipídico contendo LEG (nanoLEG) foram produzidas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, conforme descrito por Santos e colaboradores (2016), com adaptações. A fase orgânica foi preparada pela dissolução do polímero poli-ε-caprolactona em acetona e misturada com monostearato de sorbitano, óleo de coco e LEG em etanol (60,81:14,77:22,58:0.1:1,74, m:v:m:v:v). Diferentes quantidades de LEG foram testadas para o processo de nanoencapsulação, de modo que as concentrações finais obtidas foram 0,3; 1,5 e 3,0 mg de licopeno/mL de nanoformulação. A fase orgânica foi submetida a agitação magnética por 10 minutos a 40°C e, posteriormente,

adicionada à fase aquosa (190 mL) contendo polisorbato 80 (150 µL), sob as mesmas condições de agitação e temperatura previamente citadas. A formulação foi concentrada sob pressão reduzida (50 mbar), a 37°C, em um rotaevaporador R-215 (Buchi, Suíça), de modo a se obter um volume final de 10 mL. A formulação de nanocápsulas de núcleo lipídico sem LEG (nomeada nano “vazia”) também foi produzida como controle. Todas as nanocápsulas foram armazenadas em frascos de plástico firmemente fechados, em refrigerador (5°C), sem proteção contra a luz.

2.3.2. Medida do potencial de hidrogênio (pH) e da eficiência de encapsulação

O pH das nanopartículas foi mensurado sem diluição prévia, em um pHmetro digital Digimed DM23 (Brasil), a 25°C. A eficiência de encapsulação foi avaliada de acordo com Shariffa *et al.* (2017) e Venturini *et al.* (2011), com algumas adaptações. Para isso, as nanoLEG foram adicionadas a uma solução de etanol:clorofórmio (1mL, 1:2), misturadas por 2 minutos em vórtex e centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos. O precipitado foi analisado em um espectrofotômetro UV-1280 (Shimadzu, Japão), com varredura entre os comprimentos de onda (λ) de 600 a 300 nm e quantificação em 472 nm, em cubeta de quartzo (1 mL). A eficiência de encapsulação (%EE) foi calculada conforme a equação seguinte:

$$\%EE = \frac{C_t - C_a}{C_i} \times 100$$

Onde C_t corresponde ao conteúdo total de licopeno determinado no precipitado, C_a corresponde ao conteúdo de licopeno na superfície (não-encapsulado) da nanoLEG em água destilada (1:500) e C_i corresponde à quantidade de licopeno adicionado no processo de síntese. A nano vazia foi utilizada como controle (branco).

2.3.3. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e potencial zeta

O tamanho médio das partículas e o índice de polidispersão (IPD) foram mensurados por DLS (*Dynamic Light Scattering*), utilizando um equipamento Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, RU). No momento da análise, as amostras foram diluídas em água ultrapura (1:200, 1 mL) e analisadas em triplicata, em um ângulo de 90°, com

tempo de equilíbrio de 120 segundos a 25°C antes da análise. O potencial zeta foi determinado nas mesmas condições. As análises foram realizadas imediatamente após a síntese e mensalmente, durante 7 meses.

2.3.4. Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

A técnica de NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*) foi realizada utilizando um instrumento Malvern Panalytical NanoSight NS300, equipado com módulo laser de 642 nm (Malvern, RU). Os dados foram coletados e analisados com o auxílio do Software NTA 3.3 para se obter o diâmetro hidrodinâmico e a concentração de partículas suspensas no meio. As amostras foram diluídas 50.000 vezes, utilizando água ultrapura. Uma alíquota da suspensão obtida foi retirada utilizando uma seringa de plástico para que se pudesse injetar na célula de fluxo do equipamento. O foco e o nível da câmera foram ajustados para se obter a melhor visão possível das partículas, seguindo as orientações fornecidas pelo fabricante, garantindo a ausência de bolhas e de partículas aderidas às paredes da célula. Cinco vídeos, com duração de 1 minuto cada, foram capturados, enquanto a amostra avançava pela célula de fluxo a uma taxa de 2 µL/minuto, o que possibilitou a mensuração de um maior número de partículas diferentes ao longo da alíquota. As configurações de análise, particularmente o limite de detecção, foram ajustados dependendo da intensidade do espalhamento de luz observada durante a captura dos vídeos. As medidas foram realizadas a 25°C e, para a análise dos dados, os valores de viscosidade da água foram considerados. Cada vídeo foi analisado de forma independente e os resultados foram automaticamente combinados de modo a fornecer o gráfico de distribuição de tamanhos das partículas.

2.3.5. Avaliação da morfologia das partículas por Microscopia de Força Atômica (MFA) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a análise por MFA, as amostras foram diluídas (3:1) e depositadas em uma superfície limpa da mica recentemente clivada e deixadas para secar ao ar. As imagens foram realizadas utilizando um microscópio de força atômica JPK Nanowizard 4 e sondas AppNano ACT, em modo de contato intermitente. As imagens

foram obtidas em pelo menos três diferentes áreas de cada amostra e imagens representativas foram apresentadas na Figura 4.

Para a análise por MET, as amostras foram depositadas sobre grades revestidas de formvar tratadas com plasma, seguido de coloração negativa com acetato de urânio, lavadas e deixadas para secar ao ar. As amostras foram avaliadas em um microscópio eletrônico de transmissão Hitachi H7000, a 10 keV. Pelo menos seis áreas foram examinadas por amostra e imagens representativas estão apresentadas na Figura 4.

2.4. Estudos biológicos

2.4.1. Ensaio de viabilidade celular

A linhagem de célula de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) foi adquirida da *American Type Culture Collection* (ATCC®, EUA). As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dubelco's Modified Eagle's Medium*, Gibco BRL, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor (Gibco, EUA) e 1% de antibióticos (10.000 U/mL penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina, Sigma-Aldrich, EUA), a 37°C e 5% de CO₂, em atmosfera umidificada. Primeiramente, as células MCF-7 foram plaqueadas em placas de 96 poços, em uma densidade de 3×10^3 células/poço e mantidas por 24 horas nas condições já descritas. Então, as células foram tratadas com nanoLEG (3 mg/mL) diluída em meio DMEM, em concentrações que variaram de 200 a 6,25 µg/mL, baseadas no teor de licopeno, em quintuplicata. LEG livre diluído em 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO), em concentrações de 200 a 6,25 µg/mL, ou meio DMEM foram utilizados como controles. As placas foram incubadas por 24 e 72 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo método da redução do sal MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2, 5-difenil-2H-tetrazólio, Sigma-Aldrich, EUA). Após o tempo de exposição, o meio de cultura foi removido e 100 µL de uma solução de MTT diluído em DMEM (0,75 mg/mL) foi adicionada a cada poço e incubada por 2 horas a 37°C. Posteriormente, 100 µL de DMSO foram adicionados aos poços para dissolver os cristais de formazan produzidos pelas células metabolicamente ativas. A absorbância foi mensurada 595 nm utilizando um leitor de

microplacas SpectraMax® Plus 384 (Molecular Devices, EUA). Os testes biológicos foram realizados utilizando amostras armazenadas por 1-2 meses.

2.4.2. Coloração das células MCF-7 por Hematoxilina e Eosina

As células MCF-7 foram plaqueadas em placas de 24 poços, em densidade de 5×10^4 células/poço e mantidas por 24 horas a 37°C e 5% CO₂ em atmosfera umidificada, para análise morfológica após o tratamento com nanoLEG. Para tanto, as células foram tratadas com a nanoLEG 3 mg/mL, diluída em DMEM, em concentrações de 200 µg/mL. DMEM e peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 1 mM) foram utilizados como controles de viabilidade e morte celular, respectivamente. A placa foi incubada por 24 horas e, posteriormente, o meio foi removido, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído por 15 minutos e lavadas com STF (salina tamponada com fosfato) gelada. A coloração foi realizada com Hematoxilina e Eosina (HE) por um minuto cada. As células foram analisadas em um microscópio invertido (Leica Microsystems DMil, Alemanha) e as imagens foram capturadas com auxílio do software ToupView (China), com ampliação de 100x.

2.4.3. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e ativação de fator nuclear kappa-B (NF-κB) por imagem de células vivas utilizando biossensores

A linhagem de células da micróglia humana (HMC3, JANABI *et al.*, 1995) foi adquirida da *American Type Culture Collection* (ATCC®, EUA) e cultivada conforme descrito por Socodato e colaboradores (2018). Para os ensaios, as células foram plaqueadas em placas de cultura com fundo plástico (µ-Dish 35 mm, iBidi) e transientemente transfectadas com o biossensor pFRET-HSP33 cys (aqui referido como biossensor HSP) (GUZY *et al.*, 2005) para detectar a produção de EROs, ou transfectadas com o biossensor plkBα-miRFP703, para mensurar a ativação de NF-κB (SHCHERBAKOVA *et al.*, 2016), utilizando Jetprime (Polyplus), de acordo com as instruções do fabricante. Os experimentos foram conduzidos em um microscópio DMI6000B (Leica Microsystems, Alemanha), equipado com díodos apropriados para CFPYFP FRET, conforme descrito previamente (SOCODATO *et al.*, 2020). As células da micróglia foram registradas por 10 minutos em HBSS (*Hanks' Balanced Salt*

solution, Sigma-Aldrich, Alemanha) para a linha de base e na presença de 1 µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS) por 30 minutos (período de estimulação). As células foram tratadas com nanoLEG 3 mg/mL diluída em HBSS, na concentração de 200 µg/mL. A quantificação do biossensor foi realizada conforme descrito por Socodato e colaboradores (2020).

2.4.4. Ensaio de atividade hemolítica

O ensaio de hemólise foi realizado de acordo com Santos e colaboradores (2018). O experimento teve aprovação do comitê de ética em pesquisa com animais do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (UnB), sob número de protocolo 09/2019 (Anexo I). O sangue foi coletado em EDTA (1,8 mg/mL), de um carneiro (*Ovis aries*) da Fazenda Água Limpa (FAL) da Universidade de Brasília. O sangue do carneiro foi centrifugado por 10 minutos a 1.500 rpm e, posteriormente, os eritrócitos foram lavados três vezes com STF a 37°C. A solução de eritrócitos foi ajustada para obter-se 5% de células em STF. Posteriormente, 80 µL desta solução foram adicionados a 20 µL de nanoLEG 3 mg/mL, diluída em STF, com concentrações variando de 200 a 6,25 µg/mL. As amostras foram incubadas por 1 hora a 37°C e, depois, a reação foi interrompida pela adição de 200 µL de STF. As amostras foram, então, centrifugadas a 4.700 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi mensurado a 550 nm em um leitor de microplacas SpectraMax® Plus 384 (Molecular devices, EUA). Devido à alta densidade óptica das soluções de nanopartículas, um controle sem células foi utilizado. O experimento foi conduzido em triplicata. Os controles negativo (ausência de hemólise) e positivo (100% de hemólise) consistiram em STF e Triton-X 100, respectivamente.

2.4.5. Microscopia de Força Atômica (MFA) dos eritrócitos

Os eritrócitos de carneiro do grupo controle e do grupo tratado (DMEM e nanoLEG, 200 µg/mL), utilizados no experimento mencionado acima, foram analisados por MFA para verificar a morfologia celular. Para isto, as células foram fixadas com 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato 0,1 M (1:100) por 1 hora, sob suave agitação. Subsequentemente, as células foram depositadas em lamínulas

revestidas com 0,1% de poli-L-lisina, lavadas uma vez com solução de cacodilato 0,1 M e uma vez com água ultrapura, e deixadas para secar ao ar livre em sequência. As imagens foram obtidas utilizando um instrumento JPK Nanowizard 4, no modo AC-AFM (contato intermitente), utilizando *cantilevers* ACT (AppNano, EUA), com frequência de ressonância de aproximadamente 300 kHz.

2.5. Análise estatística

A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, utilizando o software Graphpad Prism 6.0 (GraphPad Software, EUA). A análise de variância (ANOVA) seguida pela análise de comparações múltiplas de Bonferroni foi utilizada para verificar diferenças estatísticas entre os grupos. ANOVA de duas vias seguida de comparações múltiplas de Bonferroni foram utilizadas para comparar as médias obtidas nos tempos de 24 e 72 horas. O teste *t* não-pareado foi aplicado para comparar as médias dos grupos no teste de produção de EROs e ativação de NF- κ B. As diferenças entre as médias dos grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) das quintuplicatas de dois experimentos diferentes.

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização química do LEG

O espectro de absorção UV-Vis do LEG em clorofórmio:etanol (1:20) exibiu três bandas de absorção máxima na região do visível, nos comprimentos de onda de 503, 472 e 447 nm, as quais foram semelhantes aos valores de $\lambda_{\text{máx}}$ obtidos para o padrão de licopeno de tomate (505, 473 and 447 nm), nas mesmas condições analíticas (Figura 1A). A quantificação da concentração equivalente de licopeno no extrato foi feita em 472 nm, o comprimento de onde de máxima absorção observada, apresentando um rendimento de 27% de licopeno por peso de extrato seco, o que já era esperado para a metodologia aplicada (10-40%) (AMORIM *et al.*, 2018). Além do licopeno (conteúdo de 5-*cis*-licopeno equivalente a 91 $\mu\text{g/g}$ e de licopeno *all-E* de 13

$\mu\text{g/g}$), o extrato de goiaba também demonstra um considerável conteúdo de outros carotenoides, como o beta-caroteno ($31 \mu\text{g/g}$), por exemplo (AMORIM *et al.*, 2018).

A separação dos componentes do LEG por CLAE-DAD demonstrou um perfil comatográfico relativamente simples em 472 nm (Figura 1B). O pico majoritário, com tempo de retenção (TR) de 9,50 minutos foi identificado como licopeno pela comparação com o TR encontrado para o padrão de licopeno (9,53 min). Os compostos com TR de 8,85 e 15,41 minutos, aparentemente, também eram carotenoides, com base no espectro UV-Vis extraído do cromatograma DAD ($\lambda_{\text{max}} = 498, 467$ e 441 nm para o primeiro; $\lambda_{\text{máx}} = 478$ e 453 nm para o último), conforme relatado previamente na literatura (AMORIM *et al.*, 2018). A análise do pico majoritário por EMAR resultou em um íon molecular de $[M]^+ 536,4391$ Da, característico para o licopeno (erro de $[M]^+ t = 536,4382, 1,68$ ppm), e em fragmentos principais de m/z 467,3694; 444,3767; 375,3062 e 269,2274. A ausência de um fragmento de m/z 521 sugere que o LEG contém, principalmente, licopeno *all-trans* (ARATHI *et al.*, 2015; DOS SANTOS *et al.*, 2018).

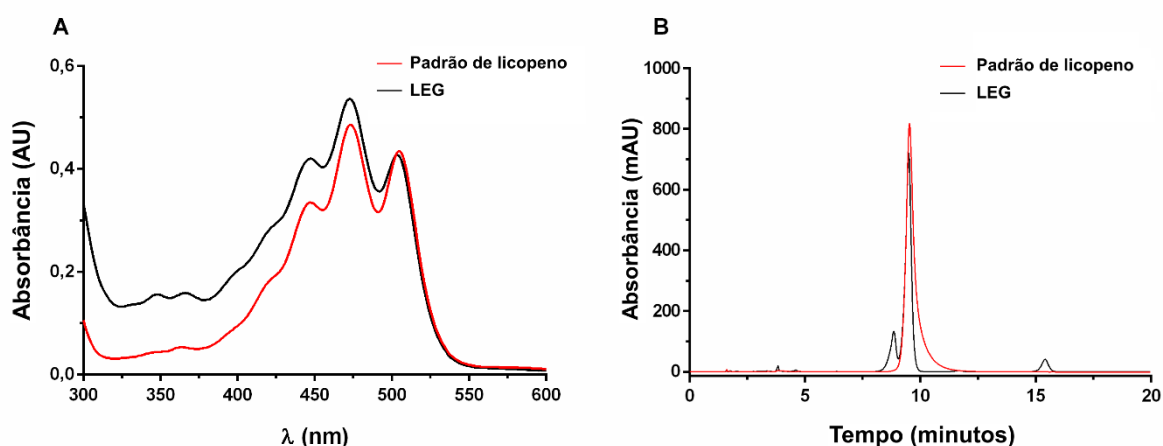


Figura 1. Espectro UV-Vis de 600 a 300 nm (A) e cromatograma obtido por CLAE-DAD (B) mostrando as similaridades entre o LEG e o padrão de licopeno de tomate (Sigma-Aldrich) diluídos em clorofórmio:etanol (1:20).

3.2. Caracterização da nanoLEG e da nano vazia

As nanocápsulas de núcleo lipídico foram produzidas utilizando poli- ϵ -coprolactona, um polímero biocompatível e biodegradável (TORGE *et al.*, 2017), como parede da nanopartícula, estabilizada com dois surfactantes (polisorbato 80 e

monoestearato de sorbitano) e com acetona e etanol, aplicados com sucesso em estudos prévios (DOS SANTOS *et al.*, 2015; FROZZA *et al.*, 2010). O polisorbato 80 é um surfactante e emulsificante não-iônico, utilizado em alimentos e cosméticos, com baixa toxicidade, classificado como “geralmente reconhecido como seguro” pela *Food and Drug Administration* (FDA) (HOW, ABDULLAH, ABBASALIPOURKABIR, 2011). O núcleo lipídico consistiu em monoestearato de sorbitano, um surfactante não-iônico (cadeia hidrocarbônica - C17), com propriedades emulsificantes, dispersantes e umectantes; óleo de coco extravirgem prensado a frio, o qual foi utilizado como fonte de cadeias de triglicerídeos e ácidos graxos entre C6 e C20, como os ácidos cáprico e caprílico; e LEG, o composto bioativo baseado no extrato rico em licopeno. As cadeias hidrocarbônicas dos constituintes do núcleo interagem entre si por meio da alta área de superfície disponível pela indução de dipolos nas ligações C-H. Uma representação conceitual da nanocápsulas de núcleo lipídico contendo extrato rico em licopeno de goiaba (nanoLEG) é mostrada na Figura 2A. As nanoformulações apresentaram um aspecto homogêneo, sem agregação, formação de fase ou licopeno precipitado (Figura 2B).

As análises espectrofotométricas das nanopartículas intactas (Figura 2C, D e E) demonstraram que o sinal UV-Vis característico para o LEG foi ocultado pelo espalhamento de luz da nanopartícula, ao passo que após a ruptura com clorofórmio:etanol, o perfil UV-Vis do LEG se apresenta no precipitado, sugerindo que o extrato foi eficientemente encapsulado. Além disso, o perfil UV-Vis do LEG das nanopartículas após 7 meses de armazenamento em frascos firmemente fechados, mantidos a 5°C, mostrou estabilidade (Figura 2F). Em contraste, o LEG livre, armazenado sob as mesmas condições, apresentou degradação significativa em 45 dias (Figura 2G).

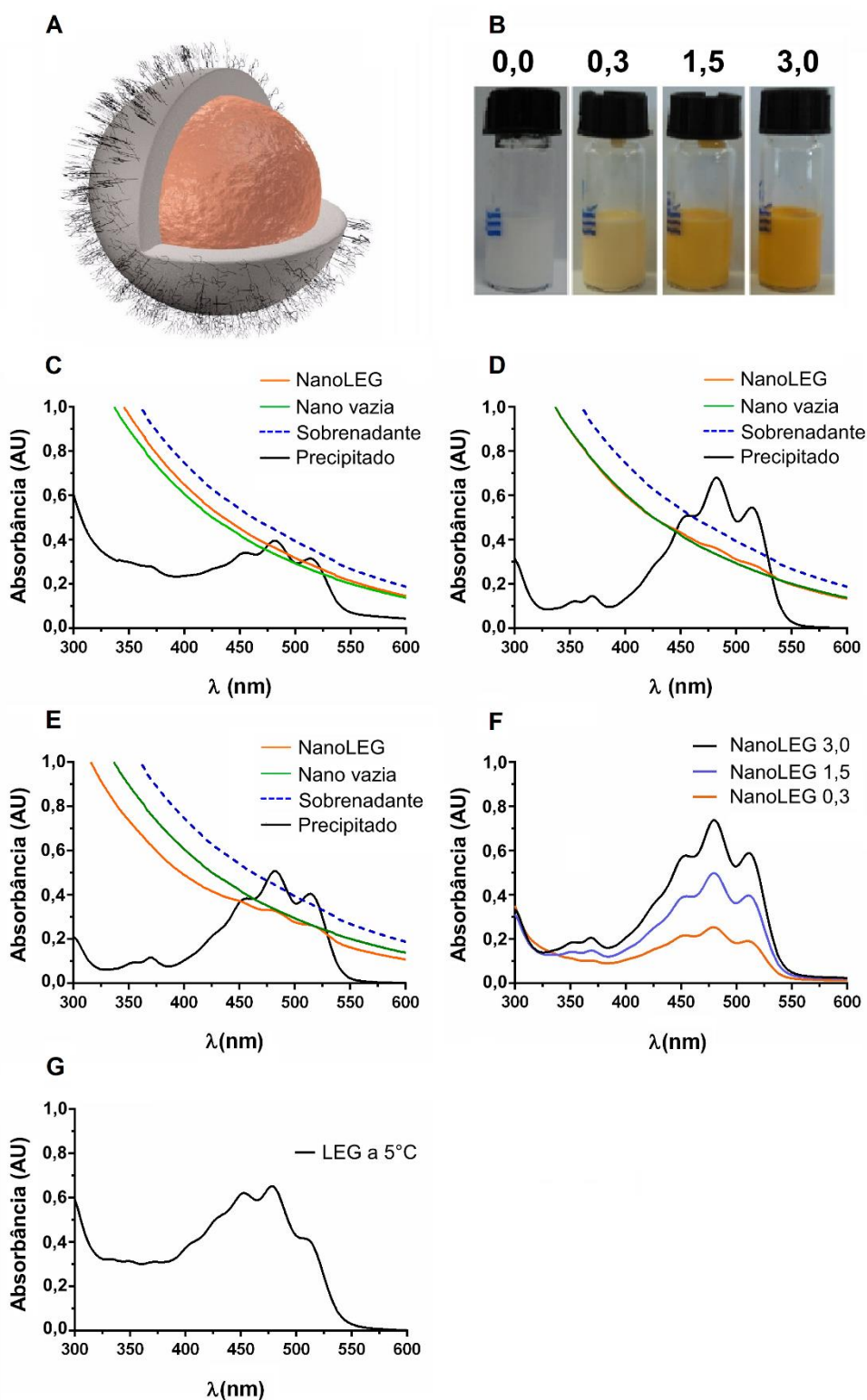


Figura 2. Representação conceitual da nanocápsulas de núcleo lipídico com extrato rico em licopeno de goiaba (nanoLEG), mostrando o núcleo oleoso contendo LEG (rosa) e a parede polimérica revestida com polisorbato 80 (A); fotografias representativas das nanocápsulas (B); espectro UV-Vis da nanoLEG 0,3 (C); 1,5 (D) e 3,0 (E) antes e após ruptura com solução de clorofórmio:etanol (1:2). Espectros UV-Vis das nanoLEGs 0,3; 1,5 e 3,0 extraídos das nanocápsulas após 7 meses de armazenamento (F) e do LEG livre nas mesmas condições (G).

O processo de degradação do licopeno pode ser acompanhado pela modificação do seu espectro UV-Vis, o qual demonstra redução na distinção entre os picos, na intensidade e definição, bem como um aumento na absorbância da região de vale entre os três picos. Também é possível observar uma significativa perda de absorbância em 503 nm, aumento significativo na absorbância em 447 nm e ausência do pico de absorção máxima, relacionada ao *cis*-licopeno (PHAN-THI, WACHÉ, 2014; TAN, SODERSTROM, 1989). De forma semelhante ao observado neste estudo, a instabilidade do licopeno livre a 5°C também foi demonstrado por Amorim e colaboradores (2020). Além disso, uma nanoemulsão contendo licopeno purificado da goiaba vermelha (LPG) demonstrou uma perda média de licopeno de $9,80\pm 0,29\%$ quando armazenada a 8°C por 12 meses, enquanto o LPG livre apresentou cerca de 50% de perda em apenas um mês de armazenamento nas mesmas condições (AMORIM *et al.*, 2020).

Além disso, o percentual de LEG encapsulado foi alto em todas as nanocápsulas, indicando a viabilidade deste sistema mesmo para concentrações maiores de extrato. A eficiência de encapsulação variou ligeiramente conforme a concentração de LEG aumentava, fluando de 98% para a nanoLEG 0,3 mg/mL a 95% para nanoLEG 3 mg/mL (Tabela 1). A alta eficiência de encapsulação pode estar relacionada ao núcleo oleoso, o qual retém moléculas lipofílicas, como o licopeno. Alta eficiência de encapsulação também foi relatada por Nazemiyeh e colaboradores (2016) para nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com licopeno de tomate (98,4%) e foi maior do que o reportado por Dos Santos e colaboradores (2016) para nanocápsulas de núcleo lipídico contendo extrato de licopeno de tomate (40%).

O pH das nanocápsulas diminuiu conforme a quantidade de LEG aumentou e durante o período de 7 meses de análise, mas ainda assim se manteve em uma faixa satisfatória (Tabela 1). O pH é um parâmetro importante de estabilidade, uma vez que a taxa de degradação de carotenoides, como o licopeno, em emulsões água/óleo é maior em pH 3 do que em pH 4-8 (QIAN *et al.*, 2012). Isto ocorre por que a acidez induz reações de isomerização *cis-trans* e reações adicionais de degradação pela protonação dos carotenoides (MORTENSEN, SKIBSTED, 2000; QIAN *et al.*, 2012). NanoLEG 0,3; 1,5 e 3,0 mostraram pH compatível com o observado para nanocápsulas com núcleo lipídico contendo extrato de licopeno de tomate (6,01) (DOS SANTOS *et al.*, 2016). Ademais, González-Reza e colaboradores (2018)

correlacionaram os tamanhos das nanopartículas ao pH, indicando que partículas com tamanho médio de 220-290 nm seriam observados em formulações com pH próximo a 6.

Tabela 1. Caracterização das nanocápsulas de núcleo lipídico (nanoLEG e nano vazia).

Parâmetro	Mês	Nano vazia	NanoLEG 0,3	NanoLEG 1,5	NanoLEG 3,0
Eficiência de encapsulação (%)	0	--	98	96	95
pH	0	7,31	7,13	6,69	5,80
	7	6,10	5,37	5,89	5,25
Tamanho (nm) ¹	0	238,9±1,76	251,0±2,59	223,6±2,22	211,3±2,57
	7	255,0±0,20	246,9±4,94	245,3±2,27	234,9±4,83
IPD ¹	0	0,134±0,06	0,112±0,01	0,087±0,02	0,142±0,04
	7	0,176±0,06	0,127±0,03	0,127±0,02	0,173±0,01
Potencial zeta (mV)	0	-28,0±1,35	-22,0±0,49	-24,3±0,38	-36,3±1,22
	7	-24,3±0,55	-26,0±0,11	-27,4±0,25	-21,6±0,85

¹ Dados obtidos por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).

Considerando o tamanho das nanopartículas, os dados de DLS (Tabela 1) revelaram um diâmetro maior que 200 nm, com pequenas variações observadas durante o período de armazenamento, o que sugere mudanças não significativas no tamanho das partículas durante 7 meses. O índice de polidispersão (IPD) encontrado foi próximo a 0,1, e aumentou muito discretamente durante os 7 meses de armazenamento para todas as amostras. De acordo com González-Reza e colaboradores (2018), valores de IPD entre 0,1 e 0,3 indicam homogeneidade na distribuição de tamanhos, enquanto valores acima de 0,5 estão associados a uma distribuição mais heterogênea. Portanto, as nanoLEGs e a nano vazia apresentaram homogeneidade na distribuição de tamanhos, com boa estabilidade ao longo do tempo.

Os dados obtidos por NTA corroboraram as informações fornecidas pela técnica de DLS, mostrando amostras polidispersas, com diâmetro hidrodinâmico na faixa de 100 a 300 nm, e tamanho médio próximo a 200 nm (Figura 3). A concentração de nanopartículas foi semelhante entre as amostras, variando em, aproximadamente, 0,1 µM. O tamanho das nanopartículas é um dos parâmetros que governam as

propriedades de sistemas de entrega e, portanto, é crucial determinar o tamanho e a distribuição das nanopartículas com alta precisão (KIM *et al.*, 2019). A técnica de NTA fornece uma análise precisa de tamanho por meio da visualização e rastreamento individual, direto e em tempo real das partículas, complementando os dados de DLS (FILIFE; HAWES; JISKOOT, 2010; GRIFFITHS; CARNELL-MORRIS; WRIGHT, 2020; KIM *et al.*, 2019)

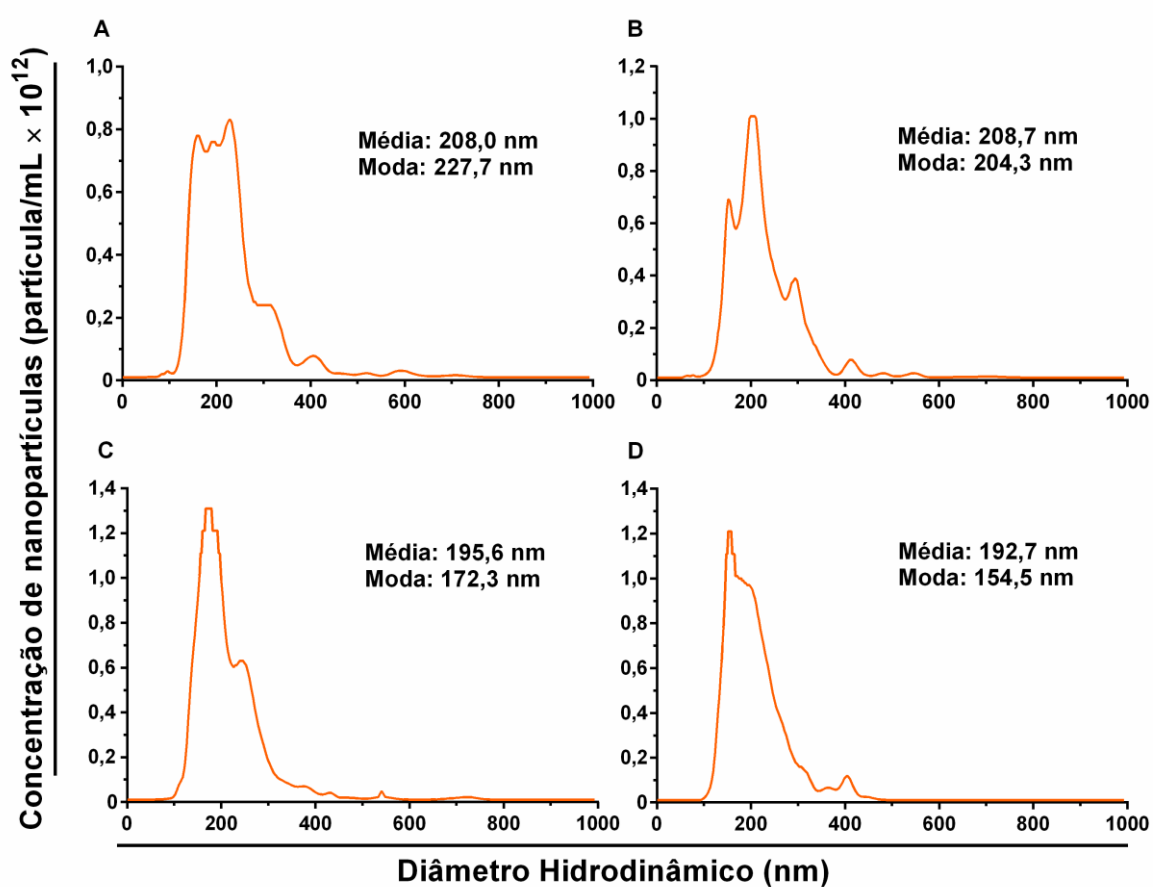


Figura 3. Diâmetro hidrodinâmico e distribuição por análise de NTA para a nano vazia (A), nanoLEG 0,3 (B); nanoLEG 1,5 (C) e nanoLEG 3,0 (D). As amostras foram diluídas 50.000 vezes e analisadas na célula de fluxo a 2 μ L/minuto com captura de vídeos ao vivo, com 1 minuto de duração, cada.

A literatura científica mostra que a distribuição de tamanhos das nanopartículas, bem como a distribuição quantitativa de partículas nas amostras, possuem importantes implicações no desenvolvimento de nanossistemas para aplicações biológicas e podem influenciar na interação com células e nos parâmetros farmacocinéticos (BHATTACHARJEE, 2016; HUANG *et al.*, 2010). Há um consenso de que o tamanho de 100 nm é utilizado como limite superior para uma nanopartícula,

mas não há evidência científica que comprove a adequação deste valor (BHATTACHARJEE, 2016). De fato, nanocápsulas de núcleo lipídico contendo trans-resveratrol apresentaram um diâmetro médio de 241 nm e um índice de polidispersão de 0,2 e demonstraram um melhoramento na segurança gastrointestinal quando comparadas à substância livre (FROZZA *et al.*, 2010). Em um outro exemplo, nanocápsulas lipídicas otimizadas para aumentar a biodisponibilidade e permeabilidade oral de curcumina exibiram tamanho médio de 190 nm e índice de polidispersão de 0,24, com excelente estabilidade (BAPAT *et al.*, 2019).

O potencial zeta das nanopartículas foi negativo para todas as formulações e se manteve durante o período de armazenamento, sugerindo que o sistema apresenta estabilidade físico-química (Tabela 1). O potencial zeta está relacionado à densidade de carga da superfície das partículas e, quando diferentes de zero (0), aponta para repulsão eletrostática, o que previne a agregação (RAVIADARAN *et al.*, 2018). Os valores encontrados devem-se aos grupos carboxila da poli- ϵ -coprolactona (GRILLO *et al.*, 2012). Ainda que a repulsão eletrostática previna a agregação, a estabilidade das nanopartículas pode, também, ser afetada por repulsão estérica devido à “cabeça polimérica” advinda do polisorbato 80 (ZHU *et al.*, 2019).

A análise morfológica das nanoLEGs foi realizada por MFA e MET (Figura 4). As micrografias de MET para as nanoLEGs 0,3; 1,5 e 3,0 mostram nanopartículas esféricas, com distribuição de tamanhos heterogênea. Partículas esféricas constituem as mais reportadas na literatura, embora partículas não-esféricas demonstrem aplicações biomédicas promissoras devido à sua circulação prolongada no sistema cardiovascular (DE CARVALHO *et al.*, 2018; JINDAL, 2017; YOO; CHAMBERS; MITRAGOTRI, 2010; ZHAO; STENZEL, 2018).

Nas imagens de MFA (Figuras 4A, C e E) é possível observar a tendência das partículas em agruparem-se na superfície da mica, provavelmente durante o processo de secagem no preparo das amostras, conforme relatado previamente para nanopartículas similares (FIEL *et al.*, 2011; LEITE *et al.*, 2005). Intrigantemente, as imagens de MFA mostram uma textura única, com aspecto “fibroso” na superfície das nanopartículas, o que, presume-se, seja causada agentes poliméricos de encapsulação. Esta textura não é visível por MET, uma vez que esta é uma técnica muito menos sensível para a caracterização de superfícies. Reconhecidamente, a forma é um parâmetro crucial para a performance das nanopartículas.

