

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia Química
Área de Concentração:
Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DE LICOPENO
OBTIDO POR EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA COMO AGENTE
ANTIAPOPTÓTICO NO CULTIVO DE CÉLULAS DE INSETO**

Autora: Juliana Andrade Egydio (FEQ/UNICAMP)

Orientadora: Prof^ª Dra. Ângela Maria Moraes – FEQ - UNICAMP

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa - IQ-UNICAMP

Dissertação de mestrado apresentado à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas – SP

Julho de 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -
UNICAMP

Eg92a Egydio, Juliana Andrade
Avaliação do potencial de utilização de licopeno obtido por extração supercrítica como agente antiapoptótico no cultivo de células de inseto / Juliana Andrade Egydio. --Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Ângela Maria Moraes, Paulo de Tarso Vieira e Rosa.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Licopeno. 2. Extração supercrítica. 3. Atividade antioxidante. 4. Apoptose. 5. *Drosophila melanogaster*.
I. Moraes, Ângela Maria. II. Rosa, Paulo de Tarso Vieira e. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Evaluation of the potential use of lycopene obtained by supercritical extraction as an antiapoptotic agent in insect cell culture

Palavras-chave em Inglês: Lycopene, Supercritical extraction, Antioxidant activity, Apoptosis, *Drosophila melanogaster*

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Fernanda Gadelha, Theo Guenter Kieckbusch

Data da defesa: 30/07/2009

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Juliana Andrade Egydio e aprovada em 30 de julho de 2009 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof.^a. Dra. – Ângela Maria Moraes

Orientadora – Faculdade de Engenharia Química/Unicamp



Prof.^a. Dra. Fernanda Gadelha

Instituto de Biologia/Unicamp



Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch

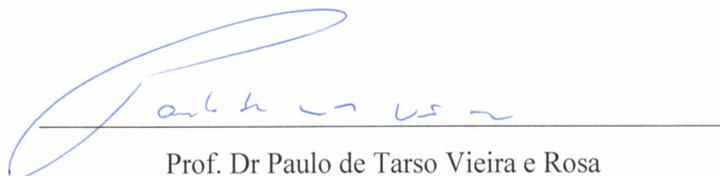
Faculdade de Engenharia Química/Unicamp

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Juliana Andrade Egydio e aprovada pela comissão julgadora em 30 de julho de 2009.



Profª Dra Ângela Maria Moraes

Orientadora – Faculdade de Engenharia Química/Unicamp



Prof. Dr Paulo de Tarso Vieira e Rosa

Co-Orientador – Instituto de Química/Unicamp

*À minha família pelo amor e apoio
incondicional em todos os momentos*

AGRADECIMENTOS

Em especial aos meus orientadores, Prof^ª. Dra. Ângela Maria Moraes e Prof. Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa, pela confiança e incentivo, em todos os momentos.

Aos meus pais, Antonio Egydio e Joceli, e à minha irmã Carolina, que mesmo à distância, me deram apoio e me incentivaram a continuar.

Ao Renato, pelo carinho, pela paciência e pelo companheirismo em todos os momentos.

À minha segunda família, Maria Josefa, Cibele, Janine e Júlia pelo carinho de muitos anos.

Aos companheiros do Departamento de Processos Biotecnológicos/Unicamp, Alan, Anayla, Érica, Gisele, Iara, Igor, Itiara, Lucimara, Luisa, Maria Cristiane, Nemayla e Priscila pelos momentos de descontração e aprendizado. Em especial ao amigo Igor, por ser sempre tão prestativo e por me “apresentar ao DPB”.

Às companheiras Fabiana, Fernanda e Oselys pela contribuição e paciência nos ensinamentos e discussões.

Aos professores Dr. Everson Alves Miranda e Dra. Sônia Maria Alves Bueno, pelo uso das dependências de seus laboratórios.

À professora Dra. Maria Beatriz Puzzi por disponibilizar as instalações de seu laboratório para armazenamento das células S2.

Às professoras Dra. Fernanda Gadelha e Dra. Giovana Degasperi pelo auxílio nos ensaios de citometria.

Aos funcionários da Faculdade de Engenharia Química e do Instituto de Química que colaboraram para a realização deste trabalho.

A todos que de certa forma contribuíram para o sucesso deste trabalho.

À Capes, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Nos últimos anos o cultivo de células animais tornou-se uma importante tecnologia de produção de vacinas e proteínas terapêuticas recombinantes. Durante o crescimento *in vitro* de células animais, alterações nas condições ambientais ótimas do cultivo podem resultar em perda de viabilidade. Uma forma de controlar a apoptose, que é um processo de morte celular programado, é a inclusão de agentes antioxidantes no meio de cultura. O licopeno, cuja principal fonte é o tomate, tem despertado crescente interesse devido às suas propriedades antioxidantes e por apresentar atividade de proteção contra o câncer e doenças do coração. A caracterização da atividade biológica do licopeno *in vitro* é dificultada pelo fato de que solventes potencialmente tóxicos são empregados para sua obtenção. Assim, a extração de licopeno de tomate empregando CO₂ supercrítico, consiste em uma opção atraente.

Neste trabalho desenvolveu-se um processo de obtenção de licopeno de suco de tomate a partir de extração com CO₂ supercrítico, em diferentes condições de temperatura e pressão, sem a etapa prévia de secagem do material, mas pela substituição de parte da água por etanol. Após a caracterização do extrato quanto à atividade antioxidante, a aplicabilidade do extrato como agente antiapoptótico foi avaliada no cultivo de células animais, especificamente da linhagem *Drosophila melanogaster* S2.

Foram obtidos rendimentos na faixa de 7,7% a 76,9%, com efeito estatisticamente significativo apenas para a temperatura. Através da análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), observou-se que o licopeno é o principal composto presente nos extratos obtidos, com picos de 82,7% em média. O estudo da atividade antioxidante indicou que o extrato obtido à 40 °C e 350 bar apresenta maior capacidade antioxidante, de 49,7% pelo método do DPPH• e 38,2% pelo método do rubreno. Nos ensaios de citotoxicidade, o mesmo extrato não apresentou efeito citotóxico às células S2 em concentrações inferiores a 0,182 mg/mL quando disperso no solvente DMSO, entretanto quando disperso em THF, mostrou-se citotóxico às células. O extrato dissolvido em DMSO apresentou elevado potencial para ser utilizado como agente antiapoptótico no cultivo de células S2, resultando em proteção superior a 92% contra a apoptose induzida por H₂O₂.

Palavras-chave: licopeno, extração supercrítica, atividade antioxidante, apoptose, *Drosophila melanogaster*.

ABSTRACT

In recent years the cultivation of animal cells has become an important technology for the production of vaccines and therapeutic recombinant proteins. During *in vitro* culture of animal cells, changes in optimum environmental conditions may result in loss of viability. One way to control apoptosis, a process of programmed cell death is the inclusion of antioxidants in the culture medium. Lycopene, whose main source is tomatoes, has attracted increasing interest due to its antioxidant activity and because it can provide protection against cancer and heart diseases. The characterization of the biological activity of lycopene *in vitro* is complicated by the fact that potentially toxic solvents are used for their production. Thus, the extraction of lycopene from tomatoes using supercritical CO₂ is an attractive option.

In this work, a process was developed for obtaining lycopene from tomato juice by extraction with supercritical CO₂ at different conditions of temperature and pressure, without the prior step of drying the material, but replacing water by ethanol. After characterizing the extract regarding its antioxidant activity, the applicability of the extract as an antiapoptotic agent was evaluated for the cultivation of animal cells, specifically the *Drosophila melanogaster* S2 cell line.

Yields in the range of 7.7% to 76.9% were observed, with statistically significant effect only for the temperature. The analysis by high performance liquid chromatography (HPLC) indicated that lycopene was the main compound present in the extracts obtained, with peaks of 82.7% in average. The extract obtained at 40 °C and 350 bar showed the highest antioxidant capacity, equal to 49.7% by the DPPH[•] method and 38.2% by the rubrene method. The same extract showed no cytotoxic effect on S2 cells concentrations up to 0.182 mg/mL when dispersed in the solvent DMSO, however, when dispersed in THF, it proved to be cytotoxic to cells. The extract dissolved in DMSO showed strong potential to be used as an antiapoptotic agent in the culture of S2 cells, resulting in protection above 92% against apoptosis induced by H₂O₂.

Keywords: lycopene, supercritical extraction, antioxidant activity, apoptosis, *Drosophila melanogaster*.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Objetivos.....	4
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. Cultivo de Células Animais Visando à Produção de Biofármacos	5
2.1.1. Comparação entre células de mamíferos e de insetos	7
2.1.2. Linhagem de células Schneider 2	8
2.2. Morte por Apoptose no Cultivo de Células Animais	11
2.2.1. Métodos para Detecção da Apoptose	14
2.2.2. Estratégias de Prevenção da Apoptose	16
2.3. Radicais Livres e Antioxidantes.....	17
2.4. Licopeno	19
2.5. Obtenção de Extratos Bioativos de Plantas através de Fluidos Supercríticos.....	23
2.6. Extração de Licopeno em Condições Supercríticas	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. Materiais	31
3.2. Métodos	32
3.2.1. Substituição Parcial da Fase Aquosa do Suco de Tomate por Etanol	32
3.2.2. Obtenção de Licopeno do Suco de Tomate por Extração com CO ₂ Supercrítico	32

3.2.3. Caracterização dos Extratos Obtidos.....	34
3.2.3.1. Determinação da Concentração de Licopeno em Solução por Colorimetria...	34
3.2.3.2. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	36
3.2.3.3. Avaliação da Atividade Antioxidante	36
3.2.3.3.1. Método de Seqüestro de Radicais Livres de DPPH [•]	36
3.2.3.3.2. Oxidação do Rubreno	37
3.2.4 Preparação do Banco de Células de <i>Drosophila melanogaster</i> S2 e do Inóculo para os Ensaio Biológicos	39
3.2.5. Análise do Perfil de Citotoxicidade do Extrato a Células S2.....	40
3.2.6. Avaliação da Atividade Antiapoptótica dos Extratos Ativos	41
3.2.6.1. Microscopia de Fluorescência	41
3.2.6.2. Citometria de Fluxo.....	42
3.2.7. Avaliação da Concentração Celular	43
3.2.8. Determinação dos Parâmetros Cinéticos de Crescimento Celular	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. Efeito da Substituição da Fase Aquosa do Suco de Tomate por Etanol na Eficiência do Processo de Extração	45
4.2. Influência da Temperatura e da Pressão de Extração nas Características dos Extratos Obtidos	46
4.2.1. Efeitos no Rendimento em Licopeno e na Eficiência da Extração.....	46
4.2.2. Perfil Cromatográfico dos Extratos Obtidos	50
4.2.3. Efeitos na Atividade Antioxidante	54
4.2.3.1. Método de Sequestro de Radicais Livres de DPPH [•]	54
4.2.3.2. Oxidação do Rubreno	58
4.3 – Análise da Adição de Extrato Rico em Licopeno no Cultivo de Células de <i>Drosophila melanogaster</i> S2.....	59
4.3.1. Atividade Citotóxica nas Células S2	59
4.4. Avaliação do Potencial Antiapoptótico dos Extratos de Licopeno	63
4.4.1. Efeitos na Cinética de Crescimento Celular	63
4.4.2. Avaliação da apoptose por microscopia de fluorescência.....	68
4.4.3. Estudo da apoptose por citometria de fluxo	72

5. CONCLUSÕES	75
5.1. Sugestões para trabalhos futuros	76
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXO	93
Anexo A – Resultados Complementares Referentes à Seção 4.2.....	93
Anexo B. Resultados Complementares Referentes à Seção 4.2.3.....	98
Anexo C. Resultados Complementares Referentes à Seção 4.3.....	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Eventos característicos dos processos de morte celular por necrose e apoptose (adaptado de Poulin, 2005).....	13
Figura 2.2 - Sequência de transformações morfológicas durante a apoptose e necrose onde (A) célula viável não-apoptótica, (B) célula necrótica (entumescimento seguido de lise e extravasamento do material intracelular), (C) célula viável apoptótica, com condensação da cromatina próxima à parede nuclear, (D) células não-viáveis apoptóticas, com formação de corpos apoptóticos e (E) fase final, onde a célula não apresenta cromatina (Pellegrini et al., 2008).....	15
Figura 2.3 - Estrutura química do licopeno na forma integralmente <i>trans</i>	20
Figura 2.4 – Recuperação de licopeno a partir de tomate a diferentes temperaturas na pressão de 405 bar (adaptado de Ollanketo <i>et al.</i> , 2001).....	28
Figura 3.1 - Representação esquemática da unidade de extração supercrítica.....	33
Figura 3.2 – Oxidação do rubreno pelo oxigênio singlete (adaptado de Nardello <i>et al.</i> , 1999).....	37
Figura 4.1 - Leito de partículas após o processo de extração utilizando CO ₂ supercrítico como solvente a 60°C e 275 bar: A) dois ciclos de lavagem, B) três ciclos de lavagem, C) quatro ciclos de lavagem.	46
Figura 4.2 - Leito de partículas lavadas quatro vezes com etanol após o processo de extração utilizando CO ₂ supercrítico à 80 °C e 350 bar como solvente.	48
Figura 4.3 - Valores de rendimento de extração obtidos experimentalmente e preditos pelo modelo estatístico, erro residual de 36,83286.	49
Figura 4.4 - Superfície de resposta obtida no planejamento experimental para verificação dos efeitos das variáveis independentes codificadas temperatura e pressão sobre o rendimento de extração.....	49
Figura 4.5 - Perfil cromatográfico do extrato de licopeno obtido por extração com CO ₂ supercrítico à 80 °C e 350 bar.....	51
Figura 4.6 - Perfil cromatográfico do padrão de licopeno a 100 ppm. Fase móvel: metanol/THF (90:10 v/v).....	52
Figura 4.7 - Perfil cromatográfico do extrato de licopeno obtido por extração com CO ₂	

supercrítico à 80°C e 350 bar. Fase móvel: metanol/THF (90:10 v/v).....	53
Figura 4.8 - Perfil cromatográfico do extrato de licopeno obtido por extração com CO ₂ supercrítico à 40°C e 350 bar. Fase móvel: metanol/THF (90:10 v/v).....	53
Figura 4.9 - Variação da quantidade remanescente do radical DPPH [•] após reação por 60 min com diferentes concentrações do extrato obtido a 80°C e 350 bar. EC ₉₅ = 0,363 mg...	54
Figura 4.10 – Capacidade antioxidante dos extratos obtidos por extração supercrítica.....	57
Figura 4.11 - Inibição da proliferação das células S2 expostas aos solventes DMSO e THF e ao licopeno dissolvido nestes solventes após 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas.....	62
Figura 4.12 - Cinética de crescimento das células <i>Drosophila melanogaster</i> S2, com inóculo de concentração igual a 5,0x10 ⁵ células viáveis/L em meio Sf 900 II, na presença ou não de extrato rico em licopeno solubilizado em DMSO ou THF.	65
Figura 4.13 - Viabilidade das células <i>Drosophila melanogaster</i> S2, com inóculo de concentração igual a 5,0x10 ⁵ células viáveis/L em meio Sf 900 II, na presença ou não de extrato rico em licopeno solubilizado em DMSO ou THF.....	65
Figura 4.14 – Cinética de crescimento celular para as células <i>Drosophila melanogaster</i> S2, com inóculo de concentração igual a 1,0x10 ⁶ células viáveis/L na presença ou não de extrato rico em licopeno solubilizado em DMSO, ou de DMSO somente.	66
Figura 4.15 - Viabilidade das células <i>Drosophila melanogaster</i> S2, com inóculo de concentração igual a 1,0x10 ⁶ células viáveis/L na presença ou não de extrato rico em licopeno solubilizado em DMSO.	67
Figura 4.16 –Perfil de células viáveis não apoptóticas (VNA) no ensaio cinético.	69
Figura 4.17 – Perfil de células viáveis apoptóticas (VA) no ensaio cinético.	69
Figura 4.18 – Perfil de células não viáveis apoptóticas (NVA) no ensaio cinético.	69
Figura 4.19 – Perfil de células não viáveis necróticas (NEC) no ensaio cinético.	70
Figura 4.20 – Perfil de células livres de cromatina (LC) no ensaio cinético.....	70
Figura 4.21 – Aspecto típico das células de <i>Drosophila melanogaster</i> S2 cultivadas com e sem adição de licopeno e DMSO durante o estudo de comportamento durante o crescimento celular nos dias 1, 5, 10, 15 e 18.	71
Figura 4.22 - Representação gráfica das características físicas das células de <i>Drosophila melanogaster</i> S2 determinadas por citometria de fluxo. A intensidade do espalhamento frontal (Forward Scatter Height, FSC-H) representa o tamanho das células e a do espalhamento lateral (Side Scatter Height, SSC – H) a complexidade interna.	72