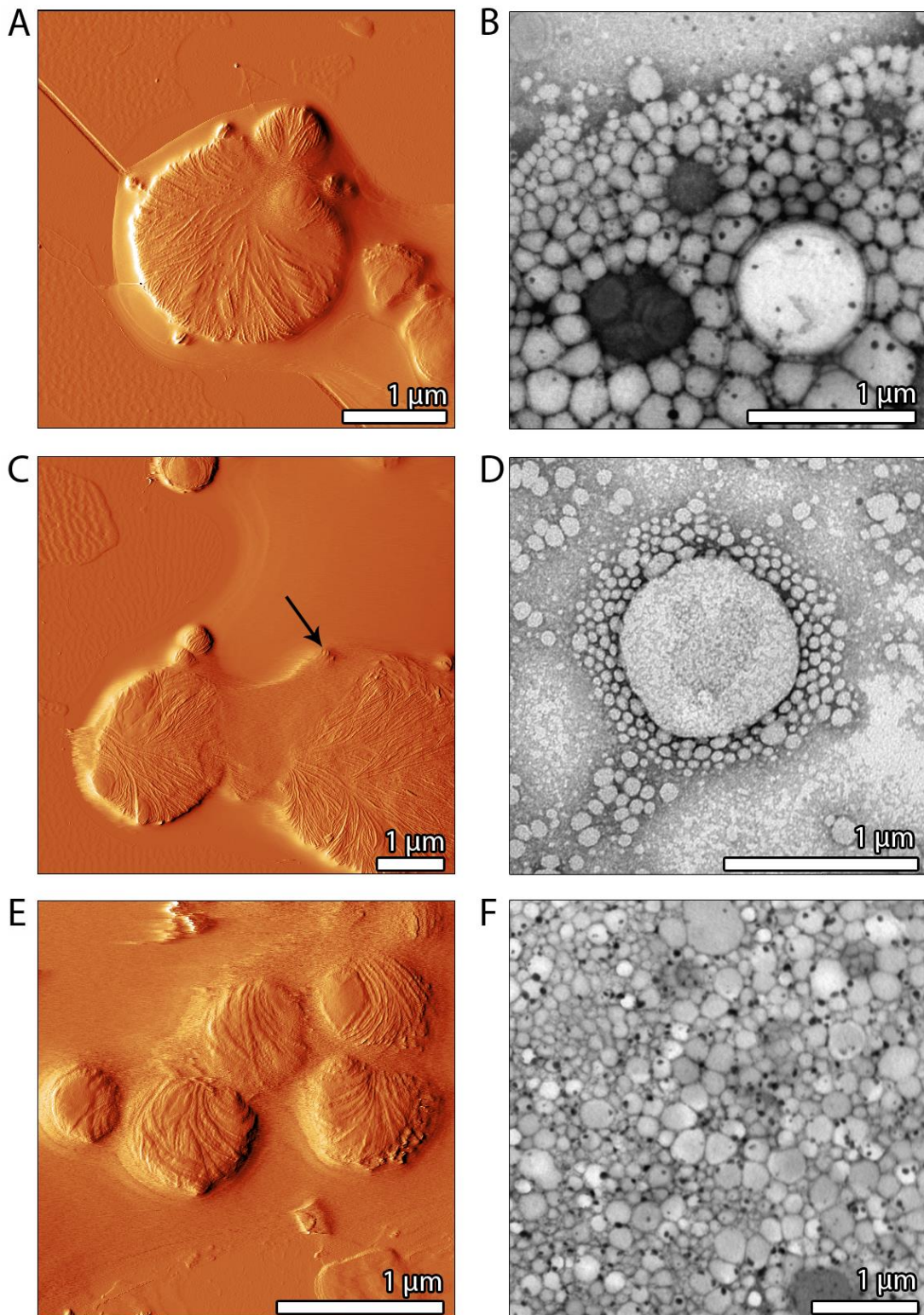


Figura 4. Micrografias representativas obtidas por MFA (à esquerda) e MET (à direita) para nanoLEG 0,3 (A e B), nanoLEG 1,5 (C e D) e nanoLEG 3,0 (E e F). Todas as figuras são apresentadas com uma escala de 1 µm. A seta no painel 4C evidencia uma nanopartícula parcialmente ofuscada, conforme discutido no texto.

As imagens mostradas na Figura 4 sugerem que as nanopartículas pareciam ser maiores quando analisadas por MFA em comparação a MET, embora uma alta dispersão nos tamanhos tenha sido observada em ambas as técnicas. Embora não tenhamos realizado uma análise exaustiva das imagens obtidas, medidas realizadas em algumas partículas representativas (informação não mostrada) de fato demonstrou que as partículas analisadas por MFA se mostravam maiores em média do que o observado pelas análises por MET.

Um estudo prévio discutiu amplamente potenciais diferenças no tamanho de partículas sólidas utilizando diferentes técnicas de microscopia (EATON *et al.*, 2017), dentre as quais o já conhecido alargamento, causado pela dilatação da ponta em AFM, o que pode explicar nossos resultados (EATON, WEST, 2010). Outro aspecto importante a ser considerado é que as partículas secas foram espalhadas sobre diferentes substratos (mica para MFA *versus* formvar tratado com plasma para MET), seguido de secagem, o que pode resultar em diferenças em suas características de espalhamento. Além disso, enquanto MET faz imagens através da amostra como um todo, a técnica de MFA sofre interferência de alguns tipos de material orgânico presentes na amostra, o que pode ofuscar algumas partículas menores (veja a seta na Figura 4), potencialmente distorcendo os resultados para partículas maiores. Semelhantemente ao observado por DLS e NTA, observou-se uma ampla variedade de tamanhos entre as amostras. As técnicas de MFA e MET são úteis para análises morfológicas, enquanto DLS e NTA são mais relevantes para medidas de tamanho, não sofrendo interferências por artefatos de secagem.

3.3. NanoLEG apresentou toxicidade contra células de câncer de mama

Devido às suas características físico-químicas satisfatórias e alto conteúdo de licopeno, a nanoLEG 3,0 mg/mL (denominada nanoLEG 3,0) foi utilizada nos estudos biológicos frente à uma linhagem de câncer de mama humano. O ensaio de viabilidade celular foi realizado pelo método do MTT em células da linhagem MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*), uma linhagem de adenocarcinoma de mama humano com fenótipo luminal epitelial, isolada de uma mulher caucasiana de 69 anos, em 1970 (COMŞA; CIMPEAN; RAICA, 2015). O ensaio demonstrou que o tratamento com a nanoLEG 3,0 (6,25 a 200 µg/mL) reduziu significativamente ($p < 0,05$) a viabilidade

celular em 24 e 72 horas de exposição, mesmo na menor concentração (Figura 5A). A CI_{50} não pôde ser determinada.

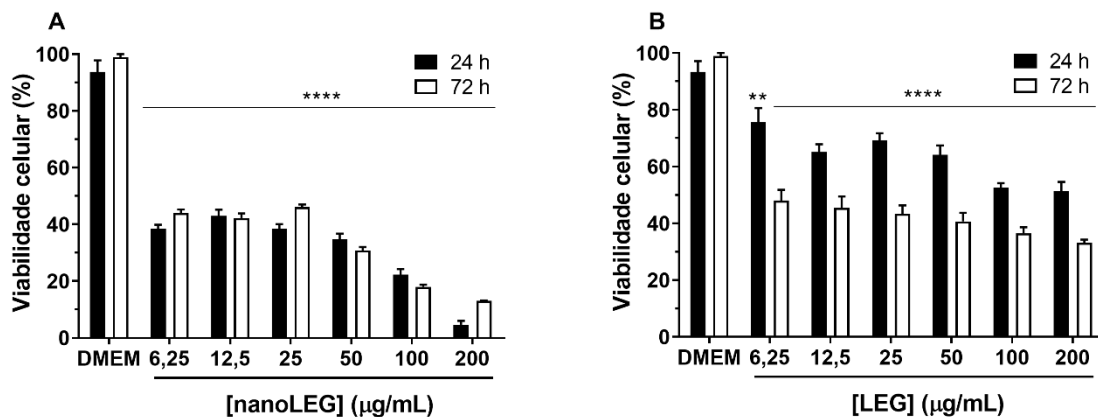


Figura 5. Efeito da nanoLEG 3,0 (A) e do LEG (B) em células de câncer de mama humano (MCF-7) após 24 e 72 horas de exposição. Valores expressos em médias \pm EPM. ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ versus grupo controle (DMEM).

O tratamento com LEG livre afetou significativamente ($p < 0,05$) a viabilidade celular, desde a menor concentração (6,25 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 5B). O efeito foi semelhante ao relatado em um estudo prévio realizado com LEG, onde se observou um efeito significativo em células MCF-7 em concentrações variando de 6,25 a 1.000 $\mu\text{g/mL}$, com CI_{50} de 29,85 e 5,96 $\mu\text{g/mL}$ em 24 e 72 horas, respectivamente (DOS SANTOS *et al.*, 2018).

As nanocápsulas de núcleo lipídico aumentaram os efeitos deletérios já observados para o LEG livre na linhagem MCF-7. Os dados demonstraram uma redução de 24,35% da viabilidade celular após a exposição ao LEG livre a 6,25 $\mu\text{g/mL}$, por 24 horas, enquanto reduções de 61,47% e 55,96% foram observadas para a mesma linhagem após a exposição a 6,25 $\mu\text{g/mL}$ de nanoLEG durante 24 e 72 horas, respectivamente. Estes resultados sugerem que o LEG tem sua atividade citotóxica em células cancerosas otimizada quando carregado em nanocápsulas de núcleo lipídico. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os tempos de exposição de 24 e 72 horas para a nanoLEG. Outros estudos relevantes corroboram estes resultados e demonstram que nanopartículas têm sido efetivas no melhoramento da atividade anticâncer de fármacos e substâncias bioativas, incluindo o licopeno. Resultados obtidos por Genç, Kutlu e Güney (2015) mostraram que o efeito

inibidor de nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com vitamina B12 foi significativamente maior que a vitamina B12 livre na linhagem cancerosa 5RP7 (fibroblastos murinos transformados por H-ras), com inibição máxima de 53% a 20 μM . Yang e colaboradores (2013) demonstraram que nanocarreadores lipídicos contendo paclitaxel, revestidos com ácido hialurônico, aumentaram a atividade antitumoral do fármaco em comparação com o paclitaxel livre em camundongos Kunming inoculados com a linhagem B16.

Nanopartículas lipídicas sólidas carreando *trans*-licopeno mostraram citotoxicidade aumentada ($\text{CI}_{50} = 77,84 \pm 0,89 \mu\text{g/mL}$) frente a células de câncer de mama da linhagem MCF-7 comparado ao licopeno livre ($84,06 \pm 0,81 \mu\text{g/mL}$) após exposição durante 24 horas (JAIN *et al.*, 2017). Outro estudo mostrou que o licopeno manteve sua toxicidade contra células MCF-7 quando incorporado em nanopartículas proteicas e que o processo de encapsulação não afetou sua atividade anticâncer (JAIN *et al.*, 2018). Entretanto, até o momento não há dados disponíveis na literatura sobre a atividade de nanocápsulas de poli- ϵ -coprolactona com núcleo lipídico contendo extrato de licopeno.

É importante mencionar que, embora não tenha sido possível determinar a CI_{50} no presente estudo, a redução na viabilidade celular observada após o tratamento com nanoLEG a 6,25 $\mu\text{g/mL}$ foi eficiente e satisfatória quando comparada a agentes quimioterápicos aprovados para uso clínico, tais como o 5-Fluorouracil ($\text{CI}_{50} = 10 \mu\text{M}$ ou 1,3 $\mu\text{g/mL}$) (HERNÁNDEZ-VARGAS *et al.*, 2006) e a doxorubicina ($\text{CI}_{50} = 375,804 \text{ nM}$ ou 0,204 $\mu\text{g/mL}$ de acordo com Lestari *et al.*, 2015 e $\text{CI}_{50} = 0,4 \mu\text{m}$ ou 0,217 $\mu\text{g/mL}$ segundo Meiyanto *et al.*, 2014).

Além disso, a análise morfológica das células MCF-7 revelou que as células do controle (Figura 6A) mostravam um contorno citoplasmático bem definido, núcleo e nucléolos evidentes, basofilia preservada, granulosidade citoplasmática esperada para esta linhagem, arranjo típico em domo, formando uma monocamada, características sugestivas de células sem danos. Em contraste, as células tratadas com H_2O_2 (Figura 6B) exibiam características que, juntas, são sugestivas para dano celular, como eosinofilia celular e nuclear aumentada, muitos *debris* celulares, células menores e retraídas, mas ainda unidas e poligonais; algumas células encontravam-se em processo de apoptose, menores e mais coradas. O H_2O_2 é reconhecido por

promover morte celular por mecanismos intracelulares que resultam em apoptose (MARTÍN-GUERRERO *et al.*, 2017).

As células MCF-7 tratadas com nanoLEG 3,0 a 200 µg/mL por 24 horas (Figura 6C) exibiam alterações morfológicas proeminentes quando comparadas ao grupo que recebeu DMEM, com danos visíveis à integridade celular. É possível observar eosinofilia celular e nuclear aumentada, muitas células em processo apoptótico, com núcleos menores e picnóticos e muitos *debris*, sugerindo morte celular. Estes dados corroboram a atividade citotóxica observada para a nanoLEG em células MCF-7 pelo método do MTT. De acordo com Dos Santos e colaboradores (2018), o LEG causou detenção do ciclo celular, fragmentação do DNA, modificações na membrana mitocondrial e alterações morfológicas relacionadas à granularidade e ao tamanho das células MCF-7, levando a efeitos citostáticos e citotóxicos nas células de câncer de mama via indução de uma via semelhante a apoptose. Entretanto, o mecanismo exato pelo qual a nanoLEG desempenhou os efeitos observados na linhagem cancerosa ainda precisa ser melhor explorado.

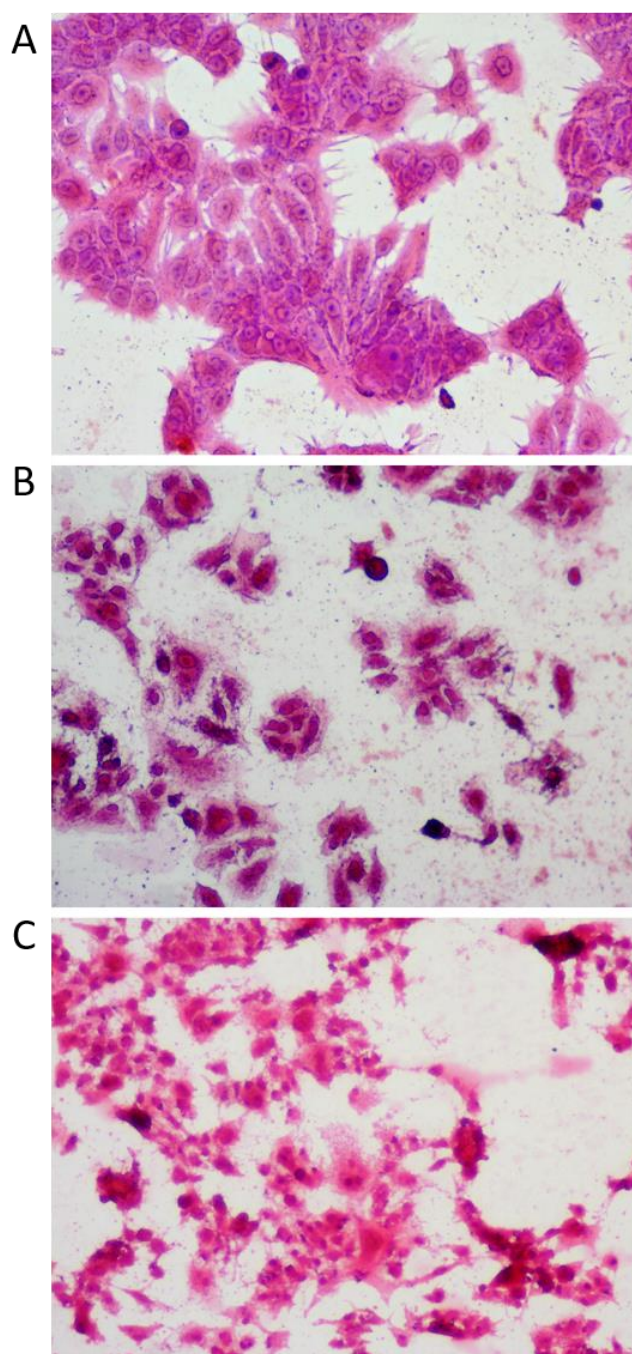


Figura 6. Fotomicrografias representativas das células MCF-7 tratadas com DMEM (A), H₂O₂ (B) e nanoLEG 3,0 em uma concentração de 200 µg/mL (C) por 24 horas. As células foram coradas com hematoxilina e eosina e as imagens foram capturadas em aumento de 100x.

3.4. A nanoLEG inibiu a ativação de NF- κ B e a produção de EROs induzidas por LPS em células da micróglia

Os efeitos da nanoLEG no estresse oxidativo e na sinalização intracelular foram avaliados em células microgлияis humanas estimuladas com LPS, por meio de

experimentos de imagem. A nanoLEG 3,0 (200 µg/mL) inibiu a ativação de NF-κB, bem como a produção de EROs, em uma análise de 40 minutos (Figura 7). A figura 7A demonstra que, após 15 minutos de incubação, houve uma evidente inibição de NF-κB nas células tratadas com nanoLEG em comparação às células não tratadas. O papel do fator de transcrição NF-κB é bem descrito na regulação de processos fisiológicos, tais como respostas imunes, inflamação e ciclo celular (BAUD, KARIN, 2009). Uma vez que o NF-κB estimula a proliferação celular e previne a apoptose, ele desempenha um importante papel no desenvolvimento e na progressão do câncer (TANIGUCHI, KARIN, 2018). Além disso, a inflamação tem sido citada como uma característica favorável à formação de tumor, facilitando a aquisição de marcadores do câncer e, por esta razão, o NF-κB tem sido considerado um potencial alvo terapêutico (GRETEN; GRIVENNIKOV, 2019; HANAHAN; WEINBERG, 2011; TANIGUCHI; KARIN, 2018). Estudos prévios demonstraram que o licopeno isolado, em concentrações de 1-2 µg/mL, foi capaz de reduzir a atividade transcricional do NF-κB, conforme observado pelo ensaio de gene repórter em células de câncer de mama e de próstata (ASSAR et al., 2016). Em ensaio imunohistoquímico, o tecido obtido da pata inflamada de animais tratados com licopeno purificado da goiaba vermelha (LPG) demonstrou baixa imunopositividade para o NF-κB (26,20±5,84 células imunocoradas/5 campos) quando comparado ao grupo controle que recebeu carragenana (72,75±11,31 células imunocoradas/5 campos), sugerindo que o licopeno de goiaba pode prevenir a expressão de genes envolvidos no processo inflamatório (VASCONCELOS *et al.*, 2017).

É notável que nos primeiros minutos (< 15 min) a diferença comportamental entre o grupo LPS e o grupo nanoLEG + LPS é pequena (Figura 7A), o que sugere que a manutenção e a estabilidade do LEG no sistema nanoestruturado pode reduzir a velocidade de liberação do licopeno e, após a ruptura do sistema, o efeito redutor no NF-κB é, então, observado. Conforme demonstrado previamente, alterações em vias metabólicas podem ser avaliados em um sistema de células vivas por meio da utilização de sondas FRET nos primeiros momentos de contato com o agente externo (SOUSA *et al.*, 2020). Uma vez que estes estudos foram conduzidos em células gliais, a atividade da nanoLEG frente à neuroinflamação e até mesmo a manutenção da atividade constituinte do LEG nesta formulação são esperadas.

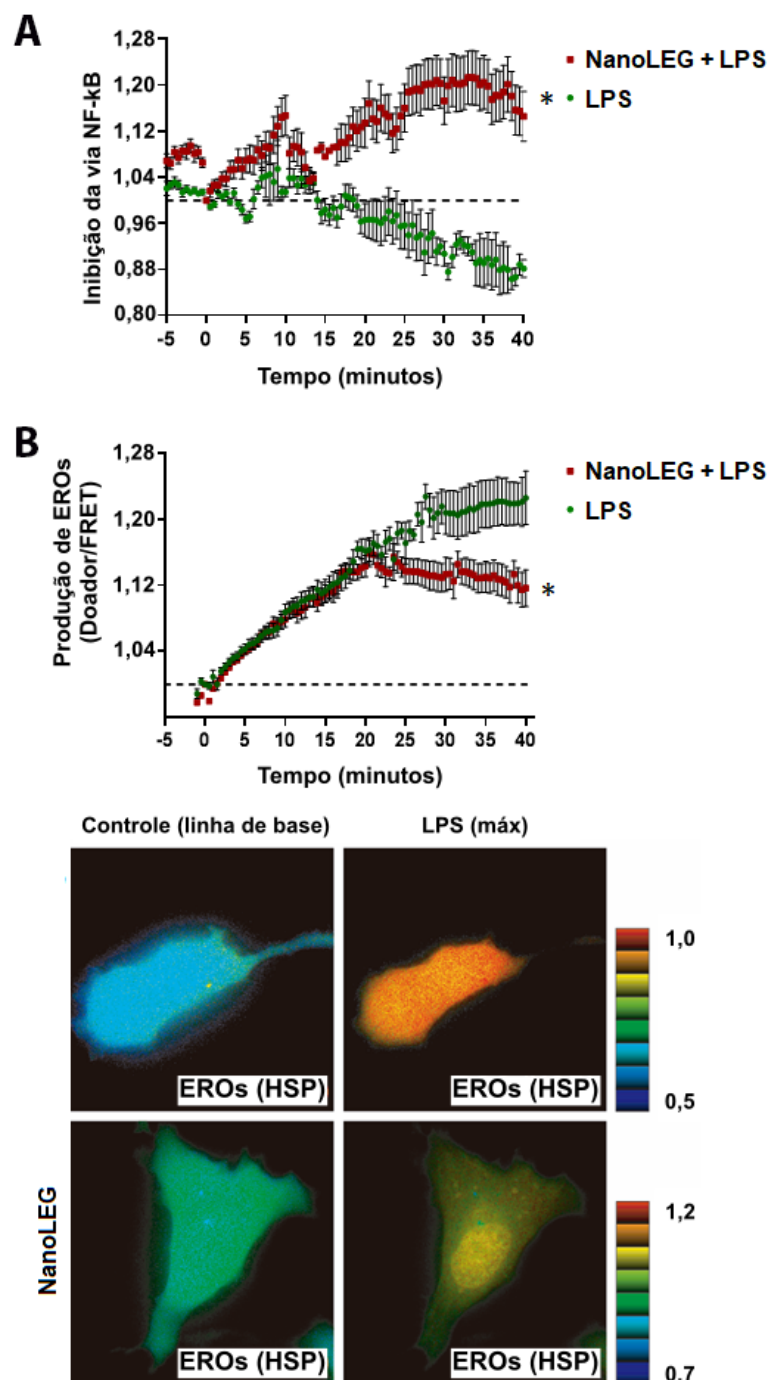


Figura 7. (A) Inibição da via do NF- κ B em células HMC3 tratadas com nanoLEG (200 μ g/mL) sob estimulação por LPS (sinais fluorescentes normalizados). Mudanças na intensidade de fluorescência de acordo com o intervalo de tempo são demonstradas para o sensor inibidor da via do NF- κ B ($n = 7$ células). * $p < 0,001$ versus grupo LPS. (B) Produção de EROs por células HMC3 tratadas com nanoLEG expressando o biossensor pFRET-HSP33 cys (biossensor HSP) sob estimulação por LPS (doador normalizado/proporções FRET). Medidas de geração de EROs de acordo com o tempo são demonstradas ($n = 7-9$ células). * $p < 0,005$ versus grupo LPS. As imagens abaixo são representativas de células microgliais humanas expressando o biossensor HSP.

Além disso, a nanoLEG 3,0 reduziu a produção de EROs em células microgliais humanas estimuladas com LPS (Figura 7B). De modo interessante, as mesmas características encontradas na curva prévia da via de inibição do NF- κ B também foram observadas, onde os efeitos para os grupos controle e experimentais são semelhantes nos primeiros minutos de incubação, mas na curva de produção de EROs, um efeito pronunciado só é observado após 20 minutos. Este comportamento já era esperado, uma vez que a cadeia de eventos que levam à redução de EROs pode estar relacionada à inibição da via do NF- κ B intracelular, embora este evento relacionado aos mecanismos do licopeno ainda precise de maiores investigações. De maneira geral, estes resultados demonstram que os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios do licopeno da goiaba vermelha, previamente descritos na literatura, são preservados na formulação nanoLEG.

A produção excessiva de EROs, causada pela disfunção mitocondrial, pode facilitar o crescimento de células tumorais e causar efeito antiapoptótico pela ativação de vias de sinalização de sobrevivência, como a via do NF- κ B e a expressão de seus genes-alvo (KARIN *et al.*, 2002). Jeong, Lim e Kim (2019) demonstraram que o licopeno reduziu o nível de EROs intracelular e mitocondrial, a atividade do NF- κ B e a expressão de genes de sobrevivência dependentes de NF- κ B em células PANC-1 (células de câncer pancreático). Além disso, o licopeno reduziu a viabilidade celular, com aumento da atividade da caspase-3 e da relação BAX/BCL-2 em células PANC-1. A partir de então, mais estudos precisam ser conduzidos para esclarecer os mecanismos de ação da nanoLEG. Finalmente, estudos para aumentar a estabilidade da nanoLEG podem levar a novas estratégias para modular o processo inflamatório que possa estar associado à promoção tumoral.

3.5. A nanoLEG não apresentou atividade hemolítica

A nanoLEG 3,0 (Figura 8A) não afetou a viabilidade de eritrócitos de carneiro nas concentrações testadas (6,25 a 200 μ g/mL), indicando biocompatibilidade frente ao modelo celular utilizado. Dos Santos e colaboradores (2018) avaliaram a atividade hemolítica do LEG em eritrócitos de carneiro e demonstraram que o tratamento apenas causou 5% de redução na viabilidade celular em uma concentração de 800 μ g/mL, o que é muito maior do que a janela de concentração testada no presente

estudo. Em ambos os casos, o valor da CH_{50} (concentração hemolítica média) não pôde ser determinado, indicando ausência de citotoxicidade.

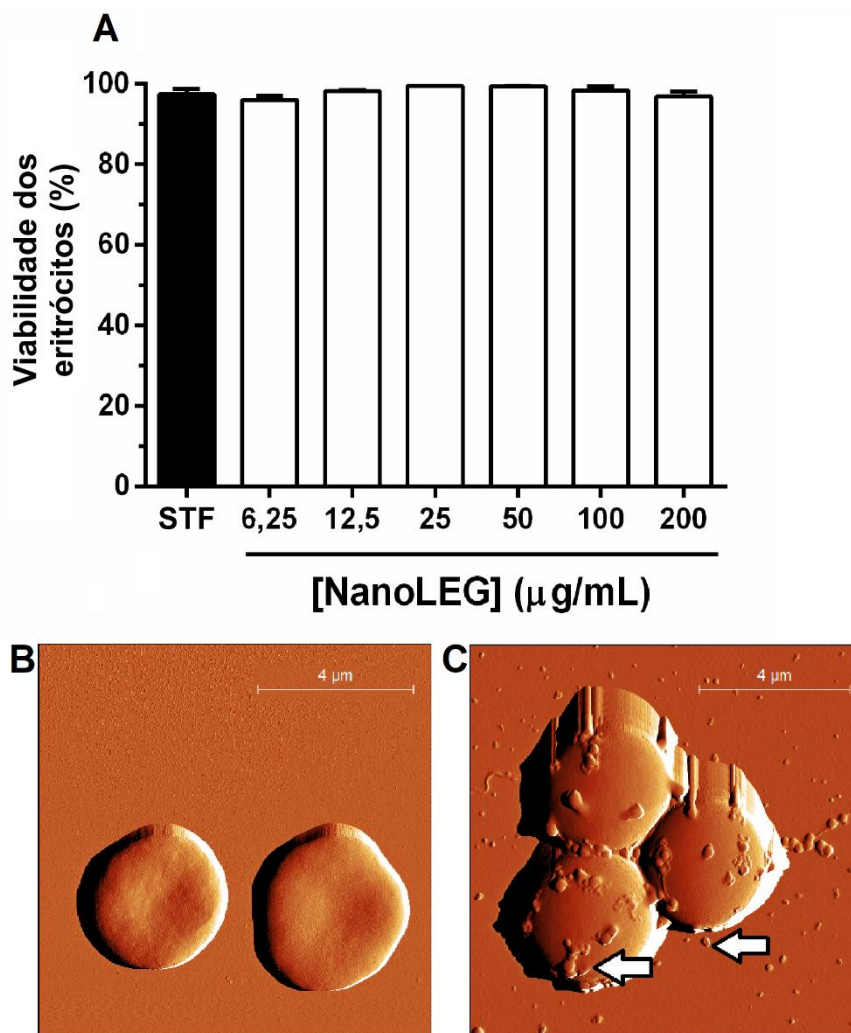


Figura 8. Efeito citotóxico da nanoLEG em eritrócitos de carneiro (A) e micrografias obtidas por Microscopia de Força Atômica para os eritrócitos de carneiro tratados com STF (Controle, B) e nanoLEG (200 $\mu\text{g/mL}$, C). Os valores estão expressos em média \pm EPM. Os pequenos pontos indicados pelas setas correspondem a nanopartículas. STF = salina tamponada com fosfato.

Adicionalmente, a morfologia dos eritrócitos, avaliada por Microscopia de Força Atômica, revela que a nanoLEG a 200 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 8C) causou alterações em comparação à morfologia das células do grupo controle (Figura 8B), as quais exibem o típico formato discoide bicôncavo. As células mostraram morfologia globular quando tratadas com as nanocápsulas na maior concentração testada no ensaio de hemólise. Mesmo que tenha havido uma alteração morfológica, estes dados mostram que as nanopartículas em alta dose não causa prejuízos à membrana eritrocitária, de forma

que as alterações possivelmente estão mais relacionadas a um efeito da osmolaridade do meio no experimento do que a uma ação citotóxica. A hemocompatibilidade das nanopartículas é considerada um parâmetro crítico para aplicações em saúde, uma vez que os eritrócitos representam uma alta fração da composição sanguínea. Em estudos prévios, nanopartículas com polímeros biodegradáveis também exibiram hemocompatibilidade. Este efeito foi demonstrado por Bender e colaboradores (2012) para nanocápsulas de núcleo lipídico estabilizadas com polisorbato-80 e lecitina *in vitro* e por Bulcão e colaboradores (2013) para nanocápsulas de poli- ϵ -copolactona com núcleo lipídico revestidas com polisorbato 80, *in vivo*.

4. Conclusão

Os resultados encontrados no presente estudo trazem evidências de que as nanocápsulas de núcleo lipídico produzidas com uma parede de poli- ϵ -copolactona revestidas com polisorbato 80 foram eficientemente aplicadas para a estabilização do extrato rico em licopeno de goiaba, gerando um produto com propriedades físico-químicas e biológicas satisfatórias. As nanocápsulas de núcleo-lipídico otimizaram a estabilidade do licopeno a 5°C por 7 meses, melhoraram sua toxicidade frente a células cancerosas da linhagem MCF-7, inibiram a produção de EROs e NF- κ B em células microgliais humanas e não afetaram a integridade de membrana em eritrócitos, o que enfatiza seu potencial uso como um tratamento para o câncer. Mais estudos utilizando modelos biológicos adicionais ainda são requeridos para entender melhor e caracterizar os mecanismos anticâncer observados para a nanoLEG, bem como sua segurança, visando sua aplicação como um nutracêutico baseado em nanotecnologia na promoção de saúde.

Referências bibliográficas

- AMORIM, A. *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant activity improvement of lycopene from guava on nanoemulsifying system. **Journal of Dispersion Science and Technology**, p. 1–11, 2 mar. 2020.
- AMORIM, A. G. *et al.* 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**, v. 120, n. 3, p. 1700330, 2018.
- AMORIM, A. G. N.; LEITE, J. R. S. A.; PINTADO, M. E. **Obtainment process of carotenoids concentrate rich in lycopene from red fruits and/or red fruit pulp.** Depositante: Universidade Católica Portuguesa. Patente nº EP3400812 A1, 2018.
- ANARJAN, N.; JOUYBAN, A. Preparation of lycopene nanodispersions from tomato processing waste: Effects of organic phase composition. **Food and Bioproducts Processing**, v. 103, p. 104–113, maio 2017.
- ARATHI, B. P. *et al.* An Improved Method of UPLC-PDA-MS/MS analysis of lycopene isomers. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 8, p. 1962–1969, set. 2015.
- ASSAR, E. A. *et al.* Lycopene acts through inhibition of I κ B kinase to suppress NF- κ B signaling in human prostate and breast cancer cells. **Tumor Biology**, v. 37, n. 7, p. 9375–9385, jul. 2016.
- BAPAT, P. *et al.* Tocophersolan stabilized lipid nanocapsules with high drug loading to improve the permeability and oral bioavailability of curcumin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 560, p. 219–227, abr. 2019.
- BAUD, V.; KARIN, M. Is NF- κ B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 1, p. 33–40, jan. 2009.
- BENDER, E. A. *et al.* Hemocompatibility of poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 426, n. 1–2, p. 271–279, abr. 2012.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, ago. 2016.
- BULCÃO, R. P. *et al.* Acute and subchronic toxicity evaluation of poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules in rats. **Toxicological Sciences**, v. 132, n. 1, p. 162–176, mar. 2013.
- COMŞA, Ş.; CIMPEAN, A. M.; RAICA, M. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. **Anticancer research**, v. 35, n. 6, p. 3147–3154, 2015.

DA SILVA, G. R. *et al.* Ocular biocompatibility of dexamethasone acetate loaded poly(ϵ -caprolactone) nanofibers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 142, p. 20–30, set. 2019.

DE CARVALHO, T. G. *et al.* Spherical neutral gold nanoparticles improve anti-inflammatory response, oxidative stress and fibrosis in alcohol-methamphetamine-induced liver injury in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 548, n. 1, p. 1–14, set. 2018.

DI MASCO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 274, n. 2, p. 532–538, 1989.

DOS SANTOS, P. P. *et al.* Development of lycopene-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and stability study. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, n. 2, p. 107, fev. 2015.

DOS SANTOS, P. P. *et al.* Stability study of lycopene-loaded lipid-core nanocapsules under temperature and photosensitization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 190–195, set. 2016.

DOS SANTOS, R. C. *et al.* 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**, v. 105, p. 184–196, 2018.

EATON, P. *et al.* A direct comparison of experimental methods to measure dimensions of synthetic nanoparticles. **Ultramicroscopy**, v. 182, p. 179–190, 2017.

EATON, P.; WEST, P. **Atomic force microscopy**. United States: Oxford University Press, 2010. ISBN: 978-0-19-957045-4.

EJIKE, D. E. *et al.* Lycopene attenuates diabetes-induced oxidative stress in Wistar rats. **Journal of Diabetes and Endocrinology**, v. 9, n. 2, p. 11–19, 31 maio 2018.

ELHESAISY, N.; SWIDAN, S. Trazodone loaded lipid core poly-(ϵ -caprolactone) nanocapsules: development, characterization and in vivo antidepressant effect evaluation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1964, dez. 2020.

FAN, Y. *et al.* Absorption and antioxidant activity of lycopene nanoliposomes in vivo. **Current Topics in Nutraceutical Research**, v. 9, n. 4, 2011.

FIEL, L. A. *et al.* Diverse deformation properties of polymeric nanocapsules and lipid-core nanocapsules. **Soft Matter**, v. 7, n. 16, p. 7240, 2011.

FILIFE, V.; HAWE, A.; JISKOOT, W. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 5, p. 796–810, maio 2010.

FROZZA, R. L. *et al.* Characterization of trans-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules and tissue distribution studies in rats. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6, n. 6, p. 694–703, 1 dez. 2010.

GENÇ, L.; KUTLU, H. M.; GÜNEY, G. Vitamin B₁₂-loaded solid lipid nanoparticles as a drug carrier in cancer therapy. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 20, n. 3, p. 337–344, 3 abr. 2015.

GONZÁLEZ-REZA, R. M. *et al.* Effect of sucrose concentration and pH onto the physical stability of β -carotene nanocapsules. **LWT**, v. 90, p. 354–361, abr. 2018.

GRANATA, G. *et al.* Hydroxycinnamic acids loaded in lipid-core nanocapsules. **Food Chemistry**, v. 245, p. 551–556, abr. 2018.

GRETEN, F. R.; GRIVENNIKOV, S. I. Inflammation and cancer: triggers, mechanisms, and consequences. **Immunity**, v. 51, n. 1, p. 27–41, jul. 2019.

GRIFFITHS, D.; CARNELL-MORRIS, P.; WRIGHT, M. Nanoparticle Tracking Analysis for multiparameter characterization and counting of nanoparticle suspensions. In: FERRARI, E.; SOLOVIEV, M. (Eds.). **Nanoparticles in Biology and Medicine**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer US, v. 2118p. 289–303, 2020.

GRILLO, R. *et al.* Poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules as carrier systems for herbicides: physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 231–232, p. 1–9, set. 2012.