Figura 4. 23 – Histogramas obtidos por citometria de fluxo para avaliação do potencial anti-apoptótico do extrato rico em licopeno na cultura de células de <i>Drosophila melanogaster</i> S2. (A) controle positivo (células cultivadas na presença de 20 mM de H ₂ O ₂); (B) controle negativo (células na ausência de H ₂ O ₂ e de extrato); (C) células na presença de 20 mM de H ₂ O ₂ e de extrato rico em licopeno disperso em DMSO (0,182 mg/mL).....	73
Figura A1 - Perfil cromatográfico do extrato de licopeno obtido por extração com CO ₂ supercrítico à 40°C e 200 bar. Fase móvel: acetonitrila/metanol (90:10 v/v).	93
Figura A2 - Perfil cromatográfico do extrato de licopeno obtido por extração com CO ₂ supercrítico à 80°C e 200 bar. Fase móvel: acetonitrila/metanol (90:10 v/v).	93
Figura A3 - Perfil cromatográfico do extrato de licopeno obtido por extração com CO ₂ supercrítico à 40°C e 350 bar. Fase móvel: acetonitrila/metanol (90:10 v/v).	93
Figura A4 - Perfil cromatográfico do extrato de licopeno obtido por extração com CO ₂ supercrítico à 60°C e 275 bar. Fase móvel: acetonitrila/metanol (90:10 v/v).	94
Figura A5 - Perfil cromatográfico do extrato de licopeno obtido por extração com CO ₂ supercrítico à 60°C e 275 bar. Fase móvel: acetonitrila/metanol (90:10 v/v).	94
Figura A6 - Perfil cromatográfico do extrato de licopeno obtido por extração com CO ₂ supercrítico à 60°C e 275 bar. Fase móvel: acetonitrila/metanol (90:10 v/v).	94
Figura A7 – Curva de calibração do licopeno padrão.	95
Figura A8 - Perfil cromatográfico do extrato de licopeno obtido por extração com CO ₂ supercrítico à 40°C e 200 bar. Fase móvel: metanol/THF (90:10 v/v).....	95
Figura A9 - Perfil cromatográfico do extrato de licopeno obtido por extração com CO ₂ supercrítico à 80°C e 200 bar. Fase móvel: metanol/THF (90:10 v/v).....	95
Figura A10 - Perfil cromatográfico do extrato de licopeno obtido por extração com CO ₂ supercrítico à 40°C e 350 bar. Fase móvel: metanol/THF (90:10 v/v).....	96
Figura A11 - Perfil cromatográfico do extrato de licopeno obtido por extração com CO ₂ supercrítico à 80°C e 350 bar. Fase móvel: metanol/THF (90:10 v/v).....	96
Figura A12 - Perfil cromatográfico do extrato de licopeno obtido por extração com CO ₂ supercrítico à 60°C e 275 bar, 1ª repetição. Fase móvel: metanol/THF (90:10 v/v).	96
Figura A13 - Perfil cromatográfico do extrato de licopeno obtido por extração com CO ₂ supercrítico à 60°C e 275 bar, 2ª repetição. Fase móvel: metanol/THF (90:10 v/v).	97
Figura A14 - Perfil cromatográfico do extrato de licopeno obtido por extração com CO ₂ supercrítico à 60°C e 275 bar, 3ª repetição. Fase móvel: metanol/THF (90:10 v/v).	97

Figura B1 – Curva de calibração do DPPH [•] para determinação da atividade antioxidante dos extratos.....	98
Figura B2 - Variação da quantidade remanescente do radical DPPH [•] após reação por 60 min com diferentes concentrações do extrato obtido a 60°C e 275 bar, após 60 minutos de reação. EC ₉₅ = 4,952 mg.....	98
Figura B3 - Variação da quantidade remanescente do radical DPPH [•] após reação por 60 min com diferentes concentrações do extrato obtido a 80°C e 200 bar, após 60 minutos de reação. EC ₉₅ = 7,328 mg.....	99
Figura B4 - Variação da quantidade remanescente do radical DPPH [•] após reação por 60 min com diferentes concentrações do extrato obtido a 60°C e 275 bar, após 60 minutos de reação. EC ₉₅ = 6,523 mg.....	99
Figura B5 - Variação da quantidade remanescente do radical DPPH [•] após reação por 60 min com diferentes concentrações do extrato obtido a 40°C e 200 bar, após 60 minutos de reação. EC ₉₅ = 7,375 mg.....	100
Figura B6 - Variação da quantidade remanescente do radical DPPH [•] após reação por 60 min com diferentes concentrações do extrato obtido a 40°C e 350 bar, após 60 minutos de reação. EC ₉₅ = 1,795 mg.....	100
Figura B7 - Variação da quantidade remanescente do radical DPPH [•] após reação por 60 min com diferentes concentrações do extrato obtido a 60°C e 275 bar, após 60 minutos de reação. EC ₉₅ = 2,163 mg.....	101
Figura B8 – Curva de calibração obtida para o padrão Trolox para a determinação da atividade antioxidante através da redução do radical DPPH.....	101
Figura B9 – Curva de calibração obtida para o padrão Trolox para a determinação da atividade antioxidante através da oxidação do rubreno.....	102
Figura C1 – Curva de calibração do MTT para análise da viabilidade celular do extrato de licopeno.	103
Figura C2 – Inibição da proliferação das células S2 expostas ao solvente DMSO e ao licopeno dissolvido em DMSO em culturas de células S2 após 24 (a), 48 (b) e 72 (c) horas. Concentração de licopeno na amostra antes das diluições: 14,55mg/mL.	104
Figura C3 – Curva de calibração do MTT para análise da viabilidade celular do extrato de licopeno	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Histórico do desenvolvimento dos processos que utilizam células animais (adaptada de Griffiths, 1991; Augusto e Oliveira, 2001; Mellado e Castilho, 2008).....	6
Tabela 2.2. Comparação entre células de insetos e de mamíferos em termos de tecnologia de propagação celular (adaptada de Agathos, 1991; Batista, 2007).....	9
Tabela 2.3 – Proteínas produzidas por células de <i>Drosophila melanogaster</i> S2.	11
Tabela 2.4 – Substâncias antioxidantes (adaptado de Koury e Donangelo, 2003).....	18
Tabela 2.5 – Propriedades críticas dos solventes em termos de temperatura crítica (T_c) e pressão crítica (P_c) (Clifford, 1999).....	24
Tabela 2.6 – Dados da extração supercrítica do licopeno a partir de tomate, em diferentes condições.	29
Tabela 3. 1– Planejamento fatorial 2^2 completo com 3 repetições no ponto central.....	34
Tabela 3.2. – Composição da solução tampão PBS	41
Tabela 4.1 – Resultados do planejamento fatorial 2^2 completo com 3 repetições no ponto central.	47
Tabela 4.2 – Efeitos estatísticos principais das variáveis do planejamento 2^2	48
Tabela 4.3 – Porcentagem da área correspondente ao pico do licopeno.	53
Tabela 4.4 – Valores de coeficiente de eficiência EC_{95} para os extratos obtidos em diferentes condições de extração ($n = 3$).	55
Tabela 4.5 – Atividade antioxidante dos extratos obtidos por extração supercrítica analisados após 60 min pelo método do radical DPPH $^{\bullet}$ ($n = 3$).	57
Tabela 4.6 - Atividade antioxidante dos extratos obtidos por extração supercrítica e analisados após 40 min pelo método de oxidação de rubreno ($n=3$).....	59
Tabela 4.7 – Inibição do crescimento celular de células S2 em contato com licopeno em diferentes solventes por diversos períodos ($n = 3$).	63
Tabela 4.8 – Análise das células S2 quanto à apoptose.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu_{\text{máx}}$: taxa máxima de crescimento celular;

ATA: ácido aurintricarboxílico;

BHT: butil hidroxitolueno;

CE: coeficiente de extinção;

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência;

DMSO: dimetilsulfóxido;

DPPH[•]: 2,2- Difenil-1-picril-hidrazilo;

EROs: espécies reativas ao oxigênio;

GPV: glicoproteína G do vírus da raiva;

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo;

n: número de eventos;

PBS: *Phosphate Buffered Saline* (fosfato salino tamponado);

S2: linhagem de células *Drosophila melanogaster* S2;

SDS: dodecil sulfato de sódio;

SFB: soro fetal bovino;

TEAC: capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*);

t_d : tempo de duplicação celular;

THF: tetrahydrofurano;

Trolox: 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico;

UV: ultravioleta.

1. INTRODUÇÃO

Biotecnologia pode ser definida como a aplicação de princípios científicos e de engenharia no processamento de materiais por agentes biológicos, ou a aplicação industrial de organismos, sistemas e componentes biológicos para produção de bens e serviços que apresentem valor agregado, gerando inovações tecnológicas principalmente nos setores farmacêutico, químico, agroindustrial e ambiental (Mccoy, 2004; Scott, 2004; Walsh, 2005).

Biofármacos são medicamentos (em geral proteínas e outras substâncias) obtidos através do cultivo de células microbianas ou animais modificadas ou não geneticamente para a expressão do princípio ativo de interesse. Não são considerados biofármacos os produtos obtidos pela extração direta de fontes biológicas como órgãos de animais.

A demanda por biofármacos tem aumentado rapidamente nos últimos anos (Buttler, 2005). Apesar de a produção de biofármacos por células animais ter se desenvolvido mais nas últimas duas décadas, essa tecnologia teve início durante a Segunda Guerra Mundial, quando buscava-se vacinas virais, em particular contra a poliomelite (Alvez *et al.*, 2008). Após esse período a tecnologia de cultivo de células animais tem se desenvolvido através de métodos de caracterização, padronização e manutenção de linhagens celulares, tanto em laboratórios quanto em escalas semi-industriais e industriais (Galesi, 2007).

O interesse atual na cultura de células animais é focado na produção de proteínas recombinantes, as quais podem ser aplicadas em imunização, diagnóstico, terapia, ensaios analíticos e controle de qualidade. Células animais podem também ser usadas para a produção de vírus úteis no controle biológico na agricultura. Já em 1992, metade dos produtos gerados por companhias biotecnológicas no mundo era obtida a partir do cultivo de células animais (Cotter e Al-Rubeai, 1995).

Dentre os principais biofármacos aprovados obtidos através do cultivo de células animais, destacam-se o β -interferon (usado para o tratamento de esclerose múltipla), os fatores VIII e IX (para a terapia de hemofilia), a eritropoietina (usada no tratamento de

anemia), o hormônio folículo estimulante (para infertilidade feminina) e variados tipos de anticorpos monoclonais (para o tratamento, por exemplo, de câncer de mama e leucemia). Até 2005, cerca de 30 biofármacos produzidos por cultivo de células animais foram licenciados (Walsh, 2003; Pavlou, 2003; Molowa e Mazanet, 2003).

Para a obtenção de biofármacos, em geral são utilizadas linhagens celulares como a CHO.K1, a BHK-21 e a Vero, além de hibridomas diversos secretores de anticorpos. Células embrionárias de dípteros como as de *Drosophila melanogaster* S2 estão sendo utilizadas com sucesso na expressão de diversas proteínas recombinantes, tendo ótimo potencial para compor novas plataformas de produção de biofármacos. Em comparação a células de mamíferos, este sistema de expressão mostra-se capaz de realizar modificações pós-tradução na complexidade requerida, apresentando maior facilidade de cultivo. Entretanto, ainda não há registro de produtos comercialmente disponíveis que tenham sido obtidos através destas células.

Durante o cultivo de células animais *in vitro*, alterações das condições ambientais ótimas do meio de cultivo podem rapidamente resultar na ativação do mecanismo de morte celular programada, denominada apoptose, implicando em perda de viabilidade e em redução da produtividade celular. Atitudes tomadas no sentido de minimizar a ocorrência precoce desse processo podem resultar em apreciável impacto do ponto de vista econômico do processo, já que o período de produção celular pode ser prolongado.

A morte por apoptose ocorre regularmente no desenvolvimento de animais e plantas, no qual as células fisiologicamente indesejáveis, desnecessárias ou excessivas morrem de maneira ordenada, de forma a não causar danos ao restante do organismo (Agostini *et al.*, 2002; Blandini *et al.*, 2003). O mecanismo de apoptose, provavelmente, é responsável pela morte da maioria das células de mamíferos, tanto *in vivo* como *in vitro* (Dickson, 1998), e pela morte de mais de 80% de alguns tipos de células cultivadas em batelada (Goswami *et al.*, 1999).

Os principais agentes disparadores da apoptose são: o esgotamento de nutrientes no meio de cultura, a temperatura e níveis de concentração de oxigênio dissolvido distintos dos ótimos verificados no cultivo, além do acúmulo excessivo de produtos tóxicos e de radicais livres (Menezes-Acosta *et al.*, 2001).

A manipulação do meio de cultura e das condições gerais de cultura são algumas das estratégias para a prevenção da apoptose. Neste sentido foi sugerida a transfecção de inibidores genéticos de apoptose e a inclusão de nutrientes e compostos químicos antiapoptóticos nos meios de culturas (Cotter e Al-Rubeai, 1995; Menezes-Acosta *et al.*, 2001). São agentes antiapoptóticos ou inibidores dos processos de apoptose celular compostos como por exemplo as proteínas c-IAP1, c-IAP2, XIAP, ML-IAP, ILP2, survivin, Apollon/Bruce e Livin (Schimmer, 2004; Chen *et al.*, 2009; Flygare e Vucic, 2009), citocinas como as interleucinas, o ácido aurintricarboxílico (ATA), íons zinco e antioxidantes de várias fontes (Cotter e Al-Rubeai, 1995), por exemplo, o licopeno do tomate.

O licopeno (um carotenóide da mesma família que o β -caroteno) apresenta excelente capacidade de desativação de radicais livres de oxigênio devido às 11 duplas ligações conjugadas em sua estrutura (Setiawan *et al.*, 2001). Entretanto, o efeito do licopeno no cultivo de células animais ainda é controverso, parecendo depender do tipo de célula e do estresse ao qual esta está exposta. Há relatos de que o licopeno pode inibir o crescimento de células animais, de forma dependente da dose e do tempo de exposição, interrompendo a progressão do ciclo celular e promovendo a apoptose, por exemplo, em células expostas à fumaça de tabaco condensada (Palozza *et al.*, 2005). Todavia, o licopeno pode atuar na inibição de efeitos citotóxicos de compostos como a aflatoxina e o etanol em hepatócitos em cultura (Reddy *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2003). Em adição, o licopeno mostrou atividade protetora em células de rim de macaco verde africano da linhagem CV1-P em cultura contra peroxidação lipídica e danos oxidativos ao DNA (Matos *et al.*, 2000), células estas correlatas à linhagem Vero, de importância na produção industrial de biofármacos, conforme já mencionado.

Diversos autores discutiram a extração supercrítica de licopeno proveniente de tomate, estudando as condições ótimas de temperatura e pressão de extração, a influência do pré-processamento (teor de umidade e diâmetro de partículas) e presença ou não de co-solventes como, por exemplo, etanol e óleo vegetal (Baysal, *et al.*, 2000; Cadoni *et al.*, 2000; Rozzi *et al.*, 2002; Vasapollo *et al.*, 2004; Fuente *et al.*, 2006).

Uma das etapas prévias geralmente efetuadas na extração supercrítica de licopeno de tomate é secagem, que comumente é realizada em secadores de bandeja com

temperaturas relativamente baixas (cerca de 40 °C) e por longos períodos. Esta secagem é necessária para permitir o acesso do CO₂, um solvente hidrofóbico, ao interior das partículas que contêm o licopeno. Entretanto, além desta forma de secagem apresentar alto custo, pode causar a oxidação do licopeno e também alterar a sua estrutura de *trans* para *cis*, diminuindo sua atividade biológica.

Uma forma de minimizar este efeito da secagem é a substituição da água presente na estrutura vegetal do tomate por etanol. Diferentemente da água, o etanol é solúvel em CO₂ supercrítico e, portanto, pode ser removido por este solvente. Dessa forma, a extração do licopeno deve ser mais rápida e ter menor tendência de causar mudanças na forma isomérica do licopeno.

1.1. Objetivos

Dentro deste contexto, os objetivos deste trabalho consistem em:

- 1) Desenvolver um processo de extração de licopeno presente em sucos de tomate, com teor de água parcialmente substituído por etanol, por extração com dióxido de carbono supercrítico, determinando as condições operacionais adequadas para sua recuperação;
- 2) Caracterizar a atividade antioxidante *in vitro* do licopeno extraído do suco de tomate;
- 3) Determinar o efeito da adição de licopeno extraído por CO₂ supercrítico em variadas concentrações e por diferentes tempos de exposição no cultivo de células S2, visando minimizar e/ou retardar a morte das células por apoptose, induzida por água oxigenada ou por períodos de cultivo prolongados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Cultivo de Células Animais Visando à Produção de Biofármacos

O ano de 1907 é considerado um marco do início dos cultivos de células animais, com o sucesso dos experimentos de Ross Harrison, que descreveu a manutenção e o crescimento de células nervosas em suspensão por um período superior a 30 dias (Kretzmer, 2002).

Em 1949, Enders, Weller e Robbins mostraram ser possível a obtenção de uma linhagem de poliovírus em culturas primárias de tecidos não-neurais. Isso permitiu a propagação de grandes volumes de vírus e atenuação do poliovírus para uso em vacinas (Jubelt e Lipton, 1989). Cinco anos depois, foi licenciada a primeira vacina de uso humano contra poliomielite obtida em cultura de células de rins de macaco. Segundo Butler (2005), até o ano de 2005 havia mais de 30 biofármacos licenciados, entre eles proteínas recombinantes, anticorpos monoclonais e produtos baseados em ácidos nucleicos. A Tabela 2.1 apresenta um breve histórico dos produtos obtidos através do cultivo de células animais.