GUZY, R. D. *et al.* Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. **Cell Metabolism**, v. 1, n. 6, p. 401–408, jun. 2005.

HA, T. V. A. *et al.* Antioxidant activity and bioaccessibility of size-different nanoemulsions for lycopene-enriched tomato extract. **Food Chemistry**, v. 178, p. 115–121, jul. 2015.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

HERNÁNDEZ-VARGAS, H. *et al.* Transcriptional profiling of MCF7 breast cancer cells in response to 5-Fluorouracil: relationship with cell cycle changes and apoptosis, and identification of novel targets of p53. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 5, p. 1164–1175, 1 set. 2006.

HOW, C. W.; ABDULLAH, R.; ABBASALIPOURKABIR, R. Physicochemical properties of nanostructured lipid carriers as colloidal carrier system stabilized with polysorbate 20 and polysorbate 80. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 9, p. 1684–1689, 2011.

HUANG, J. *et al.* Effects of nanoparticle size on cellular uptake and liver MRI with polyvinylpyrrolidone-coated iron oxide nanoparticles. **ACS Nano**, v. 4, n. 12, p. 7151–7160, 28 dez. 2010.

ISLAMIAN, J. P.; MEHRALI, H. Lycopene as a carotenoid provides radioprotectant and antioxidant effects by quenching radiation-induced free radical singlet oxygen: an overview. **Cell J (Yakhteh)**, v. 16, n. 4, jun. 2017.

JAIN, A. *et al.* Fabrication and functional attributes of lipidic nanoconstructs of lycopene: An innovative endeavour for enhanced cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 152, p. 482–491, abr. 2017.

JAIN, A. *et al.* Lycopene loaded whey protein isolate nanoparticles: an innovative endeavor for enhanced bioavailability of lycopene and anti-cancer activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 546, n. 1–2, p. 97–105, jul. 2018.

JANABI, N. *et al.* Establishment of human microglial cell lines after transfection of primary cultures of embryonic microglial cells with the SV40 large T antigen. **Neuroscience Letters**, v. 195, n. 2, p. 105–108, ago. 1995.

JEONG, Y.; LIM, J.; KIM, H. Lycopene inhibits reactive oxygen species-mediated NF- κ B signaling and induces apoptosis in pancreatic cancer cells. **Nutrients**, v. 11, n. 4, p. 762, 1 abr. 2019.

JINDAL, A. B. The effect of particle shape on cellular interaction and drug delivery applications of micro- and nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 532, n. 1, p. 450–465, out. 2017.

KARIN, M. *et al.* NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 4, p. 301–310, abr. 2002.

KIM, A. *et al.* Validation of size estimation of Nanoparticle Tracking Analysis on polydisperse macromolecule assembly. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 2639, dez. 2019.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles-based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1–18, jan. 2010.

LEITE, E. A. *et al.* Poly-Caprolactone nanocapsules morphological features by Atomic Force Microscopy. **Microscopy and Microanalysis**, v. 11, n. S03, p. 48–51, dez. 2005.

LEONG, H. Y. *et al.* Natural red pigments from plants and their health benefits: a review. **Food Reviews International**, v. 34, n. 5, p. 463–482, 4 jul. 2018.

LESTARI, P. *et al.* Combinational effects of n-hexane extract of poguntano leaves (*Picria fel-terrae* Lour.) with doxorubicin on MCF-7 breast cancer cells. **J Chem Pharm Res**, v. 7, n. 5, p. 353–355, 2015.

MARTÍN-GUERRERO, S. M. *et al.* Poly(ADP-ribose)polymerases inhibitors prevent early mitochondrial fragmentation and hepatocyte cell death induced by H₂O₂. **PLOS ONE**, v. 12, n. 10, p. e0187130, 26 out. 2017.

MEIYANTO, E. *et al.* Curcumin and its analogues (PGV-0 and PGV-1) enhance sensitivity of resistant MCF-7 cells to doxorubicin through inhibition of HER2 and NF- κ B activation. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 1, p. 179–184, 15 jan. 2014.

MORTENSEN, A.; SKIBSTED, L. H. Kinetics and mechanism of the primary steps of degradation of carotenoids by acid in homogeneous solution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 2, p. 279–286, fev. 2000.

NAZEMIYEH, E. *et al.* Formulation and physicochemical characterization of lycopene-loaded solid lipid nanoparticles. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 6, n. 2, p. 235–241, 29 jun. 2016.

PETYAEV, I. M. *et al.* Effect of lycopene supplementation on cardiovascular parameters and markers of inflammation and oxidation in patients with coronary vascular disease. **Food Science & Nutrition**, v. 6, n. 6, p. 1770–1777, set. 2018.

PHAN-THI, H.; WACHÉ, Y. Isomerization and increase in the antioxidant properties of lycopene from *Momordica cochinchinensis* (gac) by moderate heat treatment with UV–Vis spectra as a marker. **Food Chemistry**, v. 156, p. 58–63, ago. 2014.

QIAN, C. *et al.* Physical and chemical stability of β -carotene-enriched nanoemulsions: Influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1221–1229, jun. 2012.

RAO, A. V.; AGARWAL, S. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: A review. **Nutrition Research**, v. 19, n. 2, p. 305–323, fev. 1999.

RAVIADARAN, R. *et al.* Optimization of palm oil in water nano-emulsion with curcumin using microfluidizer and response surface methodology. **LWT**, v. 96, p. 58–65, 2018.

REHMAN, A. *et al.* Carotenoid-loaded nanocarriers: a comprehensive review. **Advances in colloid and interface science**, v. 275, p. 102048, 2020.

REZAEI, A. *et al.* Improving the solubility and in vitro cytotoxicity (anticancer activity) of ferulic acid by loading it into cyclodextrin nanosponges. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 14, p. 4589–4599, jun. 2019.

ROSTAMABADI, H.; FALSAFI, S. R.; JAFARI, S. M. Nanoencapsulation of carotenoids within lipid-based nanocarriers. **Journal of Controlled Release**, v. 298, p. 38–67, mar. 2019.

SHARIFFA, Y. N. *et al.* Producing a lycopene nanodispersion: formulation development and the effects of high pressure homogenization. **Food Research International**, v. 101, p. 165–172, nov. 2017.

SHCHERBAKOVA, D. M. *et al.* Bright monomeric near-infrared fluorescent proteins as tags and biosensors for multiscale imaging. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 12405, nov. 2016.

SINWOO HWANG; JOO LIM; HYEYOUNG KIM. Inhibitory effect of lycopene on amyloid- β -induced apoptosis in neuronal cells. **Nutrients**, v. 9, n. 8, p. 883, 16 ago. 2017.

SOCODATO, R. *et al.* Redox tuning of Ca²⁺ signaling in microglia drives glutamate release during hypoxia. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 118, p. 137–149, abr. 2018.

SOCODATO, R. *et al.* Microglia dysfunction caused by the loss of rhoa disrupts neuronal physiology and leads to neurodegeneration. **Cell Reports**, v. 31, n. 12, p. 107796, jun. 2020.

SOUSA, N. A. *et al.* Novel ocellatin peptides mitigate Ips-induced ROS formation and NF-κB activation in microglia and hippocampal neurons. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 2696, dez. 2020.

SRIVASTAVA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Lycopene; chemistry, biosynthesis, metabolism and degradation under various abiotic parameters. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 41–53, jan. 2015.

TAN, B.; SODERSTROM, D. N. Qualitative aspects of UV-vis spectrophotometry of beta-carotene and lycopene. **Journal of Chemical Education**, v. 66, n. 3, p. 258, mar. 1989.

TANIGUCHI, K.; KARIN, M. NF-κB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 5, p. 309–324, maio 2018.

TORGE, A. *et al.* Ciprofloxacin-loaded lipid-core nanocapsules as mucus penetrating drug delivery system intended for the treatment of bacterial infections in cystic fibrosis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 527, n. 1–2, p. 92–102, jul. 2017.

VASCONCELOS, A. G. *et al.* 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**, v. 99, p. 959–968, set. 2017.

VENTURINI, C. G. *et al.* Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, n. 1–3, p. 200–208, fev. 2011.

YANG, X. *et al.* Hyaluronic acid-coated nanostructured lipid carriers for targeting paclitaxel to cancer. **Cancer Letters**, v. 334, n. 2, p. 338–345, jul. 2013.

YOO, J.-W.; CHAMBERS, E.; MITRAGOTRI, S. Factors that control the circulation time of nanoparticles in blood: challenges, solutions and future prospects. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 21, p. 2298–2307, 2010.

ZANOTTO-FILHO, A. *et al.* Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83, n. 2, p. 156–167, fev. 2013.

ZARE, M. *et al.* Improving the cancer prevention/treatment role of carotenoids through various nano-delivery systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 3, p. 522–534, 4 fev. 2021.

ZHAO, J.; STENZEL, M. H. Entry of nanoparticles into cells: the importance of nanoparticle properties. **Polymer Chemistry**, v. 9, n. 3, p. 259–272, 2018.

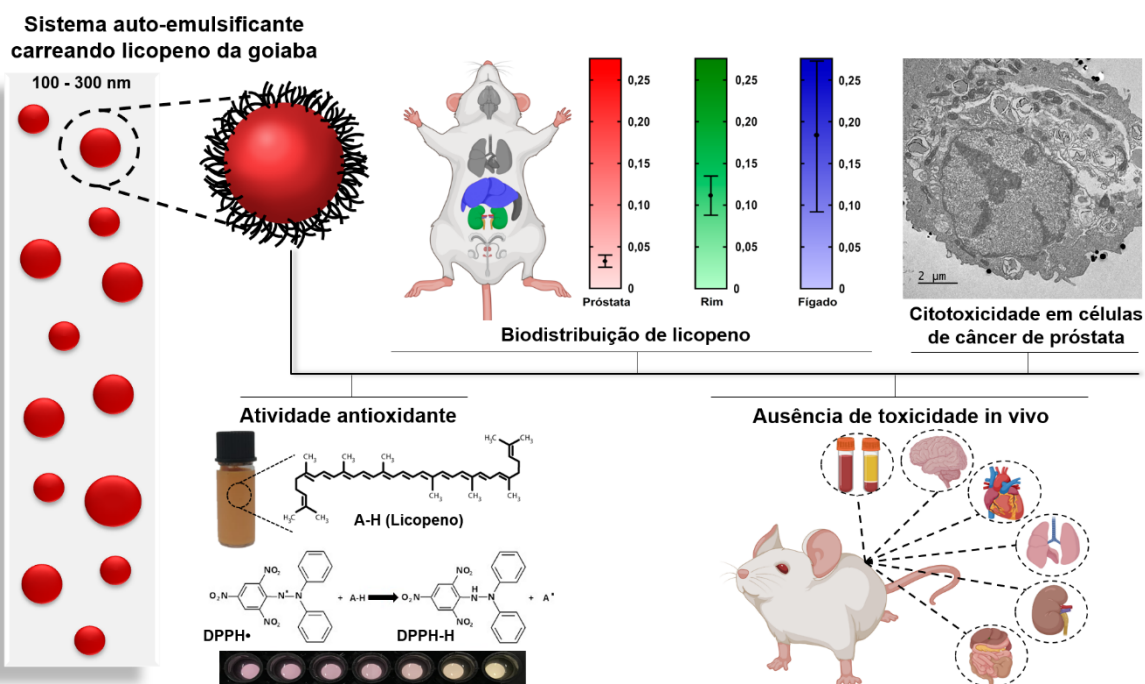
ZHU, Z. *et al.* Comparison of natural and synthetic surfactants at forming and stabilizing nanoemulsions: Tea saponin, Quillaja saponin, and Tween 80. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 536, p. 80–87, fev. 2019.

ZUORRO, A. *et al.* Kinetics of lycopene degradation in sunflower and grape seed oils. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 34, n. 5, p. 2229–2235, 20 out. 2018.

CAPÍTULO II

Artigo submetido ao periódico Cancer Nanotechnology em 2021.

ISSN: 1477-3155



Promissor sistema autoemulsificante de entrega de droga carregando licopeno de goiaba (*Psidium guajava* L.): toxicidade *in vivo*, biodistribuição e citotoxicidade em células de câncer de próstata

Resumo

Um sistema autoemulsificante de entrega de droga carregando licopeno purificado de goiaba vermelha (nanoLPG) foi produzido e caracterizado. A atividade antioxidante, a toxicidade *in vivo*, a distribuição nos tecidos e a citotoxicidade em células de carcinoma de próstata humano (DU-145) foram avaliadas. A NanoLPG exibiu propriedades físico-químicas satisfatórias. Os parâmetros de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta sofreram alterações insignificantes durante os 12 meses de armazenamento a 5°C. NanoLPG exibiu atividade de eliminação de radicais livres. Os estudos *in vivo* revelaram ausência de alterações significativas nos parâmetros clínicos, comportamentais, hematológicos, bioquímicos e histopatológicos em camundongos tratados por via oral com nanoLPG a 10 mg/kg por 28 dias. Além disso, a nanoLPG entregou com sucesso licopeno ao fígado, rim e próstata, bem como melhorou sua citotoxicidade contra células DU-145, por via independente de necrose e apoptose clássicas, de acordo com dados de citometria de fluxo e microscopia eletrônica de transmissão. Assim, a nanoLPG é um candidato promissor e biosseguro para sistema de entrega de licopeno como um produto baseado em nanotecnologia aplicado à saúde.

Palavras-chave: nanomedicina; autoemulsionante; goiaba; carotenoides; antitumoral.

1. Introdução

O licopeno (C₄₀H₅₆) é um pigmento de cadeia alifática que pertence ao grupo dos carotenoides, ocorrendo naturalmente em frutas e vegetais vermelho-alaranjados, bem como em fungos, bactérias e algas (PRZYBYLSKA, 2020). Ele é um antioxidante bem conhecido e tem sido associado à proteção contra substâncias tóxicas sintéticas ou naturais, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, diabetes e muitos tipos

de câncer (EJIKE *et al.*, 2018; HEDAYATI *et al.*, 2019; PRZYBYLSKA, 2020). Conforme descrito previamente, extratos ricos em licopeno foram satisfatoriamente obtidos a partir da goiaba vermelha (*Psidium guajava* L.) e apresentaram alta atividade antioxidante ($2.890 \pm 34 \mu\text{M}$ Trolox/g pelo método do ABTS) (AMORIM *et al.*, 2018). A administração intraperitoneal e oral de um extrato rico em licopeno de goiaba (LEG) e do licopeno purificado da goiaba vermelha (LPG) inibiu a inflamação aguda causada por carragenina em camundongos *Swiss* em doses de 50 e 12,5 mg/kg, respectivamente (VASCONCELOS *et al.*, 2017). Além disso, o LEG reduziu significativamente a viabilidade de células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) ($\text{CI}_{50} = 29,85$ e $5,96 \mu\text{g/mL}$ em de 24 e 72 horas, respectivamente), bem como diminuiu as taxas de triglicerídeos e biomarcadores de peroxidação lipídica em hamsters (DA SILVA BRITO *et al.*, 2019; DOS SANTOS *et al.*, 2018).

Entretanto, o licopeno pode sofrer isomerização ou completa degradação quando exposto à luz, ao oxigênio e a variações de temperatura, além de exibir baixa biodisponibilidade oral e solubilidade em água, o que representa um desafio para o desenvolvimento de produtos comerciais contendo carotenoides (CHERNYSHOVA *et al.*, 2019; SRIVASTAVA; SRIVASTAVA, 2015). Neste contexto, a nanobiotecnologia tem sido vista como uma alternativa inovadora para melhorar a estabilidade e as atividades biológicas deste composto. Por exemplo, nanocápsulas de núcleo lipídico com uma parede de poli- ϵ -coprolactona revestidas com polisorbato 80 foram eficientemente aplicadas para estabilizar o LEG por 7 meses e melhorar sua atividade citotóxica contra câncer de mama (VASCONCELOS *et al.*, 2020).

Dentre os principais nanocarreadores descritos na literatura, os sistemas autoemulsificantes de entrega de drogas (SEDDS) têm emergido rapidamente nos últimos anos como um sistema atrativo para carrear moléculas bioativas, com o objetivo de propor aplicações na indústria alimentícia, cosmética, química e farmacêutica. Os SEDDS apresentam alta capacidade em melhorar a solubilidade em água, a estabilidade físico-química e a biodisponibilidade oral de compostos lipofílicos, são termodinamicamente estáveis e facilmente produzidos (BETAGERI, 2019; SINGH, BAJPAI, MISHRA, 2020). Trata-se de um método de emulsificação espontânea, o qual utiliza óleos, surfactantes e solventes, mas é diferente da emulsificação convencional (TRAN, PARK, 2021). A emulsificação por SEDDS é

realizada, inicialmente, por meio de uma mistura de óleo com surfactante, em agitação suave, seguido pela diluição na fase aquosa (TRAN; PARK, 2021; ZHAO *et al.*, 2020).

No presente estudo, uma formulação promissora utilizando um sistema autoemulsificante de entrega de drogas para o licopeno purificado da goiaba vermelha, denominado nanoLPG, é apresentada. Ademais, este trabalho avaliou suas características físico-químicas, atividade antioxidante, toxicidade *in vivo*, distribuição tecidual e citotoxicidade *in vitro* contra células de câncer de próstata humano, para avaliar sua potencial aplicação como um produto anticâncer baseado em nanobiotecnologia.

2. Material e métodos

2.1. Reagentes

Etanol (Dinâmica), diclorometano (Shalab S. L.), acetona (Dinâmica) e dimetilsulfóxido (DMSO, Dinâmica) de grau analítico, bem como acetonitrila (Merck), metanol (Merck), N-hexano (Tedia) e acetato de amônia (J.T. Baker) de grau cromatográfico foram adquiridos. Clorofórmio, polisorbato 80 (Tween[®] 80), monostearato de sorbitano (Span[®] 60), padrão de licopeno de tomate (L9879, ≥ 90%), Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil) e MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difeniltetrazólio) foram comprados da Sigma-Aldrich Chemical Co. Óleo de coco natural extravirgem (*Cocos nucifera* L., Copra) foi comprado em uma loja especializada em óleos de um mercado local, em Brasília, DF, Brasil. O meio de cultura *Dubelco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), soro fetal bovino (SFB), tripsina-EDTA (0,5%) e a solução de antibióticos foram comprados da LGC Biotecnologia.

2.2. Produção do licopeno purificado da goiaba vermelha

O licopeno purificado da goiaba vermelha (LPG) foi produzido de acordo com a metodologia de Amorim e colaboradores (2018) e detalhada na patente número BR 102016030594-2 (AMORIM, LEITE, ROPKE, 2016). Goiabas vermelhas (*Psidium guajava* L.), em alto grau de maturação, foram adquiridas em um mercado local na

cidade de Parnaíba, Piauí. As frutas (500 g) foram submetidas a desidratação com etanol e extração com diclorometano em agitação ultrassônica. O extrato foi, posteriormente, filtrado em papel filtro quantitativo e seco sob pressão reduzida (50 mbar), à temperatura ambiente, em um rotaevaporador R-215 (Buchi, Suíça), sob baixa luminosidade. Subsequentemente, o extrato foi submetido à cristalização a -20°C e o licopeno purificado foi obtido por lavagens com etanol e clorofórmio. Após a extração e purificação, o licopeno isolado foi armazenado a -80°C.

2.3. Avaliação do extrato de licopeno por espectrofotometria UV-Vis e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A análise UV-Vis foi realizada para verificar o perfil de absorção e quantificar a concentração equivalente a licopeno no extrato utilizando um espectrofotômetro UV-1280 (Shimadzu, Japão). O LPG foi diluído em clorofórmio:etanol (1:20) e avaliado por varredura entre 600 e 300 nm, utilizando clorofórmio:etanol como branco, em uma cubeta de quartzo (1 mL). A quantificação foi conduzida em 472 nm, o comprimento de onda com máxima absorbância, utilizando uma curva de calibração construída a partir de concentrações conhecidas (1 a 10 µg/mL) de um padrão de licopeno de goiaba.

Para a análise por CLAE, o LPG foi diluído em clorofórmio:etanol (1:20), filtrado em filtros de seringa de 0,45 µm (PTFE) e injetado (20 µL) para separação utilizando uma coluna RPAQUEOUS Develosil C30 (4,6 × 150 mm, 5 µm), em um cromatógrafo líquido (Shimadzu, Japão), equipado com um detector de arranjo de fotodiodo (DAD, SPD-M20A). A fase móvel foi composta por acetonitrila, metanol, hexano, diclorometano e acetato de amônio (55:22:11,5:11,5:0,02, v:v:v:v:m), com fluxo de 1 mL/min de 0 a 20 minutos. A detecção foi realizada no intervalo de 800-200 nm, a 1,2 nm/s, com monitoramento em 472 nm.

2.4. Síntese e caracterização da nanoemulsão

2.4.1. Produção do sistema autoemulsificante de entrega de drogas contendo licopeno purificado da goiaba vermelha (nanoLPG)

NanoLPG foram produzidas conforme o método de Yen e colaboradores (2017), com modificações. O LPG, monostearato de sorbitano e óleo de coco (1:10:0,6 m:m:v) foram misturados com etanol e acetona (1:8, v:v), sob agitação magnética por 10 minutos a 40°C. Depois, a mistura foi despejada em água destilada (pH 7) contendo polisorbato 80 (0,45 g), sob as mesmas condições de agitação e temperatura, seguindo uma proporção de 1:2,5 (v:v) das fases orgânica:aquosa. A formulação foi concentrada sob pressão reduzida (30 mbar) a 37°C em um rotaevaporador R-215 (Buchi, Suíça) até atingir um volume final de 20 mL, eliminando os solventes orgânicos. A nanoLPG foi armazenada em frascos de plástico fechados, em refrigerador (5-8°C).

2.4.2. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e potencial zeta

O tamanho médio das partículas e o índice de polidispersão (IPD) foram mensurados por DLS (*Dynamic Light Scattering*) utilizando um equipamento Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, RU). As amostras foram diluídas no momento da análise em água ultrapura (1:400) e analisadas em triplicata, em um ângulo de 90°, com tempo de equilíbrio de 60 segundos a 25°C antes das medidas. O potencial zeta foi determinado nas mesmas condições. As análises foram realizadas imediatamente após a síntese e depois mensalmente por 12 meses.

2.4.3. Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

A nanoLPG foi diluída 50.000 vezes em água ultrapura e o diâmetro hidrodinâmico e a concentração de partículas suspensas no meio foram obtidos utilizando um instrumento Malvern Panalytical NanoSight NS300, equipado com um módulo laser de 642 nm (Malvern, RU). A coleta e a análise de dados foram realizadas utilizando o software NTA 3.2. Cinco vídeos, com 1 minuto de duração cada, foram capturados com os seguintes parâmetros: célula de fluxo a 2 µL/min, temperatura de 25°C, viscosidade da água a 0,9 cP e limite de detecção 4. Cada vídeo foi analisado independentemente e os resultados foram automaticamente combinados para formar o gráfico de distribuição de tamanhos.

2.4.4. Conteúdo de licopeno

O conteúdo de licopeno na nanoLPG foi avaliado por espectrofotometria. A nanoemulsão (50 μ L) foi diluída em 950 μ L de clorofórmio com uma solução saturada de cloreto de sódio (1:1, v/v). A amostra foi misturada por 1 minuto e depois centrifugada a 1.000 rpm por 5 minutos. A fase clorofórmica (precipitado) foi mensurada por varredura de 600 a 300 nm, em cubeta de quartzo (1 mL), com quantificação em 472 nm, utilizando um espectrofotômetro UV-1280 (Shimadzu, Japão). O LPG livre também foi analisado para avaliar a estabilidade quando armazenado nas mesmas condições da nanoLPG, conforme descrito na secção 2.3.

2.4.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A ultraestrutura da nanoLPG foi avaliada por MET utilizando um microscópio Jeol JEM-1011 (Japão). A amostra foi diluída 1.000 vezes em água ultrapura e depositada em grades revestidas com formvar. Posteriormente, a amostra foi corada com acetato de uranila, lavadas, secas ao ar e examinadas a 80 keV.

2.4.6. Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR foram obtidos no modo de reflectância total atenuada (ATR) utilizando um espectrômetro FTIR Perkin-Elmer Spectrum BX, equipado com um único cristal de ATR. As medidas foram realizadas entre 500 e 3000 números de onda, com uma resolução de 2 números de onda.

2.4.7. Estabilidade coloidal da nanoLPG em meio biológico

A estabilidade coloidal da nanoLPG em meio de cultura foi investigada seguindo a metodologia proposta por Friedrich *et al.* (2015). A nanoemulsão foi diluída em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (5.000 U/mL de penicilina e 5.000 U/mL de estreptomicina), em concentrações de 3,125; 25 e 200 μ g/mL. Estas concentrações foram baseadas no conteúdo de licopeno na nanoLPG e nos subseqüentes ensaios citotóxicos. O tamanho médio das partículas e o índice de

polidispersão (IPD) foram medidos por DLS, utilizando um equipamento Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, RU) imediatamente e 24 horas após a incubação a 37°C e 5% de CO₂ em atmosfera úmida.

2.5. Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante da nanoLPG foi avaliada utilizando o ensaio do sequestro do radical DPPH. Uma solução-estoque de 100 µM de DPPH foi preparada em etanol de grau cromatográfico e mantida a -20°C por um período inferior a uma semana. Momentos antes do experimento, a solução-estoque de DPPH foi diluída até atingir uma absorbância de 0,7 a 517 nm para produzir a solução de trabalho de DPPH. A nanoemulsão foi diluída para 0,1 mg/mL em salina tamponada com fosfato (STF) e 25 µL foram misturados a 225 µL da solução de trabalho de DPPH em microtubos. Os tubos foram incubados no escuro, à temperatura ambiente, por 30 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 5.000 × *g* por 5 minutos para remover qualquer material insolúvel.

Então, 200 µL do sobrenadante foram transferidos para microplacas de 96 poços de fundo chato pretas (#3605, Corning, EUA) e lidas em 517 nm em um leitor de microplacas (Spectramax® Plus 384, Molecular Devices, EUA). Contando com uma possível interferência das nanopartículas a 517 nm, experimentos controles foram realizados utilizando a nanoemulsão e etanol (sem DPPH) em paralelo. A habilidade da nanoLPG em sequestrar o radical DPPH foi comparada às de diluições de Trolox em STF, em uma curva de calibração com concentrações variando de 12,5 a 200 µM. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos como µM equivalentes a Trolox/g de nanoLPG.

2.6. Estudos *in vivo*.

2.6.1. Animais e comitê de ética

O comitê de ética em pesquisa animal do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília aprovou previamente os experimentos sob protocolo número 66728/2016 (Anexo II) e os procedimentos foram conduzidos de acordo com as orientações do

Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com a legislação nacional vigente, Lei 11.794/2008 e 9.605/1988.

Camundongos *Swiss* machos (25 ± 5 g, 8-12 semanas de idade) mantidos no biotério do Centro de Pesquisa em Plantas Medicinais (NPPM) da Universidade Federal do Piauí (UFPI) foram usados para a avaliação de toxicidade aguda do LPG. Camundongos *Swiss* machos (30 ± 5 g, 6-8 semanas de idade) mantidos no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB, Brasil) foram usados para os estudos de toxicidade de doses repetidas e biodistribuição de nanoLPG. Os animais foram mantidos em temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), em ciclo claro/escuro 12/12 com livre acesso a água e comida.

2.6.2. Toxicidade em dose única do LPG

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos ($n = 5$) e tratados com água (grupo controle) ou LPG em dose única de 2.000 mg/kg (grupo teste) por via oral. Os animais foram observados por 8 horas no primeiro dia e, depois, diariamente por 14 dias para avaliar sinais de toxicidade aguda, de acordo com a diretriz 420: Procedimento oral para toxicidade em dose fixa da Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OCDE, 2002a).

2.6.3. Toxicidade em doses repetidas da nanoLPG

O efeito tóxico *in vivo* da nanoLPG foi avaliado segundo a diretriz 407: Estudo de toxicidade em doses repetidas para roedores em 28 dias, da Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OCDE, 2008). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos ($n = 9$) e tratados com água (grupo controle) ou nanoLPG a 10 mg/kg (grupo teste) diariamente por via oral durante 28 dias. Os animais foram eutanaziados 1 dia após a administração da última dose, com cetamina e xilasina, administradas por via intraperitoneal, conforme estabelecido pelas diretrizes para a prática de eutanásia do CONCEA.

2.6.3.1. Análise clínica e comportamental

Os parâmetros clínicos e comportamentais foram avaliados de acordo com o *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Human Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, da OECD (OCDE, 2002b). Pontuações foram estabelecidas para mensurar o grau de mudança de cada parâmetro, onde zero (0) indicava ausência de efeito e três (3) efeito severo. Além disso, ganho de peso corporal, bem como o consumo de alimento e água foram avaliados diariamente durante 4 dias e, depois, a cada 3 dias por 28 dias. Após a eutanásia, os órgãos foram removidos, seus aspectos clínicos foram analisados e seu peso foi mensurado.

2.6.3.2. Parâmetros bioquímicos e hematológicos

Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca em tubos sem e com EDTA para análises bioquímicas e hematológicas, respectivamente. Os marcadores bioquímicos glicose, ureia, creatinina, colesterol, triglicerídeos, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FAL) foram mensurados utilizando um analisador bioquímico semiautomatizado (Bio-200, BIOLUS, Brasil) e reagentes LABTEST® (Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante. O hemograma foi realizado utilizando um analisador hematológico automatizado (SDH-3 VET, LABTEST®, Brasil). O conteúdo de hemoglobina e proteínas plasmáticas totais foram analisadas em um analisador bioquímico semiautomatizado (Bio-200, BIOLUS, Brasil). A análise morfológica dos leucócitos e eritrócitos foi realizada por microscopia óptica em esfregaço sanguíneo corado pelo método panótico (NEWPROV, Brasil).

2.6.3.3. Biodistribuição

Cérebro, coração, pulmão, fígado, baço, rins e próstata foram congeladas em nitrogênio líquido e preservadas a -80°C. Os órgãos (100-300 mg) foram homogeneizados em uma solução de etanol, água, butil-hidroxitolueno (BHT) e hidróxido de potássio (54.9:44.98:0,02:0,01) a 1:5 (m:v) sob agitação ultrassônica por 15 minutos a 50°C, seguido de banho gelado. A extração do licopeno a partir do homogenato foi conduzida com 2 mL de diclorometano:hexano (1:5, v:v). As amostras

foram centrifugadas a 4.000 rpm por 10 minutos a 10°C e o sobrenadante foi coletado, filtrado e seco utilizando um concentrador LabConco CentriVap (EUA). O processo de extração foi repetido três vezes.

A quantificação do licopeno extraído dos órgãos foi realizada por CLAE. As amostras foram injetadas (70 µL) para separação utilizando uma coluna RPAQUEOUS Develosil C30 (4,6 x 150 mm, 5 µm). A fase móvel foi composta por acetonitrila, metanol, hexano, diclorometano e acetato de amônio (55:22:11,5:0,02, v:v:v:w), a um fluxo de 1 mL/min de 0 a 20 minutos. A detecção foi feita no intervalo de 800-200 nm, a 1,2 nm/s, com monitoramento em 472 nm e o licopeno foi quantificado utilizando uma curva de calibração construída com um padrão de licopeno de tomate em concentrações que variavam de 0 a 20 µg/mL.

2.6.3.4. Análise histopatológica

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos (n = 5) e tratados com água (grupo controle) ou nanoLPG a 10 mg/kg (grupo teste) em doses repetidas por via oral durante 28 dias. O cérebro, coração, aorta, pulmão, fígado, baço, estômago, esôfago, intestino delgado, intestino grosso, pâncreas e rins foram fixados com formalina tamponada neutra a 10% por 24 horas. Os espécimes de tecido foram desidratados com concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xileno e embebidos em parafina histológica. As amostras foram seccionadas em 4-6 µm e corados com Hematoxilina e Eosina (HE). Os cortes histológicos foram examinados utilizando um microscópio ScanScope Aperio (Leica Biosystem Inc, EUA), equipado com um sistema de captura e processamento de imagens ScanScope Console v10.2.0.2352, em aumento de 400x. As análises histopatológicas foram realizadas por um observador em todos os cortes para avaliar a arquitetura tecidual e realizar a análise semiquantitativa. Mudanças histopatológicas foram classificadas entre normais a lesões severas.

2.7. Citotoxicidade *in vitro*

2.7.1. Ensaio de viabilidade celular

A linhagem de carcinoma de próstata humana (DU-145) foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor e 1% de antibióticos (5.000 U/mL de penicilina e streptomicina) a 37°C e 5% de CO₂ em atmosfera umidificada. O ensaio de viabilidade celular foi realizado pelo método do MTT, utilizando uma densidade celular de 3×10^3 células/poço. As placas de 96-poços foram mantidas por 24 horas a 37°C e, posteriormente, as células foram tratadas com a nanoLPG, em concentrações que variaram de 200 a 3,125 µg/mL. O LPG livre diluído em 0,5% de DMSO (200 - 6,25 µg/mL), meio DMEM e 20% de DMSO foram utilizados como controles. As células foram incubadas por 6, 12, 24, 48 e 72 horas. Após o tempo de exposição, o meio foi removido e 100 µL de uma solução de MTT diluído em DMEM (0,75 mg/mL) foi adicionada a cada poço e as placas foram incubadas novamente por 2 horas a 37°C. Posteriormente, adicionou-se DMSO (100 µL) para dissolver os sais de formazan produzidos pelas células viáveis. A absorbância foi mensurada a 595 nm, utilizando um leitor de microplacas SpectraMax® (Molecular Devices, EUA). Os dados foram representativos para as triplicatas de dois experimentos independentes.

2.7.2. Ensaio de integridade de membrana celular

A integridade de membrana das células DU-145 foi avaliada pelo ensaio com azul de tripan. As células foram tratadas com nanoLPG e com o LPG livre, em concentrações de 200 a 6,89 µg/mL em triplicata e incubadas por 24 horas. O meio DMEM e 20% de DMSO foram utilizados como controles. Após o tempo de exposição, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 2.500 rpm por 5 minutos a 4°C, e lavadas com STF três vezes. As suspensões celulares (50 µL) foram coradas com uma solução de azul de tripan 0,4% (1:1, v/v) e 10 µL foram contados em câmara de Neubauer. As células foram classificadas como: com perturbações de membrana ou íntegras. Fotomicrografias representativas das células DU-145 do controle ou tratadas foram capturadas com aumento de 100x utilizando um microscópio Nikon Exlipse Ts2 (Japão) com software Nis Elements L Imaging (versão 1.02.00).

2.7.3. Análises de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência

Para avaliar o mecanismo de morte da célula cancerosa tratada com a nanoLPG, o ensaio de Anexina-V FITC/IP foi utilizado a fim de distinguir as células apoptóticas das necróticas. Células da linhagem DU-145 foram plaqueadas em placas de 24 poços, em uma densidade de $1,5 \times 10^5$ células/poço e mantidas a 37°C por 24 horas. Após o tratamento com a nanoLPG ou com o LPG livre (6,89 e 200 µg/mL) e incubação por 24 horas a 37°C, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e 2.500 rpm por 5 minutos a 4°C e lavadas com STF três vezes. As células foram ressuspensas em 100 µL de tampão de ligação (BD Pharmingen™) e marcadas com 5 µL de Anexina-V FITC e 10 µL de iodeto de propídio (IP) (BD Pharmingen™) por 15 minutos à temperatura ambiente, protegidos da luz. Em seguida 100 µL do tampão de ligação foram adicionados e a suspensão celular foi analisada em citômetro de fluxo (LSR II Fortessa™, BD, EUA), com uma taxa de 20.000 eventos por amostra. DMEM e 20% de DMSO foram usados como controles. O ensaio foi conduzido em triplicata. Fotomicrografias representativas das células DU-145 controles ou tratadas foram obtidas por microscopia de contraste de fase e microscopia de fluorescência utilizando um microscópio Nikon Eclipse Ts2 (Japão) equipado com o software Nis Elements L Imaging (versão 1.02.00), com aumento de 200x.

2.7.4. Análise ultraestrutural das células cancerosas

As células DU-145, a uma densidade de 1×10^6 células/poço, foram tratadas com meio DMEM (controle), LPG livre ou nanoLPG (6,89 e 200 µg/mL) e incubadas por 24 horas a 37°C. As células foram tripsinizadas, centrifugadas a 2.500 rpm por 5 minutos a 4°C, lavadas três vezes com STF e fixadas com solução fixadora de Karnovsky. As amostras foram lavadas, fixadas com tetróxido de ósmio (1%) desidratadas utilizando acetona (50-100%) e embebidas em resina Spurr. As células foram coradas com 0,5% de acetato de uranila e examinadas por MET utilizando um microscópio Jeol JEM-1011 (Japão).

2.8. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software GaphPad Prism versão 8.4.3 (GraphPad Software, EUA). O teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de

comparações múltiplas de Dunn foram utilizados para verificar as diferenças estatísticas nos parâmetros físico-químicos da nanoemulsão ao longo do tempo. O teste *t* não-pareado foi utilizado para analisar as diferenças estatísticas no ensaio de estabilidade coloidal e com relação aos parâmetros de toxicidade *in vivo*. Para os experimentos em células, a normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e Análise de Variância de uma via (ANOVA), seguida da análise de comparações múltiplas de Bonferroni, foi empregada para analisar as diferenças estatísticas entre os grupos. ANOVA de duas vias seguida pela análise de comparações múltiplas de Bonferroni foram utilizadas para comparar as médias entre os tempos de exposição no ensaio de citotoxicidade. As diferenças entre as médias foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização do LPG e da nanoLPG

A análise espectrofotométrica do LPG mostrou um perfil de absorção equivalente ao da referência analítica de licopeno do tomate, exibindo três bandas de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) em 503, 472 e 447 nm (Figura 1A). O espectro de absorção do LPG foi semelhante ao relatado por Amorim e colaboradores (2018), com valores de $\lambda_{\text{máx}}$ de 505, 473 e 448 nm, correspondendo ao 5-Z-licopeno. A quantificação do licopeno no extrato apresentou um rendimento de 97,70% de licopeno/massa de extrato seco e 82,18 mg de licopeno/100 g de fruta. O rendimento corrobora com o descrito por Amorim *et al.* (2018) para o mesmo método de extração (61,66±0,73 mg de 5-Z-licopeno/100 g de goiaba). Os dados de CLAE para o LPG em 472 nm (Figura 1B) mostrou um pico majoritário com tempo de retenção (TR) de 9,49 minutos, o qual foi identificado como licopeno ao comparar-se com o TR e o espectro DAD observado para o padrão de licopeno (9,53 minutos).

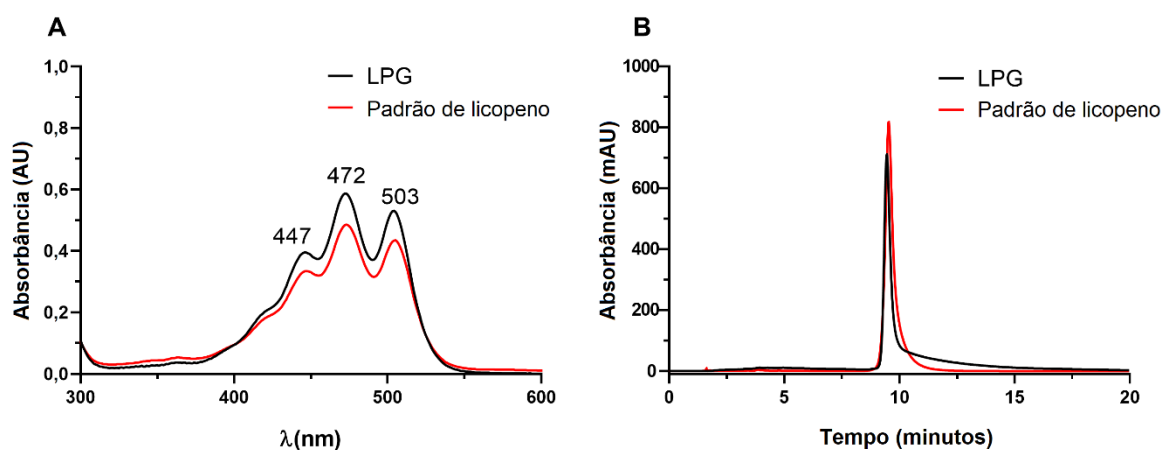


Figura 1. Espectro UV-Vis de 600-300 nm (A) e cromatograma por CLAE-DAD (B) do LPG e do padrão analítico de licopeno de tomate em uma concentração de 50 µg/mL.

Um sistema autoemulsificante de entrega de drogas contendo licopeno purificado da goiaba vermelha (nanoLPG) foi produzido aplicando surfactantes reconhecidos como seguros pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, Brasil) e pela *Food and Drug Administration* (FDA, EUA) e empregado com sucesso em estudos prévios (DOS SANTOS *et al.*, 2015; VASCONCELOS *et al.*, 2020). A nanoLPG apresentou-se como um líquido de aspecto turvo, leitoso e homogêneo (Figura 2B). A amostra foi inicialmente analisada quanto ao tamanho médio, distribuição, potencial zeta, concentração e estabilidade de licopeno na nanopartícula.

A análise por DLS mostrou nanopartículas polidispersas, com um diâmetro médio de aproximadamente 200 nm (Tabela 1). Os dados de NTA (Figura 2A) revelaram um diâmetro hidrodinâmico no intervalo de 100 a 300 nm, com um diâmetro médio de 180 nm, corroborando os dados de DLS. A concentração de nanopartículas por mililitro foi de $3,74 \times 10^{11}$. O tamanho das nanopartículas é um parâmetro importante para aplicações biológicas, uma vez que pode afetar a estabilidade do sistema devido à sedimentação ou agregação, bem como a internalização celular e a toxicidade em células (BARANOWSKA-WÓJCIK *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020). No presente estudo, o tamanho das nanopartículas se mostrou satisfatório, de acordo com estudos prévios envolvendo nanopartículas de licopeno ($211,30 \pm 2,5$ e $250 \pm 8,21$ nm) (VASCONCELOS *et al.*, 2020; WANYI *et al.*, 2020). Embora o valor do IPD e os dados de NTA tenham indicado polidispersão, a distribuição dos tamanhos das nanopartículas estava adequadamente uniforme. Para Silva e colaboradores (2020),

valores de IPD entre 0,1 e 0,5 expressam uma distribuição de tamanhos suficientemente homogênea. De fato, uma distribuição de tamanhos maiores está associada a valores de IPD acima de 0,5 (GONZÁLEZ-REZA *et al.*, 2018).

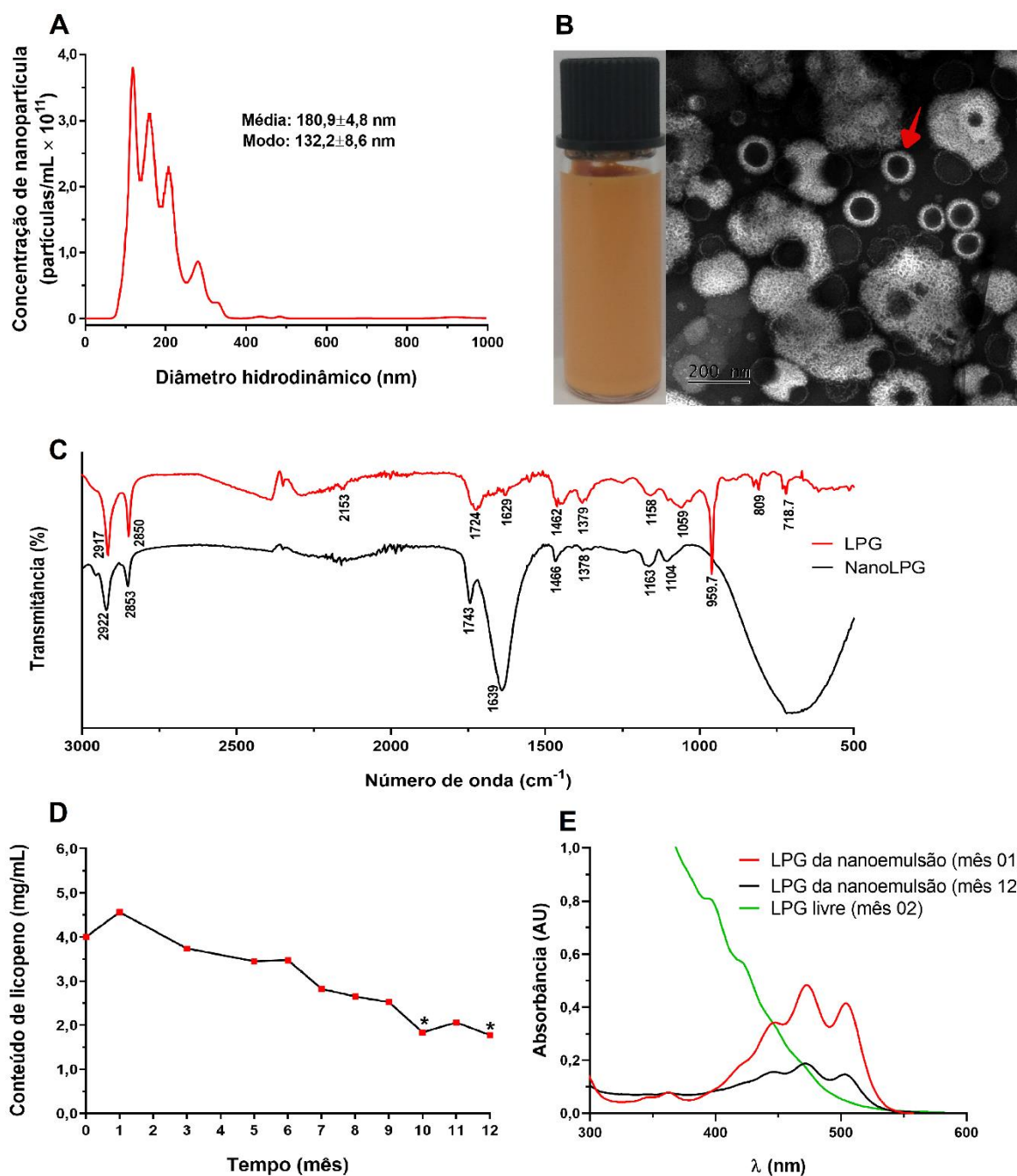


Figura 2. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico por NTA da nanoLPG (A). Fotografia da nanoemulsão e fotomicrografia da nanoLPG (seta) por Microscopia Eletrônica de Transmissão (B). Espectro FTIR-ATR do LPG e da nanoLPG (C). Conteúdo de licopeno na nanoLPG pelo período de 12 meses (D) e espectro UV-Vis do LPG extraído da nanoemulsão e do LPG livre mantidos sob as mesmas condições de armazenamento (E). Dados de média e modo do NTA expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ versus mês 0.

O potencial zeta é um parâmetro representativo da carga de superfície das partículas, determinando seu caráter catiônico, aniônico ou neutro (SMITH *et al.*, 2017). O valor do potencial zeta encontrado para a nanoLPG foi negativo (Tabela 1), contribuindo para a repulsão eletrostática que previne sua agregação e confere estabilidade física ao nanossistema. O valor negativo pode ser atribuído aos grupos hidroxilas do polissorbato 80 (XIONG *et al.*, 2012; ZARDINI *et al.*, 2018).

Tabela 1. Caracterização da nanoLPG.

Parâmetro	Mês	nanoLPG
Tamanho (nm) ¹	0	239,90±8,67
	12	248,00±0,80
IPD ¹	0	0,22±0,03
	12	0,21±0,02
Potencial zeta (mV)	0	-28,30±0,52
	12	-33,00±0,17
Conteúdo de licopeno (mg/mL)	0	4,13±0,02
	12	1,78±0,01*

¹ Dados obtidos por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS). Dados foram expressos como média ± DP.

*p<0,05 *versus* mês 0.

Juntos, o tamanho, o índice de polidispersão e o potencial zeta sofreram alterações insignificantes durante 12 meses de armazenamento (Tabela 1), sugerindo estabilidade físico-química para as nanopartículas. Adicionalmente, a análise morfológica da nanoLPG realizada por MET mostrou partículas com formato esférico e topologia lisa (seta vermelha, Figura 2B). O formato esférico é a morfologia mais comum reportada na literatura e apresenta um potencial expressivo para a liberação controlada e a preservação das moléculas encapsuladas. Isto provavelmente está associado à pequena área de superfície específica e o contato mínimo com o ambiente aquoso (ZARDINI *et al.*, 2018). Além disso, nanopartículas esféricas provaram ser mais citotóxicas do que outras morfologias quando analisadas em células cancerosas HeLa, provavelmente devido ao pequeno tamanho e à pouca agregação que ocorrem nestas nanopartículas (WOŻNIAK *et al.*, 2017).

Os resultados de FTIR-ATR para a análise de LPG e nanoLPG estão representados na Figura 2C. No espectro do LPG, o pico em 959,7 cm⁻¹ pode ser

atribuído à ligação C-H conjugada *trans* fora de plano e as bandas entre 1379 e 1462 cm^{-1} são típicos do estiramento C=C do licopeno. No geral, as frequências vibracionais do LPG foram semelhantes às encontradas para o extrato rico em licopeno de goiaba por Dos Santos *et al.* (2018). A ausência do pico acentuado em 959,7 cm^{-1} pode estar relacionada à encapsulação do LPG, conforme sugerido por Li e colaboradores (2018), que também observaram o desaparecimento deste pico após a nanoencapsulação (em um sistema diferente). Entretanto, não é possível descartar que este pico esteja, na verdade, ofuscado pela presença de uma forte e larga banda de OH em 750 cm^{-1} , proveniente da água no sistema.

Com relação ao conteúdo de licopeno na nanoemulsão, a perda de licopeno foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) apenas a partir do décimo mês de armazenamento a 5-8°C (Figura 2D). Entretanto, o perfil UV-Vis do licopeno extraído da nanoemulsão após 12 meses ainda está característico para a molécula, com as três bandas de absorção máxima em 503, 471 e 447 nm (Figura 1E). Em contraste, o LPG livre armazenado nas mesmas condições da nanoLPG apresentou total degradação no primeiro mês (Figura 2E). O perfil espectrofotométrico sugestivo para a degradação do licopeno mostra uma perda significativa da absorbância na região próxima a 503 nm, ausência de distinção entre os três picos e um aumento progressivo na absorbância da região abaixo de 447 nm, semelhante ao que já foi descrito previamente (TAN, SODERSTROM, 1989; VASCONCELOS *et al.*, 2020). A temperatura é um dos principais fatores que afetam a estabilidade do licopeno, resultando inicialmente em isomerização, seguida de auto-oxidação das ligações insaturadas, dificultando possíveis aplicações biológicas (ALIYU; KABIRUYUNUSA; ABDULLAHI, 2020; SRIVASTAVA; SRIVASTAVA, 2015). Estes dados sugerem que a nanoemulsão preserva o licopeno por um período satisfatório em temperatura de refrigeração, propiciando sua aplicação biotecnológica.

NanoLPG diluída em DMEM a 3,125 e 25 $\mu\text{g/mL}$ demonstrou um aumento significativo ($p < 0,05$) no tamanho de partícula 24 horas após a incubação a 37°C (Tabela 2), indicando agregação. O aumento no IPD na concentração de 3,125 $\mu\text{g/mL}$ após 24 horas sugere que apenas parte da população das nanopartículas sofreu agregação, resultando em uma distribuição de tamanhos heterogênea. O tamanho e os valores de IPD das nanopartículas diluídas em DMEM (3,125 e 25 $\mu\text{g/mL}$) imediatamente analisadas (0 horas) foram comparáveis àqueles obtidos para

nanoLPG avaliada sob procedimentos experimentais padrão. Entretanto, estes resultados não foram observados para a nanoLPG em meio de cultura a 200 µg/mL. Esta diluição exibiu alta opacidade e viscosidade, sendo, portanto, inapropriada para uma análise por DLS. Segundo observado por Panchal e colaboradores (2014) para tamanhos padrão de partículas de poliestireno e amostras de IgG agregadas em baixas e altas concentrações, na maior concentração, o instrumento de DLS não foi capaz de determinar os valores.

Tabela 2. Estabilidade coloidal de nanoLPG diluída em meio de cultura de células.

Concentração (µg/mL)	0 hora		24 horas	
	Tamanho (nm)	IPD	Tamanho (nm)	IPD
3,12	226,90±3,96	0,26±0,01	391,20±33,20*	0,61±0,01*
25	256,80±1,79	0,17±0,08	359,60±26,06*	0,17±0,09
200	66,41±1,02	0,50±0,01	52,85±0,89	0,47±0,02
DMEM	20,59±1,43	0,73±0,10	26,79±0,73	0,88±0,03

Dados foram expressos como média ± DP. *p<0.05 versus 0 hora.

Portanto, estes dados sugerem uma instabilidade parcial das nanopartículas em condições biológicas, como as utilizadas em cultura de células, as quais poderiam afetar sua atividade biológica ou biodistribuição. A estabilidade pode ser afetada pelos grupos de cabeças poliméricas do polisorbato 80, promovendo estabilização estérica e aumentando o tempo de circulação sanguínea devido à prevenção da adsorção plasmática (FRIEDRICH *et al.*, 2015; ZHU *et al.*, 2019). Apesar da nanoLPG conter polisorbato 80, possivelmente não foi suficiente para prevenir a agregação em meio biológico e conferir estabilidade coloidal para as nanopartículas. Por outro lado, o nível de polisorbato 80 na nanoLPG foi projetado para seguir as sugestões de ingestão oral diária segura (10-25 mg/kg) (EFSA, 2015; KRIEGEL *et al.*, 2019).

3.2. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante da nanoLPG foi avaliada pelo método do sequestro do radical DPPH comparado ao Trolox. Como pode ser observado na Figura 3, a nanoLPG a 0,1 mg/mL exibiu atividade de sequestro do radical, com $171,10 \pm 7,41$ µM

equivalente de Trolox/g. A atividade antioxidante da nanoLPG corroborou os dados observados por Amorim e colaboradores (2020) para o licopeno da goiaba vermelha (LPG) pelo método do ABTS. Os autores relataram que o LPG exibiu a capacidade de sequestrar o radical ABTS equivalente a $139,52 \pm 0,30 \mu\text{M}$ de Trolox/g. Embora os resultados tenham sido obtidos por métodos diferentes, o DPPH e o ABTS demonstraram valores aproximados e possuem o mesmo mecanismo antioxidante (CAETANO-SILVA *et al.*, 2020). É possível sugerir que a nanoLPG possui um efeito antioxidante produzido pelo mecanismo de doação de hidrogênio, uma vez que o radical DPPH é um acceptor de hidrogênio para converter-se em uma molécula estável (MARSUP *et al.*, 2020).

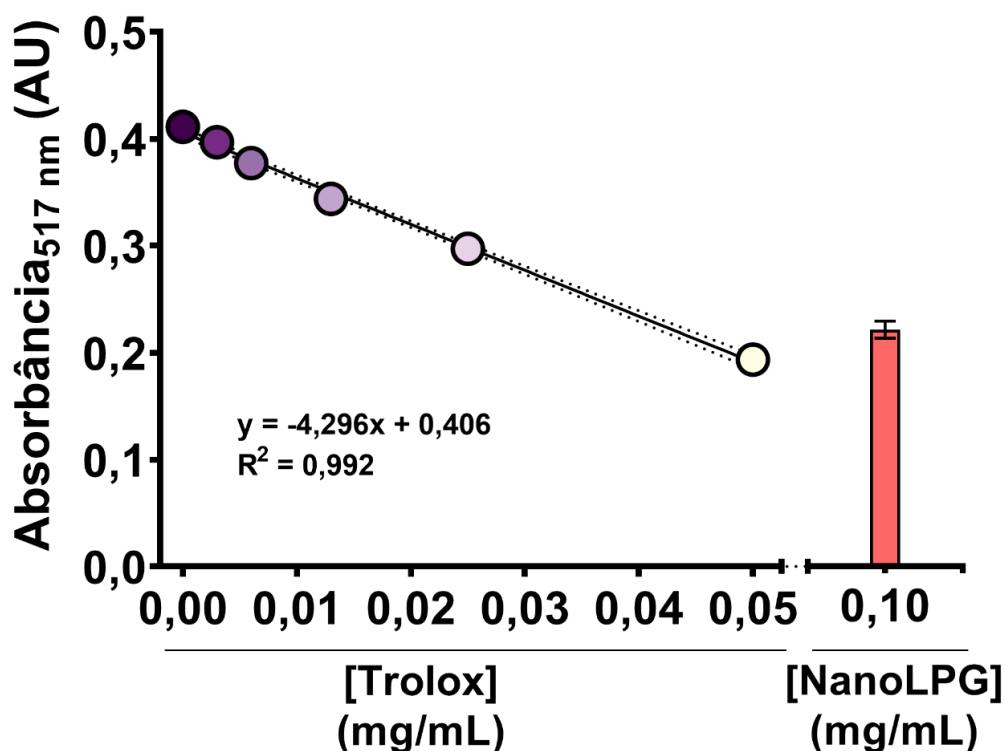


Figura 3. Atividade antioxidante da nanoLPG pelo método do sequestro do radical DPPH comparada ao Trolox. Dados expressos como média \pm DP.

3.3. Toxicidade do LPG e da nanoLPG *in vivo*

A avaliação da toxicidade do LPG livre não demonstrou morte ou alterações dos parâmetros comportamentais ou clínicos dos camundongos *Swiss* tratados com uma dose única oral do extrato a 2.000 mg/kg e observados por 14 dias. Além disso, nenhuma mudança significativa foi observada no peso corporal ou dos órgãos dos

animais (Tabela 3). Estes resultados indicam a ausência de toxicidade aguda sistêmica para o LPG. Uma vez que não houve mortes, não foi possível determinar a dose letal média (DL₅₀).

Tabela 3. Peso corporal e dos órgãos de camundongos *Swiss* tratados com dose única de LPG (2.000 mg/kg) e observados por 14 dias.

Parâmetro	Dia	Controle	LPG
Peso corporal (g)	0	29,26±3,06	29,54±3,41
	14	28,72±2,64	29,16±3,38
Peso dos órgãos (g)			
Coração	14	0,12±0,01	0,11±0,02
Pulmão		0,16±0,02	0,16±0,02
Fígado		0,99±0,14	0,95±0,12
Rim		0,38±0,04	0,37±0,08

Valores foram expressos como média ± EPM. N = 5 animais por grupo.

Os animais expostos à nanoLPG a 10 mg/kg por 28 dias não exibiram características clínicas anormais ou mudanças no comportamento em geral quando comparados com o grupo tratado com água (Tabela 4). Nenhuma morte foi registrada nos grupos tratado e controle.

Tabela 4. Efeito da nanoLPG em parâmetros clínicos e comportamentais de camundongos *Swiss*.

	Parâmetro	Controle		NanoLPG	
		Dia 0	Dia 28	Dia 0	Dia 28
Estimulante	Hiperatividade	0	0	0	0
	Agressividade	0	0	0	0
	Tremores	0	0	0	0
	Convulsão	0	0	0	0
	Piloereção	0	0	0	0
Depressivo	Ptose	0	0	0	0
	Bulbo do nariz	0	0	0	0
	Bulbo da bochecha	0	0	0	0
	Posição da orelha	0	0	0	0
	Alteração do bigode	0	0	0	0
	Sedação/Anestesia/Analgesia	0	0	0	0
	Ataxia	0	0	0	0
	Reflexo de endireitamento	0	0	0	0
	Catatonía	0	0	0	0
	Perda de reflexo corneal	0	0	0	0
Perda de reflexo auricular	0	0	0	0	
Relacionado ao sistema nervoso	Diarreia	0	0	0	0
	Constipação	0	0	0	0
	Lacrimação	0	0	0	0
	Salivação/Vômito	0	0	0	0
	Cianosis	0	0	0	0
Outros	Deambulação	0	0	0	0
	Auto-limpeza (grooming)	0	0	0	0
	Escalada	0	0	0	0
	Vocalização	0	0	0	0
	Contorção abdominal	0	0	0	0
	Mortes	0	0	0	0

0 = sem efeito. N = 9 animais por grupo.

A evolução no ganho de peso corporal (Figura 4A) e no consumo de ração e água (Figura 4B) dos camundongos *Swiss* ao longo dos 28 dias de acompanhamento não apresentou mudanças significativas entre o grupo tratado oralmente com a nanoLPG a 10 mg/kg e os grupos controle. O peso dos órgãos também não mostrou modificações significativas quando comparados ao grupo tratado com água (Figura 4C). Além disso, a análise macroscópica dos órgãos não demonstrou modificações significativas tanto no grupo tratado com a nanoLPG quanto no grupo controle. Estes resultados indicam a ausência de toxicidade sistêmica no tratamento com doses repetidas de nanoLPG pelo período dos experimentos.

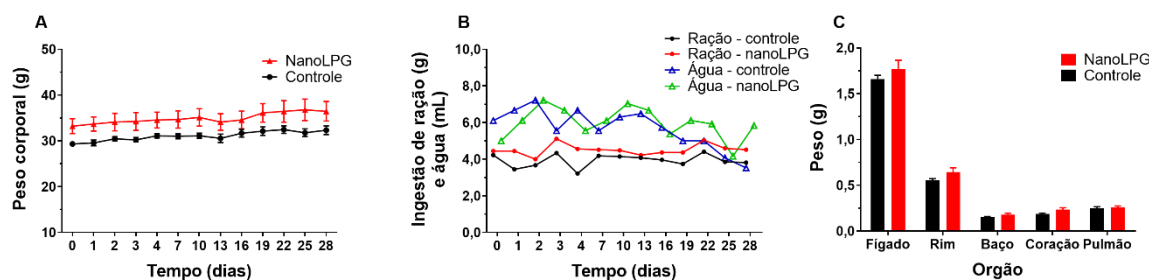


Figura 4. Evolução do ganho de peso corporal (A), consumo de alimento e água (B) e peso relativo dos órgãos (C) de camundongos Swiss do grupo controle ou tratados oralmente com a nanoLPG a 10 mg/kg por 28 dias. Dados expressos como média \pm EPM. N = 9 animais por grupo.

Os parâmetros bioquímicos e hematológicos são importantes para monitorar as condições gerais de saúde, resposta imune e lesões teciduais induzidas por substâncias. No presente estudo, o hemograma dos camundongos tratados com nanoLPG não mostrou alterações significativas quando comparado ao do grupo controle (Tabela 5). Estes dados sugerem que houve hemocompatibilidade da nanoLPG nas condições experimentais utilizadas. Ademais, não houve variação significativa na contagem de leucócitos, o que indica que a nanoLPG não provocou leucopenia ou leucocitose nos camundongos após 28 dias de tratamento (Tabela 5). Outra observação importante foi a ausência de bastonetes no sangue periférico. Os bastonetes são neutrófilos imaturos que podem entrar na circulação em resposta a estresse, como inflamação, dano tecidual ou infecção, caracterizando um fenômeno denominado desvio à esquerda (CORNBLEET, 2002). Neste contexto, a nanoLPG a 10 mg/kg não induziu aumento de neutrófilos imaturos nos camundongos 28 dias após o tratamento.

Não houve mudanças significativas na contagem de plaquetas (Tabela 5). A toxicidade no sistema de coagulação pode ser afetada pela carga superficial das partículas. Conforme demonstrado por Wu e colaboradores (2018) para nanopartículas lipídicas sólidas, a superfície catiônica apresenta maior risco para ativação e agregação plaquetária sistêmica *in vivo*, reduzindo o tempo de circulação sanguínea das nanopartículas e sua captação celular. Uma vez que a nanoLPG apresenta potencial zeta negativo, toxicidade trombótica não foi observada. Finalmente, as proteínas plasmáticas totais não foram afetadas pelo tratamento com a nanoLPG por 28 dias (Tabela 5). Alterações nas proteínas do sangue são

normalmente associadas com flutuações nos níveis de albumina e globulina, como resultado de desordens no sistema imune e de lesões no fígado e nos rins (GHELICHPOUR *et al.*, 2017).

Tabela 5. Efeito da nanoLPG em parâmetros hematológicos de camundongos *Swiss*.

Parâmetros	Controle	NanoLPG
Hematócrito (%)	48,60±0,51	46,13±0,85
Eritrócitos (×10 ⁶ células/μL)	09,95±0,13	09,39±0,20
Hemoglobina (g/dL)	17,72±0,55	18,14±1,29
VCM (fL)	48,82±0,79	49,23±1,11
CHCM (%)	36,44±1,08	39,36±2,89
Leucócitos (células/μL)	5750±1096	4275±575
Monócitos (%)	2,20±0,37	2,37±0,59
Linfócitos (%)	79,80±2,15	76,88±1,96
Eosinófilo (%)	0,60±0,24	0,25±0,16
Basófilo (%)	0,00±0,00	0,00±0,00
Neutrófilos imaturos (%)	0,00±0,00	0,00±0,00
Neutrófilos segmentados (%)	17,40±2,31	20,50±2,03
Plaquetas (cells/μL)	800000±107165	897250±66576
Proteínas plasmáticas totais (g/dL)	6,56±0,29	6,85±0,88

Dados foram expressos como média ± EPM. VCM: volume corpuscular médio. CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média. N = 5-9 animais por grupo.

Além disso, as taxas de glicose, colesterol total e triglicerídeos não demonstraram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas aos do grupo controle (Tabela 6). Os marcadores de lesão renal usuais, ureia e creatinina, sugerem a ausência de nefrotoxicidade nos camundongos tratados com nanoLPG. Estes achados são muito importantes, considerando que nanopartículas na circulação sanguínea devem passar pela vasculatura renal (DU; YU; ZHENG, 2018). Com relação aos marcadores de função hepática (ALT, AST e FAL), notou-se uma tendência à redução nos níveis no grupo tratado com a nanoLPG em relação ao grupo controle (Tabela 6). Entretanto, a diferença entre os grupos não foi estatisticamente

significativa, indicando uma flutuação normal dos valores acumulados e não um achado fisiológico.

Tabela 6. Efeito de nanoLPG em parâmetros bioquímicos de camundongos *Swiss*.

Parâmetro	Controle	NanoLPG
Glicose (mg/dL)	215,90±9,74	238,60±11,18
Colesterol (mg/dL)	127,00±3,57	128,70±5,12
Triglicerídeos (mg/dL)	130,70±16,06	152,60±27,29
Ureia (mg/dL)	42,75±2,46	49,02±2,47
Creatinina (mg/dL)	0,42±0,04	0,33±0,04
ALT (U.I./L)	68,67±10,16	55,63±6,96
AST (U.I./L)	339,40±51,42	272,30±28,56
FAL (U.I./L)	101,02±5,94	89,28±10,64

Dados foram expressos como média ± EPM. ALT: alanina aminotransferase. AST: aspartato aminotransferase. FAL: fosfatase alcalina. N = 5-9 animais por grupo.

Em suma, a nanoemulsão carregada com licopeno da goiaba vermelha não apresentou alterações fisiológicas sugestivas de toxicidade *in vivo* considerando todos os parâmetros analisados neste estudo. A toxicidade das nanopartículas é uma característica crítica para aplicação biológica como sistema de entrega de drogas e precisa ser muito bem explorada.

3.4. Análise histopatológica

A análise histopatológica do cérebro, aorta, coração, pulmão, fígado, baço, rim, estômago, esôfago, intestino delgado, intestino grosso e pâncreas revelou que a administração oral da nanoLPG a 10 mg/kg por 28 dias não induziu danos patológicos com significado clínico sugestivo para toxicidade em camundongos *Swiss* (Figura 5). Sinais mínimos foram observados no fígado, como degeneração hidrópica difusa nos hepatócitos (seta vermelha). A degeneração hidrópica ou vacuolar pode ser resultante da dificuldade dos hepatócitos em manter a homeostase iônica e fluida, o que aumenta a água intracelular (SUSILO *et al.*, 2019). Vale ressaltar que esta é uma lesão aguda reversível e não letal. Estes resultados corroboram os achados clínicos, bioquímicos e hematológicos.

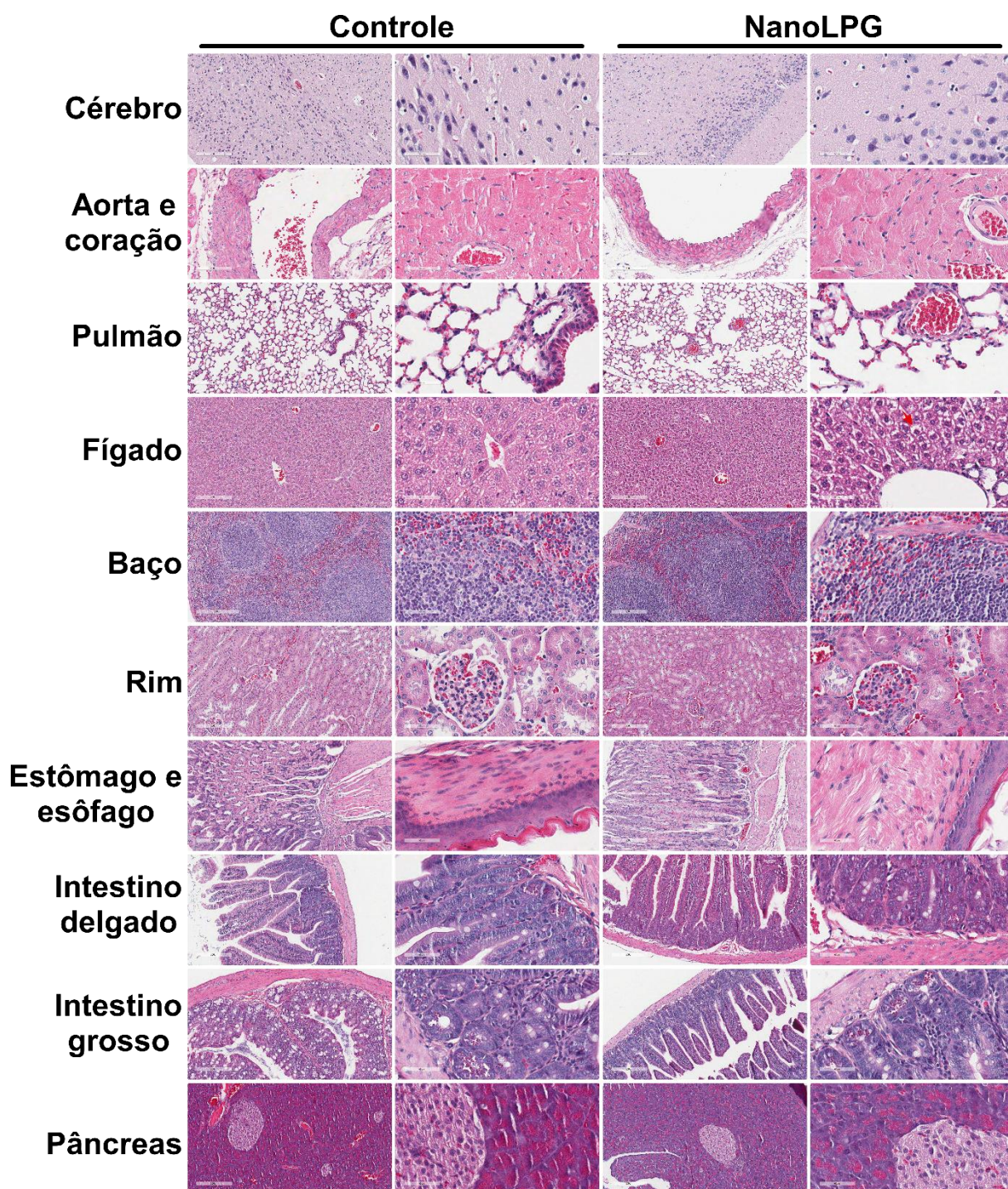


Figura 5. Fotomicrografias representativas das análises histopatológicas de diversos tecidos de camundongos *Swiss* após o tratamento oral com nanoLPG a 10 mg/kg ou com água (controle) por 28 dias. Ampliação de 100x à esquerda (exceto para aorta, cuja ampliação é de 200x) e barra de escala = 200 nm; ampliação de 400x à direita e barra de escala de 50 nm. A seta vermelha indica degeneração hidrópica nos hepatócitos. N = 5 animais por grupo.