O cultivo de células animais tem sido muito utilizado pela indústria biotecnológica para sintetizar produtos, que são, em sua grande maioria, destinados à área de saúde humana e animal. Os produtos de células animais são tipicamente moléculas de massa molar elevada (em muitos casos proteínas), que podem ser classificados em cinco categorias (Augusto e Oliveira, 2001): substâncias imunobiológicas (como vacinas virais, anticorpos monoclonais e citocinas); bioinseticidas (exemplo: baculovírus); enzimas (como asparaginase, colagenase, citocromo P450, fatores sanguíneos VII, VIII e IX, pepsina, renina, tripsina e uroquinase); hormônios de cadeias longas (com 50 a 200 resíduos de aminoácidos, como os hormônios luteinizantes, coriônico, folículo estimulante) e células propriamente ditas, utilizadas como fonte para a extração de enzimas e hormônios, em testes toxicológicos, como substrato para sistemas de bioensaios, como ferramenta de seleção para agentes anti-tumorogênicos, antivirais e antídotos de drogas, como tecido artificial e outras aplicações.

Tabela 2.1 – Histórico do desenvolvimento dos processos que utilizam células animais (adaptada de Griffiths, 1991; Augusto e Oliveira, 2001; Mellado e Castilho, 2008).

Ano	Evento ou produto desenvolvido
1949	Obtenção de vírus em cultura de células
1954	Vacina inativada Salk contra poliomielite (com células de rim de macaco)
1963	Vacina contra sarampo (com células de embrião de galinha)
1964	Vacina contra raiva (com células WI-38)
1967	Vacina contra caxumba (com células WI-38)
1969	Vacina contra a rubéola (com células WI-38)
1970-	a) Vacinas humanas experimentais (varicela, citomegalovírus, e outros);
1974	b) Várias vacinas veterinárias
1979	Primeira linhagem de célula recombinante
1981	Primeiro <i>kit</i> de diagnóstico com anticorpo monoclonal
1982	Primeiro produto farmacêutico resultante da tecnologia de DNA recombinante (insulina)
1986	a) Licenciamento da produção de γ -interferon linfoblastóide; b) Testes clínicos com vários produtos resultantes da tecnologia de DNA recombinante; c) Vacinas contra poliomielite e raiva produzidas em células Vero
1987	Licença para produção de OKT3 – anticorpo envolvido na imunologia de transplantes
1988	Licença para produção de tPA recombinante (ativador de plaminogênio)
1990- 1995	Testes clínicos de diversos produtos oriundos da tecnologia de recombinação de DNA (antígeno da hepatite B, fatores sanguíneos VIII e IX, anticorpos monoclonais, anticorpos envolvidos na imunologia de transplantes, diversas citocinas, e outros)
1996- 2006	Aprovação para comercialização dos biofármacos: hormônio folículo-estimulante (Puregon®/Follistim AQ/Follitropin β), imunoglobulina G1 (Raptiva®/Efalizumab), fator VII (Advate®), α -glucosidase ácida (Myozyme®/Alglucosidase α).

A combinação de diversos fatores como a composição do meio de cultivo, a densidade do inóculo celular e o tipo de suporte para adesão celular (no caso de células aderentes) são essenciais para o sucesso do cultivo *in vitro* das células animais. Também se pode destacar a temperatura, o pH, a pressão osmótica, a agitação e a concentração de oxigênio dissolvido como fatores que influenciam o cultivo celular (Mitsubishi, 1989).

O interesse atual na otimização da tecnologia de cultura de células tem demandado importantes esforços no sentido de desenvolver processos que possibilitem a obtenção de cultivos celulares com alta densidade e que levem à síntese e produção de grandes quantidades de um determinado produto alvo com alta atividade biológica, baixo custo material e operacional atendendo a requisitos pré-estabelecidos de qualidade final, tendo em conta sempre as inevitáveis perdas na produtividade que ocorrem durante os processos de concentração e purificação.

2.1.1. Comparação entre células de mamíferos e de insetos

A principal vantagem dos sistemas de expressão baseados em células de mamíferos é que a síntese, o processamento e a secreção extracelular de proteínas eucarióticas são etapas eficientemente reconhecidas por este sistema, além disto, estas células podem receber múltiplos plasmídios. Entretanto, deve ser destacado o alto custo associado ao crescimento deste tipo de células e ao fato de que existem grandes diferenças entre as várias linhagens celulares que podem ser empregadas nesta área (Benting *et al.*, 2000).

As células de mamíferos podem crescer em suspensão ou requerer uma superfície adequada para seu crescimento, dependendo do tipo de tecido do qual são isoladas. Se forem provenientes de tecidos sólidos, como os rins, crescem de forma aderida, se do sangue, em suspensão. A necessidade básica de um suporte para ancoragem orienta todas as escolhas do processo produtivo (Freshney, 1994), como por exemplo o tipo de biorreator. As células de mamíferos apresentam temperatura ótima para o desenvolvimento celular em torno de 37 °C e o pH adequado para o seu desenvolvimento situa-se na faixa de 7,4 e 7,7 para algumas linhagens normais de fibroblastos e entre 7,0 e 7,4 para células transformadas (Léo *et al.*, 2008). São utilizados agentes tamponantes como HEPES, bicarbonato de sódio e ar acrescido de 5 % de CO₂ para a manutenção do pH ótimo de operação (Freshney, 1992).

Células de insetos, na maioria das vezes, são cultivadas em suspensão, portanto, não necessitam de suporte sólido, desenvolvendo-se livremente no meio de cultura. As células são mantidas através de repiques sucessivos, pela substituição do meio de cultura já metabolizado por meio fresco. O pH adequado no cultivo de células de insetos situa-se, geralmente, entre 6,2 e 6,5 (Léo *et al.*, 2008), e a temperatura ótima para o desenvolvimento celular é de 28 °C, não havendo a necessidade de acréscimo de CO₂, o que reduz a complexidade e os custos do cultivo (Mitsubishi, 1989).

Na Tabela 2.2 apresenta-se uma breve comparação, em termos de tecnologia de propagação, do cultivo de células de mamíferos e de insetos. Observa-se que as células de insetos revelam-se significativamente mais resistentes quanto ao cultivo, principalmente em relação à manutenção, facilidade de adaptação na mudança de sistemas aderentes para suspensos, e principalmente por apresentarem maior resistência a estresse ambiental, como mudanças de pH e de osmolalidade (Ikonomou *et al.*, 2003).

As principais linhagens de células de inseto estudadas atualmente são: linhagem Sf-9, isolada do tecido do ovário de pupa da borboleta *Spodoptera frugiperda* e que utiliza baculovírus como vetores para a expressão de bioprodutos de interesse; a linhagem High FiveTM, que possui alta capacidade de expressar altos níveis de proteínas recombinantes, também empregando baculovírus como vetor para expressar bioprodutos, e a linhagem S2, que pode ser modificada geneticamente para expressar proteínas heterólogas (Léo *et al.* 2008), tendo, portanto, uma vantagem sobre as linhagens anteriormente mencionadas (a de não requer infecção viral).

A seguir serão discutidas algumas das particularidades das linhagens S2 empregadas na realização deste trabalho.

2.1.2. Linhagem de células Schneider 2

Em um estudo publicado em 1972, Schneider divulgou o desenvolvimento de três linhagens celulares primárias obtidas de embriões de *Drosophila melanogaster* em estágio tardio (20-24h), que foram mantidas *in vitro* por mais de um ano. O estudo foi iniciado em 1969. As três linhagens apresentaram morfologia relativamente similar, predominando a aparência epitelial, diâmetro variando de 5 a 11 µm e comprimento de 11 a 35 µm.

Existem hoje por volta de 94 linhagens cultiváveis de *Drosophila melanogaster*, das quais 12 são facilmente obtidas, mas a maioria dos estudos tem utilizado as linhagens Schneider S2 e S3 ou células derivadas da linhagem Kc de Ohanession (Mc Carrol e King, 1997).

A linhagem S2 é versátil e cresce rapidamente à temperatura ambiente e sem CO₂ e se adapta facilmente à cultura em suspensão (ATCC – American Type Culture Collection).

Tabela 2.2. Comparação entre células de insetos e de mamíferos em termos de tecnologia de propagação celular (adaptada de Agathos, 1991; Batista, 2007).

Fatores	Células de Insetos	Células de Mamíferos
Manutenção	fácil	difícil
Versatilidade de suspensão / aderência	maior / pouco recorrente	menor / recorrente
Imortalidade	presente	somente linhagens transformadas
Inibição por contato	ausente	presente, exceto para linhagem de linfócitos e células CHO adaptadas em suspensão
Remoção do suporte de adesão	mecânica	mecânica (hibridomas) e tratamento enzimático
Demanda de oxigênio	alta	moderada
Sensibilidade a mudanças de pH, temperatura e a choque osmótico	moderada	alta
Velocidade máxima específica de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$)	alta	moderada
Sensibilidade ao cisalhamento	alta	alta
Dependência do crescimento com a concentração do inóculo	presente	presente

O cultivo de células de insetos tem sido um sistema emergente muito utilizado para a expressão de várias proteínas recombinantes como antígenos, anticorpos, oncogenes, moléculas de adesão celular, receptores e fatores transcricionais (Nilsen e Castellino, 1999; Valle *et al.*, 2001; Lynn, 2002, Cha *et al.*, 2005, Pamboukian, 2007). Isto se deve principalmente à facilidade de cultura destas células (como temperatura amena e alta tolerância à osmolalidade), às elevadas densidades celulares atingidas, às altas eficiências de expressão protéicas e aos custos relativamente baixos (menores que os de sistemas de células de mamíferos), mostrando grande potencial de aplicação em maiores escalas (Mendonça *et al.*, 1999; Benting *et al.*, 2000, Ikonomou *et al.*, 2003). A Tabela 2.3 mostra algumas proteínas expressas por células de *Drosophila melanogaster* S2.

As células S2 podem ser modificadas geneticamente para a expressão da glicoproteína G do vírus da raiva (GPV) (Yokomizo, 2006). A linhagem modificada é heterogênea, com populações que expressam diferentes níveis de proteína e com a presença de células que contêm apenas o gene de resistência à higromicina. Esta heterogeneidade é atribuída à etapa de clonagem celular, visto que estas células apresentam crescimento limitado quando em baixa concentração, o que dificulta a obtenção de clones puros. Uma vez realizado o processo de clonagem, as células transfectadas produzem a GPV de modo razoavelmente estável, sendo potencialmente aplicáveis para a produção de uma vacina contra a raiva mais segura. Em geral vacinas virais são constituídas de vírus atenuados. O que não ocorreria com a vacina à base de GPV que consistiria da proteína atenuada, apresentando, portanto potencial de infectividade nulo tanto dos operadores da linha de produção quanto de usuários, caso a inativação viral não fosse 100% eficiente.

Esta linhagem, além de outra que expressa a proteína do vírus da hepatite B (HBsAg), vem sendo estudadas nos últimos seis anos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia de Biorreações e Colóides (FEQ), no âmbito de um projeto temático realizado em conjunto com equipes do Instituto Butantan, do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, da Universidade de São Paulo e da Universidade Federal de São Carlos, tendo-se já alcançado a produção de quantidades expressivas de ambas as proteínas-alvo, conforme divulgado em variadas publicações (Astray *et al.*, 2008, Galesi *et al.*, 2008, Jorge *et al.*, 2008, Santos *et al.*, 2007, Yokomizo *et al.* 2007).

Tabela 2.3 – Proteínas produzidas por células de *Drosophila melanogaster* S2.

Proteína	Referência
H-ras (Val ¹² mutante)	Johansen <i>et al.</i> , 1989
Caopitina <i>Drosophila</i>	Krantz e Zipursky, 1990
HIV-1 gp160	Ivey-Hoyle e Rosenberg, 1990 Brighty e Rosenberg, 1994
Interleucina Humana 5 (IL5)	Johanson <i>et al.</i> , 1995
IgG ₁ Humana	Kirpatrick <i>et al.</i> , 1995
Dopamina humana β -hidroxilase	Li <i>et al.</i> , 1996
Plasminogênio humano	Nilsen e Castellino, 1999
Interleucina Humana 12 (IL12)	Lehr <i>et al.</i> , 2000
Receptor da Eritropoietina Humano	Lehr <i>et al.</i> , 2000
Proteína acoplada ao receptor <i>S. calcitrans</i> STKR	Torfs <i>et al.</i> , 2000
Interleucina – 2	Shin <i>et al.</i> , 2003 Cha <i>et al.</i> , 2005
Transferrina Humana	Lim e Cha, 2006
Glicoproteína G do vírus da raiva	Galesi, 2007 Pamboukian, 2007

2.2. Morte por Apoptose no Cultivo de Células Animais

Dependendo das condições ambientais a que as culturas celulares são submetidas, as células podem morrer mais ou menos rapidamente. Até alguns anos atrás acreditava-se que as células sempre morriam por um processo de morte passivo ou necrose (Cotter e Al-Rubeai, 1995), decorrente de altos níveis de estresse, após lesões consideradas como extensas, e devido a agentes químicos e físicos como, por exemplo, na presença de altos níveis de toxinas, mudanças no pH do meio de cultura ou altas velocidades de agitação. O

estresse promove um rápido colapso da homeostase interna, acompanhado de lise da membrana celular e das endomembranas, com liberação de fragmentos celulares. As células morrem por necrose, principalmente, porque não dispõem de tempo suficiente para responder ou se adaptar ao estímulo.

Nos últimos anos tem sido demonstrado que, em condições fisiológicas e *in vitro*, as células que experimentam baixos níveis de estresse ambiental morrem não por necrose, mas por um processo ativo controlado geneticamente, conhecido como morte celular programada ou apoptose (Green, 1998), que é uma forma de autodestruição celular característica do desenvolvimento regular de animais e plantas. Neste processo, as células fisiologicamente indesejáveis, desnecessárias ou excessivas morrem de forma ordenada, observando-se que a apoptose tem um importante papel em várias patologias celulares (Agostini *et al.*, 2002; Blandini *et al.*, 2003).

A Figura 2.1 ilustra as principais alterações celulares características da necrose e da apoptose. Na morte por necrose, a célula e as organelas citoplasmáticas incham e o núcleo mantém-se relativamente intacto. Em seguida, a célula rompe-se, liberando o conteúdo de seu citoplasma. Já o processo de apoptose é caracterizado por um significativo encolhimento celular. Além da redução do volume, verifica-se também a condensação da cromatina nuclear, que resulta na concentração de massa nas bordas internas do núcleo, que se parte, levando à formação de corpos apoptóticos. Em adição à fragmentação do DNA internucleossomal, verificam-se mudanças na permeabilidade da membrana mitocondrial e o aumento da concentração de Ca^{2+} em alguns tipos de células. No entanto, a membrana celular e as endomembranas são preservadas (Cotter e Al-Rubeai, 1995; Goswami *et al.*, 1999, Nunes *et al.*, 2005). *In vivo*, os corpos apoptóticos formados são fagocitados. Quando isso não ocorre, como no caso de cultivo *in vitro*, tem-se a chamada necrose secundária.

A apoptose ocorre em células defeituosas ou sem função que se encontram entre outras que funcionam normalmente. Este tipo de morte requer energia e síntese protéica para a sua execução e precisa de vias sinalizadoras, sendo necessários sinais que atuem sobre receptores superficiais, para que a célula entre em apoptose. Os sinais podem ser positivos, quando presentes, ou negativos, quando ausentes. Entre os vários parâmetros, a literatura reporta como agentes disparadores do processo de apoptose o esgotamento de nutrientes no meio de cultura, a temperatura e a concentração de oxigênio dissolvido

distintas das ótimas verificadas no cultivo, o acúmulo excessivo de produtos tóxicos às células e de radicais livres. Em alguns casos, a apoptose pode necessitar da ativação de genes para a síntese protéica. Nestes casos, após o sinal, a célula promove a síntese das proteínas c-Myc, p53 e pRb/E2F, sem as quais não ocorre a morte celular apoptótica (Menezes-Acosta *et al.*, 2001).