3.5. Distribuição tecidual de licopeno

A biodistribuição do licopeno obtida pela administração oral da nanoemulsão foi avaliada por CLAE para o cérebro, coração, pulmão, fígado, baço, rins e próstata de camundongos tratados por 28 dias com uma dose de 10 mg/kg. O licopeno foi detectado na próstata ($0,03 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$), nos rins ($0,11 \pm 0,02 \mu\text{g/g}$) e no fígado ($0,18 \pm 0,09 \mu\text{g/g}$) (Figura 6), enquanto não foi detectado nos demais órgãos e no grupo controle. Conforme demonstrado em estudos em humanos e animais, o licopeno intacto pode se concentrar em vários tecidos, como o fígado, glândulas adrenais, baço, pulmões, próstata, cólon e pele (MIRAHMADI *et al.*, 2020; SRIVASTAVA; SRIVASTAVA, 2015; WANG, 2012).

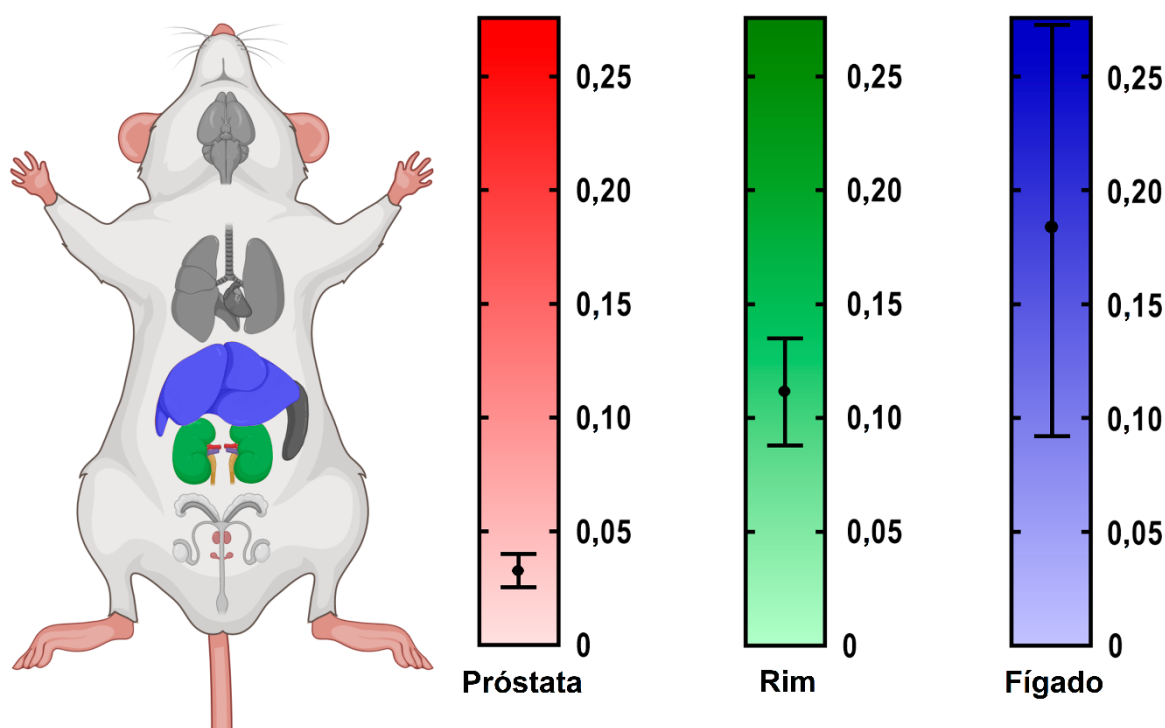


Figura 6. Biodistribuição do licopeno avaliada nos tecidos do cérebro, coração, pulmão, fígado, baço, rins e próstata de camundongos Swiss após tratamento oral com nanoLPG a 10 mg/kg por 28 dias. Dados expressos como média \pm EPM. N = 9 animais por grupo.

A concentração de licopeno na próstata foi comparável ao relatado em outros estudos. O nível de licopeno na próstata dos camundongos alimentados com uma dieta suplementada com licopeno comercial a 150 mg/kg por 60 dias foi de $0,81 \pm 0,08 \text{ nmol/g}$ (equivalente a $0,4349 \mu\text{g/g}$) (LINDSHIELD *et al.*, 2008). Nota-se que o nível de licopeno foi 13 vezes maior do que o encontrado no presente trabalho, mas vale

ressaltar que a dose administrada foi 15 vezes maior do que a utilizada neste estudo. Na próstata de ratos tratados com a oleorresina de tomate a 4,6 mg/kg por 9 semanas, a concentração de licopeno observada foi de $24 \pm 10,3$ nmol/kg (equivalente a 0,0129 $\mu\text{g/g}$) (FERREIRA *et al.*, 2000). Consistentemente, o nível de licopeno relatado foi de, aproximadamente, a metade encontrada no presente trabalho, assim como a dose também foi equivalente à metade da utilizada no trabalho citado. Portanto, a administração oral da nanoLPG fornece licopeno ao tecido prostático de forma correspondente ao que ocorre com o licopeno de outras fontes.

A presença de licopeno no rim pode ser resultado das nanopartículas na corrente sanguínea, incluindo na vasculatura renal, embora a literatura relate o acúmulo de licopeno via receptores *scavenger* classe B tipo 1 (SR-B1) encontrados neste tecido (WANG, 2012). A concentração de licopeno no fígado tende a ser maior do que em outros órgãos. De acordo com Korytko e colaboradores (2003), a avaliação da distribuição tecidual do licopeno administrado oralmente a 30 mg/kg em cães machos revelou que uma maior concentração de licopeno no fígado foi encontrada 1 e 5 dias após o período de 28 dias de tratamento (65,6 e 91,0 nmol/g, respectivamente), o que está em consonância com o encontrado no presente estudo.

A distribuição das nanopartículas para a entrega de compostos bioativos pode ser influenciada pelo diâmetro hidrodinâmico (KAGA *et al.*, 2017). Baranowska-Wójcik e colaboradores (2020) avaliaram o efeito dos diferentes tamanhos de nanopartículas de dióxido de titânio na biodistribuição após a administração oral em dose única e demonstraram que partículas maiores (>80 nm) são predominantemente acumuladas no fígado. Semelhantemente, Kaga e colaboradores (2017) descreveram que nanopartículas poliméricas de maior tamanho foram rapidamente biodistribuídas para o fígado e para o baço. Embora os parâmetros farmacocinéticos não tenham sido avaliados neste estudo, os dados demonstram que a nanoLPG fornece satisfatoriamente licopeno para os tecidos. Além disso, o acúmulo de licopeno nos tecidos pode prevenir diversas doenças, como o câncer de próstata, colestase, esteatose, inflamação, doença hepática alcoólica, entre outras (STICE, XIA, WANG, 2018; WADIE *et al.*, 2020).

3.6. Efeito citotóxico em células de câncer de próstata

Devido ao acúmulo de licopeno na próstata de camundongos tratados com a nanoLPG, avaliou-se a citotoxicidade da nanoemulsão em uma linhagem de células de adenocarcinoma de próstata humana (DU-145). O ensaio do MTT demonstrou que o tratamento com o LPG livre afetou significativamente ($p < 0,05$) a viabilidade celular após 6 horas de exposição, mesmo na menor concentração empregada (3,125 $\mu\text{g/mL}$), com uma redução de $19,33 \pm 2,36\%$ (Figura 7A). De maneira similar, a nanoLPG também reduziu significativamente ($p < 0,05$) a viabilidade das células da linhagem DU-145 após 6 horas de exposição a 3,125 $\mu\text{g/mL}$, apresentando $44,65 \pm 6,90\%$ de redução (Figura 7B). Note que a nanoemulsão potencializou os efeitos deletérios do LPG livre nas células de câncer de próstata.

Este efeito pode também ser observado pelos valores de CI_{50} , os quais foram marcadamente menores para a nanoLPG em comparação ao LPG livre, em todos os tempos avaliados (Figura 7C). Além disso, os valores de CI_{50} foram gradualmente reduzidos ao longo do tempo até 48 horas (Figura 7C). O efeito máximo para o LPG livre e para a nanoLPG foi observado 72 horas após a exposição a 200 $\mu\text{g/mL}$ ($93,20 \pm 0,31\%$ e $100 \pm 3,32\%$ de redução na viabilidade, respectivamente). Entretanto, não houve diferenças estatisticamente significativas com relação ao tempo de 48 horas de exposição para ambas as amostras.

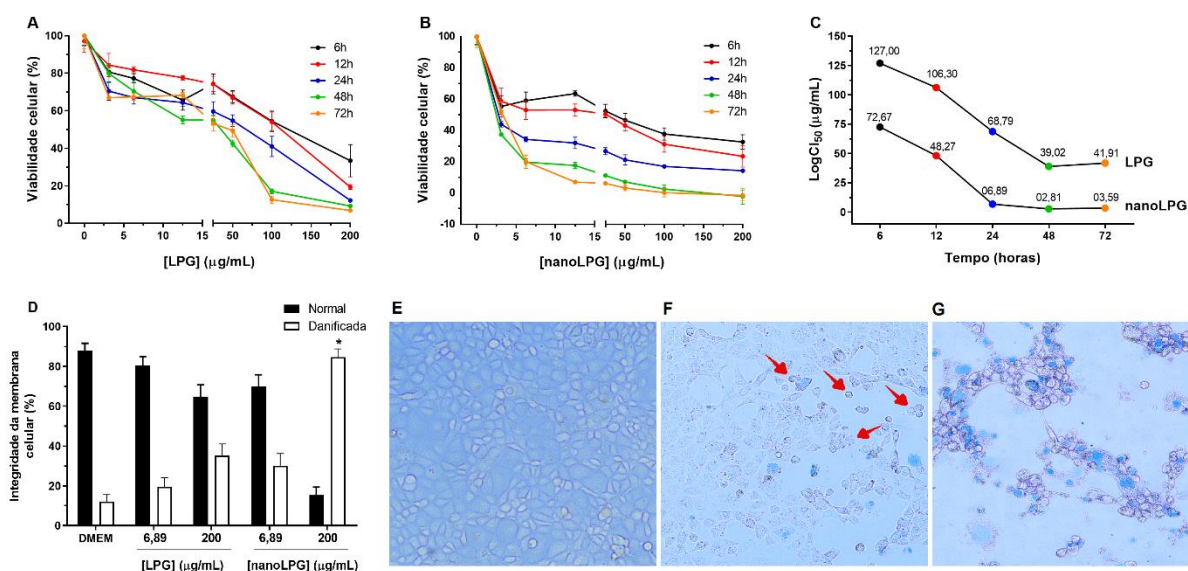


Figura 7. Efeito do LPG (A) e da nanoLPG (B) na viabilidade de células de carcinoma de próstata humana (DU-145) após 6, 12, 24, 48 e 72 horas de exposição. (C) Valores de CI_{50} obtidos pelo teste de viabilidade celular para DU-145. (D) Integridade de membrana celular após 24 horas de exposição. Ver fotomicrografias representativas das células DU-145 tratadas com meio DMEM (E), nanoLPG a

6,89 $\mu\text{g/mL}$ (F) e 200 $\mu\text{g/mL}$ (G) por 24 horas. As células foram coradas com azul de tripan e as imagens foram capturadas em ampliação de 100x. As setas vermelhas indicam células com morfologia sugestiva de morte celular. Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,01$ versus grupo controle DMEM.

O mecanismo inerente aos efeitos da nanoLPG nas células DU-145 foi avaliado seguindo os parâmetros: concentração correspondente à CI_{50} da nanoemulsão (6,89 $\mu\text{g/mL}$) e a maior concentração (200 $\mu\text{g/mL}$) com exposição por 24 horas. A análise de integridade de membrana celular pelo método de coloração por azul de tripan demonstrou que o LPG livre (6,89 e 200 $\mu\text{g/mL}$) não causou danos significativos em 24 horas de exposição quando comparadas ao controle negativo DMEM (Figura 7D). Este resultado corrobora com o observado por Dos Santos e colaboradores (2018) para o extrato rico de licopeno de goiaba (LEG) em células MCF-7.

O tratamento com a nanoLPG causou danos estatisticamente significativos à membrana celular apenas na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 7D). O azul de tripan cora células não-viáveis com uma coloração azul devido à ruptura da membrana, enquanto células não danificadas aparecem sem coloração (CROWLEY *et al.*, 2016a). Portanto, é possível notar nas fotomicrografias que as células do controle falham em captar o corante (Figura 7E), células tratadas com a nanoLPG a 6,89 $\mu\text{g/mL}$ também estavam sem coloração, embora muitas apresentassem morfologia sugestiva de morte celular (setas vermelhas, Figura 7F), enquanto as células tratadas com a nanoLPG a 200 $\mu\text{g/mL}$ encontravam-se coradas pelo tripan (Figura 7G). Este resultado mostra que a nanoemulsão, em altas concentrações, é capaz de afetar a integridade de membrana.

Além disso, a análise por citometria de fluxo das células DU-145 revelou que a nanoLPG, nas concentrações de 6,89 e 200 $\mu\text{g/mL}$ induziu alterações morfológicas expressivas (Figura 8A, D, E e F). Observou-se uma redução significativa ($p < 0,05$) na dispersão frontal de luz (*Forward Scatter* - FSC, Figura 8A) e na dispersão lateral de luz (*Side Scatter* - SSC, Figura 8D), o que é um indicativo de redução no tamanho e na granulosidade das células, respectivamente. Estas alterações morfológicas sugerem ruptura de membrana e extravasamento de conteúdo citoplasmático, o que ocorre na morte celular por necrose, como foi evidenciado também pelo ensaio com o azul de tripan. Nenhuma alteração morfológica significativa foi observada em células tratadas com o LPG livre (Figura 8A, D, G e H) quando comparado ao controle com DMEM (Figura 8A, B e D), o que pode estar relacionado ao baixo percentual de células

mortas neste ensaio. O grupo controle com DMSO (Figura 8A, C e D) exibiu redução na FSC e aumento na SSC, indicativos de encolhimento celular, o que acontece na morte celular por apoptose.

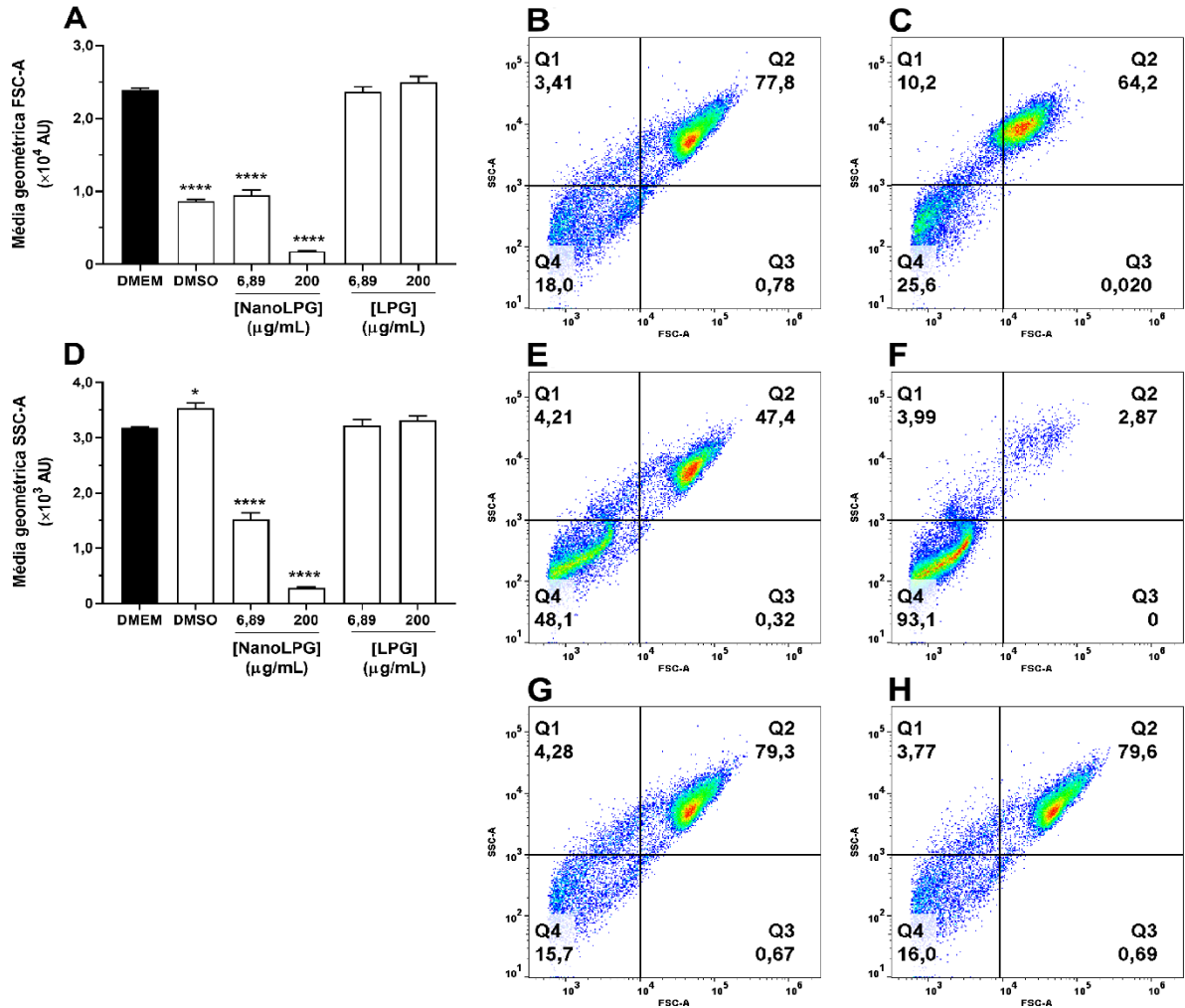


Figura 8. Efeito do LPG livre e da nanoLPG nos parâmetros morfológicos das células DU-145 analisadas por citometria de fluxo (20.000 eventos/amostra) após 24 horas de exposição a concentrações de 6,89 e 200 μ g/mL. Média geométrica do espalhamento frontal (FSC, A) e espalhamento lateral (SSC, D). *Scatter-plot* dos grupos DMEM (B), DMSO 20% (C), nanoLPG a 6,89 μ g/mL (E), nanoLPG a 200 μ g/mL (F), LPG a 6,89 μ g/mL (G) e LPG a 200 μ g/mL (H).

A análise da linhagem DU-145 por citometria de fluxo utilizando Anexina-V FITC/IP está representada na Figura 9. As células tratadas com o DMSO exibiram aumento na intensidade de fluorescência do IP e da Anexina-V, sugestivos de apoptose tardia (Figura 9B). A Anexina-V é comumente utilizada como um marcador para a fase inicial da via de apoptose tradicional por sua afinidade com a

fosfatidilserina (CROWLEY *et al.*, 2016b; DOS SANTOS *et al.*, 2018). O iodeto de propídio é um composto fluorogênico que se liga aos ácidos nucleicos, utilizado para marcar células necróticas (CROWLEY *et al.*, 2016b). Uma vez que as células tratadas com a nanoLPG (Figura 9C e D) não foram marcadas significativamente com a Anexina-V, o mecanismo de morte celular desempenhado pela amostra não corresponde à apoptose tradicional. Entretanto, a coloração por IP também não foi estatisticamente significativa quando comparada ao grupo controle tratado com DMEM (Figura 9A), embora os ensaios mencionados anteriormente sugiram um componente de necrose para a nanoLPG. Portanto, é possível hipotetizar que os efeitos desempenhados pela nanoLPG nas células DU-145 também não devem contemplar a necrose clássica. A necrose é tradicionalmente uma forma passiva e traumática de morte celular, mas a literatura descreve que certas necroses podem ocorrer de uma maneira altamente regulada, como a morte celular por parthanatos, necroptose, piroptose, entre outros (LU *et al.*, 2021; NIRMALA; LOPUS, 2020).

As células tratadas com o LPG livre (6,89 e 200 µg/mL) não exibiram aumento na intensidade de fluorescência do IP e/ou da Anexina-V (Figura 9E e F), o que pode estar relacionado ao baixo percentual de células mortas neste ensaio. Dos Santos e colaboradores (2018) demonstraram que o extrato rico em licopeno da goiaba vermelha (LEG) foi citotóxico para células de câncer de mama humano (MCF-7), pela indução de uma via semelhante à apoptose. Inúmeros estudos *in vitro* e *in vivo* descrevem os efeitos do licopeno no câncer de próstata. Mirahmadi e colaboradores (2020) revisaram recentemente que a atividade contra células de câncer de próstata era mediada principalmente pela inibição da proliferação celular, indução de apoptose, detenção do ciclo celular, controle da fase metastática e por meio de “*up*” ou “*down*” regulação de moléculas sinalizadoras e fatores de transcrição. Entretanto, o mecanismo específico de morte celular do LPG e da nanoLPG nas células de câncer de próstata ainda precisa ser mais investigado.

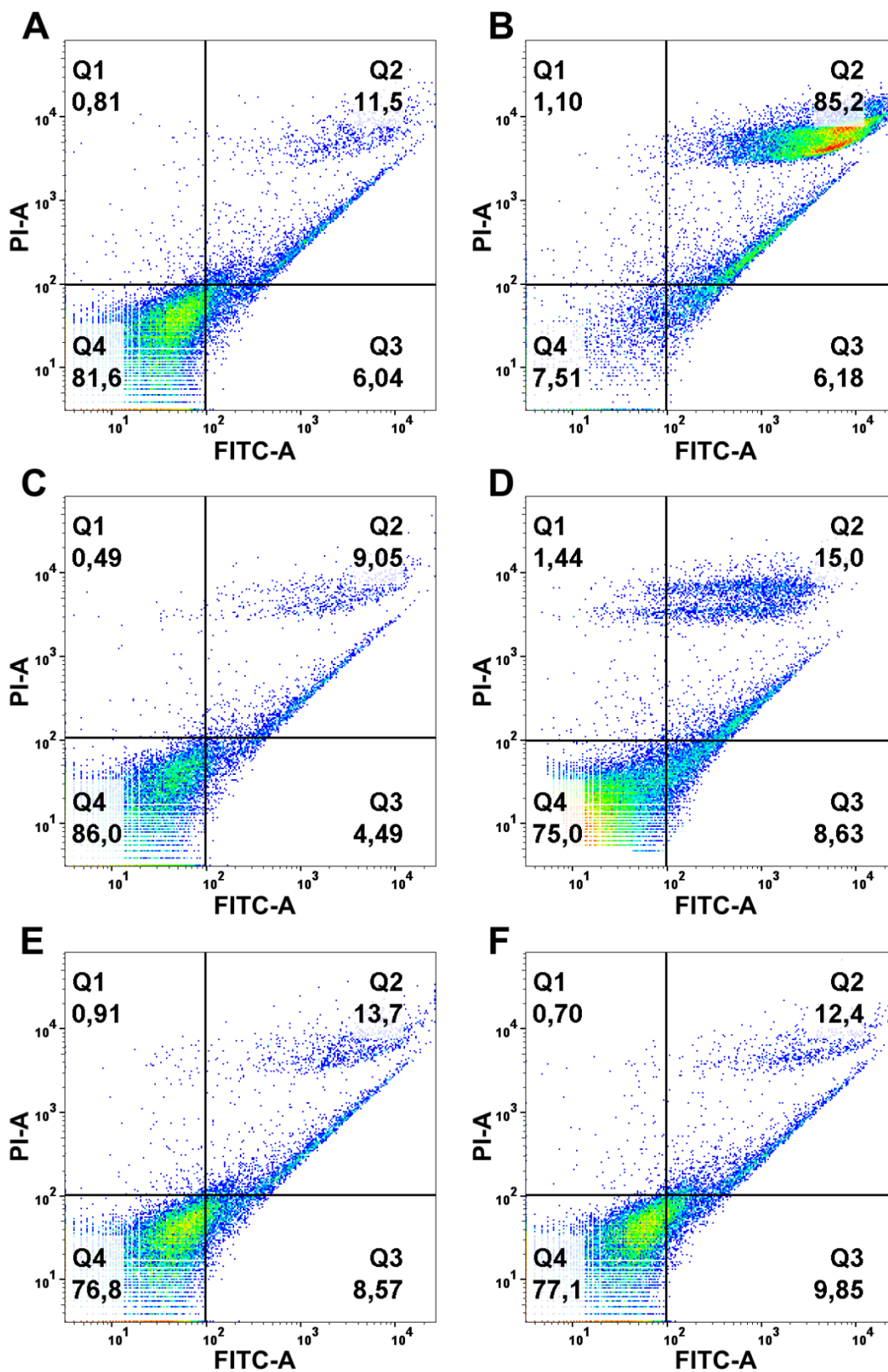


Figura 9. Análise por citometria de fluxo (20.000 eventos/amostra) de células DU-145 tratadas com LPG livre e com nanoLPG após 24 horas de exposição a 6,89 e 200 μ g/mL utilizando marcação por Anexina-V FITC/iodeto de propídio. DMEM (A) DMSO 20% (B), nanoLPG a 6,89 μ g/mL (C), nanoLPG a 200 μ g/mL (D), LPG a 6,89 μ g/mL (E) e LPG a 200 μ g/mL (F).

Células marcadas por fluorescência também foram analisadas em microscópio invertido sobre luz visível ou fluorescente. No grupo controle tratado com DMEM, observaram-se células viáveis, exibindo contorno citoplasmático bem definido (Figura 10A) e não-marcadas com Anexina-V (Figura 10B) ou IP (Figura 10C). Por outro lado, no grupo controle tratado com DMSO, as células mostraram características de dano celular, como aumento na granulosidade, perda do contorno citoplasmático bem definido e algumas células retraídas (Figura 10D). Nota-se a intensidade de fluorescência para ambos os marcadores de morte celular utilizados: Anexina-V (Figura 10E) ou IP (Figura 10F), característicos de apoptose tardia. As células tratadas com LPG a 200 µg/mL apresentaram-se semelhantes às células do grupo controle DMEM (Figura 10G), mas com a presença de poucas células marcadas com Anexina-V (Figura 10H) ou IP (Figura 10I). As células tratadas com a nanoLPG a 200 µg/mL apresentaram uma série de alterações morfológicas sugestivas para morte celular e mais células marcadas por fluorescência do que o LPG, mas ainda insuficientes quando comparadas ao grupo DMSO (Figura 10J, K, L). Estes resultados apoiam os dados observados por citometria de fluxo para necrose/apoptose.

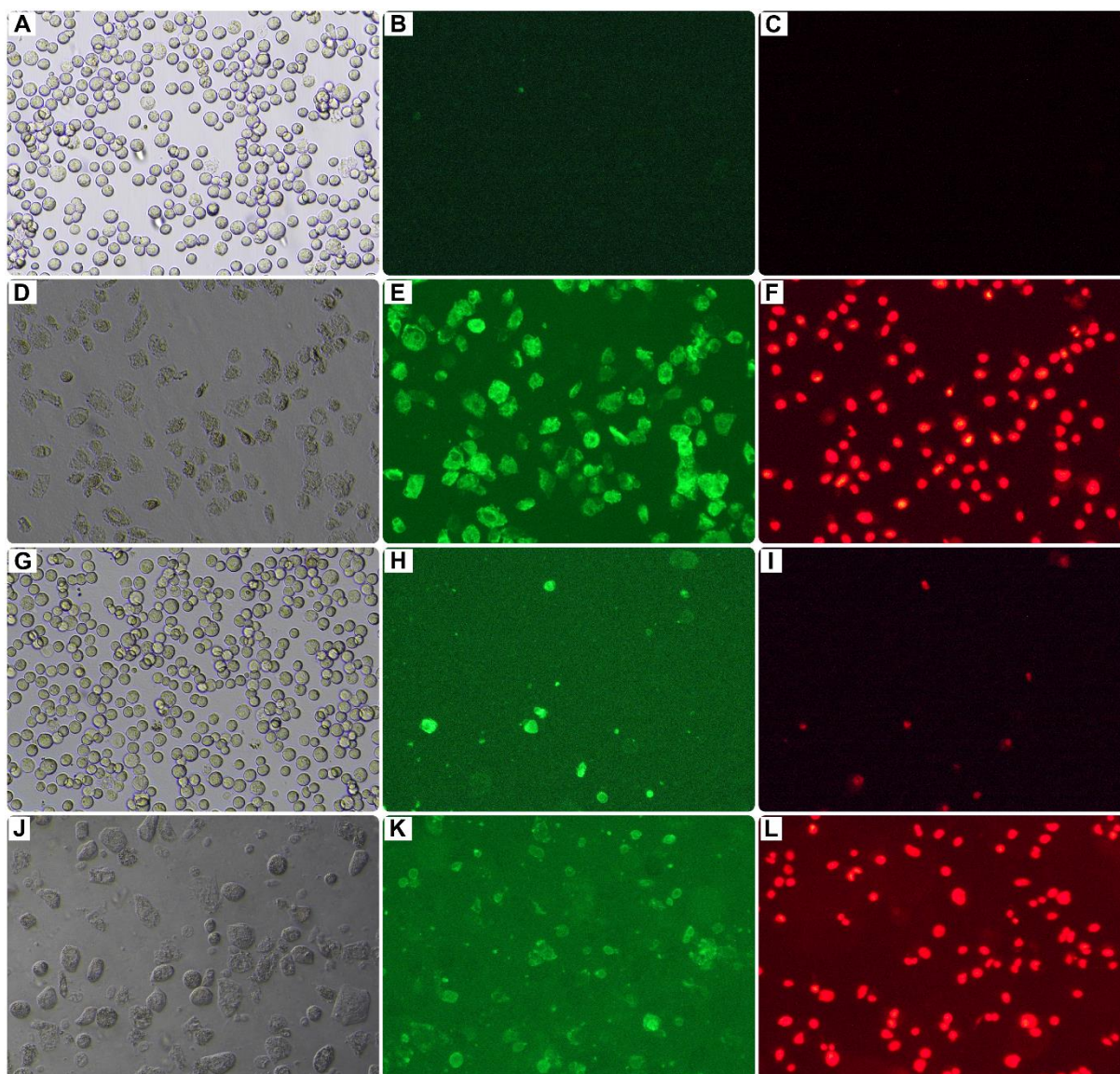


Figura 10. Fotomicrografias de microscopia de fluorescência representativas para as células DU-145 tratadas com meio DMEM (A, B, C), DMSO (D, E, F), LPG a 200 µg/mL (G, H, I), e nanoLPG a 200 µg/mL (J, K, L) por 24 horas. As células foram marcadas com Anexina-V FITC/Iodeto de propídio e as imagens foram capturadas em aumento de 200x. À esquerda: imagens de contraste de fase; no meio: marcação por Anexina-V; à direita: marcação por iodeto de propídio.

As alterações ultraestruturais das células DU-145 tratadas com o LPG livre e com a nanoLPG foram analisadas por MET, que fornece informações adicionais sobre os mecanismos que possam estar envolvidos nos efeitos da nanoemulsão nas células de câncer de próstata. A célula controle (Figura 11A) apresentavam superfície com algumas microvilosidades (cabeça de seta azul), retículo endoplasmático abundante (cabeça de seta vermelha) e núcleo oval (N), o que é considerado aspecto basal da linhagem DU-145 (STONE *et al.*, 1978). As células tratadas com LPG a 6,89 µg/mL

exibiram algumas alterações, como digestão celular (seta vermelha, Figura 11B), focos necróticos (seta azul, Figura 11C), mas com formação de estruturas membranosas (seta verde, Figura 11C) sugestivas de compartimentalização celular, que acontece no processo de apoptose. Nota-se que na mesma célula há componentes necróticos e apoptóticos (Figura 11C). A Figura 11D mostra a morfologia das células tratadas com LPG a 200 µg/mL, exibindo digestão intracelular difusa, aspecto vacuolizado, dissolução da membrana nuclear e do contorno citoplasmático, mas sem sinais de rompimento na membrana celular. As células tratadas com nanoLPG a 6,89 µg/mL mostrou focos necróticos (seta azul, Figura 11E e F) e aspecto vacuolizado (Figura 11E). Focos necróticos também foram observados nas células tratadas com nanoLPG a 200 µg/mL, associados com tumefação citoplasmática (seta azul, Figura 11H), mas sem danos visíveis à membrana celular. A ausência de danos abruptos na membrana corrobora com a observação de poucas células marcadas com o IP nos ensaios de fluorescência. Resumidamente, estes achados mostram alterações morfológicas sugestivas para necrose não clássica, o que corrobora com os dados de citometria. Golla, Hong e Chefetz (2021) avaliaram morte celular por necroptose utilizando MET e descreveram que o padrão visual típico destas células inclui células em tumefação, mitocôndrias aumentadas, vacúolos globulares, mas também ruptura da membrana e extravasamento do conteúdo celular. Apesar das semelhanças, mais estudos são necessários para confirmar o mecanismo de morte celular.

Além disso, as imagens de MET são evidências da interação e da internalização da nanoLPG. As setas laranjas indicam que a nanoLPG está ligada à membrana celular (Figura 11E e H), internalizada no endossomo (Figura 11E e F) e fragmentada em um endolisossomo (Figura 11I). De maneira interessante, os fragmentos das nanopartículas podem ser vistos no citoplasma ou associados a sistemas endomembranares (Figura 11G), bem como formando um rearranjo esférico em nanoescala dentro da célula (Figura 11I). Isto pode estar relacionado ao caráter lipídico das nanopartículas e do licopeno.

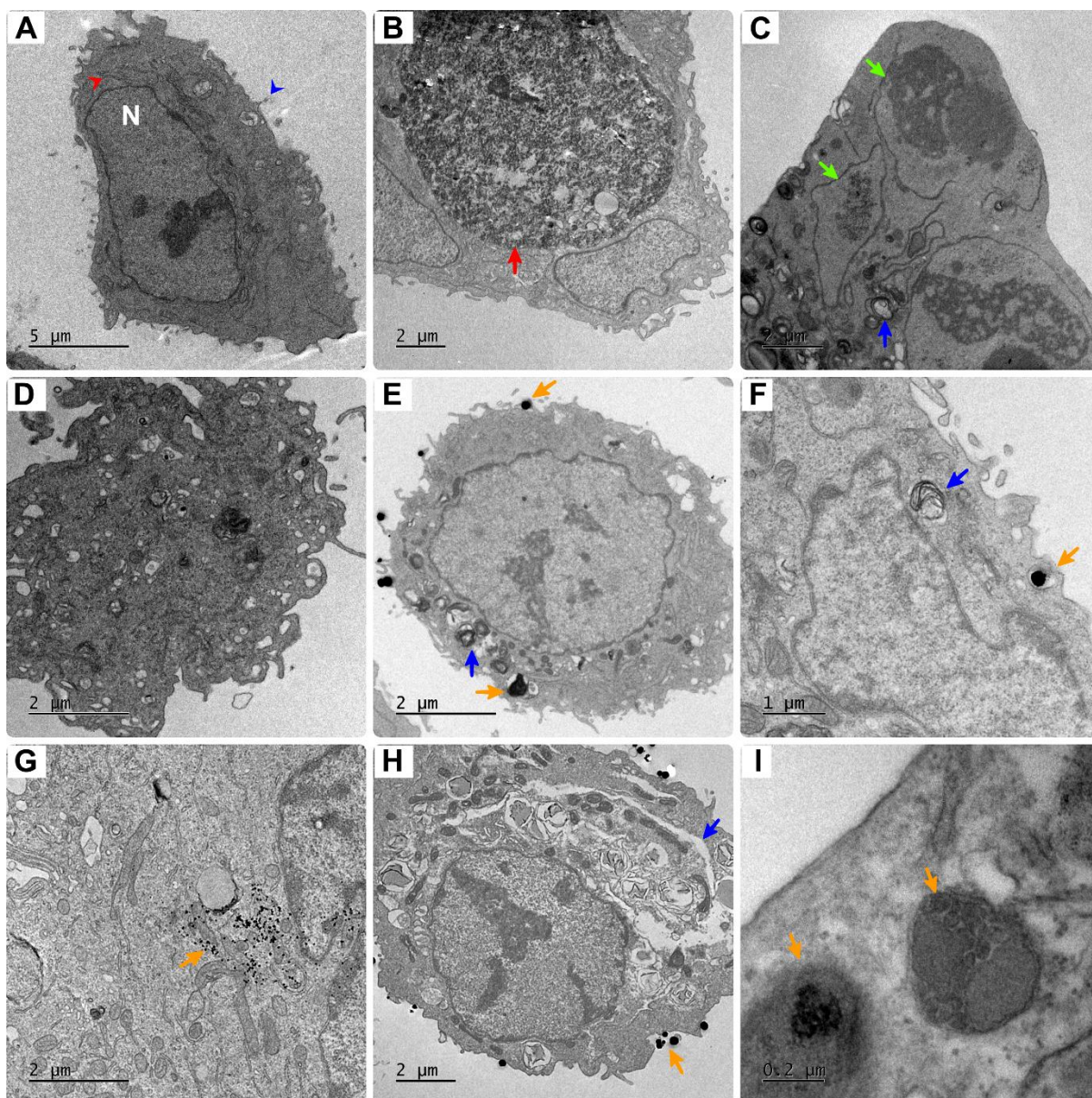


Figura 11. Micrografias representativas obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) para as células DU-145 tratadas com meio DMEM (A), LPG a 6,89 $\mu\text{g/mL}$ (B e C) e 200 $\mu\text{g/mL}$ (D), e nanoLPG a 6,89 $\mu\text{g/mL}$ (E, F e G) e 200 $\mu\text{g/mL}$ (H e I) por 24 horas. N = Núcleo. Cabeça de seta azul = microvilosidades, Cabeça de seta vermelha = retículo endoplasmático, seta vermelha = área de digestão, seta verde = área apoptótica, seta azul = foco necrótico e seta laranja = nanoLPG.

4. Conclusão

No presente estudo, um sistema autoemulsificante de entrega de drogas contendo licopeno purificado da goiaba vermelha foi satisfatoriamente produzido. A formulação mostrou propriedades físico-químicas satisfatórias, com tamanhos em torno de 200 nm, potencial zeta negativo, morfologia esférica e conferindo estabilidade

ao licopeno a 5°C por 10 meses. A nanoLPG exibiu uma atividade antioxidante atrativa e nenhuma alteração significativa foi observada nos parâmetros clínicos, comportamentais, bioquímicos e histopatológicos por 28 dias. Além disso, a nanoLPG forneceu licopeno para o fígado, rins e próstata com sucesso, bem como potencializou sua toxicidade contra células de câncer de próstata da linhagem DU-145, provavelmente por uma via independente das vias clássicas de apoptose e necrose. Juntos, estes resultados indicam que a nanoLPG pode ser um candidato viável e seguro para um sistema de entrega de licopeno, podendo ser aplicado como um produto baseado em nanotecnologia voltado para a saúde.

Referências bibliográficas

- ALIYU, A.; KABIRUYUNUSA, A.; ABDULLAHI, N. Kinetics of the thermal degradation of lycopene in tomatoes. **Croatian journal of food science and technology**, v. 12, n. 1, p. 84–89, 29 maio 2020.
- AMORIM, A. G. *et al.* 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**, v. 120, n. 3, p. 1700330, 2018.
- AMORIM, A. G. *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant activity improvement of lycopene from guava on nanoemulsifying system. **Journal of Dispersion Science and Technology**, p. 1–11, 2 mar. 2020.
- AMORIM, A. G. N.; LEITE, J. R. S. A.; ROPKE, C. D. **Obtenção de extrato rico em licopeno e licopeno puro de fonte natural**. Depositante: Universidade Federal do Piauí/Phytobios Pesquisas, Desenvolvimento e Inovação Ltda. Patente nº BR102016030594-2, 2016.
- BARANOWSKA-WÓJCIK, E. *et al.* Effects of titanium dioxide nanoparticles exposure on human health—a review. **Biological Trace Element Research**, v. 193, n. 1, p. 118–129, 1 jan. 2020.
- BETAGERI, G. V. Self-emulsifying drug delivery systems and their marketed products: a review. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 13, n. 2, p. 73–84, 2019.
- CAETANO-SILVA, M. E. *et al.* Isolation and sequencing of Cu-, Fe-, and Zn-binding whey peptides for potential neuroprotective applications as multitargeted compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 44, p. 12433–12443, 4 nov. 2020.
- CHERNYSHOVA, M. P. *et al.* Systemic and skin-targeting beneficial effects of lycopene-enriched ice cream: A pilot study. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 1, p. 14–25, jan. 2019.
- CORNBLEET, P. J. Clinical utility of the band count. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 22, n. 1, p. 101–136, mar. 2002.
- CROWLEY, L. C. *et al.* Measuring cell death by trypan blue uptake and light microscopy. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 7, p. pdb.prot087155, jul. 2016a.
- CROWLEY, L. C. *et al.* Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin v binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 11, p. pdb.prot087288, nov. 2016b.
- DA SILVA BRITO, A. K. *et al.* Lycopene-rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) decreases plasma triglycerides and improves oxidative stress biomarkers on experimentally-induced dyslipidemia in hamsters. **Nutrients**, v. 11, n. 2, p. 393, 13 fev. 2019.

DOS SANTOS, P. P. *et al.* Development of lycopene-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and stability study. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, n. 2, p. 107, fev. 2015.

DOS SANTOS, R. C. *et al.* 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**, v. 105, p. 184–196, 2018.

DU, B.; YU, M.; ZHENG, J. Transport and interactions of nanoparticles in the kidneys. **Nature Reviews Materials**, v. 3, n. 10, p. 358–374, 2018.

EFSA. Scientific Opinion on the re-evaluation of polyoxyethylene sorbitan monolaurate (E 432), polyoxyethylene sorbitan monooleate (E 433), polyoxyethylene sorbitan monopalmitate (E 434), polyoxyethylene sorbitan monostearate (E 435) and polyoxyethylene sorbitan tristearate (E 436) as food additives. **EFSA Journal**, v. 13, n. 7, jul. 2015.

EJIKE, D. E. *et al.* Lycopene attenuates diabetes-induced oxidative stress in Wistar rats. **Journal of Diabetes and Endocrinology**, v. 9, n. 2, p. 11–19, 31 maio 2018.

FERREIRA, A. L. A. *et al.* Tissue distribution of lycopene in ferrets and rats after lycopene supplementation. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 5, p. 1256–1260, 1 maio 2000.

FRIEDRICH, R. B. *et al.* Skin penetration behavior of lipid-core nanocapsules for simultaneous delivery of resveratrol and curcumin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 78, p. 204–213, out. 2015.

GHELICHPOUR, M. *et al.* Plasma proteins, hepatic enzymes, thyroid hormones and liver histopathology of *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) exposed to an oxadiazin pesticide, indoxacarb. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 11, p. 5666–5676, nov. 2017.

GOLLA, N.; HONG, L. J.; CHEFETZ, I. Visualization of necroptotic cell death through Transmission Electron Microscopy. In: ALVERO, A. B.; MOR, G. G. (Eds.). **Detection of Cell Death Mechanisms**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer US, v. 2255p. 135–147, 2021.

GONZÁLEZ-REZA, R. M. *et al.* Effect of sucrose concentration and pH onto the physical stability of β -carotene nanocapsules. **LWT**, v. 90, p. 354–361, abr. 2018.

HEDAYATI, N. *et al.* Protective effect of lycopene against chemical and natural toxins: A review: lycopene against chemical and natural toxins. **BioFactors**, v. 45, n. 1, p. 5–23, jan. 2019.

KAGA, S. *et al.* Influence of size and shape on the biodistribution of nanoparticles prepared by polymerization-induced self-assembly. **Biomacromolecules**, v. 18, n. 12, p. 3963–3970, 11 dez. 2017.

KORYTKO, P. J. *et al.* Pharmacokinetics and tissue distribution of orally administered lycopene in male dogs. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 9, p. 2788–2792, 1 set. 2003.

KRIEGEL, C. *et al.* Pediatric safety of polysorbates in drug formulations. **Children**, v. 7, n. 1, p. 1, 20 dez. 2019.

LI, D. *et al.* Physical properties of oil-in-water nanoemulsions stabilized by OSA-modified starch for the encapsulation of lycopene. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 552, p. 59–66, 2018.

LINDSHIELD, B. L. *et al.* Lycopene biodistribution is altered in 15,15'-carotenoid monooxygenase knockout mice. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 12, p. 2367–2371, 1 dez. 2008.

LU, L.-Q. *et al.* Targeting the pathways of regulated necrosis: a potential strategy for alleviation of cardio-cerebrovascular injury. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 1, p. 63–78, jan. 2021.

MARSUP, P. *et al.* Enhancement of chemical stability and dermal delivery of *Cordyceps militaris* extracts by nanoemulsion. **Nanomaterials**, v. 10, n. 8, p. 1565, 9 ago. 2020.

MIRAHMADI, M. *et al.* Potential inhibitory effect of lycopene on prostate cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 129, p. 110459, set. 2020.

NIRMALA, J. G.; LOPUS, M. Cell death mechanisms in eukaryotes. **Cell Biology and Toxicology**, v. 36, n. 2, p. 145–164, abr. 2020.

OCDE. **Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure**. [s.l.] OCDE, 2002a.

OCDE. **Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Human Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation**. [s.l.] OCDE, 2002b.

OCDE. **Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents**. [s.l.] OCDE, 2008.

PANCHAL, J. *et al.* Analyzing subvisible particles in protein drug products: a comparison of Dynamic Light Scattering (DLS) and resonant mass measurement (RMM). **The AAPS journal**, v. 16, n. 3, p. 440–451, 2014.

PRZYBYLSKA, S. Lycopene – a bioactive carotenoid offering multiple health benefits: a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 55, n. 1, p. 11–32, jan. 2020.

SILVA, B. *et al.* New nanoparticles for topical ocular delivery of erythropoietin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 576, p. 119020, fev. 2020.

SINGH, S.; BAJPAI, M.; MISHRA, P. 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**, v. 37, n. 4, p. 305–329, 2020.

SMITH, M. C. *et al.* Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 24, p. 5779–5787, set. 2017.

SRIVASTAVA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Lycopene; chemistry, biosynthesis, metabolism and degradation under various abiotic parameters. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 41–53, jan. 2015.

STICE, C. P.; XIA, H.; WANG, X.-D. Tomato lycopene prevention of alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma development. **Chronic Diseases and Translational Medicine**, v. 4, n. 4, p. 211–224, dez. 2018.

STONE, K. R. *et al.* Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). **International journal of cancer**, v. 21, n. 3, p. 274–281, 1978.

SUSILO, R. J. K. *et al.* Hepatoprotective effect of crude polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum* against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. **Veterinary World**, v. 12, n. 12, p. 1987–1991, dez. 2019.

TAN, B.; SODERSTROM, D. N. Qualitative aspects of UV-vis spectrophotometry of beta-carotene and lycopene. **Journal of Chemical Education**, v. 66, n. 3, p. 258, mar. 1989.

TRAN, P.; PARK, J.-S. Recent trends of self-emulsifying drug delivery system for enhancing the oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, p. 1–25, 2 fev. 2021.

VASCONCELOS, A. G. *et al.* 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**, v. 99, p. 959–968, set. 2017.

VASCONCELOS, A. G. *et al.* 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**, v. 136, p. 109548, 2020.

WADIE, W. *et al.* Protective impact of lycopene on ethinylestradiol-induced cholestasis in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 9 out. 2020.

WANG, C. *et al.* Fluorescent glycan nanoparticle-based FACS assays for the identification of genuine drug-resistant cancer cells with differentiation potential. **Nano Research**, v. 13, n. 11, p. 3110–3122, nov. 2020.

WANG, X. D. Lycopene metabolism and its biological significance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 96, n. 5, p. 1214S-1222S, 1 nov. 2012.

WANYI, W. *et al.* Comparison of emulsifying characteristics of different macromolecule emulsifiers and their effects on the physical properties of lycopene nanoemulsions. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 41, n. 4, p. 618–627, 20 mar. 2020.

WOŹNIAK, A. *et al.* Size and shape-dependent cytotoxicity profile of gold nanoparticles for biomedical applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 28, n. 6, p. 92, jun. 2017.

WU, X. *et al.* Inhibition of intrinsic coagulation improves safety and tumor-targeted drug delivery of cationic solid lipid nanoparticles. **Biomaterials**, v. 156, p. 77–87, fev. 2018.

XIONG, J. *et al.* Ultrasonic dispersion of nano TiC powders aided by Tween 80 addition. **Ceramics International**, v. 38, n. 3, p. 1815–1821, abr. 2012.

YEN, C.-C. *et al.* Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System for resveratrol: enhanced oral bioavailability and reduced physical fatigue in rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, p. 1853, 25 ago. 2017.

ZARDINI, A. A. *et al.* Production and characterization of nanostructured lipid carriers and solid lipid nanoparticles containing lycopene for food fortification. **Journal of food science and technology**, v. 55, n. 1, p. 287–298, 2018.

ZHAO, Z. *et al.* Preparation, characterization, and evaluation of antioxidant activity and bioavailability of a self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for buckwheat flavonoids. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 52, n. 11, p. 1265–1274, 11 dez. 2020.

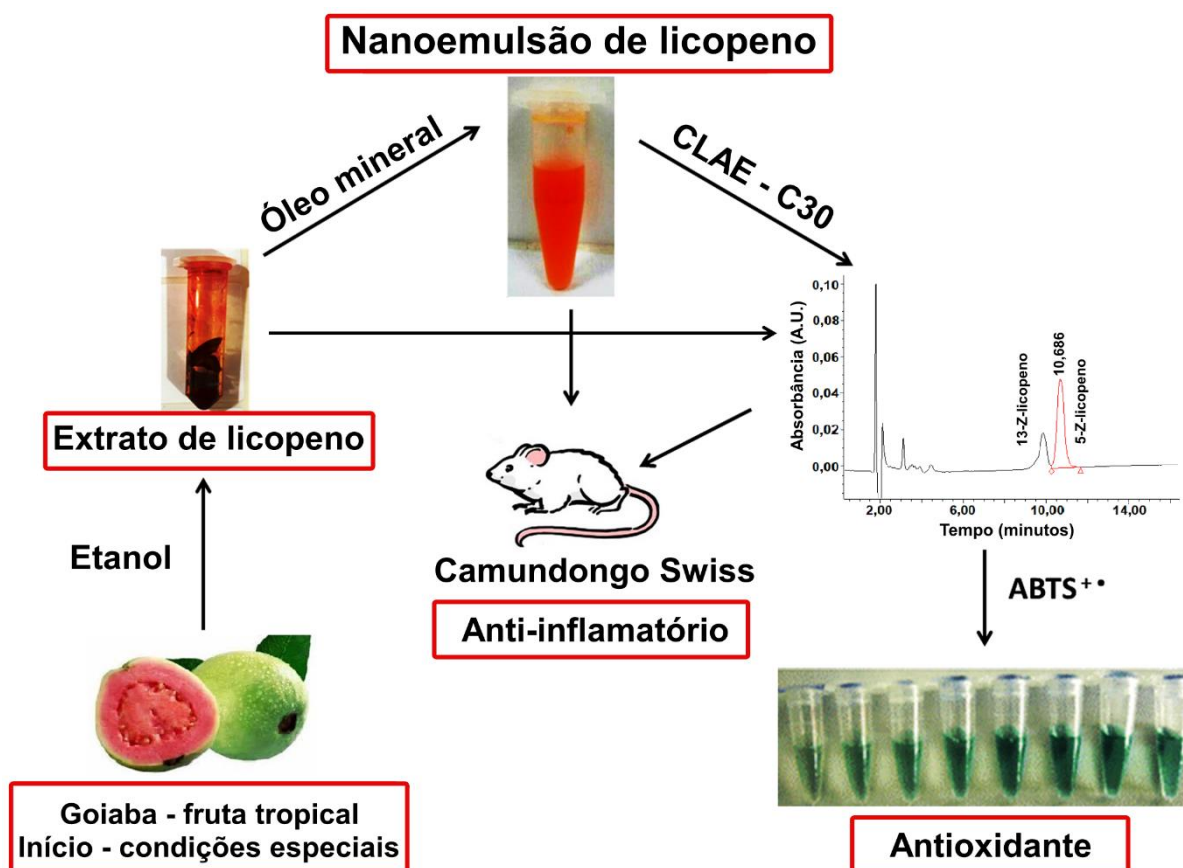
ZHU, Z. *et al.* Comparison of natural and synthetic surfactants at forming and stabilizing nanoemulsions: Tea saponin, Quillaja saponin, and Tween 80. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 536, p. 80–87, fev. 2019.

CAPÍTULO III

Artigo publicado em coautoria no periódico Journal of Dispersion Science and Technology em 2020.

ISSN: 1532-235

DOI: <https://doi.org/10.1080/01932691.2020.1728300>



Otimização da atividade anti-inflamatória e antioxidante do licopeno da goiaba em um sistema nanoemulsificado

Resumo

O sistema de nanoemulsão pode melhorar a estabilidade de moléculas antioxidantes em comparação à molécula isolada. Portanto, este estudo teve como objetivo estabelecer condições de estabilidade térmica, realizar a caracterização química e determinar a atividade antioxidante e anti-inflamatória de uma nanoemulsão de licopeno. Diferentes ensaios químicos foram utilizados para caracterizar a nanoemulsão de licopeno (LN) e o licopeno purificado da goiaba vermelha (LPG), como CLAE, UV-Vis, DLS e ABTS para analisar a atividade antioxidante da nanoemulsão de licopeno. Para testar sua estabilidade térmica como uma nanoemulsão antioxidante, as análises de termogravimetria (TGA) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram utilizadas. O modelo de edema de pata induzido por carragenana em camundongos *Swiss* foi utilizado, juntamente com a análise histopatológica, para avaliar a atividade anti-inflamatória do sistema. Uma emulsão com um diâmetro médio da partícula de 167,1 nm foi produzida. O UV-Vis detectou $\lambda_{\text{máx}} = 447,1; 473,7 \text{ e } 505,3 \text{ nm}$ para o licopeno de goiaba e a análise por CLAE-DAD, utilizando uma coluna C30, em 472 nm identificou a presença do licopeno na nanoemulsão. Esta nanoemulsão de licopeno apresentou estabilidade térmica à temperatura ambiente, bem como em concentração quando armazenada por um ano. O produto também foi capaz de inibir significativamente ($p < 0,05$) a formação do edema, com efeito inibitório máximo na dose de 50 mg/kg, tanto por via oral quanto por via intraperitoneal, além de reduzir a migração neutrofílica para o tecido da pata. A nanoemulsão de licopeno apresenta potencial como candidata para a investigação e tratamento de várias doenças, incluindo a inflamação, uma vez que esta emulsão apresentou aplicação terapêutica para doenças inflamatórias, além de ter potencial uso como um aditivo para pomadas/cremes de aplicação tópica.

Palavras-chave: anti-inflamatório, licopeno, nanoemulsão, comportamento térmico.

1. Introdução

As nanoemulsões fazem parte das dispersões coloidais. Elas são sistemas ternários simples, compostos de uma fase oleosa, uma fase aquosa e um surfactante, que se formam espontaneamente por meio de um auto-organização termodinâmica (HUANG *et al.*, 2015; KOROLEVA; YURTOV, 2012). Os antioxidantes são, por sua vez, moléculas muito instáveis, conhecidas por seu potencial de neutralizar espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais danificam as membranas biológicas (BOYACIOGLU *et al.*, 2016). Dentre os mais conhecidos antioxidantes, encontram-se os compostos fenólicos, enzimas, tocoferóis, vitamina C e os carotenoides (Vitamina A e licopeno).

Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis, responsáveis pela coloração vermelha e laranja de algumas frutas. Dentre eles, o licopeno é o carotenoide que apresenta maior capacidade antioxidante contra o oxigênio singlete, prevenindo doenças cardiovasculares e o câncer de próstata (BOEIRA *et al.*, 2014). Ele pode ser encontrado em frutas vermelhas como a goiaba, tomate, melancia e uvas (ANESE *et al.*, 2015), apresenta alta sensibilidade à luz, deteriora-se facilmente durante o processamento e armazenamento e apresenta baixa biodisponibilidade (HA *et al.*, 2015).

Obter licopeno estável é um desafio devido à presença de 11 ligações duplas conjugadas em sua estrutura, as quais conferem maior instabilidade à molécula (DEGROU *et al.*, 2013), mas também a fazem altamente reativa com o oxigênio singlete. Nanoemulsões utilizam surfactantes lipofílicos e hidrofílicos, bem como água, para construir diagramas de fase pseudoternários (KOROLEVA; YURTOV, 2012).

Então, a maior parte dos estudos conduzidos até o momento tem sido realizada assumindo que um aumento na solubilidade em água desempenha um importante papel no aumento da biodisponibilidade de compostos bioativos. A modificação das características físicas das partículas pode alterar a transparência, as propriedades de liberação, de absorção e a estabilidade do licopeno durante o armazenamento em nanoemulsões preparadas para produtos alimentícios (AMORIM *et al.*, 2018; PEPE *et al.*, 2012).

Portanto, os principais objetivos deste estudo consistiram em realizar a caracterização química e analisar a atividade biológica de uma nanoemulsão de

licopeno, determinar a estabilidade do licopeno na nanoemulsão, bem como a influência desta nanoemulsão na atividade antioxidante e anti-inflamatória do licopeno. Para isto, várias técnicas como espectrofotometria (UV-Vis), cromatografia (CLAE), estabilidade térmica (DSC), raios-X (DRX), mensuração de tamanho (DLS) e potencial zeta foram utilizadas para realizar a caracterização química da nanoemulsão. O ensaio de ABTS foi utilizado para determinar sua atividade antioxidante e a atividade anti-inflamatória foi determinada em modelo animal.

2. Material e métodos

2.1. Materiais

Os reagentes diclorometano, clorofórmio, etanol e acetato de amônio (Brasil, Portugal) eram de grau analítico, enquanto a acetonitrila, o hexano e o metanol (Portugal) utilizados para a análise de CLAE eram de grau cromatográfico. O padrão de licopeno de tomate foi comprado da Sigma-Aldrich (Portugal). Água Milli-Q foi utilizada para o ensaio antioxidante. O filtro Millipore (Brasil) foi utilizado para as análises de DLS e potencial zeta. Indometacina e λ -carragenina foram adquiridas da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

2.2. Animais

Camundongos *Swiss* (machos e fêmeas, 30 ± 5 g) foram mantidos sob um ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com controle de temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e acesso livre a água e comida. Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí, sob número de protocolo 068/14 (Anexo III), e os procedimentos foram realizados de acordo com o *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA).

2.3. Isolamento do licopeno

O licopeno foi extraído de goiabas vermelhas, em alto grau de maturação, de acordo com as metodologias descritas por Amorim *et al.* (2018) e Amorim, Leite e

Pintado (2018). As goiabas vermelhas foram obtidas da produção orgânica dos Tabuleiros Litorâneos (Parnaíba, Piauí, Brasil). A fruta foi submetida a tratamento térmico após congelamento. A extração com solvente orgânico (etanol) foi realizada até a completa extração da coloração vermelha da fruta.

O extrato de licopeno obtido foi concentrado em rotaevaporador (R215, Buchi, Suíça), a temperatura ambiente, e depois submetido ao processo de purificação. Todos os passos foram conduzidos em ambiente com baixa luminosidade e em atmosfera de nitrogênio. Os perfis do licopeno purificado da goiaba (LPG) e do licopeno na nanoemulsão foram analisados por CLAE.

2.4. Preparo da Nanoemulsão de Licopeno (LN)

O licopeno em excesso foi solubilizado em óleo mineral: 5 mg de licopeno foram adicionados a 1 mL de óleo mineral. Esta mistura foi deixada em uma incubadora com agitação (35°C) por 72 horas. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a $8944 \times g$ por 10 minutos para separar as moléculas dissolvidas no sobrenadante. A quantidade não dissolvida do composto foi obtida no *pellet* precipitado. Alíquotas do sobrenadante foram diluídas em uma solução de fosfato de potássio (KH_2PO_4) e quantificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

2.5. Espectrofotometria UV-Vis

Os espectros UV-Vis do padrão de licopeno e da nanoemulsão foram analisados em água, no intervalo de varredura de 600-200 nm e as absorções máximas ($\lambda_{\text{máx}}$) dos compostos foram determinadas. Os espectros foram obtidos utilizando um espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu (Tokyo, Japão). Para as medidas, um volume de 50 μL foram retirados das amostras em clorofórmio (LPG e padrão de licopeno) e diluídos em 3 mL de etanol. Para a nanoemulsão, 50 μL foram diluídos em 3 mL de água.

2.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As concentrações de licopeno na nanoemulsão e do licopeno purificado da goiaba foram determinadas com um sistema de CLAE Waters 2690, com um detector de arranjo de fotodiodos 966 (Waters Series 600, Massachussets, EUA), usando uma coluna RPAQUEOUS Develosil C30 (4,6 × 150 mm, 5 mm), com uma pré-coluna contendo a mesma fase estacionária (SymmetryVR, C18) e mantida a 25°C. A fase móvel utilizada consistiu em acetonitrila:metanol:hexano:diclorometano:acetato de amônio (55:22:11,5:0,02 v/v/v/v/w), em condições isocráticas e fluxo de 1 mL.min⁻¹. Os espectros DAD foram coletados de 600 a 200 nm, em intervalos de 2 nm. Os tempos de retenção, bem como os espectros, foram comparados com padrões na mesma faixa. Uma curva de calibração foi construída com licopeno e foi calculada como equivalentes a licopeno, em A₄₇₂ nm, em mg.mL⁻¹ na nanoemulsão (AMORIM, LEITE, PINTADO, 2018).

2.7. Espalhamento de Luz Dinâmico e potencial zeta.

A técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) foi utilizada para medir o tamanho hidrodinâmico (diâmetro), em modo *batch*, utilizando um equipamento Malvern Zetasizer Nano S90 (Malvern Instruments, Reino Unido). O detector apresentava uma abrangência de 10° - 175° e uma resolução de 0,9° por etapa. A amostra foi filtrada com um filtro de 0,45 µm (Millipore) e equilibradas por 5 minutos, a 25 °C antes das medidas. Três medidas foram realizadas por amostra. Os valores de potencial zeta (ζ) foram obtidos utilizando 1 mL de uma solução de LN, diluída em uma proporção de 1:200, em um espectrômetro Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Reino Unido), a 25°C.

2.8. Difração de raios-X (DRX)

Os dados de DRX foram obtidos com um difratômetro Rigaku Ultima, modelo IV, com ânodo de Cu e detector 2D, equipado com monocromador de grafite e tubo de ânodo giratório, operando em CuK α e $\lambda = 15,406$ nm, 50 kV e 100 mA. Os padrões de difração em pó foram obtidos no modo de varredura contínua, 2 horas, 3° - 50°, intervalos de 0,02° e 5s/intervalo. O *software Peak fitting module* (PEAK Fitting

Module. Northampton: OriginLab Corporation, One Roundhouse Plaza) foi utilizado para decomposição do padrão semicristalino.

2.9. Análise térmica

O ponto de fusão, entalpia e calor específico aparente foram medidos por calorimetria diferencial de varredura - DSC (modelo TGA-50H Thermobalance Shimadzu), de acordo com Singh, Tiwary e Rana (2013), com modificações. Para isto, 10 ± 1 mg de LN foram pesados em cadinho de alumínio de 50 μ L e hermeticamente fechados. Nitrogênio, em um fluxo de 20 mL.min⁻¹, foi utilizado como carreador. As amostras foram resfriadas e aquecidas de 20 - 600°C, a 2°C.min⁻¹ e equilibradas por 10 minutos. Um cadinho idêntico e vazio foi utilizado como referência durante os experimentos e água deionizada foi utilizada para ajustar a linha de base. Cada termograma foi analisado para determinar o início utilizando o software do DSC. Os valores médios de três medidas replicadas foram obtidos.

2.10. Avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio de ABTS

O ensaio de sequestro do radical ABTS foi adaptado de Amorim e colaboradores (2018) e aplicado neste estudo. A solução estoque de ABTS+• foi preparada por meio da reação de 7 mM de ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio (agente oxidante) e diluindo a solução estoque em água ultrapura até obter uma absorbância de $0,7000 \pm 0,020$ em 734 nm (espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu 1240). Um volume de 50 μ L da LN de goiaba foi adicionado a 950 μ L de uma solução de ABTS+• e a absorbância foi mensurada exatamente 6 minutos após a mistura inicial. A inibição do conteúdo de ABTS+• (%) para a amostra testada e para as concentrações conhecidas de Trolox foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: % Inibição = $[100 \times (A_0 - A)/A_0]$, onde A_0 corresponde à solução de ABTS+• diluída na ausência da amostra e A corresponde à absorbância final da solução de ABTS+• na presença da amostra. A curva de calibração (Figura 9, Equação 1) foi construída com Trolox em concentrações variando de 20 - 1.200 mM. Os resultados foram expressos em valores equivalentes a Trolox em μ M de Trolox g⁻¹ (Tabela 1).

$$y = -0,0003x + 0,3405; r^2 = 0,9974 \quad (1)$$

2.11. Avaliação da atividade anti-inflamatória por edema de pata induzido por carragenina

O edema de pata induzido por carragenina foi conduzido de acordo com o método sugerido por Vasconcelos e colaboradores (2017). Camundongos *Swiss* foram divididos aleatoriamente em grupos (n = 11) e o edema foi induzido por injeção intraplantar (i.pl) de 50 µL de uma suspensão de carragenina (500 µg/pata em solução salina estéril a 0,9%), na pata traseira. Os animais receberam um pré-tratamento trinta minutos antes da indução do edema com Indometacina (10 mg/kg), como fármaco de referência, licopeno purificado de goiaba vermelha (LPG 12,5 mg/kg) ou LN (25, 50 ou 100 mg/kg). As amostras foram administradas por via intraperitoneal (i.p) ou oral (v.o). O volume da pata foi medido imediatamente após o estímulo (V_0 : volume basal) e 1, 2, 3 e 4 horas depois (V_t) por deslocamento de água em pletistômetro (LE 7500, Panlab, Barcelona, Espanha). O percentual de inibição do edema para o grupo tratado em comparação ao grupo controle, que recebeu carragenina, foi calculado segundo a fórmula:

$$Inibição (\%) = \frac{(V_t - V_0)_{controle} - (V_t - V_0)_{tratado} \times 100}{(V_t - V_0)_{controle}}$$

2.12. Análise histopatológica

As peles da região plantar dos camundongos foram obtidas dos grupos submetidos aos testes de edema de pata induzido por carragenina após 4 horas de indução da inflamação. Os tecidos foram fixados em 10% de formaldeído tamponado por 24 horas, desidratados com concentrações crescentes de etanol, diafanizados com xileno, impregnados e embebidos em parafina, seccionados (5 µm) e corados com Hematoxilina e Eosina (HE). As imagens dos cortes histológicos foram obtidas utilizando um ScanScope Aperio (Leica Biosystem Inc, EUA), com aumento de 400x. Um único observador conduziu as análises histopatológicas em todos os cortes, para avaliar a arquitetura tecidual e quantificar o infiltrado inflamatório. A avaliação foi

realizada em três áreas equidistantes ($2,25 \times 10^4 \mu\text{m}^2$) utilizando o Software Aperio ImageScope versão 12.4.0.5043 (Leica Biosystem Inc, EUA).

2.13. Análise estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média e desvio padrão (DP) por ANOVA. A análise estatística do ensaio biológico foi realizada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov para determinar a normalidade dos dados, análise de variância de uma via (ANOVA) e pós-teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls para determinar significância estatística entre os grupos. Considerando dados paramétricos, ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni foram utilizados para comparar os dados histopatológicos obtidos para os grupos independentes. As análises realizadas empregando o software PRISM[®] 5.0 (GraphPad, EUA, 2005). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), e significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Síntese e caracterização química da LN

A Figura 1 mostra os espectros obtidos para o padrão de licopeno e a LN com três absorções máximas, espectros típicos de carotenoides. A presença do licopeno na nanoemulsão foi confirmada pelo espectro com absorbância entre 400 e 600 nm, com absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) localizada em 447,1; 473,7 e 505,3 nm (AMORIM *et al.*, 2018; DOS SANTOS *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2010). Estes $\lambda_{\text{máx}}$ foram consistentes com a faixa observada para o padrão de licopeno.

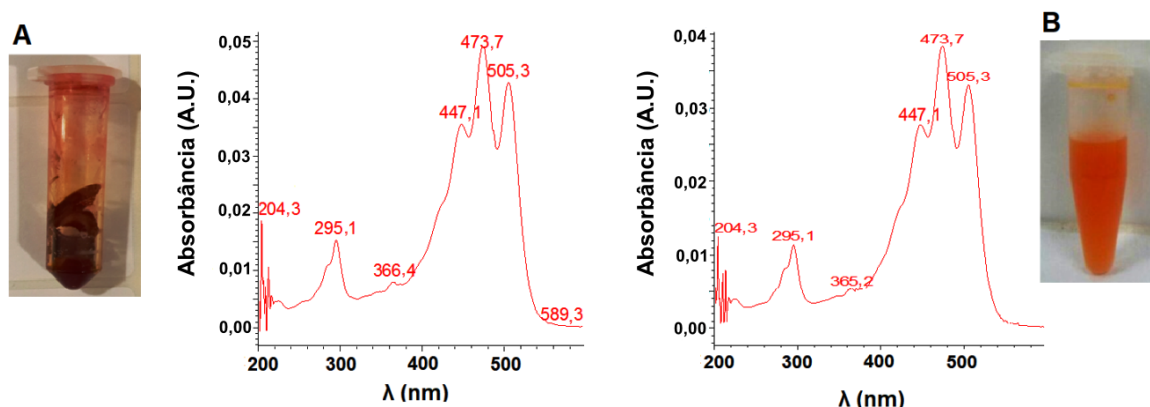


Figura 1. Espectros UV-Vis do licopeno purificado da goiaba (A) e da nanoemulsão de licopeno (B).

A área do pico de licopeno na nanoemulsão detectado por CLAE-DAD em 472 nm foi identificada como licopeno de goiaba. Os picos de interesse foram identificados pelos seus tempos de retenção e espectros UV-Vis nas amostras e no padrão. No presente estudo, dois picos com absorção máxima em diferentes tempos de retenção foram detectados (Figura 2) com espectros típicos do licopeno (Figura 1). A eluição da LN pela coluna C30 demonstrou a presença de um alto conteúdo de licopeno semelhante ao obtido a partir da goiaba e um baixo conteúdo de licopeno semelhante ao padrão, cujos tempos de retenção foram 10,6 minutos e 9,8 minutos (Figura 2). A coluna C30 foi escolhida para esta técnica por ser conveniente em termos de eficiência e velocidade, mas também por favorecer a separação de amostras com alto conteúdo de isômeros (AMORIM; LEITE; PINTADO, 2018; ARATHI *et al.*, 2015).

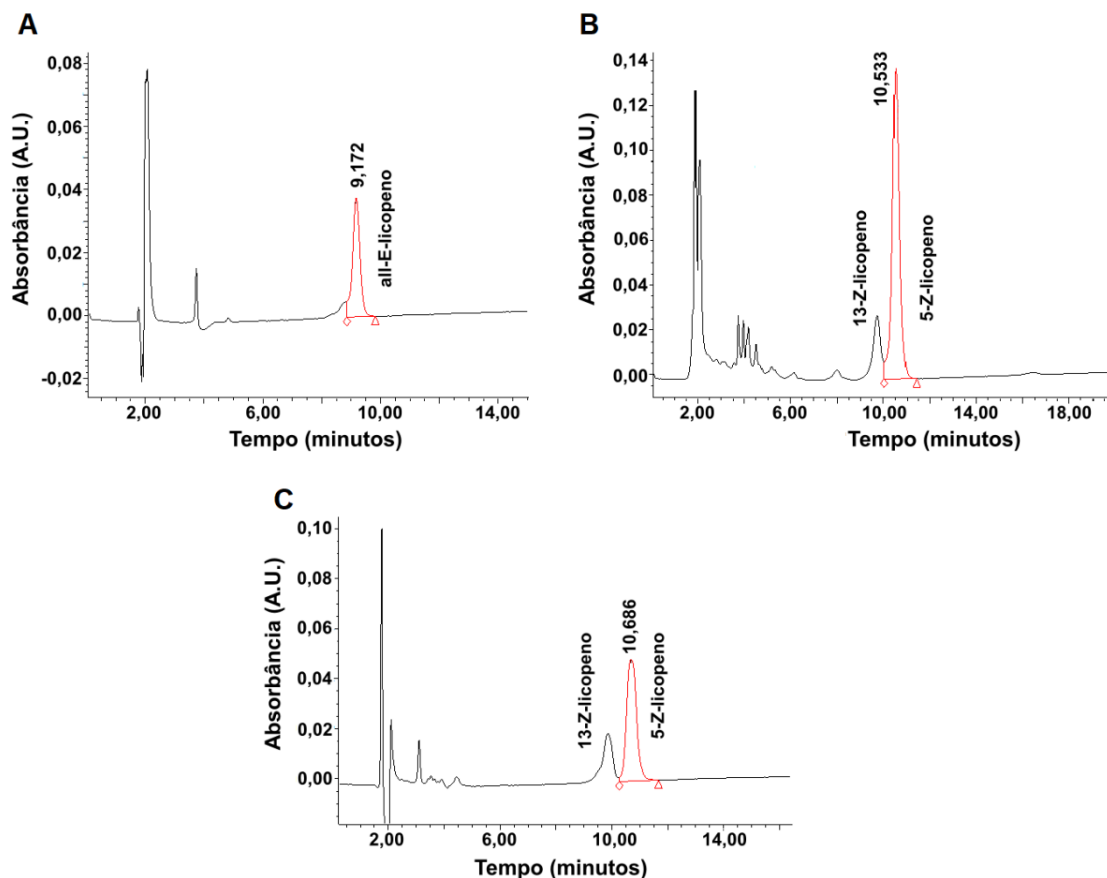


Figura 2. Cromatogramas do padrão de licopeno (A), do licopeno purificado da goiaba – LPG (B) e da nanoemulsão de licopeno – LN (C).