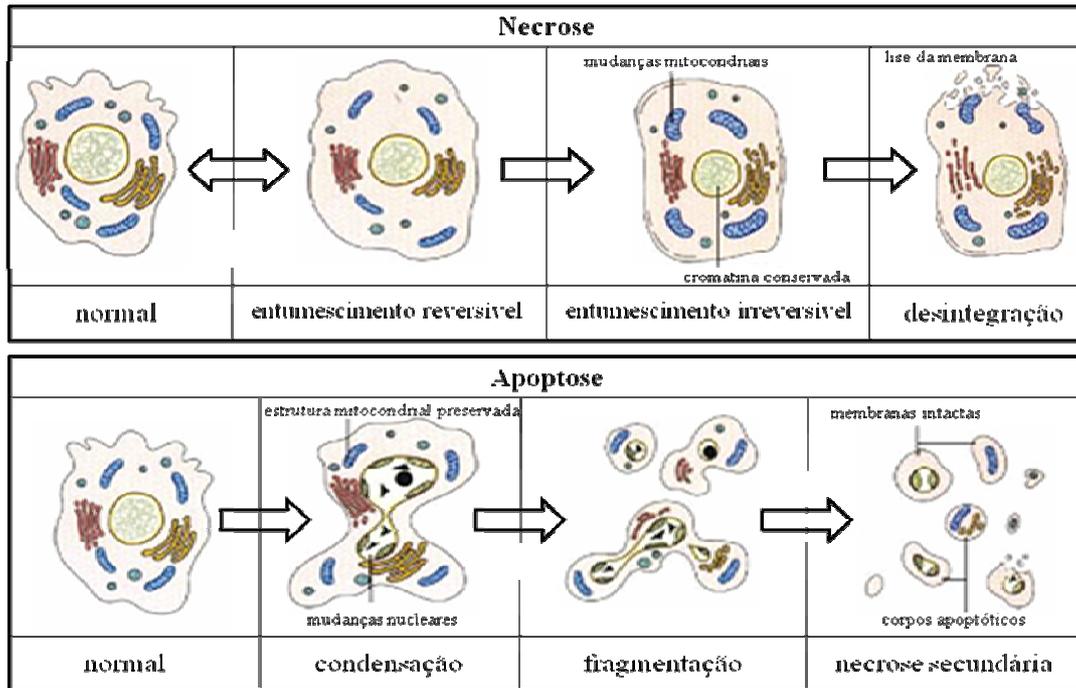


Figura 2.1 – Eventos característicos dos processos de morte celular por necrose e apoptose (adaptado de Poulin, 2005).

Vários estudos relatam que, quando a célula enfrenta estas situações adversas, somente permanece viável se os efeitos pró-apoptóticos gerados forem contrabalançados pelos efeitos anti-apoptóticos. Este mecanismo de sinalização exerce um papel-chave no controle da proliferação e morte celular (Evan e Littlewood, 1998). Assim, para o processo de proliferação celular alcançar o sucesso desejado, é preciso que a célula ative as duas vias de sinalização: a de sobrevivência, suprimindo a apoptose; e a de proliferação, que desencadeia o crescimento celular.

Embora o processo de apoptose, seguido da diminuição do crescimento celular,

seja considerado um dos maiores entraves no desenvolvimento de estratégias que otimizam a produtividade de culturas de células, seu impacto negativo nestes processos têm sido estudado apenas recentemente. Em comparação a outras linhagens celulares de importância científica e comercial, as informações referentes à apoptose no cultivo de células de insetos são menos abundantes e usualmente limitadas a observações qualitativas (Menezes-Acosta *et al.*, 2001).

2.2.1. Métodos para Detecção da Apoptose

Durante a apoptose, verificam-se fragmentação do DNA, condensação da cromatina, fragmentação do núcleo, acidificação do citoplasma, liberação de citocromo c da mitocôndria, exposição de fosfolipídeos intracelulares, ativação e degradação de proteínas, dentre outros fenômenos. Dessa forma, procedimentos laboratoriais que detectem tais eventos e os quantifiquem direta ou indiretamente podem ser empregados para o estudo da apoptose.

Dentre as metodologias disponíveis, pode-se empregar, por exemplo, a análise da morfologia de células coradas com corantes fluorescentes que se complexam com o DNA (laranja de acridina, brometo de etídio e iodeto de propídio) (Mercille e Massie, 1994a). A análise por microscopia de fluorescência revela claramente a condensação e fragmentação da cromatina associada com a apoptose. Combinando a marcação da cromatina em células com a membrana intacta (laranja de acridina) e em células com a membrana danificada (iodeto de propídio/brometo de etídio), é possível identificar nitidamente diferentes níveis de viabilidade celular (Tey *et al.*, 2000; Mercille e Massie, 1994b), como mostrado na Figura 2.2.

Outra técnica utilizada é a citometria de fluxo, que analisa as alterações na assimetria de membrana utilizando um marcador conjugado à anexina V (uma proteína que possui alta afinidade pela fosfatidilserina, que é um fosfolipídio que, em células apoptóticas, sofre translocação do folheto interno da membrana citoplasmática para o folheto externo).

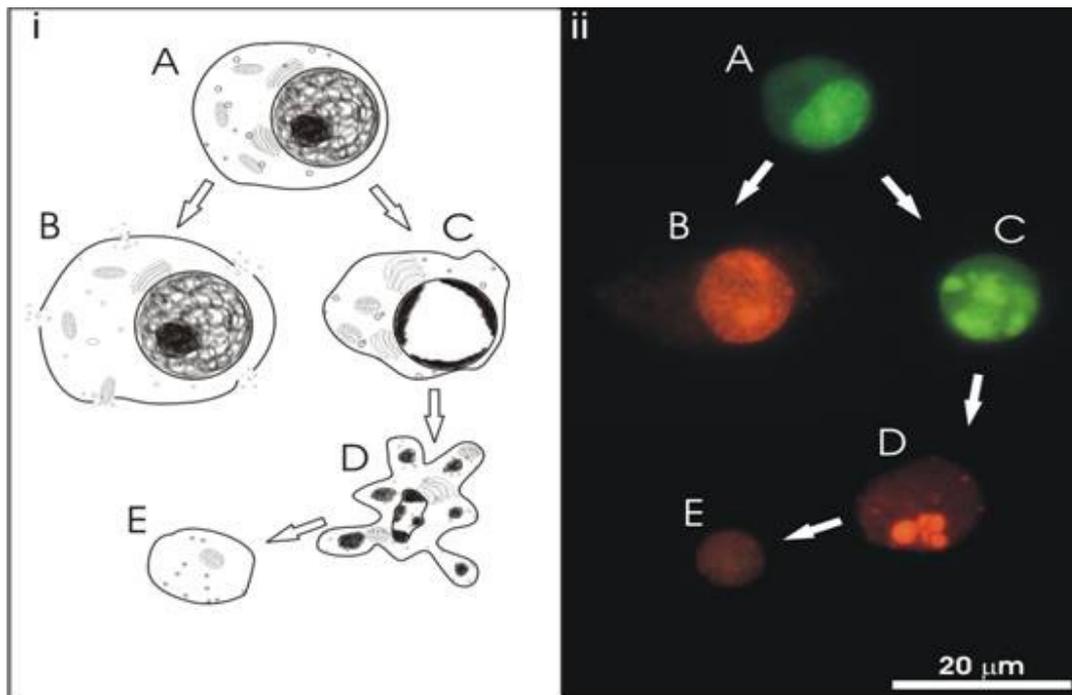


Figura 2.2 - Sequência de transformações morfológicas durante a apoptose e necrose onde (A) célula viável não-apoptótica, (B) célula necrótica (entumescimento seguido de lise e extravasamento do material intracelular), (C) célula viável apoptótica, com condensação da cromatina próxima à parede nuclear, (D) células não-viáveis apoptóticas, com formação de corpos apoptóticos e (E) fase final, onde a célula não apresenta cromatina (Pellegrini et al., 2008).

Uma metodologia alternativa amplamente usada consiste na extração e análise da fragmentação do DNA por eletroforese em gel de agarose. Recentemente, esta e outras metodologias têm sido utilizadas na avaliação quantitativa da apoptose em culturas celulares. Entre elas encontram-se a microscopia eletrônica de transmissão, a ativação de proteínas apoptóticas (como a p53 e as caspases 3 e 7) e a liberação de citocromo c no citoplasma. Cada uma destas metodologias apresenta suas inerentes vantagens e limitações e por si só fornecem uma descrição parcial do processo de apoptose, devendo-se idealmente avaliar resultados de vários tipos de análises realizadas em paralelo (Menezes-Acosta *et al.*, 2001).

2.2.2. Estratégias de Prevenção da Apoptose

Para prevenção da apoptose nas culturas celulares, sugere-se a transfecção (adição de um DNA diferente do da célula) de inibidores genéticos de apoptose e também a inclusão de nutrientes e compostos químicos antiapoptóticos nos meios de culturas (Cotter e Al-Rubeai, 1995; Menezes-Acosta *et al.*, 2001), através da manipulação dos meios e das condições gerais de cultura. Como exemplos de antiapoptóticos ou inibidores dos processos de apoptose celular podem ser citados as citocinas (como as interleucinas), o ácido aurintricarboxílico (ATA), íons zinco e antioxidantes de várias fontes.

O composto ATA é um inibidor de nuclease, capaz de inibir a apoptose sem interferir na proliferação das células, entretanto seu uso é limitado, devido à dificuldade de aumento de escala laboratorial para biorreatores em larga escala. As interleucinas apresentam altos custos; por essa razão a adição destas aos meios de cultura para evitar a apoptose nas células tem sido limitada. Para outros compostos, como o zinco, a manipulação de sua concentração nas formulações de meios de cultura exige cuidados, uma vez que os níveis requeridos para evitar a apoptose e os tóxicos às células geralmente são muito próximos (Cotter e Al-Rubeai, 1995).

Dentre os compostos orgânicos antiapoptóticos, os antioxidantes são promissores visto que são substâncias muito úteis para evitar o estresse oxidativo. De modo geral, a função destes compostos é neutralizar os efeitos das espécies reativas de oxigênio (EROs) antes delas provocarem a iniciação da morte celular por apoptose (Cotter e Al-Rubeai, 1995). Os antioxidantes naturais podem funcionar como agentes redutores, como inibidores de radicais livres, como quelantes do oxigênio singlete e como desativadores de metais pró-oxidantes.

Dentre os antioxidantes endógenos destacam-se as enzimas superóxido-dismutase, a catalase, a glutationala-peroxidase, a metionina-redutase, a soroalbumina, a ceruloplasmina, a apoferritina e a apotransferrina. Os antioxidantes não enzimáticos incluem as vitaminas A, B, C e E (α -tocoferol), glutationala, os carotenóides (como o β -caroteno e o licopeno) e outros antioxidantes derivados de plantas.

2.3. Radicais Livres e Antioxidantes

O efeito prejudicial dos radicais livres ocorre quando eles estão presentes em quantidade excessiva, ultrapassando a capacidade da célula de neutralizá-los com seus sistemas naturais. O acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) provoca estresse oxidativo nas células e pode causar danos irreversíveis à estrutura de biomoléculas como o RNA, DNA, lipídios, carboidratos e proteínas (Celiktas *et al.*, 2007). Embora o envelhecimento celular seja um processo dependente de muitos fatores, existem hoje várias evidências relacionando-o às EROs, e conseqüentemente ao estresse oxidativo. No trabalho realizado por Padma *et al.* (2007), os autores concluíram que existe uma relação direta entre as EROs e a indução da morte por apoptose nas células. Outros estudos realizados nos últimos anos relacionam a patogênese de várias enfermidades com o estresse oxidativo induzido por EROs e nitrogênio (Saito *et al.*, 2004; Capasso, 2006; Dimitrios, 2006).

As EROs são formadas primeiramente pelo radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Outros exemplos de radicais livres derivados do oxigênio incluem os radicais hidroxila (OH^{\cdot}), hidroperóxido (HOO^{\cdot}), peróxido (ROO^{\cdot}) e alcóxido (RO^{\cdot}). Importantes EROs produzidas em sistemas biológicos incluem o óxido nítrico (NO^{\cdot}), o ânion peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

A formação de radicais livres ou EROs e o desencadeamento da reação em cadeia de oxidação podem ser controlados por vários compostos, dentre eles, substâncias antioxidantes (Dimitrios, 2006; Djeridane *et al.*, 2007).

Os antioxidantes são substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações, comparadas com outros substratos oxidáveis presentes, retardam ou inibem significativamente a oxidação destes substratos, podendo agir em diferentes níveis da sequência oxidativa. Primeiramente, através do bloqueio da geração de espécies reativas ou através da remoção das mesmas, de forma a impedir sua interação com alvos biológicos, ou seja, impedindo a etapa de iniciação da cadeia da formação do radical (antioxidantes de prevenção). No segundo nível, os compostos atuam bloqueando a etapa de propagação da cadeia radicalar, sequestrando os radicais intermediários antes de promover a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (antioxidantes varredores). No último nível, favorecem a eliminação de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas

celulares danificadas, através da correção das bases oxidadas do DNA por mecanismo de reparo por excisão de bases, que atua nas modificações causadas por agentes endógenos (Koury e Donangelo, 2003, Silva *et al.*, 2009). Na Tabela 2.4 observam-se algumas substâncias antioxidantes e suas categorias.

Tabela 2.4 – Substâncias antioxidantes (adaptado de Koury e Donangelo, 2003).

Mecanismo de Ação	Antioxidantes Dietéticos	Antioxidantes Extracelulares	Antioxidantes Intracelulares
Prevenção	Zinco Selênio	Albumina	Glutathione peroxidase
		Bilirrubina	Superóxido dismutase
		Ceruloplasmina	Ácido úrico
		Ferritina	Coenzima Q
		Mioglobina	Catalases
Varredores	Ácido ascórbico	Ácido ascórbico	Ácido ascórbico
	α -Tocoferol	α -Tocoferol	α -Tocoferol
	Carotenóides	Carotenóides	Carotenóides

As células possuem sistemas naturais de eliminação de radicais livres, enzimáticos ou não, produzindo a sua eliminação ou então, impedindo sua transformação em produtos mais tóxicos para o metabolismo. Os antioxidantes não enzimáticos (sintéticos ou naturais), em sua maioria são exógenos, e podem ser divididos em: vitaminas lipossolúveis (vitamina E, vitamina A), vitaminas hidrossolúveis (vitamina C, vitaminas do complexo B), oligo-elementos (zinco, cobre, selênio, magnésio), carotenóides (β -caroteno, licopeno) e outros compostos de origem vegetal.

Os antioxidantes obtidos a partir de fontes naturais têm a vantagem de ser multifuncionais e de ter a capacidade de agir em diversos níveis da sequência oxidativa nas células, podendo atuar como agentes redutores, como inibidores de radicais livres, como

quelantes ou seqüestrantes do oxigênio singlete e como desativadores de metais pró-oxidantes (Kähkönen *et al.*, 1999; Dorman *et al.*, 2003). Em adição, os antioxidantes naturais existem em combinação, e tal combinação de diferentes antioxidantes pode agir aditivamente e até mesmo sinergeticamente (Fuhrman *et al.*, 2000). Por exemplo, a combinação de licopeno, mais vitamina E, glabridina (isoflavona), ácido rosmarínico, ácido carnósico ou óleo de alho, produzem um efeito antioxidante sinérgico na oxidação da LDL (Fuhrman *et al.*, 2000).

Muitos pesquisadores voltaram sua atenção para o licopeno devido a suas propriedades físico-químicas e biológicas e particularmente em relação à sua atividade antioxidante, que tem sido extensivamente avaliada com base na sua capacidade de sequestrar radicais livres, ou para proteger componentes celulares contra danos oxidativos tanto no cultivo celular *in vitro* quanto em modelos de animais (Yaping *et al.*, 2002).

A seguir serão detalhadas as propriedades do licopeno, que é o composto de estudo neste trabalho.

2.4. Licopeno

O licopeno é um dos mais de 600 carotenóides encontrados na natureza. Carotenóides estão entre os pigmentos naturais mais comuns e são responsáveis pela coloração vermelha, laranja ou amarela de folhas, frutas e flores, assim como a cor de algumas aves, insetos, peixes e crustáceos (Stahl e Sies, 2003). O licopeno e outros carotenóides são usados como corante alimentar há muitos anos, mas nesta década tornou-se objeto de estudo com respeito à sua atividade antioxidante e potencial de prevenção contra câncer epitelial e doenças crônicas (Bramley, 2000; Giovannucci *et al.*, 2002).

O licopeno (C₄₀H₅₆), com massa molar de 536,89 g/mol, é o hidrocarboneto de cadeia aberta com o maior grau de insaturação entre os carotenóides, contendo 11 duplas ligações conjugadas (Topal *et al.*, 2006). Suas características químicas e estruturais únicas contribuem para suas propriedades biológicas específicas (Clinton, 1998).

Dependendo da posição das cadeias em relação às duplas ligações, o licopeno pode ser encontrado na forma *cis* e *trans*, sendo possível encontrar até 72 isômeros

geométricos deste composto (Chasse *et al.*, 2001). A forma *trans*, ilustrada na Figura 2.3, é uma das estruturas mais estáveis, sendo a mais abundante em tomates, e correspondendo a mais de 90% do total de licopeno (Tavares e Amaya, 1994).

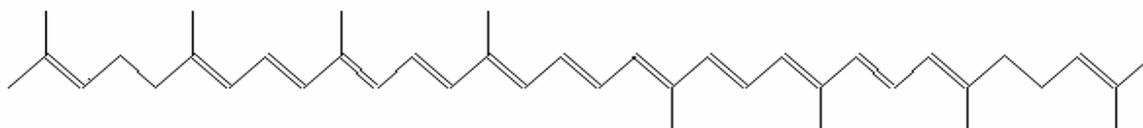


Figura 2.3 - Estrutura química do licopeno na forma integralmente *trans*.