O modelo de regressão linear foi utilizado para calcular o conteúdo de licopeno na nanoemulsão. Este modelo foi aplicado tanto para a espectrofotometria UV-Vis (3A) quanto para CLAE (3B), como demonstrado na Figura 3. A regressão linear dos pontos de calibração foi fixada de acordo com o melhor coeficiente de correlação (r^2) e duas regressões lineares demonstraram r^2 eficiente, com valores próximos à unidade, 0,993 e 0,999 para UV-Vis e CLAE, respectivamente.

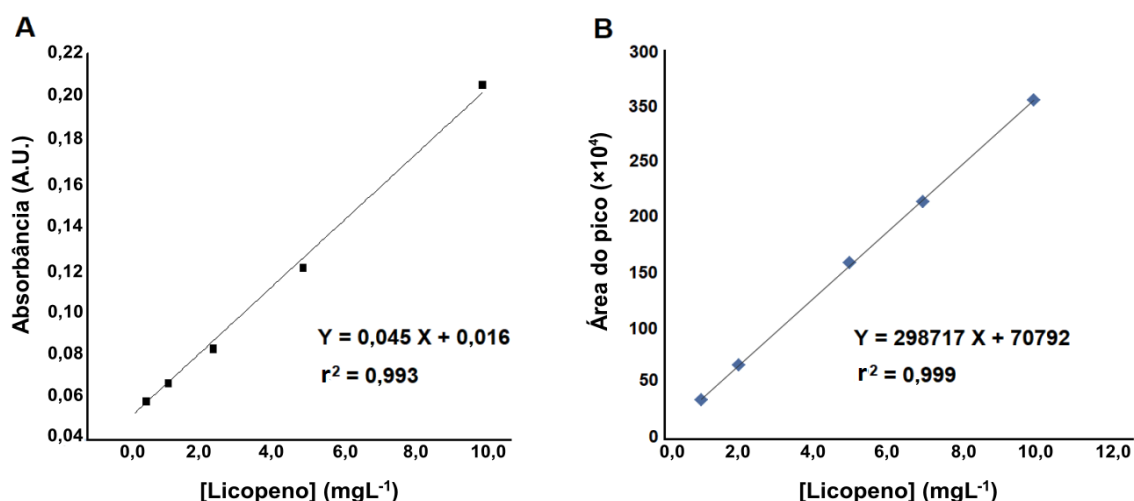


Figura 3. Regressão linear para o licopeno por UV-Vis (A) e CLAE (B).

O resultado mostra que o UV-Vis detectou menor quantidade de licopeno na nanoemulsão ($0,035 \pm 0,98$) quando comparado à CLAE ($0,021 \pm 001$). Observou-se que houve uma perda significativa de licopeno de goiaba durante a formulação e elaboração da nanoemulsão. O uso de um método combinado pode ser uma alternativa para minimizar esta perda, uma vez que as propriedades das nanoemulsões dependem de vários métodos de preparo (KOROLEVA, YURTOV, 2012).

Os dados de estabilidade mostraram uma média de perda de licopeno de $9,80\% \pm 0,29$ quando armazenada em 8°C por 12 meses (Figura 4), enquanto o LPG apresentou aproximadamente 50% de perda em um mês sob as mesmas condições, o que mostra que o sistema nanoemulsificado pode conferir maior estabilidade para a molécula (HUANG *et al.*, 2015).

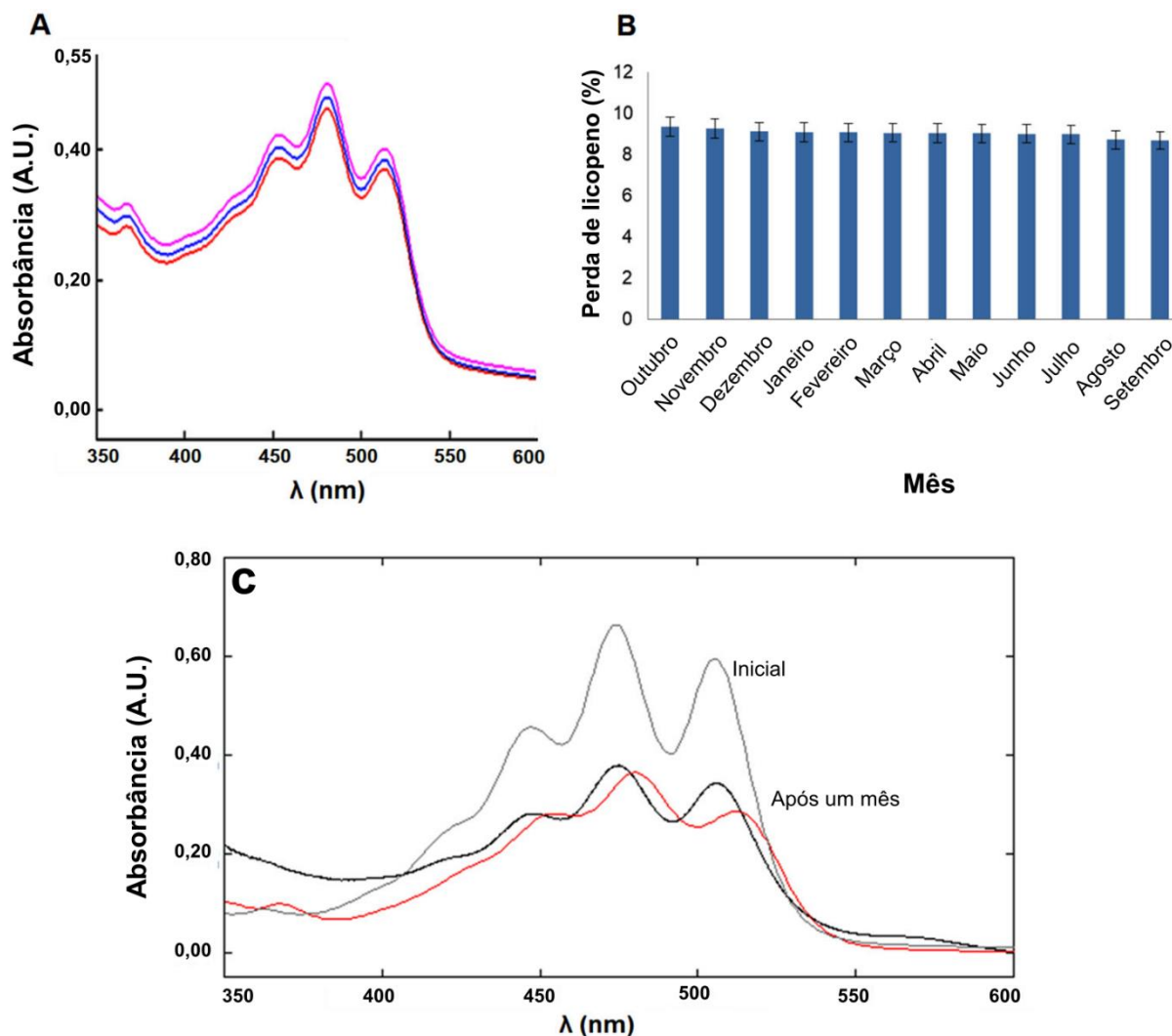


Figura 4. (A) Análise de UV-Vis para a LN. (B) Percentual de perda de licopeno e (C) Análise UV-Vis para o LPG após 1 mês a 8°C.

A figura 5 mostra os resultados de TGA/DSC para o LPG (A) e a LN (B). Na figura 5A, é possível observar uma perda de massa significativa a 106,4 °C na curva de TGA. Uma mudança no estado físico foi observada nesta temperatura. Isto demonstra que o LPG é um antioxidante apropriado considerando os processos metabólicos do corpo a 37°C. A Figura 5B mostra os dados de TGA/DSC da LN, onde é possível observar, na curva de DSC, um primeiro ponto de inflexão próximo a 80°C, o segundo ponto em 111°C e outro próximo a 398°C. A curva de TGA demonstra perda de massa nessas temperaturas e estes pontos indicam perda de licopeno na nanoemulsão. A análise da curva de TG mostra que a LN apresentou maior perda de massa entre 71 e 100°C e outra perda menor que finaliza em 413,8°C, referente à degradação dos segmentos da LN com maior estabilidade. Na figura 5A, o LPG, por sua vez, apresentou o mesmo

comportamento, mas seus pontos de inflexão ocorreram em 50°C e 228°C, mostrando, portanto, menor estabilidade térmica em comparação à LN.

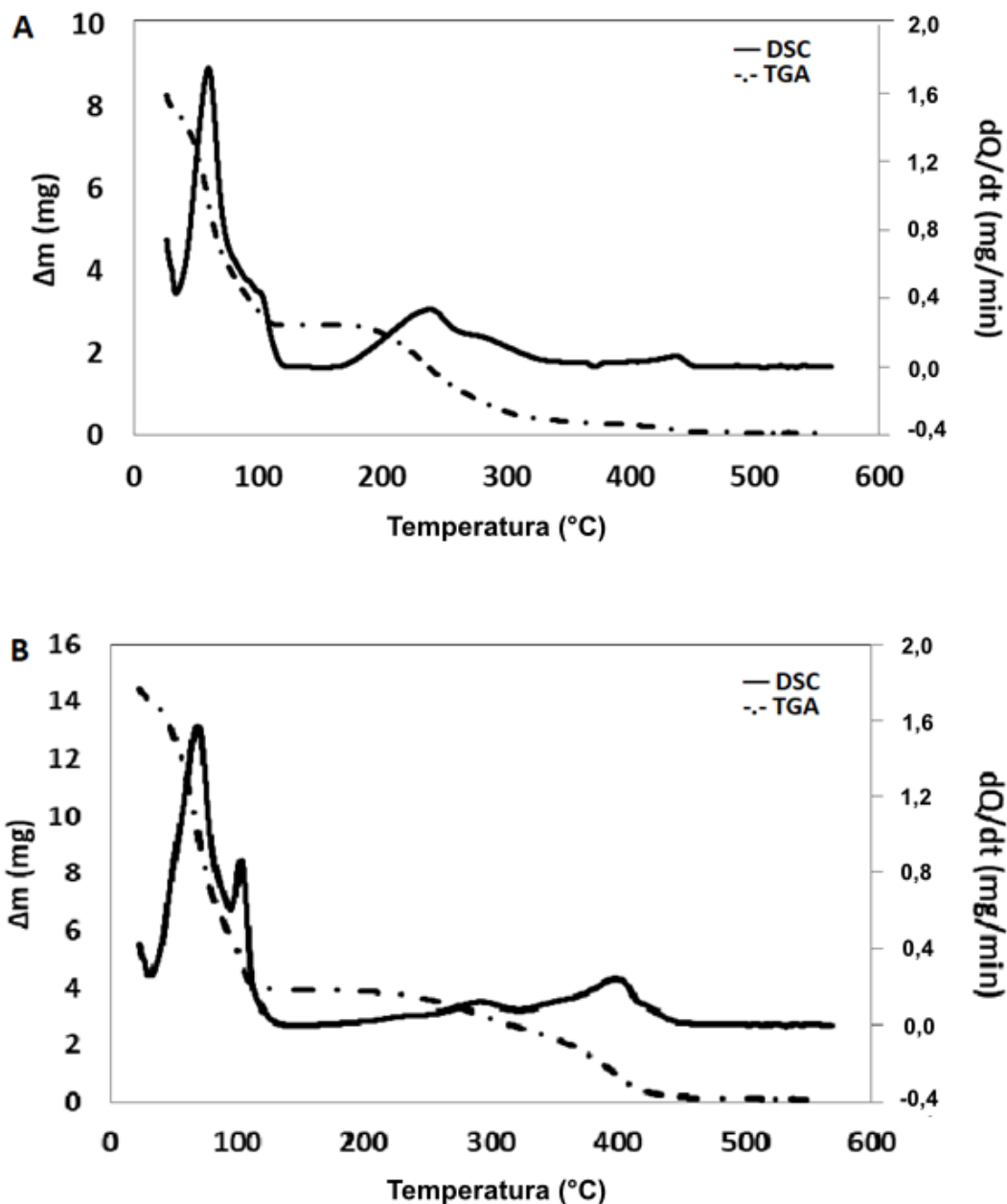


Figura 5. Análise térmica por TGA/DSC para o licopeno purificado da goiaba (A) e para a nanoemulsão de licopeno (B).

A distribuição de tamanhos e potencial zeta da LN foram mensurados por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS). Os resultados obtidos para a análise de tamanhos estão representados na Figura 6 e demonstraram distribuição normal (diâmetro 167,1 nm) de partículas. O valor de interseção é normalmente utilizado para

julgar a qualidade dos dados e valores maiores que 0,9 indicam um bom sistema. No presente estudo, o sistema analisado (LN) apresentou um valor de interseção de 0,918. O potencial zeta das nanopartículas da nanoemulsão de licopeno em pH = 5 oscilou entre -39,9 e -29,9 mV (média de $35,3 \pm 5$ mV), o que indica a presença de partículas com a superfície carregada negativamente.

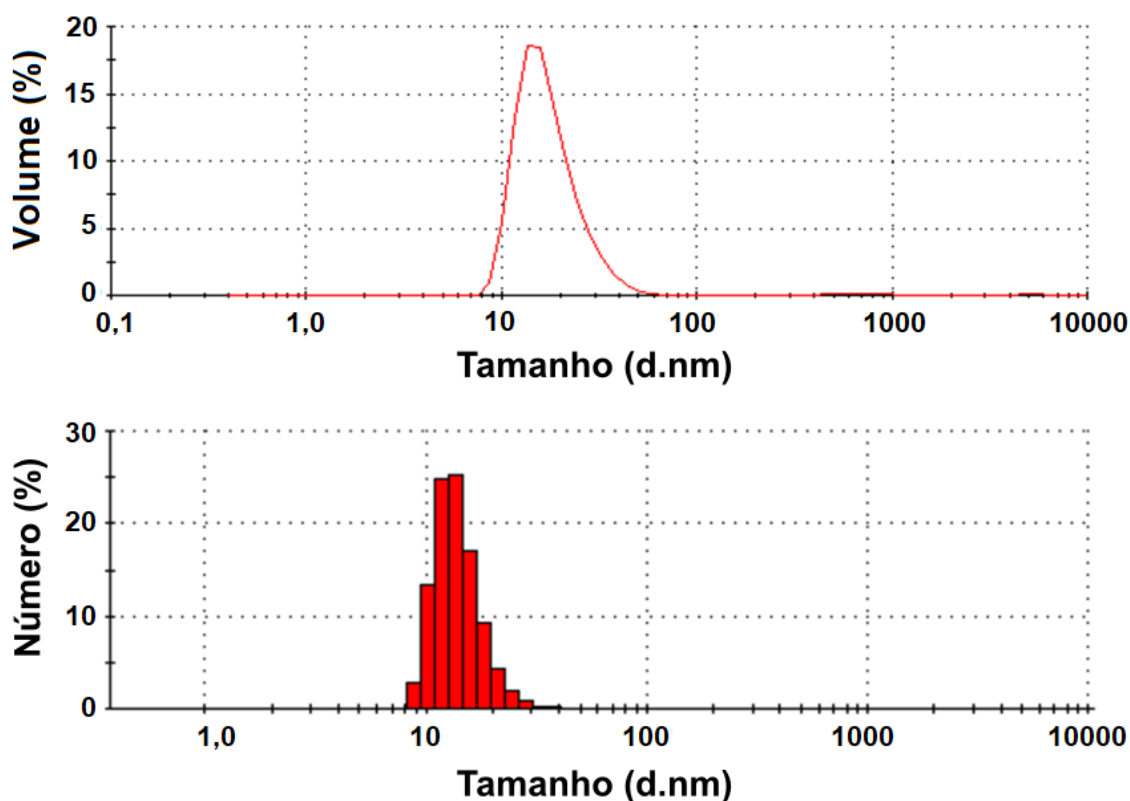


Figura 6. Perfil de distribuição de tamanho para a nanoemulsão de licopeno obtido por DLS.

A caracterização do LPG e da LN foi completada pela difração de raios-X. Para uma comparação precisa entre todas as amostras e o padrão, ajustes foram feitos e os parâmetros de cela obtidos para os compostos foram: $a = 7,7795 (3) \text{ \AA}$, $b = 9,4357 (7) \text{ \AA}$, $c = 23,3613 (0) \text{ \AA}$ e $\beta = 92,9178 (1)^\circ (15)$. Portanto, os resultados indicaram que é possível estabelecer o caráter cristalino do LPG e da LN próximo a $12,38^\circ$ e $23,62^\circ$ (Figura 7).

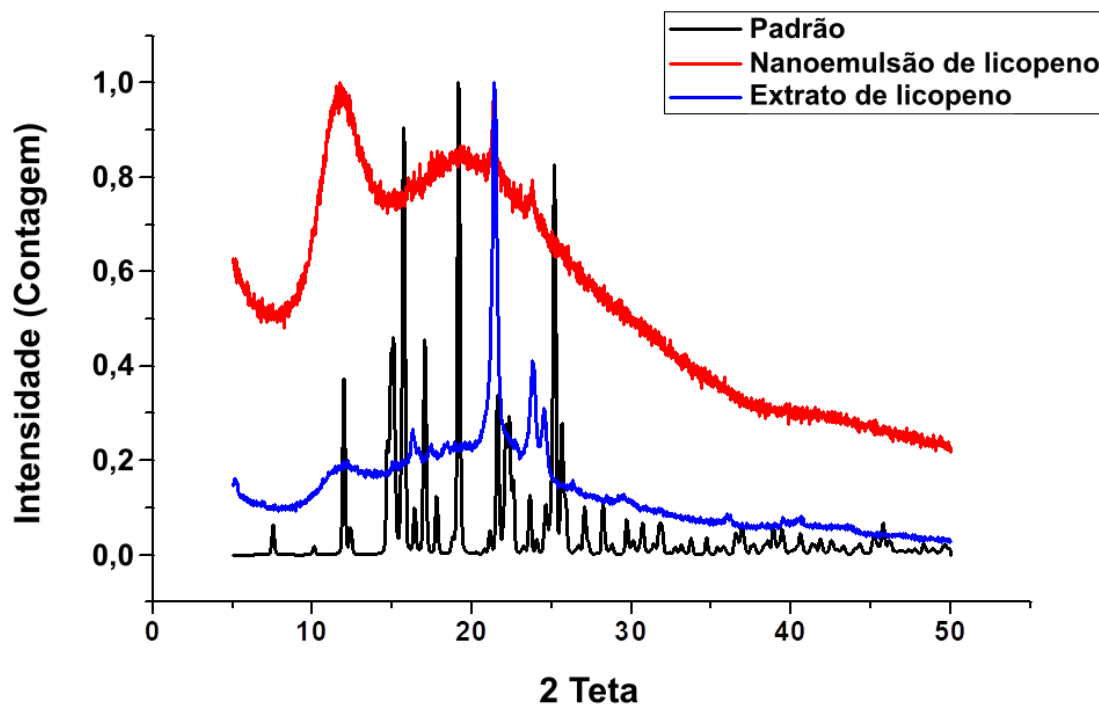


Figura 7. Difração de raios-X para a nanoemulsão de licopeno, licopeno purificado da goiaba e padrão de licopeno.

3.2. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante da nanoemulsão de licopeno e do licopeno purificado foi avaliada pela análise de sua capacidade em sequestrar o radical $ABTS^{+\bullet}$ comparado ao Trolox (Figura 8). O licopeno purificado (LPG) demonstrou uma capacidade de sequestro de $ABTS^{+\bullet}$ equivalente a $139,52 \pm 0,30$ mM de Trolox.g⁻¹, enquanto os resultados encontrados para a nanoemulsão de licopeno (LN) consistiram em $127,66 \pm 0,45$ mM de Trolox.g⁻¹. Estes resultados demonstraram que a atividade antioxidante da LN em termos de capacidade de sequestro do radical $ABTS^{+\bullet}$ foi relativamente menor quando comparada ao LPG, em um tempo de reação de 6 minutos no ensaio de $ABTS^{+\bullet}$ (Tabela 1) para inibir 80% do radical $ABTS^{+\bullet}$.

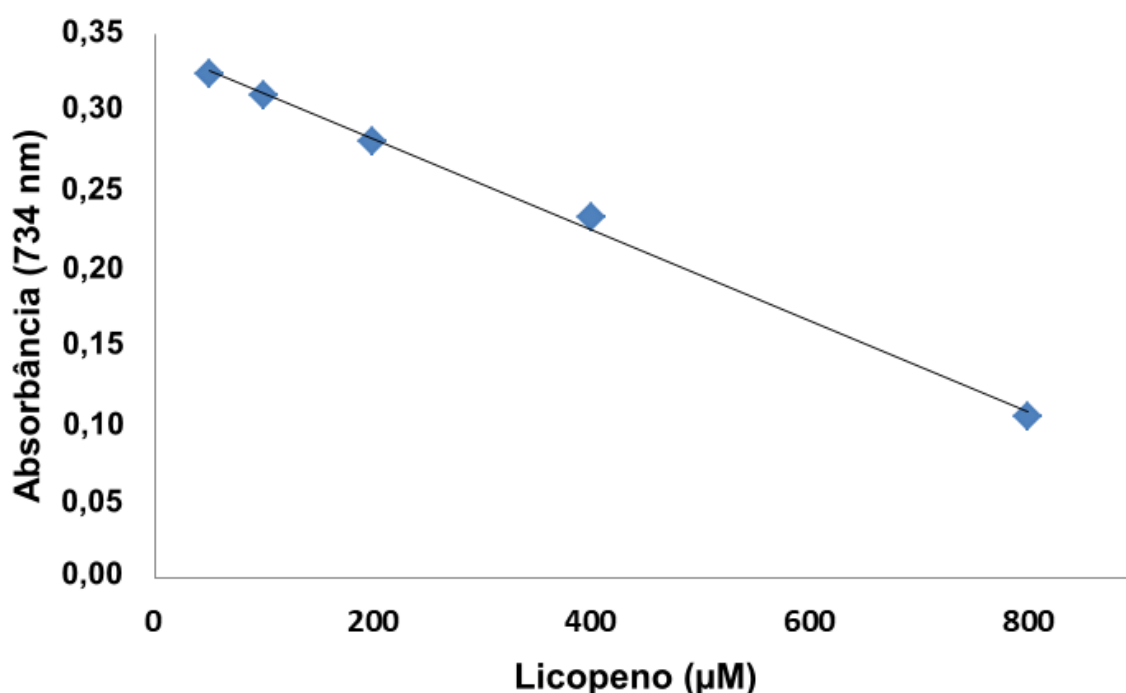


Figura 8. Curva padrão de Trolox para o ensaio de sequestro do radical ABTS.

Tabela 1. Dados quantitativos para a atividade antioxidante do licopeno purificado da goiaba e da nanoemulsão de licopeno.

Amostra	μM Trolox g ⁻¹	Licopeno mgmL ⁻¹ (CLAE)	Licopeno mgmL ⁻¹ (UV-Vis)
LPG	139,52±0,30 ^a	0,019±0,01 ^a	0,041±0,45 ^a
LN	127,66±0,45 ^b	0,021±0,01 ^a	0,035±0,98 ^b

LPG = Licopeno purificado da goiaba vermelha, LN = nanoemulsão de licopeno.

Resultados foram expressos como média ± DP (n = 3).

Médias com as diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes (p<0,05).

3.3. Efeito anti-inflamatório da nanoemulsão de licopeno (LN)

A LN inibiu significativamente (p<0,05) a formação do edema, com exceção da menor concentração testada. O efeito inibitório máximo foi observado na segunda fase, a 50 mg/kg (0,016±0,008 mL) por via oral (Figura 9A), bem como a 50 e 100 mg/kg (0,010±0,004 e 0,007±0,004 mL) por via intraperitoneal (Figura 9B), apresentando 60%, 75% e 82,5% de inibição, respectivamente. O efeito da LN foi semelhante ao do fármaco de referência, a Indometacina (10 mg/kg). Em contraste, a LN a 100 mg/kg (0,044±0,005 mL) por via oral demonstrou alto edema de pata no tempo de 2 e 3 horas (Figura 9A). Entretanto, o efeito pró-inflamatório não diferiu estatisticamente do observado para o grupo carragenina (0,040±0,008 mL).

Além disso, o LPG, em uma concentração de 12,5 mg/kg, foi utilizado como controle, apresentando 70% de inibição por via oral ($0,012 \pm 0,005$ mL) e 57,5% de inibição por via intraperitoneal ($0,017 \pm 0,006$ mL) na terceira hora. Um estudo prévio demonstrou que o LPG apresenta atividade anti-inflamatória no modelo de edema de pata induzido por carragenina nas doses de 12,5 e 25 mg/kg, mas este efeito não foi observado na dose de 50 mg/kg tanto na administração por via oral quanto por via intraperitoneal (VASCONCELOS *et al.*, 2017).

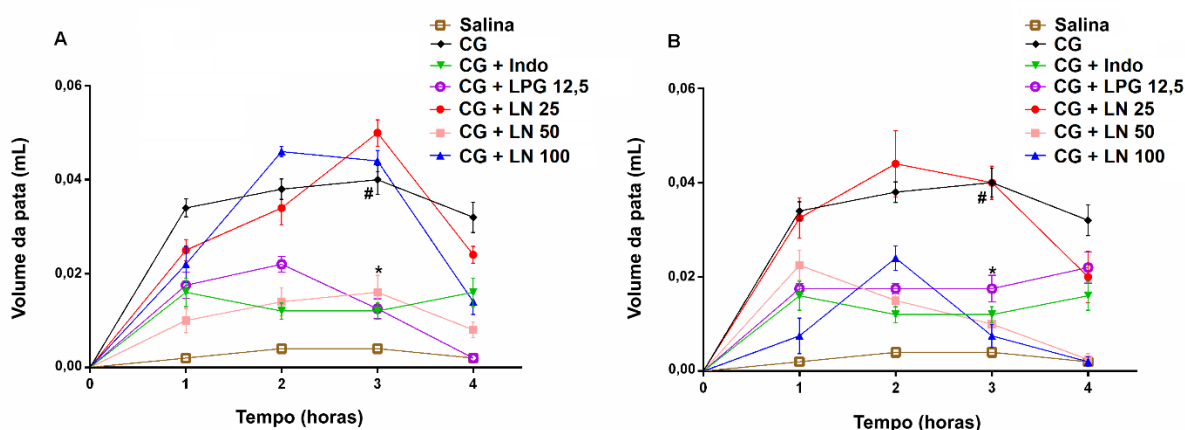


Figura 9. Efeito da nanoemulsão de licopeno de goiaba (25, 50 ou 100 mg/kg) administrada por via oral (A) ou por via intraperitoneal (B), na formação de edema de pata induzido por carragenina, 1, 2, 3 e 4 horas após o estímulo com o agente flogístico. Indometacina (10 mg/kg) foi utilizada como fármaco de referência. Os valores foram expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ versus grupo carragenina. # $p < 0,05$ versus grupo salina. CG = Carragenina; Indo = Indometacina; LPG = Licopeno purificado da goiaba vermelha; LN = Nanoemulsão de licopeno.

3.4. Análise histopatológica

A análise histopatológica foi conduzida para os grupos controle e tratado com máximo efeito inibitório. A avaliação mostrou a preservação dos tecidos epitelial e conjuntivo nos diferentes grupos. No grupo salina, sem indução de edema, é possível observar a derme reticular composta por tecido conjuntivo denso e arquitetura normal, sem evidência de infiltrado inflamatório (seta verde, Figura 10A). Por outro lado, o grupo controle carragenina apresentou denso infiltrado inflamatório, ao longo de toda área tecidual, mostrada em menor aumento (Figura 10B), com predomínio de neutrófilos (Figura 10C). A presença de eritrócitos, sugestiva para áreas hemorrágicas, foi encontrada em todos os tecidos dos animais que receberam

carragenina e está representada nas Figuras 10D, F e G dos grupos indometacina, LPG 12,5 mg/kg i.p. e LN 50 mg/kg v.o. (seta verde).

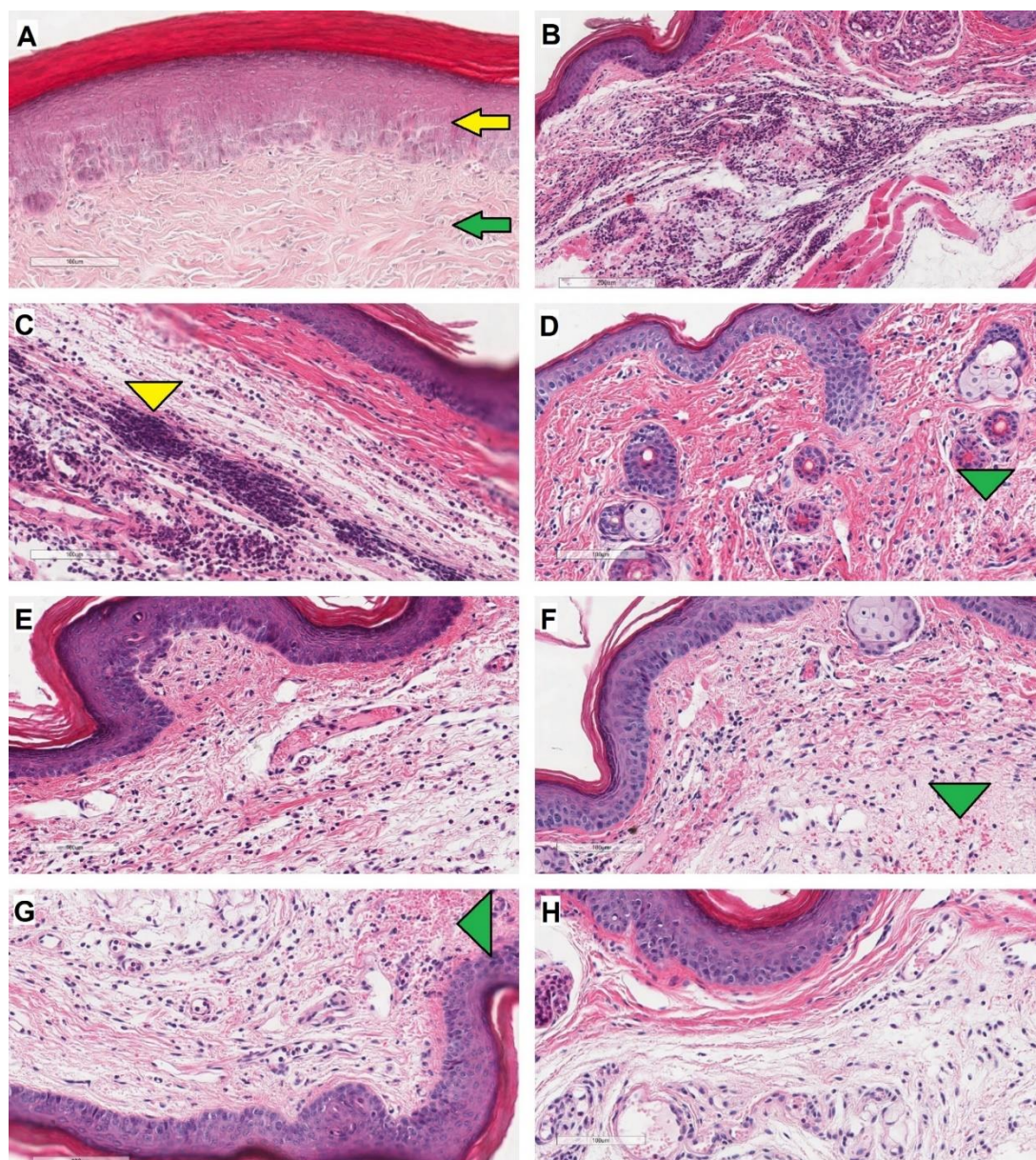


Figura 10. Fotomicrografias da pele da planta das patas de camundongos *Swiss*, representativas para os grupos controle salina (A) e carragenina (B e C) e para os grupos tratados com indometacina (D), LPG 12,5 mg/kg v.o. (E), LPG 12,5 mg/kg i.p. (F), LN 50 mg/kg v.o. (G) e LN 50 mg/kg i.p. (H). Coloração por HE (aumento de 200x para B e 400x para as demais imagens). Escala: 100 μ m e 200 μ m para B. Seta amarela: epiderme. Seta verde: derme reticular. Ponta de seta amarela: células inflamatórias; ponta de seta verde: presença de eritrócitos sugestiva de hemorragia.

A análise semiquantitativa mostrou que o tratamento com indometacina ($30,08 \pm 7,34$ células/ $2,25 \times 10^4 \mu\text{m}^2$), LPG 12,5 mg/kg v.o. ($34,41 \pm 4,05$ células/ $2,25 \times$

$10^4 \mu\text{m}^2$), LPG 12,5 mg/kg i.p. ($27,08 \pm 5,24$ células/ $2,25 \times 10^4 \mu\text{m}^2$) e LN 50 mg/kg i.p. ($27,66 \pm 5,92$ células/ $2,25 \times 10^4 \mu\text{m}^2$) reduziram significativamente ($p < 0,05$) a migração de neutrófilos para a derme em comparação com o grupo carragenina ($74,16 \pm 13,54$ células/ $2,25 \times 10^4 \mu\text{m}^2$) (Figura 11) após 4 horas de indução da inflamação. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos mencionados acima e o grupo salina ($13,83 \pm 1,64$ células/ $2,25 \times 10^4 \mu\text{m}^2$). A LN a 50 mg/kg v.o. ($47,00 \pm 1,84$ células/ $2,24 \times 10^4 \mu\text{m}^2$) não demonstrou diferenças estatísticas no que diz respeito à redução da migração de neutrófilos em comparação ao grupo carragenina.