O corpo humano não produz licopeno, portanto ele deve ser fornecido na dieta, sendo sugerida a ingestão de 4 a 35 mg/dia (Moritz e Tramonte, 2006). A principal fonte para obtenção de licopeno é o tomate. Cerca de 80% de todo o tomate produzido é consumido na forma de produtos processados como *ketchup*, molhos, suco, entre outros (Rao *et al.*, 1998).

A quantidade de licopeno presente no tomate maduro varia de 32,0 a 133,8 $\mu\text{g/g}$ de material úmido (Tavares e Amaya, 1994; Abushita *et al.*, 2000, Buratti *et al.*, 2001, Takeoka *et al.*, 2001, Caris-Veyrat *et al.*, 2004, Sahlin *et al.*, 2004). No suco de tomate, varia de 68,7 a 121,4 $\mu\text{g/g}$ (Tavares e Amaya, 1994; Lin e Chen, 2005). A variação na quantidade de licopeno ocorre principalmente devido ao estado de maturação da fruta, sendo da ordem de 4,5 $\mu\text{g/g}$ para o tomate verde e de 104,4 $\mu\text{g/g}$ para a fruta madura (Raffo *et al.*, 2002). Outros fatores importantes associados à variação da concentração de licopeno na fruta são a sua variedade (Abushita *et al.*, 2000, Takeoka *et al.*, 2001; Perkins-Veazie e Collins, 2004; Sahlin *et al.*, 2004) e as condições de cultivo da planta (Caris-Veyrat, *et al.*, 2004). Devido ao processamento térmico empregado na obtenção do suco de tomate, a quantidade de licopeno livre detectável no suco é, em geral, maior do que a observada na fruta (Dewanto *et al.*, 2002, Lin e Chen, 2005), a quantidade de licopeno encontrada no *ketchup* varia entre 102,9 e 414,0 $\mu\text{g/g}$ de material úmido, já no molho de tomate a quantidade de licopeno varia de 65,1 a 194,5 $\mu\text{g/g}$ de material úmido (Shi e Le Maguer, 2000). A pele do tomate contém uma concentração cinco vezes maior de licopeno do que a polpa (Sharma e Le Maguer, 1996a), sendo que a quantidade de licopeno associada à fração

insolúvel em água e à pele compreende entre 72 e 92% do total (Sharma e Le Maguer, 1996b). Nas frutas frescas, o licopeno ocorre essencialmente na forma *trans*. Entretanto, a isomerização do *trans*-licopeno para a forma *cis* pode ser induzida por processos térmicos e durante o processo de oxidação, resultando em perda de cor e da atividade biológica (Shi e Lê Maguer, 2002). A degradação oxidativa é a principal causa de grandes perdas na atividade de carotenóides. Ela depende da disponibilidade de oxigênio e é estimulada por luz, enzimas, alguns íons metálicos e co-oxidação com lipídios hidroperóxidos. Em geral, as condições necessárias para isomerização e oxidação de carotenóides ocorrem durante a preparação, o processamento e estocagem dos produtos que os contêm. Tais compostos também estão sujeitos à isomerização e oxidação durante procedimentos analíticos, pois suas duplas ligações conjugadas características dificultam o trabalho e a manipulação dos carotenóides, devido à sua instabilidade especialmente com relação ao oxigênio, aquecimento e condições ácidas e alcalinas (Oliver e Palou, 2000; Lee e Chen, 2002). Portanto devem ser tomadas medidas preventivas para garantir a confiabilidade dos resultados analíticos (Lee e Chen, 2002), como trabalhar com pouca luz ou no escuro e manter os carotenóides a baixa temperatura durante a estocagem, dentre outras medidas (De Ritter e Purcell, 1981; Britton, 1985).

Conforme já mencionado, o licopeno é um micronutriente que traz importantes benefícios para a saúde. Existem vários estudos que mostram uma forte correlação entre a ingestão de carotenóides e a redução na incidência de algumas doenças como problemas do coração (Rao e Agarwal, 2000; Arab e Steck, 2000), aterogênese, calcificação óssea, degeneração dos olhos e danos nos neurônios (Cantuti-Castelvetri *et al.*, 2000; Ferguson, 1997; Yamaguchi e Uchiyama, 2003) e diversos tipos de câncer (Rao e Agarwal, 1998; Giovannucci, 1999; Werts *et al.*, 2004). O licopeno é capaz de inibir o crescimento de tumores de próstata, de mama, do endométrio e da leucemia promielocítica, além de induzir apoptose em fibroblastos imortalizados expostos à fumaça de tabaco (Rao e Agarwal, 1998; Werts *et al.*, 2004; Palozza *et al.*, 2005). A fumaça de tabaco possui muito NO, enquanto que no organismo humano há muitas EROs, o que pode indicar que o licopeno age apenas nesse segundo grupo.

As evidências experimentais sugerem que o licopeno pode quelar o oxigênio singlete (Di Mascio *et al.*, 1989), apresentando uma constante quelante duas vezes maior do que a do β -caroteno (Vági *et al.*, 2007), além de sequestrar radicais livres de dióxido de

nitrogênio (NO_2^\bullet) e sulfetos (RS^\bullet) (Mortensen *et al.*, 1997) e inibir danos oxidativos aos DNA (Collins *et al.*, 1998) e à membrana das células (Woodall *et al.*, 1997).

Apesar das diversas atividades biológicas previamente descritas para o licopeno, o seu efeito no cultivo de células animais ainda é controverso, parecendo depender do tipo de célula e do estresse ao qual a célula está exposta. Há relatos de que o licopeno pode inibir o crescimento de células animais, de forma dependente da dose e do tempo de exposição, interrompendo a progressão do ciclo celular e promovendo a apoptose, por exemplo, em células expostas à fumaça de tabaco condensada (Palozza *et al.*, 2005). Todavia, o licopeno pode atuar na inibição de efeitos citotóxicos de compostos como a aflatoxina e o etanol a hepatócitos em cultura (Reddy *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2003). Em adição, o licopeno mostrou atividade protetora em células CV1-P de rim de macaco verde africano em cultura contra peroxidação lipídica e danos oxidativos ao DNA (Matos *et al.*, 2000), células estas correlatas à linhagem Vero, de importância na produção industrial de biofármacos, conforme já mencionado.

A análise de carotenóides em produtos alimentícios pode ser realizada por diferentes métodos: CLAE, espectrofotometria ou análise colorimétrica (Schoefs, 2002). Enquanto espectrofotometria ou colorimetria podem ser usadas para uma rápida avaliação da quantidade de licopeno em produtos derivados do tomate, métodos mais versáteis, sensíveis e seletivos como as análises por CLAE são necessários para avaliação confiável de amostras de alimentos. A análise de carotenóides por CLAE geralmente é feita em colunas de fase reversa do tipo C18 ou C30 (quando é necessária a separação dos isômeros *cis* e *trans*), operando em modo isocrático ou com gradientes de eluição com uma ampla variedade de mistura de diferentes solventes orgânicos como fase móvel. A detecção pode ser efetuada por espectrofotometria a 450 nm, por fotodiodo ou detecção por espectrofotometria de massa. O aquecimento da coluna é algumas vezes usado para aumentar a separação dos pigmentos, assim como para padronizar as condições de separação (Schoefs, 2002). Entretanto, os carotenóides requerem uma manipulação cuidadosa, devido à sua labilidade química (Barba *et al.*, 2006).

Com o objetivo de conhecer os principais compostos químicos responsáveis pelas atividades biológicas, bem como os mecanismos pelos quais estes efeitos são manifestados, os antioxidantes de fontes naturais têm sido intensamente estudados nas últimas décadas em

todo o mundo. Neste sentido diversos trabalhos sobre a determinação da atividade antioxidante têm sido publicados, utilizando ensaios com DPPH[•] (2,2- difenil-1-picril-hidrazilo) e rubreno.

A instabilidade do licopeno durante o processo de extração, tratamento e eliminação dos solventes orgânicos torna a preparação de amostras para ensaios analíticos uma tarefa extremamente delicada, e freqüentemente requer procedimentos sucessivos e complexos para determinar todos os carotenóides extraídos. Além disso, nem todos os métodos analíticos disponíveis para a análise de carotenóides em produtos alimentícios são adequados para alimentos ricos em licopeno devido à sua baixa solubilidade em alguns solventes comumente empregados, como o metanol, e devido ao fato de que o uso de outros solventes pode interferir com a fase móvel usada na separação do carotenóide.

O licopeno pode ser extraído com solventes orgânicos, devido à sua adequada solubilidade nestes solventes, entretanto buscam-se métodos alternativos para extração de licopeno e outros carotenóides, como por exemplo, a extração com fluidos supercríticos.

2.5. Obtenção de Extratos Bioativos de Plantas através de Fluidos Supercríticos

Um fluido supercrítico é caracterizado por estar a temperatura e pressão maiores do que as do ponto crítico. Este fluido apresenta propriedades físicas intermediárias entre gases e líquidos. A densidade deste fluido é próxima da dos líquidos e pode ser facilmente mudada com alterações da temperatura ou da pressão do sistema. Estas alterações de densidade podem conferir seletividade ao processo de extração. A viscosidade e o coeficiente de difusão são próximos aos verificados em sistemas gasosos, o que pode facilitar a transferência de massa no sistema.

A aplicação de fluidos supercríticos na extração de compostos de fontes naturais tem sido amplamente estudada, com centenas de artigos publicados. As vantagens da extração com fluido supercrítico com relação às técnicas tradicionais, como a extração com solventes, são: flexibilidade de processo devido à possibilidade de modificar a seletividade do fluido supercrítico, seguida da eliminação de solventes orgânicos poluentes e dos processos após a extração para eliminação do solvente (Reverchon e De Marco, 2006). Por

ser conduzida a temperaturas próximas da ambiente e na ausência de ar, a extração com fluido supercrítico evita danos térmicos e oxidativos nos compostos lábeis (Brunner, 1994). A maior desvantagem da extração com fluido supercrítico é o custo de investimento maior do que as técnicas tradicionais de extração (Reverchon e De Marco, 2006), devido ao maior dispêndio com equipamento.

Muitos compostos foram estudados como solventes para extração com fluido supercrítico, por exemplo, hidrocarbonetos (hexano, pentano e butano) e óxido nitroso, entre outros (Smith, 1999). A Tabela 2.5 mostra as propriedades críticas de alguns deles. Entretanto, o dióxido de carbono (CO₂) é o mais popular porque é barato, prontamente disponível, seguro, permite operações supercríticas em pressões relativamente baixas e temperaturas próximas da ambiente.

Tabela 2.5 – Propriedades críticas dos solventes em termos de temperatura crítica (T_c) e pressão crítica (P_c) (Clifford, 1999).

Solvente	T_c (°C)	P_c (bar)
Dióxido de carbono	31	74
Água	374	221
Etano	32	49
Etileno	9	50
Propano	97	43
Xenônio	17	58
Amônia	132	114
Óxido nitroso	37	72

Devido à sua baixa temperatura crítica, o CO₂ pode ser usado para extrair compostos termicamente lábeis, que não podem ser submetidos à destilação por arraste a vapor. Por conta dessas características, o CO₂ supercrítico é um solvente ideal para

indústrias de alimentos, pigmentos, fármacos e cosméticos, nas quais é essencial obter produtos com alto grau de pureza (Cadoni *et al.*, 2000).

Trabalhos recentes de extração com fluido supercrítico freqüentemente usam altas pressões (maior que 350 bar), mesmo quando são extraídos compostos solúveis em CO₂ supercrítico, por exemplo terpenos, sesquiterpenos e ácidos graxos. Operando acima dessa pressão, o poder do solvente é melhorado, mas não a sua seletividade. O conceito de otimização do poder e seletividade do solvente deve ser aplicado para obter a extração seletiva dos compostos de interesse, reduzindo a um mínimo a co-extração de compostos indesejados (Reverchon, 1997).

A adição de um co-solvente líquido polar ao CO₂ supercrítico aumenta seu poder solvente para moléculas polares. De fato, CO₂ supercrítico é um bom solvente para compostos lipofílicos (não polares), mas apresenta baixa capacidade de solubilização de compostos polares. Diversos autores adicionaram pequenas quantidades de co-solventes, como o álcool etílico, e verificaram que, quando em solução, os solventes líquidos modificam o poder solvente do CO₂ supercrítico (Dauksas *et al.*, 2002; Vasapollo *et al.*, 2004). Entretanto, torna-se necessária uma etapa para eliminação do solvente e dessa forma uma das vantagens da extração com fluido supercrítico é perdida (Reverchon e De Marco, 2006).

A seleção das condições de operação depende do composto específico ou da família de compostos a ser extraída. A massa molar e a polaridade devem ser levadas em conta caso a caso, mas algumas regras podem ser aplicadas, como fixar a temperatura entre 35 e 60 °C para extrair compostos termolábeis. O aumento da temperatura reduz a densidade do CO₂ supercrítico (para pressão fixa), reduzindo assim o poder solvente do agente supercrítico, mas aumenta a pressão de vapor dos compostos a serem extraídos. Dessa forma, a tendência desses compostos passarem para a fase fluida é aumentada. A pressão de extração é um parâmetro muito relevante e pode ser usada para direcionar a seletividade do fluido supercrítico. A regra geral é que quanto mais alta for a pressão, maior será o poder solvente e menor a seletividade da extração (Reverchon e De Marco, 2006).

Alguns processos industriais bem estabelecidos usam extração com fluido supercrítico para produzir óleos essenciais, descafeinização do café e compostos nutracêuticos (Reverchon e De Marco, 2006).

2.6. Extração de Licopeno em Condições Supercríticas

O licopeno é usado como pigmento em diferentes tipos de gêneros alimentícios. Sua importância está aumentando devido ao maior uso de compostos naturais em indústrias de alimentos, cosméticos e fármacos, seguindo diretivas da União Européia em favor dos compostos naturais ao invés dos sintéticos. O principal problema na obtenção do licopeno é sua solubilidade, visto que este composto é insolúvel em água e solúvel em compostos orgânicos altamente tóxicos como benzeno, clorofórmio (CHCl_3) e cloreto de metileno (CH_2Cl_2).

Por ser altamente solúvel em solventes orgânicos, a extração do licopeno é realizada com estes solventes, que são tóxicos, caros, de manipulação perigosa e podem restar no produto final. As preocupações com a saúde e o ambiente levaram a um maior interesse em tecnologias mais limpas e em métodos de extração alternativos e confiáveis para o licopeno e outros carotenóides (Sabio *et al.*, 2003; Phelp, *et al.*, 1996).

A extração com fluido supercrítico empregando CO_2 como solvente é uma excelente alternativa para a substituição de solventes químicos na obtenção do licopeno. No estado líquido, o CO_2 pode penetrar na pele do tomate para dissolver o licopeno, porém com grandes limitações de transferência de massa. Como um gás, o CO_2 pode adentrar no tomate mais facilmente, mas não é um bom solvente para solvatar o licopeno e extraí-lo. Durante o processo de extração, como fluido supercrítico, sua densidade permite que ele desloque o licopeno com sucesso. Dessa forma o tempo necessário para a extração e concentração dos compostos orgânicos é reduzido. O poder solvatante do fluido supercrítico está diretamente relacionado à sua densidade e pode ser controlado através de mudanças na pressão e temperatura de extração (Topal *et al.*, 2006).

Rozzi *et al.* (2002), estudaram os efeitos da temperatura e da pressão, vazão e volume de CO_2 na extração com fluido supercrítico do licopeno de tomate e extraíram 61,0% de licopeno à 86 °C e 340 bar, mostrando que temperatura e pressão influenciam na extração, aumentando o rendimento com o aumento da temperatura e da pressão. Sabio *et al.* (2003) examinaram a extração de licopeno e β -caroteno de tomate e extraíram 80% do licopeno total e 88% de β -caroteno à 80 °C e 300 bar. No estudo realizado por Yi *et al.* (2009) o máximo de licopeno (31,25 $\mu\text{g/g}$) foi obtido na condição de 100 °C e 400 bar,

condições mais drásticas de extração. Os autores observaram que o rendimento em licopeno aumenta com a elevação da temperatura, entretanto, acima de 70 °C houve isomerização do licopeno extraído, o que influenciou na atividade antioxidante do extrato, mostrando uma tendência oposta de comportamento.

Diversos autores realizaram a extração de licopeno do tomate usando CO₂ supercrítico puro (Ollanketo *et al.*, 2001; Gómez-Prieto *et al.*, 2003, Sabio *et al.*, 2003, Topal *et al.*, 2006 e Shi *et al.*, 2009) e com co-solventes. O uso de co-solventes como acetona (Ollanketo *et al.*, 2001), etanol (Baysal *et al.*, 2000 e Shi *et al.*, 2009), clorofórmio (Cadoni *et al.*, 2000) e óleos de amêndoa, de avelã, de amendoim e de semente de girassol, (Vasapollo *et al.*, 2004) e óleo de oliva (Shi *et al.*, 2009) aumentam a taxa de extração, mas tem pouca influência no rendimento final do licopeno. O uso de CO₂ supercrítico puro a pressões mais altas pode ser suficiente para compensar a ausência de co-solvente e tem a vantagem de produzir um extrato livre de solvente (Reverchon e De Marco, 2006), entretanto, os custos da pressurização e da construção do equipamento que suporte tal condições podem ser impeditivos.

A Tabela 2.6 apresenta uma coletânea de condições de extração estudadas por diferentes autores e os respectivos rendimentos atingidos. Observa-se que o uso da combinação de elevadas temperaturas e pressões parece conduzir preferencialmente a elevados rendimentos.

À temperatura inferior a 40°C e pressão menor do que 250 bar, a eficiência de extração de licopeno é muito baixa (Cadoni *et al.*, 2000). O rendimento aumenta com a pressão, pois a solubilidade do licopeno é aumentada no solvente supercrítico. A partir de dados da literatura, o parâmetro principal que controla a extração do licopeno é a temperatura de extração. Muitos autores (Vasapollo *et al.*, 2004, Rozzi *et al.*, 2002; Ollanketo *et al.*, 2001; Sabio *et al.*, 2003; Cadoni *et al.*, 2000) verificaram um forte aumento no rendimento do licopeno com a temperatura operando até 110°C, como mostrado na Figura 2.4, entretanto não foi verificado se houve degradação ou isomerização do licopeno nessa temperatura.

Tal comportamento é, de certa forma, inesperado, pois não foi encontrada dependência similar da temperatura para a extração do β-caroteno, que também é encontrado no tomate (Sabio *et al.*, 2003). Os autores explicaram a dependência da

temperatura considerando o aumento da difusividade do CO₂ supercrítico com a temperatura e um aumento na pressão de vapor do licopeno, mas essa explicação parece não convencer completamente. O licopeno está contido nas estruturas vegetais chamadas cloroplastos na forma de grandes cristais. Então, sua extração pode ser dificultada devido à forte resistência à transferência de massa. É possível que um aumento na temperatura de extração contribua para a degradação dos cloroplastos (Reverchon e De Marco, 2006).

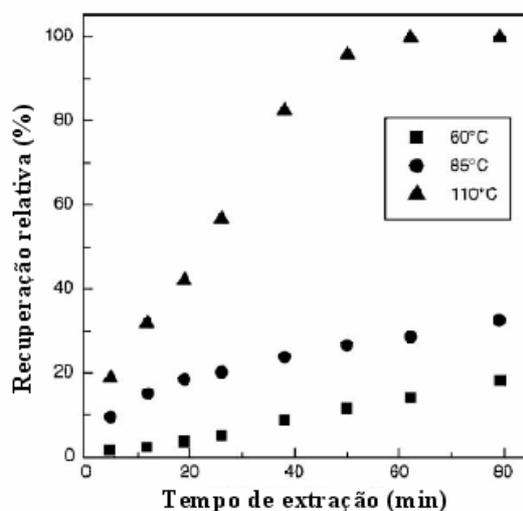


Figura 2.4 – Recuperação de licopeno a partir de tomate a diferentes temperaturas na pressão de 405 bar (adaptado de Ollanketo *et al.*, 2001).

O licopeno não é o único composto a ser extraído do tomate quando um solvente CO₂ supercrítico é utilizado. β -caroteno e grandes quantidades de compostos lipídicos também são co-extraídos (Sabio *et al.*, 2003). Em comparação com extração com solventes orgânicos, vários autores encontraram diferentes máximos de rendimento de licopeno, por extração com CO₂ supercrítico desde 54% (Baysal *et al.*, 2000), próximo de 80% (Sabio *et al.*, 2003), até quase 95% (Ollanketo *et al.*, 2001). Os máximos de rendimento foram influenciados pela pressão e temperatura máximas usadas (Reverchon e De Marco, 2006).

No trabalho de Baysal *et al.* (2000), as melhores condições para isolamento do licopeno (54% de recuperação) a partir de pasta de tomate foram 55°C e 300 bar, com adição de 5% de etanol. Cadoni *et al.* (2000) obtiveram um rendimento de 87% de licopeno

Tabela 2.6 – Dados da extração supercrítica do licopeno a partir de tomate, em diferentes condições.

Matéria-Prima	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Co-solvente	Rendimento (%)	Referência
Polpa e pele	80	275	clorofórmio	87,0	Cadoni <i>et al.</i> , 2000
Resíduos	55	300	etanol	53,93	Baysal <i>et al.</i> , 2000
Pele	110	405	acetona	94,0	Ollanketo <i>et al.</i> , 2001
			etanol	~88,0	
			---	~59,0	
Pele e semente	86	340	---	61,0	Rozzi <i>et al.</i> , 2002
Pele e semente	80	300	---	88,0	Sabio <i>et al.</i> , 2003
Pele e semente	80	460	---	90,1	Vági <i>et al.</i> , 2007
Pele e semente	45	250	--	11,0	Shi <i>et al.</i> , 2009
			etanol	34,7	
			água	31,8	
			óleo de oliva	33,0	
Pele e semente	75	350	--	25,5	Shi <i>et al.</i> , 2009
			etanol	45,3	
			água	42,6	
			óleo de oliva	60,9	
Pele e polpa	60	400	óleo de avelã	72,5	Ciurlia <i>et al.</i> , 2009

a partir de tomates maduros na condição de 80°C e 275 bar. Os autores também observaram que a recuperação aumenta com a temperatura, mas não avaliaram a degradação do licopeno, que supostamente ocorre a altas temperaturas (Pól *et al.*, 2004). Ollanketo *et al.* (2001) observaram degradação do licopeno acima de 120 °C e 405 bar.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Para extração de licopeno foi utilizado suco de tomate comercial (Milani, lote 099) e como fluido supercrítico, dióxido de carbono (CO₂) obtido da White Martins, Brasil (99,5% de pureza). Etanol (com pureza de 95,0 e 99,5%), butil hidroxitolueno (BHT), acetona, hexano, metanol, cloreto de metileno e 1-butanol foram obtidos da Synth (Brasil). Metanol grau CLAE foi obtido da Tedia (Brasil).

Tetrahidrofurano (THF) grau CLAE, álcool isopropílico, dimetilsulfóxido (DMSO), ácido clorídrico (HCL) e H₂O₂ 30% foram obtidos da Merck (Alemanha). Molibdato de sódio, grau p.a. foi obtido da Vetec (Brasil). O radical 2,2- difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH^{*}), o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo (MTT) e o padrão licopeno (pureza $\geq 90,0\%$) foram obtidos da Sigma Chemical Company (EUA). Utilizou-se 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox) da Aldrich Chemical Co. (EUA) como antioxidante de referência. Rubreno com pureza mínima de 95% foi obtido da Fluka (EUA).

As células de *Drosophila melanogaster* S2 selvagens foram gentilmente doadas pelo Laboratório de Imunologia Viral (LIV) do Instituto Butantan (São Paulo). Foi empregado o meio de cultura Sf900 II (Gibco - EUA). O corante azul de trypan foi obtido da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). A anexina V foi obtida do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP, Brasil) sob o código de referência GPAM001 e lote 005.

As membranas filtrantes com poros de 0,22 μm de diâmetro foram obtidas da Millipore (EUA). A água utilizada foi destilada e purificada em sistema Milli-Q da Millipore (Brasil).

3.2. Métodos

3.2.1. *Substituição Parcial da Fase Aquosa do Suco de Tomate por Etanol*

No suco de tomate, o licopeno está associado a estruturas vegetais sólidas que estão dispersas em um soro líquido. Para remover o soro, o suco de tomate foi centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos, a temperatura ambiente, em uma centrífuga (Fanem modelo 208N). O soro ainda presente no centrifugado foi removido parcialmente por sucessivas lavagens com etanol 99,5% à temperatura ambiente, seguidas de novas etapas de centrifugação. Os sobrenadantes foram descartados e o material centrifugado (sólido contendo boa parte do licopeno) foi utilizado nos experimentos de extração.

3.2.2. *Obtenção de Licopeno do Suco de Tomate por Extração com CO₂ Supercrítico*

Uma coluna de extração de aço inoxidável com 1 cm de diâmetro interno e 25 cm de altura foi preenchida com cerca de 15 gramas do centrifugado obtido conforme item 3.2.1, contendo aproximadamente 194 µg de licopeno por grama de amostra. A coluna foi acoplada a uma unidade de extração supercrítica montada no Laboratório de Tecnologias Supercríticas do Instituto de Química da Unicamp, esquematicamente mostrada na Figura 3.1.

Inicialmente, o CO₂ foi refrigerado a temperaturas inferiores a -5°C em um banho termostático (Nova Ética modelo 521/3D) para que o fluido estivesse no estado líquido na bomba de CLAE (Shimadzu modelo LC-6AD). Para assegurar que o CO₂ permanecesse líquido durante o processo de bombeamento, foi adaptado um trocador de calor de alumínio no cabeçote da bomba. O CO₂ líquido, a alta pressão, escoou para uma coluna de aço inoxidável com 1 cm de diâmetro e 25 cm de comprimento, que atuou como um reservatório de fluido, minimizando oscilações de pressão durante o processo de extração. Deste reservatório, o CO₂ fluiu para a coluna de extração, que se encontrava dentro de uma estufa para manter a temperatura do sistema constante. No início da extração, a coluna foi aquecida até a temperatura desejada e então a pressão foi ajustada até o valor pré-

estabelecido. O sistema foi mantido sem escoamento de CO₂ por cinco minutos para permitir um contato mais efetivo entre o CO₂ supercrítico e as partículas. Após este período estático, a válvula micrométrica foi aberta, permitindo a passagem do CO₂ a uma vazão de 0,85 e 1,7 g CO₂/min, medida no rotâmetro de CO₂ (Oxicamp modelo RCA-215). Os períodos de extração dinâmica foram de 180 minutos (para vazão de 1,7 g CO₂/min) e de 360 minutos (para vazão de 0,85 g CO₂/min). As amostras, contendo etanol residual, foram coletadas em kitassato refrigerado por banho de gelo. Após a extração, a pressão do sistema foi diminuída até zero e a tubulação após a coluna de extração foi lavada com etanol, seguida de acetato de etila e hexano, para recuperar o extrato depositado nesta região, até o solvente apresentar coloração incolor (cerca de 10 mL).

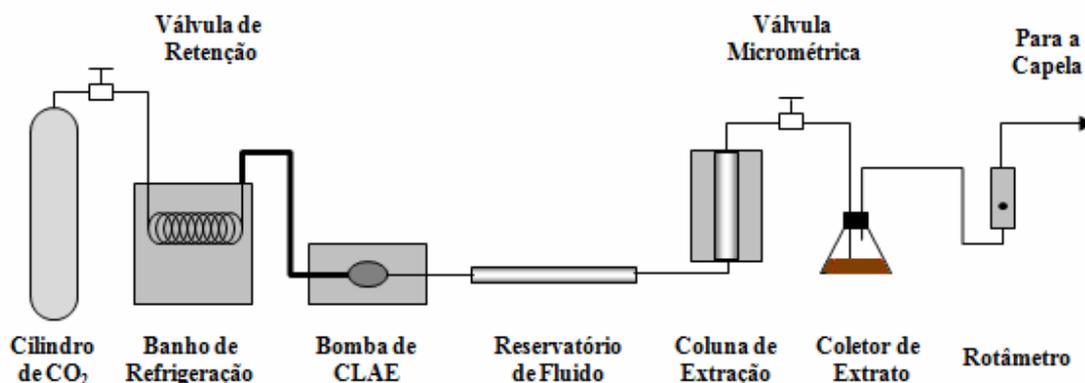


Figura 3.1 - Representação esquemática da unidade de extração supercrítica.

A influência da pressão e da temperatura sobre o rendimento de extração foi estudada através de um planejamento experimental 2² com três repetições no ponto central. Os limites utilizados foram temperatura entre 40 e 80°C e pressão entre 200 e 350 bar, os quais são os mais usualmente utilizados para experimentos de extração de licopeno de partículas de tomate (Cadoni *et al.*, 2000; Vasapollo *et al.*, 2004). Para a análise estatística dos dados, foi utilizado o software Statistica for Windows 7.0. Na Tabela 3.1 são mostradas as combinações de condições experimentais empregadas neste estudo.

Tabela 3. 1 – Planejamento fatorial 2^2 completo com 3 repetições no ponto central.

Ensaio	Temperatura (°C)	Pressão (bar)
1	40	200
2	40	350
3	80	200
4	80	350
5	60	275
6	60	275
7	60	275

Após a extração os extratos foram armazenados em frascos âmbar e em freezer a – 80 °C. Nos ensaios com células S2, o etanol presente no extrato foi eliminado em estufa a vácuo, com atmosfera inerte, a 40 °C.

3.2.3. Caracterização dos Extratos Obtidos

Os extratos ativos obtidos foram analisados por colorimetria e CLAE para a identificação e quantificação do licopeno, e avaliados quanto à atividade antioxidante, conforme descrito a seguir.

3.2.3.1. Determinação da Concentração de Licopeno em Solução por Colorimetria

A quantidade de licopeno presente nas amostras dos leitos antes e após a extração e também dos extratos etanólicos obtidos conforme item 3.2.2., foi determinada por análise colorimétrica, segundo proposto por Fish *et al.* (2002). Em frascos âmbar foram adicionados 20 mL de uma solução composta por etanol, hexano, acetona e BHT

(antioxidante) na proporção volumétrica de 1:2:1:0,002. Em seguida, em cada frasco foi adicionada uma alíquota de 0,02 a 0,6 g das amostras. Os frascos foram agitados a 180 rpm a frio por 15 minutos no escuro. Em seguida foram adicionados 3 mL de água destilada a cada amostra. As amostras foram novamente agitadas a 180 rpm, por 5 minutos. Após 5 minutos de repouso à temperatura ambiente, a absorbância da camada de hexano (superior) foi medida a 503 nm, em cubeta de quartzo, utilizando hexano como branco. O coeficiente de extinção (CE) do licopeno em hexano, de $17,2 \times 10^4 / M \text{ cm}$ (Fish *et al.*, 2002), foi usado para o cálculo da concentração de licopeno (C_{lic}), de acordo com a equação 1, na qual o termo Abs refere-se à absorbância.

$$C_{lic} = \text{Abs}/\text{CE} \quad (\text{equação 1})$$

O teor de licopeno no extrato (τ) foi calculado de acordo com as equações 2 e 3, pela razão entre a massa de licopeno extraída (m_{lic}) e a massa de amostra utilizada para o ensaio (m).

$$m_{lic} = C_{lic} * 536,89 \text{ g/L} * 10 * 10^{-3} \text{ L} \quad (\text{equação 2})$$

$$\tau = m_{lic} (\mu\text{g})/m (\text{g}) \quad (\text{equação 3})$$

As equações 4 e 5 mostram os cálculos utilizados para a determinação da eficiência da extração supercrítica, onde $m_{(\text{extrato} + \text{solvente})}$ refere-se à massa de extrato antes e após a extração.

$$\text{Licopeno}_{rec} = \tau * m_{(\text{extrato} + \text{solvente})} \quad (\text{equação 4})$$

$$\text{Eficiência da extração} = 100 - \left\{ \frac{\text{Licopeno}_{rec} (\text{leito final})}{\text{Licopeno}_{rec} (\text{leito inicial})} * 100 \right\} \quad (\text{equação 5})$$

3.2.3.2. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

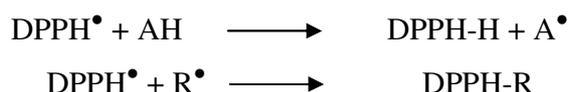
As análises dos extratos por CLAE foram realizadas no Instituto de Química/Unicamp, usando um equipamento HP SERIES 1050, com detector UV-Visível. As análises cromatográficas foram realizadas utilizando-se uma coluna de fase reversa Microsorb MV-Varian C18 (4,6 x 250 mm) com partículas de 5 µm. A caracterização dos extratos foi realizada em modo isocrático e as fases móveis utilizadas foram acetonitrila:metanol (90:10 v/v), metanol:acetonitrila (90:10 v/v) (Barba *et al.*, 2006) e metanol:tetrahydrofurano (THF) (90:10 v/v) (Topal *et al.*, 2006). A separação cromatográfica das amostras (20 µL) foi realizada a um fluxo constante de 1,0 mL/min e as leituras de absorvância foram realizadas a 472 nm. As percentagens em área dos picos foram calculadas considerando-se apenas os maiores picos.

3.2.3.3. Avaliação da Atividade Antioxidante

3.2.3.3.1. Método de Seqüestro de Radicais Livres de DPPH[•]

O método de seqüestro de radicais livres de DPPH[•] utilizado por Sánchez-Moreno *et al.* (2003) e Brand-Williams *et al.* (1995) foi empregado, com algumas modificações. Neste método, uma alíquota de 0,1 mL de solução etanólica de cada extrato, diluída ou não, foi adicionada a 1,9 mL de solução de DPPH[•] em metanol 6×10^{-5} mol/L. A mistura foi agitada vigorosamente e sua absorvância a 515 nm foi medida imediatamente. A absorvância foi, em seguida, monitorada, até que fosse atingido um platô (60 minutos).

O método de DPPH[•] é baseado no seqüestro de radicais livres resultantes da reação mostrada a seguir (Brand-Williams *et al.*, 1995)



Ao fixar um hidrogênio retirado do composto antioxidante (AH), é observada uma diminuição da absorvância do DPPH[•], que permite o cálculo da capacidade antioxidante.