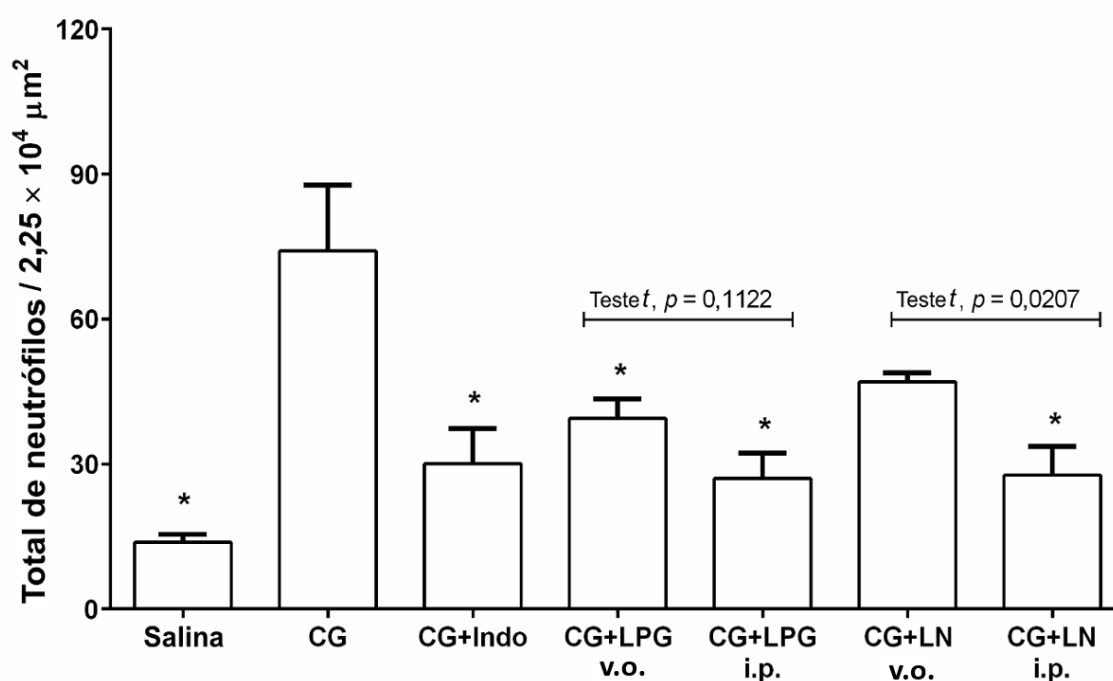


Figura 11. Número de neutrófilos presentes na derme do tecido obtido das patas dos camundongos. As células foram quantificadas em uma área de $2,25 \mu\text{m}^2$ dos cortes histológicos dos tecidos dos camundongos Swiss submetidos ao edema de pata induzido por carragenina, 4 horas após a indução da inflamação. Os valores estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ versus grupo carragenina (CG).

Além disso, diferenças significativas (teste t , $p < 0,05$) foram observadas entre as vias de administração oral e intraperitoneal nos tratamentos com LN 50 mg/kg, onde a via intraperitoneal demonstrou-se mais eficiente (Figura 11). Em contraste, nenhuma diferença estatisticamente significativa (teste t , $p > 0,05$) foi observada entre as vias de administração oral e intraperitoneal para os tratamentos com LPG 12,5 mg/kg (Figura 11).

4. Discussão

O licopeno, responsável pela coloração vermelha das frutas, apresenta uma absorbância típica na técnica de espectrofotometria UV-Vis entre 400 e 600 nm, com máxima absorção entre 470 nm (HONDA *et al.*, 2015). No presente estudo, os resultados obtidos pelo método colorimétrico para o licopeno purificado e para a nanoemulsão de licopeno foram confirmados pelos cromatogramas registrados em 472 nm, os quais são caracterizados pela ausência de picos.

Os perfis cromatográficos da nanoemulsão, do licopeno purificado da goiaba vermelha e do padrão de licopeno estão representados na Figura 2 e, por estes resultados, a presença do licopeno na nanoemulsão proposta foi confirmada. A literatura relata a qualidade da coluna C30 para a purificação e identificação de isômeros em extratos de carotenoides. Mariutti, Rodrigues e Mercadante (2013) realizaram a separação por cromatografia (CLAE-DAD) com eluição em coluna C30 de dezesseis compostos de um extrato de murici (fruta tropical), dentre os quais 13 eram carotenoides e foram identificados com base na combinação das informações obtidas pelas características de UV-Vis, pela $\lambda_{\text{máx}}$ espectral de sua estrutura fina. Informações desta varredura e testes de caracterização são utilizados pelos químicos como um ciclo de *feedbacks* para a identificação de moléculas com propriedades isoméricas e deveriam ser arquivadas em dispositivos como bibliotecas de compostos. Portanto, com base nas informações disponíveis na literatura, foi possível verificar que os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ encontrados por UV-Vis e os tempos de retenção obtidos por CLAE demonstraram que o licopeno mais abundante na nanoemulsão é o 5-Z-licopeno (HONDA *et al.*, 2015; AMORIM, LEITE, PINTADO, 2018).

Os dados de estabilidade mostraram que a LN tem a capacidade de conferir maior estabilidade ao licopeno em comparação com o LPG nas mesmas condições por 1 ano. Isto é possível devido às características das nanoemulsões, as quais são sistemas com propriedades físico-químicas que conferem estabilidade termodinâmica a moléculas instáveis quando armazenadas a 4 e 25°C por 3 meses ou quando aquecidas a 100°C por 4 horas, conforme demonstrado por Qian e colaboradores (2013).

Na curva de DSC (Figuras 5A, B), há uma reação exotérmica muito forte que causa a deformação do pico do DSC e a deformação da curva de TGA (adicionando o calor de forno e o calor gerado pela queima da amostra). A estabilidade térmica por volta de 71°C demonstrou que a LN apresentou melhor desempenho, sendo capaz de prevenir ou minimizar com maior eficiência os danos causados pela oxidação térmica do licopeno.

Dois picos foram observados ao aquecer a LN, indicando que ocorreram transições polimórficas e derretimento do cristal (QIAN *et al.*, 2013). Portanto, conhecer o comportamento térmico de uma nanoemulsão é muito importante para direcionar sua aplicação na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética, uma vez que a temperatura determina seu comportamento termodinâmico (RAO, MCCLEMENTS, 2011). A partir destes resultados, espera-se que a LN possa ser utilizada como uma opção de antioxidante para estes produtos.

Suspensões com valores de potencial zeta inferiores a 30 mV são consideradas estáveis, portanto, um sistema em emulsão consistindo de óleo deve apresentar-se como um líquido monofásico estável à temperatura ambiente. Esta propriedade das suspensões permite uma análise objetiva de seu comportamento em termos de estabilidade (OH *et al.*, 2011).

A biodisponibilidade das moléculas está relacionada à cristalinidade das nanopartículas, que afeta sua dissolução (ZHU *et al.*, 2010). Portanto, o LPG e a LN foram caracterizados por DRX como demonstrado na Figura 7. As mudanças na posição dos picos pode ser atribuída a diferenças estruturais entre o β -caroteno e o licopeno. O difratograma obtido para o LPG mostrou vários picos mais definidos do que o observado para a LN. As nanopartículas de licopeno mostraram alguns padrões de difração difusos, característicos de material amorfo. Por outro lado, o LPG parece ter apresentado maior cristalinidade, devido à presença de picos afilados no DRX (ZHU *et al.*, 2010). O maior estado amorfo observado para a LN na Figura 7 pode ser explicado pela sua rápida difusão em água, o que adiciona uma característica favorável à longa molécula de licopeno, que não apresenta solubilidade em água em seu estado isolado (PEPE *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2010).

O valor encontrado neste estudo para a atividade antioxidante é similar aos resultados observados em um estudo publicado previamente com uma nanoemulsão de licopeno (HA *et al.*, 2015). Portanto, estes achados sugerem que a reação com o

radical ABTS^{••} é mais rápida para antioxidantes não-emulsificados do que para as nanoemulsões, que protegem os antioxidantes da oxidação.

A formação de edema pela administração de carragenina (500 µg/pata) alcançou seu pico 3 horas após a injeção (0,04±0,008 mL) (Figura 9), corroborando o relatado em estudos prévios (ANILKUMAR *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2013). A carragenina é um agente comumente utilizado como modelo de inflamação aguda local para testar substâncias bioativas. Ela apresenta uma resposta bifásica, caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular na primeira e infiltrado neutrofílico, liberação de citocinas, bradicinina, prostaglandinas e radicais livres na segunda fase (SILVA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2015). No presente estudo, a resposta anti-inflamatória foi observada principalmente na segunda fase. A LN mostrou efeito inibidor contra o edema de pata induzido por carragenina e reduziu a migração de neutrófilos.

A via de administração não afetou o efeito inibitório contra o edema de pata, mas a administração de LN por via intraperitoneal reduziu de forma mais eficiente o infiltrado inflamatório. De fato, os parâmetros farmacocinéticos de uma substância ou de nanopartículas estão associados às suas vias de administração. Fluidos são absorvidos da cavidade peritoneal com considerável rapidez devido aos numerosos vasos sanguíneos encontrados na região (STARLING, 1896). Yang e colaboradores (2013) avaliaram a biodistribuição *in vivo* de nanopartículas funcionalizadas e demonstraram que diferentes tipos de nanopartículas não foram capazes de ser absorvidas pelo sistema digestivo após administração oral.

Neste estudo, uma nanoemulsão de licopeno estável foi produzida e caracterizada. Análises do licopeno na nanoemulsão por CLAE-DAD com coluna C30 demonstraram a caracterização deste carotenoide comparado ao tempo de retenção e espectros UV-Vis observados para o padrão de licopeno. A nanoemulsão de licopeno exibiu capacidade de sequestro de radicais livres e atividade biológica contra inflamação aguda local. Portanto, estudos futuros são importantes para avaliar a capacidade desta nanoemulsão em permitir uma liberação controlada do composto, bem como investigar seu potencial como anti-inflamatório ou outras aplicações, como antimicrobiano e anticâncer. Além disso, emulsões utilizando estabilizantes hidrofílicos e lipofílicos podem ser amplamente utilizadas em modelos cardíacos *in vitro* e *in vivo*.

Referências bibliográficas

AMORIM, A. G. *et al.* 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**, v. 120, n. 3, p. 1700330, 2018.

AMORIM, A. G. N.; LEITE, J. R. S. A.; PINTADO, M. E. **Obtainment process of carotenoids concentrate rich in lycopene from red fruits and/or red fruit pulp.** Depositante: Universidade Católica Portuguesa. Patente nº EP3400812 A1, 2018.

ANESE, M. *et al.* Effect of ultrasound treatment, oil addition and storage time on lycopene stability and in vitro bioaccessibility of tomato pulp. **Food Chemistry**, v. 172, p. 685–691, abr. 2015.

ANILKUMAR, K. *et al.* Evaluation of anti-inflammatory properties of isoorientin isolated from tubers of *Pueraria tuberosa*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–10, 2017.

ARATHI, B. P. *et al.* An improved method of UPLC-PDA-MS/MS analysis of lycopene isomers. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 8, p. 1962–1969, set. 2015.

BOEIRA, S. P. *et al.* Lycopene treatment prevents hematological, reproductive and histopathological damage induced by acute zearalenone administration in male Swiss mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 66, n. 4, p. 179–185, jul. 2014.

BOYACIOGLU, M. *et al.* The effects of lycopene on DNA damage and oxidative stress on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. **Clinical Nutrition**, v. 35, n. 2, p. 428–435, 2016.

DEGROU, A. *et al.* Physicochemical parameters that influence carotenoids bioaccessibility from a tomato juice. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 435–441, jan. 2013.

DOS SANTOS, R. C. *et al.* 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**, v. 105, p. 184–196, 2018.

HA, T. V. A. *et al.* Antioxidant activity and bioaccessibility of size-different nanoemulsions for lycopene-enriched tomato extract. **Food Chemistry**, v. 178, p. 115–121, jul. 2015.

HONDA, M. *et al.* Spectral characterisation of Z-isomers of lycopene formed during heat treatment and solvent effects on the E/Z isomerisation process. **Food Chemistry**, v. 171, p. 323–329, mar. 2015.

HUANG, R.-F. S. *et al.* Inhibition of colon cancer cell growth by nanoemulsion carrying gold nanoparticles and lycopene. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 2823, 2015.

KOROLEVA, M. Y.; YURTOV, E. V. Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. **Russian Chemical Reviews**, v. 81, n. 1, p. 21–43, 31 jan. 2012.

LIU, Y. *et al.* Preparative separation and purification of lycopene from tomato skins extracts by macroporous adsorption resins. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1027–1034, dez. 2010.

MARIUTTI, L. R. B.; RODRIGUES, E.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids from *Byrsonima crassifolia*: Identification, quantification and in vitro scavenging capacity against peroxy radicals. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 31, n. 1, p. 155–160, ago. 2013.

OH, D. H. *et al.* Effect of process parameters on nanoemulsion droplet size and distribution in SPG membrane emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, n. 1–2, p. 191–197, fev. 2011.

PEPE, D. *et al.* Decylglucoside-based microemulsions for cutaneous localization of lycopene and ascorbic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, n. 1–2, p. 420–428, set. 2012.

QIAN, C. *et al.* Impact of lipid nanoparticle physical state on particle aggregation and β -carotene degradation: Potential limitations of solid lipid nanoparticles. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 342–349, jun. 2013.

RAO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of flavor oil microemulsions, nanoemulsions and emulsions: influence of composition and preparation method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 5026–5035, 11 maio 2011.

SILVA, R. O. *et al.* Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 28, n. 4, p. 455–464, ago. 2014.

SILVA, R. O. *et al.* Riparin A, a compound from *Aniba riparia*, attenuate the inflammatory response by modulation of neutrophil migration. **Chemico-Biological Interactions**, v. 229, p. 55–63, mar. 2015.

SILVA, V. G. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activity of epiisopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 6, p. 1071–1077, 28 jun. 2013.

SINGH, K.; TIWARY, A. K.; RANA, V. Ethylenediaminediacetic acid bis(carbido amide chitosan): Synthesis and evaluation as solid carrier to fabricate nanoemulsion. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 303–314, jun. 2013.

STARLING, E. H. On the absorption of fluids from the connective tissue spaces. **The Journal of Physiology**, v. 19, n. 4, p. 312–326, 5 maio 1896.

VASCONCELOS, A. G. *et al.* 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**, v. 99, p. 959–968, set. 2017.

YANG, X. *et al.* Hyaluronic acid-coated nanostructured lipid carriers for targeting paclitaxel to cancer. **Cancer Letters**, v. 334, n. 2, p. 338–345, jul. 2013.

ZHU, Z. *et al.* Polyelectrolyte Stabilized Drug Nanoparticles via Flash Nanoprecipitation: A Model Study With β -Carotene. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 10, p. 4295–4306, out. 2010.

CONCLUSÃO

Em suma, o presente trabalho apresenta o desenvolvimento de três formulações nanotecnológicas para estabilização do licopeno obtido da goiaba vermelha, com propriedades físico-químicas satisfatórias para aplicações biomédicas. Nanocápsulas de núcleo lipídico produzidas com uma parede de poli- ϵ -coprolactona revestidas com polisorbato 80 otimizaram a estabilidade do licopeno por 7 meses e apresentaram atividade contra células de câncer de mama e inibiram a produção de EROs e NF- κ B em células microgliais humanas. Um sistema autoemulsificante de entrega de drogas conferiu estabilidade ao licopeno por 10 meses, não apresentou toxicidade in vivo e entregou licopeno para o fígado, rins e próstata de camundongos com sucesso, além de potencializar a toxicidade do licopeno contra células de câncer de próstata. A nanoemulsão de licopeno conferiu estabilidade à molécula por um ano e preveniu os efeitos da inflamação aguda em camundongos. Esses resultados indicam que as nanoformulações apresentam potencial para serem aplicadas como um produto baseado em nanotecnologia voltado para a saúde, a partir da biodiversidade brasileira, obtido por metodologia simples e escalonável industrialmente e com cadeia produtiva sustentável.

ANEXO I



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 28 de fevereiro de 2019.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO RICO EM LICOPENO DA GOIABA (PSIDIUM GUAJAVA L.) NANOESTRUTURADO.”** Protocolo n.º 09/2019, sob responsabilidade do Professora José Roberto de Souza de Almeida Leite foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Ovis aries* (1 macho e 1 fêmea). A presente aprovação é válida pelo período de: 01/05/2019 a 01/12/2020.



Prof. Dr. Cássio José da Silva
Coordenador da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

ANEXO II



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 6 de abril de 2018.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**AValiação da Atividade Antioxidante, Biodisponibilidade e Perfil Toxicológico do Extrato Rico em Licopeno da Goiaba (Psidium Guajava L.) Nanoestruturado**", Protocolo n.º 66728/2016, sob responsabilidade do Professor José Roberto de Souza de Almeida Leite foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: Ratus norvegicus (60 machos e 54 fêmeas) e Mus musculus (30 machos e 30 fêmeas). A presente aprovação é válida pelo período de: 7/3/2017 a 01/03/2020.



Prof. Dr. Cássio José da Silva
Coordenador da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

ANEXO III



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



Teresina, 24 de Outubro de 2014.

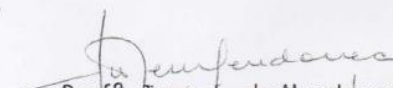
Ilmo.

Prof. Dr. JAND VENES ROLIM MEDEIROS
Departamento: Biotecnologia- CMRV_ Parnaíba /UFPI

Senhor Pesquisador,

Em reunião na presente data (24 de Outubro de 2014), a Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais em Pesquisa, da Universidade Federal do Piauí, analisou e **Aprovou** no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, sob o número **068/14**, o projeto de pesquisa intitulado "**Prospecção farmacológica de moléculas biologicamente ativas extraídas de produtos naturais- ênfase no potencial terapêutico**", sob a sua responsabilidade. Informamos que este projeto tem Período de Vigência de Dezembro/2014 à Dezembro/2020, e serão usados 340 Camundongos isogênicos (machos e fêmeas) e 320 Ratos isogênicos (machos e fêmeas). Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEEA/UFPI, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei Nº 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,


Prof^ª. Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

ANEXO IV

Food Research International 136 (2020) 109548



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Cytotoxic activity of poly-ε-caprolactone lipid-core nanocapsules loaded with lycopene-rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) on breast cancer cells



Andreanne G. Vasconcelos^a, Martina O. Valim^a, Adriany G.N. Amorim^b,
Constança Pais do Amaral^c, Miguel Peixoto de Almeida^d, Tatiana K.S. Borges^e, Renato Socodato^f,
Camila C. Portugal^g, Guilherme D. Brand^h, Jacó Saraiva C. Mattos^h, João Relvas^f,
Alexandra Plácido^{d,f}, Peter Eaton^{c,d}, Doralina A.R. Ramosⁱ, Selma A.S. Kückelhaus^a,
José Roberto S.A. Leite^{a,*}

^a Applied Immunology and Morphology Research Centre, NuPMIA, Morphology Area, Faculty of Medicine, University of Brasília, UnB, Brasília, Distrito Federal, Brazil

^b Biotechnology and Biodiversity Research Centre, BIOTEC, Campus Ministro Reis Velloso, Federal University of Piauí, UFPI, Parnaíba, Piauí, Brazil

^c Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

^d LAQV/REQUIMTE, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, Portugal

^e Laboratory of Cellular Immunology, Pathology Area, Faculty of Medicine, University of Brasília, UnB, Brasília, Distrito Federal, Brazil

^f Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, I3S, Universidade do Porto, Porto, Portugal

^g Institute of Chemistry, University of Brasília, UnB, Brasília, Distrito Federal, Brazil

^h Medlig, Barretos, São Paulo, Brazil

ⁱ Laboratory of Molecular Pathology of Cancer, Pathology Area, Faculty of Medicine, University of Brasília, UnB, Brasília, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Carotenoids
Red guava
Nanoparticles
Breast cancer
Cell viability
Nanomedicine

ABSTRACT

The aims of this study were to produce poly-ε-caprolactone lipid-core nanocapsules containing lycopene-rich extract from red guava (LEG), to characterize those nanoparticles and to evaluate their cytotoxic effects on human breast cancer cells. Lipid-core nanocapsules containing the extract (nanoLEG) were produced by the method of interfacial deposition of the preformed polymer. The nanoparticles were characterized by Dynamic Light Scattering (DLS), Polydispersity Index, Zeta Potential, pH, Encapsulation Efficiency, Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), Atomic Force Microscopy (AFM) and Transmission Electron Microscopy (TEM). Cell viability was evaluated by the MTT dye reduction method in the human breast cancer MCF-7 cell line and inhibition of ROS and NF-κB was assayed in living human microglial cell line (HMC3) by time-lapse images microscopy. A hemolytic activity assay was carried out with sheep blood. Data showed that nanoparticles average size was around 200 nm, nanoparticles concentration/mL was around 0.1 μM, negative zeta potential, pH < 5.0 and spherical shape, with low variation during a long storage period (7 months) at 5 °C, indicating stability of the system and protection against lycopene degradation. The percentage of encapsulation varied from 95% to 98%. The nanoLEG particles significantly reduced the viability of the MCF-7 cells after 24 h (61.47%) and 72 h (55.96%) of exposure, even at the lowest concentration tested (6.25–200 μg/ml) and improved on the cytotoxicity of free LEG to MCF-7. NanoLEG inhibited LPS-induced NF-κB activation and ROS production in microglial cells. The particles did not affect the membrane integrity of sheep blood erythrocytes at the concentrations tested (6.25–200 μg/mL). Thus, the formulation of lipid-core nanocapsules with a polysorbate 80-coated poly-ε-caprolactone wall was efficiently applied to stabilize the lycopene-rich extract from red guava, generating a product with satisfactory physico-chemical and biological properties for application as health-promoting nanotechnology-based nutraceutical, emphasizing its potential to be used as a cancer treatment.

* Corresponding author at: Universidade de Brasília, UnB, Faculdade de Medicina, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte. 70910900, Brasília, DF, Brasil.
E-mail address: jrleite@pq.cnpq.br (J.R.S.A. Leite).

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109548>

Received 20 January 2020; Received in revised form 8 July 2020; Accepted 9 July 2020

Available online 15 July 2020

0963-9969/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

ANEXO V

Cancer Nanotechnology

Promising self-emulsifying drug delivery system loading lycopene from red guava (Psidium guajava L.): in vivo toxicity, biodistribution and cytotoxicity on prostate cancer cells

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	CANO-D-21-00051	
Full Title:	Promising self-emulsifying drug delivery system loading lycopene from red guava (Psidium guajava L.): in vivo toxicity, biodistribution and cytotoxicity on prostate cancer cells	
Article Type:	Research	
Section/Category:	Basic Research	
Funding Information:	CAPES Brazil (1713871)	Mrs Andreanne Vasconcelos
	FCT, Portugal (UIDB/50006/2020)	Dr. Peter Eaton
	FCT, Portugal (PTDC/BII-BIO/31158/2017)	Dr. Alexandra Plácido
Abstract:	<p>Self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) has attracted attention due to advantages in solubility and bioavailability of lipophilic compounds. Herein, a SEDDS loading lycopene-purified from red guava (nanoLPG) was produced. The nanoemulsion was characterized by dynamic light scattering (DLS), zeta potential, nanoparticle tracking analysis (NTA), transmission electron microscopy (TEM), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), lycopene content, and colloidal stability in cell culture medium. The antioxidant activity, in vivo toxicity, tissue distribution, and cytotoxicity on human prostate carcinoma cells (DU-145) were evaluated. NanoLPG exhibited satisfactory physico-chemical properties, with a size around 200 nm, negative zeta-potential, spherical morphology, and stability to lycopene at 5°C for 10 months. The size, polydispersity index, and zeta potential parameters suffered insignificant alterations during the 12 months storage at 5°C. The nanoemulsion showed partial aggregation in cell culture medium at 37°C for 24 hours. NanoLPG at 0.10 mg/mL exhibited radical scavenging activity of 171.10±7.41 µM Trolox equivalent/g. The in vivo studies did not reveal any significant changes in clinical, behavioral, hematological, biochemical, and histopathological parameters in mice orally treated with nanoLPG at 10 mg/kg for 28 days. In addition, nanoLPG successfully delivered lycopene to the liver, kidney and prostate, as well as improved its cytotoxicity against DU-145 prostate cancer cells, probably by pathway independent on classical necrosis and apoptosis, according to data from flow cytometry and TEM. Thus, nanoLPG stands as be a promising and biosafe candidate for the lycopene delivery system as a nanotechnology-based health product.</p>	
Corresponding Author:	JOSE ROBERTO LEITE University of Brasilia: Universidade de Brasilia BRAZIL	
Corresponding Author E-Mail:	jrsaleite@gmail.com	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	University of Brasilia: Universidade de Brasilia	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Andreanne Vasconcelos, MSc	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Andreanne Vasconcelos, MSc	
	Ana Barros, BSc	

ANEXO VI



Journal of Dispersion Science and Technology



ISSN: 0193-2691 (Print) 1532-2351 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/ldis20>

Anti-inflammatory and antioxidant activity improvement of lycopene from guava on nanoemulsifying system

Amorim Adriany, Souza Jéssica, Oliveira Ana, Santos Raimunda, Vasconcelos Andreanne, Souza Luan, Araújo Thiago, Cabral Wanessa, Silva Maria, Mafud Ana, Mascarenhas Yvonne, Medeiros Jand-Venes, Saraiva Jaco, Muehlmann Luis, Kückelhaus Selma, Pintado Manuela & Leite José R.

To cite this article: Amorim Adriany, Souza Jéssica, Oliveira Ana, Santos Raimunda, Vasconcelos Andreanne, Souza Luan, Araújo Thiago, Cabral Wanessa, Silva Maria, Mafud Ana, Mascarenhas Yvonne, Medeiros Jand-Venes, Saraiva Jaco, Muehlmann Luis, Kückelhaus Selma, Pintado Manuela & Leite José R. (2020): Anti-inflammatory and antioxidant activity improvement of lycopene from guava on nanoemulsifying system, *Journal of Dispersion Science and Technology*

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/01932691.2020.1728300>



Published online: 02 Mar 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 96



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ldis20>

APÊNDICE A

PRODUÇÃO REALIZADA DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO

Artigos completos publicados em revistas indexadas:

1. **VASCONCELOS, A. G.**; VALIM, M. O.; AMORIM, A. G. N.; DO AMARAL, C. P.; DE ALMEIDA, M. P.; BORGES, T. K. S.; SOCODATO, R.; PORTUGAL, C. C.; BRAND, G. D.; MATTOS, J. S. C.; RELVAS, J.; PLÁCIDO, A.; EATON, P.; RAMOS, D. A. R.; KÜCKELHAUS, S. A. S.; LEITE, J. R. S. A. 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*, v. 136, p. 109548, 2020.
2. ARARUNA, F. B.; DE OLIVEIRA, T. M.; QUELEMES, P. V.; DE ARAÚJO, A. R.; PLÁCIDO, A.; **VASCONCELOS, A. G.**; DE PAULA, R. C. M.; MAFUD, A. C.; DE ALMEIDA, M. P.; DELERUE-MATOS, C.; MASCARENHAS, Y. P.; EATON, P.; LEITE, J. R. S. A.; DA SILVA, D. A. Antibacterial application of natural and carboxymethylated cashew gum-based silver nanoparticles produced by microwave-assisted synthesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 241, p. 115260, 2020.
3. AMORIM, A. G. N.; SOUZA, J. M. T.; OLIVEIRA, A.; DOS SANTOS, R. C.; **VASCONCELOS, A. G.**; SOUZA, L. K. M.; ARAÚJO, T. S. L.; CABRAL, W. F.; SILVA, M. G.; MAFUD, A.; MASCARENHAS, Y.; MEDEIROS, J.-V. R.; MATTOS, J. S. C.; MUEHLMANN, L. A.; KUCKELHAUS, S. A. S.; PINTADO, M.; LEITE, J. R. S. A. Anti-inflammatory and antioxidant activity improvement of lycopene from guava on nanoemulsifying system. *Journal Of Dispersion Science And Technology*, v. 42, p. 760-770, 2020.
4. EATON, P.; AMARAL, C. P.; COUTO, S. C. P.; OLIVEIRA, M. S.; **VASCONCELOS, A. G.**; BORGES, T. K. S.; KÜCKELHAUS, S. A. S.; LEITE, J. R. S. A.; MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I. Atomic Force Microscopy is a potent technique to study eosinophil activation. **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 1-8, 2019.
5. BRAND, G. D.; RAMADA, M. H. S.; MANICKCHAND, J. R.; CORREA, R.; RIBEIRO, D. J. S.; SANTOS, M. A.; **VASCONCELOS, A. G.**; ABRÃO, F. Y.; PRATES, M. V.; MURAD, A. M.; CARDOZO, J. L.; LEITE, J. R. S. A.; MAGALHÃES, K. G.; OLIVEIRA, A. L.; BLOCH, C. Intragenic antimicrobial peptides (IAPs) from human proteins with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity. **PLoS One**, v. 14, p. e0220656, 2019.
6. BRANGO-VANEGAS, J.; MARTINHO, L. A.; BESSA, L. J.; **VASCONCELOS, A. G.**; PLÁCIDO, A.; PEREIRA, A. L.; LEITE, J. R. S. A.; MACHADO, A. H. L. Synthesis of novel sulfide-based cyclic peptidomimetic analogues to solonomides. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 15, p. 2544-2551, 2019.

7. DOS SANTOS, R. C.; OMBREDANE, A. S.; SOUZA, J. M. T.; **VASCONCELOS, A. G.**; PLÁCIDO, A.; AMORIM, A. G. N.; BARBOSA, E. A.; LIMA, F. C. D. A.; ROPKE, C. D.; ALVES, M. M. M.; ARCANJO, D. D. R.; CARVALHO, F. A. A.; DELERUE-MATOS, C.; JOANITTI, G. A.; LEITE, J. R. S. A. 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**, v. 105, p. 184-196, 2018.
8. CAMPELO, Y.; OMBREDANE, A.; **VASCONCELOS, A. G.**; ALBUQUERQUE, L.; MOREIRA, D.; PLÁCIDO, A.; ROCHA, J.; HILARION FOKOUE, H.; YAMAGUCHI, L.; MAFUD, A.; MASCARENHAS, Y.; DELERUE-MATOS, C.; BORGES, T.; JOANITTI, G.; ARCANJO, D.; KATO, M.; KUCKELHAUS, S.; SILVA, M.; MORAES, J.; LEITE, J. R. S. A. Structure-activity relationship of piplartine and synthetic analogues against *Schistosoma mansoni* and cytotoxicity to mammalian cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 1802, 2018.

Artigos completos submetidos em revistas indexadas:

1. PERFEITO, M. L. G.; COSTA, J. M. A. R.; LIMA NETO, F. E. M.; ARAÚJO, T. D. S.; SILVA, R. E.; SOARES, M. J. S.; RIBEIRO, F. O. S.; BRITO, L. M.; SILVA, M. F. S.; PESSOA, C.; DIAS, J. N.; SILVA-PEREIRA, I.; **VASCONCELOS, A. G.**; LEITE, J. R. S. A.; SILVA, D. A. Cashew gum-based nanoemulsion loading eugenol-rich essential oils for antioxidant, antimicrobial and anticancer application. **Applied Surface Science Journal**. Manuscript Number: APSUSC-D-21-02601, 2021.
2. **VASCONCELOS, A. G.**; BARROS, A.; CABRAL, W; CARNEIRO D; SILVA, I; ALMEIDA, M.; ALBUQUERQUE, L.; SANTOS, R.; BRITO, A.; ARCANJO, D.; MARTINS, M.; BORGES, T.; BAO, S.; PLÁCIDO, A.; EATON, P.; KUCKELHAUS, S.; LEITE, J. R. S. A. Promising self-emulsifying drug delivery system loading lycopene from red guava (*Psidium guajava* L.): in vivo toxicity, biodistribution and cytotoxicity on prostate cancer cells. **Cancer Nanotechnology**. Manuscript Number: JNAN-D-21-00330, 2021.
3. SOUSA, N. A; MARANI, M.; LOPES, A. L. F.; SILVA, E. M.; BARBOSA, E. A.; **VASCONCELOS, A. G.**; KUZNIEWSKI, F. T. B.; LUSTOSA, S. S.; GOMES, K. P.; COLUGNATI, D. B.; ROCHA, J. A.; BENQUERER, M. P.; QUELEMES, P.; VERAZ, L.; MOREIRA, D. C.; LEITE, J. R.S.A.; GADELHA, K. K. L.; MAGALHÃES, P. J. C.; PLÁCIDO, A.; EATON, P.; NICOLAU, L.; MEDEIROS, J. V. R. BR-bombesin: A novel bombesin-related from the skin secretion of the Chaco tree frog (*Boana raniceps*) with physiological gastric effects. **Amino acids**. Manuscript Number: AMAC-D-21-00223.
4. ANDRADES, E. O.; COSTA, J. M. A. R.; LIMA NETO, F. E. M.; ARAUJO, A. R.; RIBEIRO, F. O. S.; **VASCONCELOS, A. G.**; OLIVEIRA, A. C. J.; SOARES SOBRINHO, J. L.; ALMEIDA, M. P.; CARVALHO, A. P.; DIAS, J. N.; SILVA, I. G. M.; ALBUQUERQUE, P.; PEREIRA, I. S.; RABELLO, D. A. R.; AMORIM, A. G. N.;

LEITE, J. R. S. A.; SILVA, D. A. Acetylated cashew gum and fucan for incorporation of lycopene rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) in nanostructured systems: Antioxidant and antitumor capacity. International Journal of Biological Macromolecules.

Trabalhos apresentados em eventos científicos nacionais e internacionais:

Relacionados ao projeto de tese:

1. AMORIM, A. G. N.; SOUZA, J. M. T.; SANTOS, R. C.; **VASCONCELOS, A. G.**; SOUZA, L. K. M.; ARAÚJO, T. S. L.; CABRAL, W. F.; SILVA, M. G.; MEDEIROS, J-V. R.; MUEHLMANN, L. A.; KUCKELHAUS, S. A. S.; LEITE, J.R.S.A. Anti-inflammatory and antioxidant activity improvement of lycopene from guava on nanoemulsifying system. II Encontro Internacional de Inovação em Saúde do Distrito Federal, 2020.
2. **VASCONCELOS, A. G.**; VALIM, M. O.; ALMEIDA, M. P.; MATTOS, J. S. C.; RABELLO, D. A. R.; EATON, P.; KUCKELHAUS, S. A. S.; LEITE, J. R. S. A. Production of lipid-core nanocapsules containing lycopene-rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) with cytotoxic activity in breast cancer cells. Brazilian Breast Cancer Symposium, 2019.
3. **VASCONCELOS, A. G.**; VALIM, M. O.; AMORIM, A. G. N.; ALMEIDA, M. P.; MATTOS, J. S. C.; RABELLO, D. A. R.; EATON, P.; KUCKELHAUS, S. A. S.; LEITE, J. R. S. A. Nanocápsulas De Núcleo lipídico contendo extrato rico em licopeno da goiaba vermelha com atividade anticâncer: produção e avaliação citotóxica. I Encontro Internacional de Inovação em Saúde do Distrito Federal, 2018.
4. SANTOS, R. C.; OMBREDANE, A. S.; SOUZA, J. M. T.; **VASCONCELOS, A. G.**; PLÁCIDO, A.; AMORIM, A. DAS G.N.; JOANITTI, G. A.; LEITE, J. R. S. A. Evaluation of anticancer activity of lycopene rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) in human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. Goiania Breast Cancer Symposium, 2017.

Não relacionados ao projeto de tese:

1. BRANGO-VANEGAS, J. F.; **VASCONCELOS, A. G.**; BESSA, L. J.; ALBUQUERQUE, L. F. F.; BORGES, T. K. S.; LEITE, JOSÉ ROBERTO DE S.A. Inhibition of *Quorum Sensing* in *Staphylococcus aureus* by a cyclic peptide: a preliminary study. I Encontro Internacional de Inovação em Saúde do Distrito Federal, 2018.
2. BEZERRA, I. B. M.; COMERMA-STEFFENSEN, S. G.; **VASCONCELOS, A. G.**; RAMOS, R. M.; BEMQUERER, M. P.; LEITE, J. R. S. A.; SIMONSEN, U.; ARCANJO, D. D. R. Provável envolvimento da enzima argininosuccinato sintase

(AsS) no efeito vasorrelaxante do BPP-BrachyNH₂. IV Congresso Regional da Sociedade Brasileira de Biofísica, 2018.

3. ARCANJO, D. D. R.; COMERMA-STEFFENSEN, S. G.; **VASCONCELOS, A. G.**; MENDES, A. N.; MARTINS, M. C. C.; NUNES, P. H. M.; OLIVEIRA, A. P.; SIMONSEN, ULF; LEITE, J.R.S.A. BPP-Brachy-NH₂, um oligopeptídeo rico em prolina, apresenta efeito vasorelaxante mediado pelo óxido nítrico em artérias de resistência. III Congresso Regional da Sociedade Brasileira de Biofísica, 2017.
4. SILVA, M. G.; ARCANJO, D. R.; **VASCONCELOS, A. G.**; DA SILVA-FILHO, J. C.; KÜCKELHAUS, S. A. S. ; LEITE, J.R.S.A. Avaliação toxicológica aguda do BPP-Brachy-NH₂, um peptídeo vasoativo identificado na secreção cutânea de *Brachycephalus ephippium*. III Encontro Estratégico de Ciências Farmacêuticas, II Seminário Ibero Americano de P&D de Medicamentos e do II Simpósio Internacional de Farmácia Clínica, 2017.