A partir de uma curva de calibração a 515 nm foi calculada a concentração inicial de DPPH[•] no meio reacional. A porcentagem de DPPH[•] remanescente (%DPPH[•]_{rem}) após exposição a diferentes concentrações de licopeno foi calculada conforme a equação 6, onde [DPPH[•]]_{t=60} refere-se à concentração no tempo igual a 60 minutos e [DPPH[•]]_{t=0} refere-se à concentração no início do experimento.

$$\%DPPH^{\bullet}_{rem} = ([DPPH^{\bullet}]_{t=60} / [DPPH^{\bullet}]_{t=0}) \times 100 \quad (\text{equação 6})$$

Os valores de EC₉₅, ou seja, a quantidade necessária de licopeno para que a concentração inicial do radical DPPH[•] na reação diminua em 5%, foram calculados a partir das equações das retas dos extratos a diferentes condições de extração.

Os resultados obtidos foram expressos tanto de forma absoluta quanto como capacidade antioxidante dos extratos equivalente ao antioxidante de referência Trolox (TEAC – *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*).

3.2.3.3.2. Oxidação do Rubreno

O princípio deste método consiste na proteção do rubreno contra foto oxidação autosensibilizada do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que atua como uma fonte química de oxigênio singlete, pelos extratos ricos em licopeno. Sem proteção antioxidante, o rubreno (de cor vermelha) é oxidado pelo oxigênio singlete, produzindo cicloendoperóxidos (sem coloração) conforme descrito na Figura 3.2 (Nardello *et al.*, 1999).

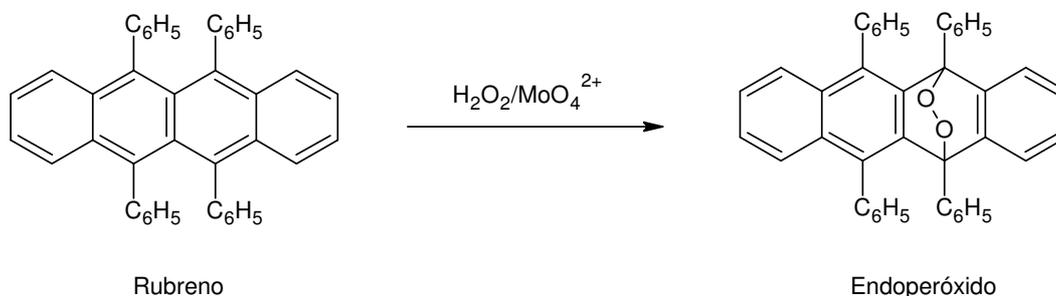
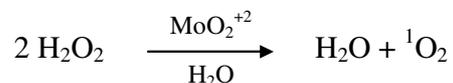


Figura 3.2 – Oxidação do rubreno pelo oxigênio singlete (adaptado de Nardello *et al.*, 1999).

Nesta reação o oxigênio singlete é gerado pela decomposição do H₂O₂, catalisada por íons molibdato (MoO₄⁺²). A reação ocorre em temperatura ambiente, e é bastante eficiente, com todos os oxigênios gerados no estado singlete, como mostra a reação abaixo:



A oxidação do rubreno disperso em uma microemulsão foi realizada de acordo com o método proposto por Oh *et al.* (2006), com pequenas modificações. Neste ensaio empregou-se uma concentração de apenas 50 μmol de H₂O₂, para evitar que o excesso de H₂O₂ destruísse os compostos antioxidantes das amostras e levasse a conclusões incorretas relacionadas à baixa atividade de seqüestro de oxigênio singlete.

A microemulsão foi preparada à temperatura ambiente pela adição de 6 mL de solução a 0,2 M de Na₂MoO₄.H₂O (290,4 mg em 6 mL de solução tampão fosfato, PBS, a 0,15 M, pH 7,4) adicionada lentamente, gota a gota, com agitação magnética, a uma solução contendo 4,7 g de SDS, 9,4 g de 1-butanol e 60 mL de cloreto de metileno. Após alguns minutos, a suspensão turbida foi convertida em um líquido transparente. Cerca de 0,02 g (37,5 μmol) de rubreno foi colocado em um pequeno frasco âmbar embrulhado em folhas de alumínio, adicionando-se, então, 10 mL da microemulsão preparada anteriormente. Toda a preparação foi realizada sob pouca luz, para evitar a foto-oxidação do rubreno.

Uma alíquota de 2,5 mL da microemulsão de rubreno foi transferida para um frasco âmbar, então 100 μL dos extratos obtidos por extração supercrítica foram adicionados ao frasco e agitados vigorosamente com um agitador magnético por 5 minutos. Em seguida, 10 μL de H₂O₂ 15% (50 μmol) foram adicionados à microemulsão vermelha de rubreno, e o meio reacional foi agitado com agitador magnético à temperatura ambiente. A reação se completou após 40 minutos. Após o final da reação, 100 μL do meio reacional foram diluídos em 6 mL de cloreto de metileno, então a oxidação do rubreno foi monitorada pela medição de rubreno residual por espectroscopia visível a 522 nm.

A atividade das amostras foi determinada com base em de uma curva de calibração do antioxidante sintético de referência Trolox analisado nas mesmas condições antes expostas para as amostras. Os resultados obtidos foram expressos como capacidade antioxidante dos extratos equivalente ao Trolox (TEAC).

3.2.4 Preparação do Banco de Células de *Drosophila melanogaster* S2 e do Inóculo para os Ensaios Biológicos

O inóculo celular padronizado foi obtido partindo-se das células de *Drosophila melanogaster* S2 preservadas por criogenia. Para a obtenção do banco de células congeladas, estas foram cultivadas em meio Sf900 II, em frascos T para cultura celular (TPP) de 25 cm², a 28°C até a obtenção de uma densidade celular de 10⁵ a 10⁷ células por mililitro durante a fase de crescimento exponencial. A suspensão celular foi então centrifugada a 1000 rpm durante 5 minutos a 28°C em tubos de centrífuga estéreis para a retirada do meio condicionado. O sedimento obtido foi posteriormente ressuspensionado em meio de congelamento, mantido refrigerado à 4 °C, e composto por 40% do meio de cultivo fresco Sf900 II, 10% de DMSO e 50% de soro fetal bovino (SFB). A suspensão, com concentração celular ajustada para 1x10⁶ células/mL, foi distribuída (1 mL) nos frascos de congelamento, que consistiam em criotubos de 1,5 mL de capacidade (Nunc) e mantida em contato com este meio durante no máximo 15 a 20 minutos (incluindo o tempo de distribuição). Estes frascos foram então mantidos durante 24 horas em freezer à -80 °C de temperatura e armazenados após este período à -196 °C em nitrogênio líquido.

Para a realização dos ensaios, foi realizado o descongelamento da suspensão celular, efetuado rapidamente à 37 °C em banho termostático. A suspensão de células obtida foi transferida por gotejamento para tubos de centrífuga estéreis, contendo 10 mL do meio de cultivo fresco Sf900 II. Após este procedimento, as células foram centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos a 28°C, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e as células foram ressuspensionadas em 5 mL de meio de cultura. Após esta etapa, a suspensão celular foi transferida para frascos de cultura de 25 cm² ou 75 cm², e mantida durante no máximo 3 a 4 dias à 28 °C em incubadora Modelo MA 415 (Marconi, Brasil). Ao final deste período, a concentração celular foi determinada em câmara de Neubauer com azul de Trypan 0,2% e ajustada para 10⁶ células/mL e as células foram, então, empregadas como inóculo nos ensaios subsequentes.

3.2.5. Análise do Perfil de Citotoxicidade do Extrato a Células S2

Com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos tóxicos dos extratos, foi realizada a análise de citotoxicidade por seu contato direto com a cultura de células. O ensaio constituiu de, após a reativação e propagação das células S2 congeladas, em sua exposição ao extrato rico em licopeno dissolvido em DMSO, THF e em meio de cultura SF900.

Alíquotas de 50 μL da suspensão celular de concentração ajustada para 10^6 células/mL de meio Sf 900 II foram transferidas para cada poço de uma placa de 96 poços de fundo chato do tipo ELISA contendo o mesmo volume de extrato em DMSO e THF a 10% e diluído serialmente no mesmo meio de cultura, visto que o extrato apresenta caráter predominantemente hidrofóbico. A concentração de partida de licopeno nestes solventes foi de 14,55 mg/mL. O extrato diluído foi previamente esterilizado usando filtros descartáveis com tamanho de poro de 0,22 μm . Como controle negativo, foram analisadas as células cultivadas em meio de cultura somente. Paralelamente, analisou-se também o efeito isolado dos solventes DMSO e THF empregados em diferentes proporções.

As placas foram incubadas por diferentes períodos a 28 °C, após o que se avaliou a citotoxicidade através do indicador metabólico MTT. O sal MTT, quando incubado com células vivas, é lisado por enzimas mitocondriais, transformando-se de um composto amarelo em outro azul escuro (formazan) detectável espectrofotometricamente. Neste ensaio, 10 μL de solução de MTT (5 mg/mL), dissolvido em tampão PBS estéril a 0,02 M e pH 7, foram adicionados a cada poço das placas do tipo ELISA com a cultura celular. As placas foram mantidas em estufa à 28 °C por quatro horas e após este período, foram adicionados 100 μL de isopropanol acidificado (30 μL de HCl em 10 mL de isopropanol) em cada poço para a dissolução dos cristais de formazan. Após incubação por uma hora, a leitura das absorbâncias foi efetuada em leitora ELISA Biotek, (modelo ELx808, EUA) a 490 nm (ATCC). Todos os ensaios foram realizados em, no mínimo, triplicata.

3.2.6. Avaliação da Atividade Antiapoptótica dos Extratos Ativos

3.2.6.1. Microscopia de Fluorescência

Para avaliar o efeito antiapoptótico dos extratos ativos foi utilizada uma técnica baseada na detecção da condensação da cromatina por microscopia de fluorescência, associada à capacidade de permeação da membrana aos corantes fluorescentes laranja de acridina e brometo de etídio (Pellegrini *et al.*, 2008). Por esta metodologia é possível identificar vários níveis de viabilidade celular. Células viáveis não apoptóticas mostram o núcleo de cor verde e a cromatina não condensada, enquanto células ainda viáveis, mas em início de apoptose, apresentam grânulos verdes brilhante na região nuclear, correspondentes à cromatina condensada e fragmentada. Células apoptóticas tardias e não viáveis mostram-se vermelho-alaranjadas, com tamanho reduzido e grânulos laranja brilhante na região nuclear. No último nível, encontram-se as células necróticas, de tamanho inalterado ou aumentado, totalmente coradas em cor laranja, indicando a perda da integridade da membrana nuclear, e por vezes mesmo células sem cromatina.

A análise foi realizada segundo protocolo de Mercille e Massie. (1994 a e b). Foi preparada uma solução com os 100 µg/mL de laranja de acridina e 100 µg/mL de brometo de etídio, em solução tampão PBS, com composição mostrada na Tabela 3.2. Um volume de 4 µL desta mistura de corantes foi adicionada a uma amostra de 100 µL de suspensão de células. As mudanças morfológicas das células S2 foram então examinadas em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E200.

Tabela 3.2. – Composição da solução tampão PBS

Composto	Quantidade (g)
NaCl	80,0
KCl	2,0
Na ₂ HPO ₄	11,5
KH ₂ PO ₄	2,0
Água destilada	q.s.p 1,0 L

As células foram, então, classificadas em: VNA (células viáveis com núcleo não apoptótico), VA (células viáveis com núcleo apoptótico), NEC (células necróticas), NVA (células não viáveis com núcleo apoptótico), LC (células livres de cromatina).

3.2.6.2. Citometria de Fluxo

Através da análise de citometria de fluxo pode-se avaliar as características físicas e/ou químicas de um sistema celular, correlacionando o volume celular e a complexidade interna das células, como por exemplo, a forma do núcleo, a quantidade e o tipo dos grânulos citoplasmáticos e a rugosidade da membrana.

No citômetro, utilizado para avaliação da emissão de fluorescência pelas células (*Fluorescence Activated Cell Sorter* - FACS), estas são individualmente conduzidas em um canal de corrente fluida que, ao interceptar o feixe de luz geralmente proveniente de um laser, o dispersam em várias direções, dependendo do tamanho, da estrutura interna, das características topográficas e da densidade ótica de cada célula (Macey, 1994), as quais estão diretamente correlacionadas com a morfologia celular.

Nesse contexto, o feixe de raios laser incide sobre cada célula, sendo uma parte bloqueada frontalmente (*Forward Scatter* ou FSC) e outra parte dispersada lateralmente (*Side Scatter* ou SSC). A fração FSC é relativa ao tamanho da célula e a SSC representa a complexidade intracitoplasmática, que geralmente nas células caracteriza a granulosidade interna (Macey, 1994, Robinson, 1993, Shapiro, 1985).

Nestes ensaios, as células S2 foram também cultivadas em frascos para cultura de 75 cm² por 72 horas a 28 °C no meio Sf 900 II. A suspensão de células foi então centrifugada a 1000 rpm durante 5 minutos a 28 °C em tubos de centrífuga estéreis e sua densidade celular foi ajustada a aproximadamente 10⁶ células por mililitro. Alíquotas de 4,38 mL de cultura celular foram transferidas para frascos de cultura de 25 cm², e nestas células a morte celular por apoptose foi induzida através da sua exposição a 20 mM de H₂O₂. Em seguida, um volume de 0,62 mL do extrato rico em licopeno estéril dissolvido em DMSO foi adicionado ao cultivo para atingir a concentração não citotóxica às células de 0,182 mg/mL. Tanto a água oxigenada quanto o extrato de licopeno em DMSO foram adicionados no início do cultivo. Como controle negativo foram analisadas as células cultivadas somente em meio de cultura.

Após 16 horas de cultivo, as culturas foram centrifugadas, a densidade celular foi novamente ajustada para 10^6 células/mL, as células foram diluídas em 1 mL de tampão de ligação (10 mM de HEPES a pH de 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$ e 1,8 mM $CaCl_2$) e marcadas com 1 μ L de Anexina V-FITC. As amostras das culturas foram então homogeneizadas por inversão por três vezes e incubadas à temperatura ambiente por quinze minutos, ao abrigo da luz. Durante o período de incubação, a anexina V interage e marca por fluorescência a fosfatidilserina posicionada na camada interna da membrana celular que, com a apoptose, se desloca para a superfície externa da membrana.

Nos ensaios realizados, os parâmetros analisados e as intensidades média de fluorescência das amostras foram monitorados usando um citômetro de fluxo Becton Dickinson (modelo FACSCalibur), com comprimento de onda de 488 nm.

3.2.7. Avaliação da Concentração Celular

O crescimento celular foi acompanhado por observação diária através de microscopia de fase em microscópio invertido, modelo T-100 (Nikon, USA). A morfologia, a concentração e a viabilidade celular foram periodicamente monitoradas diretamente através de microscopia ótica e indiretamente através do indicador metabólico MTT.

A microscopia ótica foi usada principalmente nos procedimentos de preparação das culturas e manutenção da linhagem celular. A concentração de células viáveis foi estimada pelo método de exclusão de azul de Trypan (0,2%). Após diferentes períodos de cultura, 90 μ L da suspensão de células foram retirados e diluídos em 10 μ L da solução de azul de Trypan para análise em câmara de Neubauer (hemacitômetro). Células mortas absorvem este corante devido às falhas nas membranas celulares, tornando-se azuis, enquanto células vivas permanecem descoloridas, por não permitirem a entrada do corante (Freshney, 1994).

3.2.8. Determinação dos Parâmetros Cinéticos de Crescimento Celular

A taxa máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) foi obtida através do coeficiente angular da reta ajustada para a variação do logaritmo neperiano da concentração celular versus o

tempo, durante o período de crescimento exponencial. O tempo de duplicação da cultura (t_d) foi calculado a partir da equação 7:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad (\text{equação 7})$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito da Substituição da Fase Aquosa do Suco de Tomate por Etanol na Eficiência do Processo de Extração

Com o objetivo de estudar o número de lavagens com etanol no qual se obtém um melhor rendimento de extração de licopeno a partir do suco de tomate, foram realizadas de uma a quatro lavagens do suco de tomate. A extração foi realizada à temperatura de 60°C e pressão de 275 bar, que é o ponto central do planejamento fatorial.

Com uma lavagem não foi possível realizar a extração, pois ainda havia uma grande quantidade de água no leite. Como o CO₂ supercrítico é pouco solúvel em água, não houve passagem do solvente pelo leite, mas sim a compressão do mesmo. A extração do licopeno a partir do suco de tomate com duas lavagens teve baixo rendimento, apenas 8,0% de licopeno extraído. O rendimento da extração com três lavagens do leite também foi baixo, 10,8%. O melhor rendimento de extração do licopeno foi com quatro lavagens do leite inicial, o qual foi de 35,4%, sendo este o número de lavagens escolhido para realizar todas as extrações subsequentes. Essa melhora no rendimento deve-se à solubilização do CO₂ supercrítico no etanol, permitindo dessa forma um melhor contato entre o solvente e o composto a ser extraído. Após a remoção parcial da água com quatro lavagens com etanol, a concentração média de licopeno presente no centrifugado foi de 194,54 µg/g.

A Figura 4.1 (A e B) mostra os leitos das amostras processadas com duas e três lavagens, respectivamente, após a extração. As amostras apresentam cor avermelhada, indicando grande quantidade de licopeno residual. Na Figura 4.1 (C) observa-se o leite em que foram realizadas quatro lavagens, com uma coloração mais clara, ou seja, com menos licopeno residual.

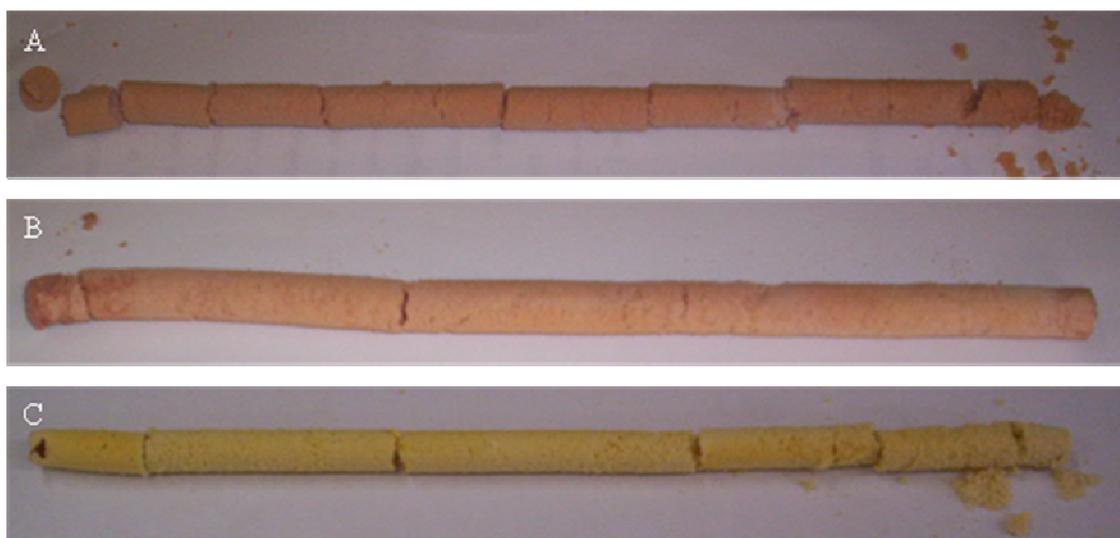


Figura 4.1 - Leito de partículas após o processo de extração utilizando CO₂ supercrítico como solvente a 60°C e 275 bar: A) dois ciclos de lavagem, B) três ciclos de lavagem, C) quatro ciclos de lavagem.

4.2. Influência da Temperatura e da Pressão de Extração nas Características dos Extratos Obtidos

4.2.1. Efeitos no Rendimento em Licopeno e na Eficiência da Extração

A fim de se estudar a influência da temperatura e da pressão no processo de extração do licopeno a partir de suco de tomate, foi realizado um planejamento fatorial 2² completo com 3 repetições no ponto central, cujos resultados são mostrados na Tabela 4.1. A eficiência da extração foi calculada considerando o licopeno contido no leito ao final e anteriormente à extração, conforme as equações 4 e 5, sendo o teor de licopeno inicial de 194,54 µg/g. As densidades do CO₂ nas condições utilizadas variaram de 0,56 g/cm³ a 80 °C e 200 bar até 0,96 g/cm³ a 40 °C e 350 bar. Os tempos de extração variaram de acordo com a vazão de CO₂ admitida pelo sistema, acima de 300 bar as extrações foram realizadas em 360 minutos.

Tabela 4.1 – Resultados do planejamento fatorial 2^2 completo com 3 repetições no ponto central.

Ensaio	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Eficiência da Extração (%)	Tempo de Extração (min)
1	40	200	7,7	180
2	40	350	27,9	360
3	80	200	72,1	180
4	80	350	76,9	360
5	60	275	35,4	180
6	60	275	40,3	180
7	60	275	40,6	180

A máxima eficiência de extração de 76,9 %, foi alcançada na condição de 80 °C, 350 bar e 360 minutos de extração. Já a mínima eficiência de extração (7,7 %), ocorreu na condição de 40 °C, 200 bar e 180 minutos de extração. Uma baixa eficiência de extração na menor pressão era esperada, pois na pressão de 200 bar a densidade do CO₂ é mínima e segundo Cadoni *et al.* (2000), à temperatura de 40 °C e pressões menores do que 250 bar, a extração de licopeno é desprezível. Observa-se também que eficiência de extração aumenta com a pressão, pois a solubilidade do licopeno é aumentada no solvente supercrítico. Entretanto, o parâmetro principal que controla a extração do licopeno é a temperatura de extração. Como pode ser visto na condição de 80 °C e 200 bar, o rendimento foi de 72,1 %, próximo do rendimento máximo obtido na mesma temperatura e pressão de 350 bar.

A eficiência máxima de extração alcançada nesse trabalho foi maior do que a obtida em diversos trabalhos, como o de Vasapollo *et al.* (2004), que foi de 35 % para a extração de licopeno de partículas secas de tomate, utilizando temperatura de 66 °C e pressão de 335 bar. Os resultados só não foram superiores aos relatados por Cadoni *et al.* (2000), Ollanketo *et al.* (2001), Sabio *et al.* (2003), Vági *et al.* (2007), que empregaram condições de extração mais drásticas, como co-solventes mais hidrofóbicos, temperaturas e pressões mais elevadas, conforme indicado na Tabela 2.6

Dessa forma, a substituição parcial da água contida no suco de tomate por etanol antes da extração melhora a recuperação do licopeno. O leito de partículas após o processo de extração a 80 °C e 350 bar pode ser visualizado na Figura 4.2. As partículas apresentam coloração rósea, indicando a presença de licopeno residual, além do β -caroteno, mas em menor quantidade do que observada na Figura 4.1. A massa inicial de partículas empacotadas na coluna de extração foi de aproximadamente 15 gramas e, após o processo de extração, o leito de partículas apresentou-se bastante seco, com massa média de 0,9 g, mostrando que, além do licopeno e de outros compostos, praticamente todo o etanol presente no leito foi extraído pelo CO₂ supercrítico.



Figura 4.2 - Leito de partículas lavadas quatro vezes com etanol após o processo de extração utilizando CO₂ supercrítico à 80 °C e 350 bar como solvente.

A análise estatística dos efeitos principais das variáveis estudadas e suas interações está apresentada na Tabela 4.2. Avaliando-se os efeitos, observa-se que apenas a temperatura tem efeito significativo na extração do licopeno a partir do suco de tomate em um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Tanto a pressão quanto a interação entre as duas variáveis não apresentam efeito significativo.

Tabela 4.2 – Efeitos estatísticos principais das variáveis do planejamento 2².

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	$t_{\text{calc}}(3)$	Valor de p
Média	42,98571	2,293869	18,73939	0,000332
Temperatura* (T)	56,70000	6,069008	9,34255	0,002597
Pressão (P)	12,50000	6,069008	2,05964	0,131541
T x P	-7,70000	6,069008	-1,26874	0,294034

*Variável com efeito estatisticamente significativo para $p < 0,05$.

A distribuição dos valores observados experimentalmente e os obtidos pelo modelo de ajuste pode ser observada na Figura 4.3. Os pontos ficaram próximos da reta, indicando um bom ajuste ao modelo.

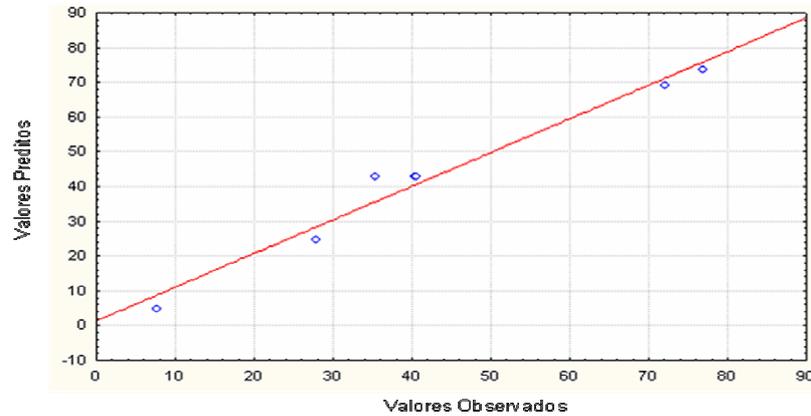


Figura 4.3 - Valores de rendimento de extração obtidos experimentalmente e preditos pelo modelo estatístico, erro residual de 36,83286.

Na superfície de resposta mostrada na Figura 4.4 observa-se que o rendimento diminui linearmente com a diminuição da temperatura, não tendo praticamente influência da pressão.

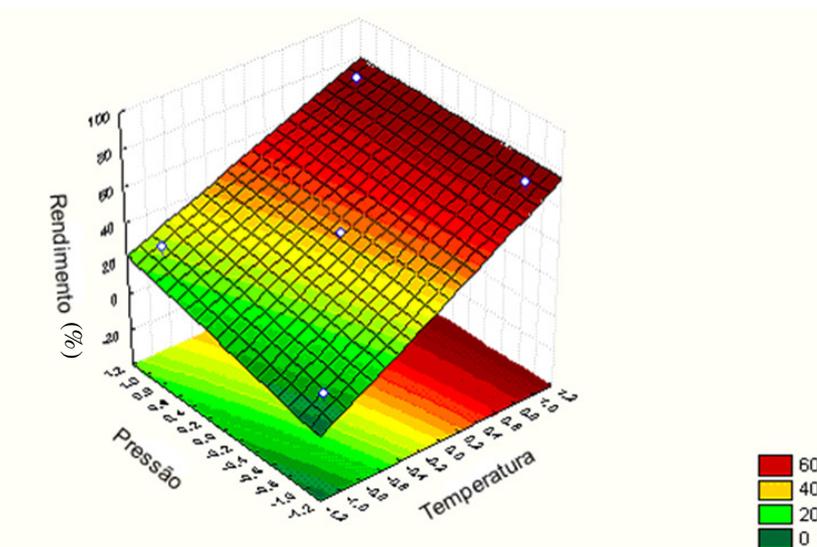


Figura 4.4 - Superfície de resposta obtida no planejamento experimental para verificação dos efeitos das variáveis independentes codificadas temperatura e pressão sobre o rendimento de extração.

Este comportamento dependente da temperatura não é muito usual em sistemas de extração utilizando CO₂ supercrítico como solvente, nos quais geralmente se observa forte influência da pressão de extração. Gómez-Prieto *et al.* (2003) observaram que o rendimento da extração de licopeno aumentou consideravelmente com a densidade do solvente, sendo o mesmo observado por Vasapollo *et al.* (2004) e por Vági *et al.* (2007), porém com uma menor intensidade. Yi *et al.* (2008) obtiveram melhores resultados em termos de rendimento de extração de tomate seco (31,25 µg/g), na maior temperatura (100 °C) e na maior pressão (400 bar) utilizadas. O aumento na densidade do CO₂, até certos níveis, resulta em elevação da solubilidade do licopeno. Shi *et al.* (2009) estudaram os efeitos da temperatura e da pressão na solubilidade do licopeno e observaram que, até a temperatura de 70 °C a solubilidade do licopeno aumentou com a elevação da temperatura e da pressão. À 80 °C foi verificada degradação térmica do licopeno, com redução da solubilidade com o aumento da pressão.

Um fator que dever ser levado em consideração nos experimentos realizados é a presença do etanol residual presente na matéria-prima, o qual pode funcionar como um co-solvente, principalmente durante os primeiros minutos da extração, favorecendo assim a extração do licopeno.

4.2.2. Perfil Cromatográfico dos Extratos Obtidos

Inicialmente foram testadas duas fases móveis na análise por CLAE: metanol/acetonitrila (90:10 v/v) e acetonitrila/metanol (90:10 v/v). A primeira fase móvel foi usada por Barba *et al.* (2006), e resultou em um tempo de retenção de licopeno de 5,18 minutos. No presente trabalho, o tempo de retenção foi maior, de cerca de 38 minutos. A diferença entre os tempos de retenção pode estar relacionada com o tipo de coluna e a temperatura empregada na separação. No presente trabalho não foi utilizado aquecimento da coluna, o que no, trabalho de Barba *et al.* (2006), foi realizado a 30°C. A coluna utilizada por estes autores foi uma µBondapack C18 (300 mm x 2,0 mm), com partículas de 10 µm e uma pré-coluna µBondapack C18 (20 mm x 3,9 mm), com partículas de 10 µm. No presente trabalho foi utilizada uma coluna de fase reversa Microsorb MV-Varian C18

(4,6 mm x 250 mm) com partículas de 5 μm , sendo esta mais seletiva por apresentar menor diâmetro de partícula, proporcionando maior tempo de retenção.

Com o intuito de reduzir o tempo de retenção foi testada outra fase móvel, acetonitrila/metanol (90:10 v/v), que resultou em um tempo de retenção ligeiramente menor, de aproximadamente 32 minutos, devido ao caráter mais hidrofóbico da fase móvel, que interagiu menos com a fase estacionária.

Analisando-se a Figura 4.5, observa-se um pico principal no tempo de 33,64 minutos, e, segundo o cromatograma obtido por Barba *et al.* (2006) para a análise de tomate, o licopeno corresponde à esse pico. Os cromatogramas de todas as extrações com esta fase móvel são mostrados no Anexo A (Figuras A1 a A6).

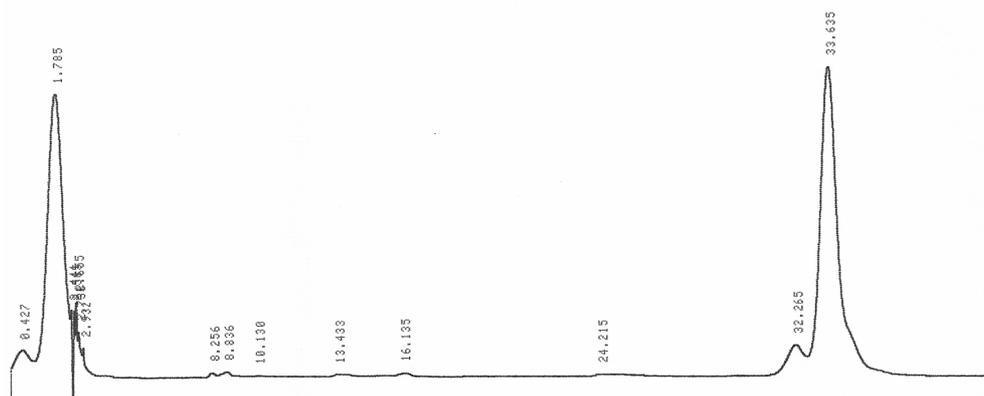


Figura 4.5 - Perfil cromatográfico do extrato de licopeno obtido por extração com CO_2 supercrítico à 80 °C e 350 bar.

Além do licopeno outros compostos são extraídos, como β -caroteno e luteína. No cromatograma apresentado no trabalho de Barba *et al.* (2006), o pico correspondente ao β -caroteno é identificado após o pico do licopeno. Nos cromatogramas do presente trabalho, supõe-se que não houve uma boa separação desses dois picos. Por essa razão foi testada uma nova fase móvel, metanol/THF (90:10 v/v), relatada por Topal *et al.* (2006), capaz de separar melhor os picos e ainda indicar as frações de licopeno nas formas *cis* e *trans*. Esta fase móvel foi empregada tanto para os extratos quanto para um padrão de licopeno disponível comercialmente. O perfil cromatográfico do padrão de licopeno e dos extratos

obtidos a 40 °C e 350 bar e 80 °C e 350 bar são mostrados nas Figuras 4.6, 4.7 e 4.8, respectivamente.

A análise do perfil cromatográfico do padrão de licopeno, mostrado na Figura 4.6, indica que o licopeno está representado pelo pico de maior área, correspondendo ao tempo de retenção de cerca de 12 minutos. Observa-se que o tempo de retenção do licopeno extraído foi discretamente maior do que o do licopeno do padrão, de aproximadamente 14 minutos.

As análises de CLAE foram realizadas para todas as condições de extração e as áreas correspondentes aos maiores picos de cada cromatograma, identificados como sendo o licopeno, são apresentadas na Tabela 4.3. Os cromatogramas de todas as extrações são mostrados no Anexo A (Figuras A8 a A14).

Não foi possível, neste trabalho, identificar os outros picos presentes nos cromatogramas. Alguns autores como Yi *et al.* (2008) e Lee e Chen (2001) sugerem que o pico principal refere-se ao *trans*-licopeno, enquanto que os outros picos referem-se ao *cis*-licopeno. Já Ciurlia *et al.* (2009) e Topal *et al.* (2006) identificaram também picos referentes à substâncias como β -caroteno antes e após o pico de licopeno, respectivamente. O que se pode sugerir é que, nas extrações realizadas neste trabalho, foram obtidas amostras com alto teor de licopeno, o que pode ser observado comparando-se os tempos de retenção das frações correspondentes aos picos principais das Figuras 4.6 a 4.8.

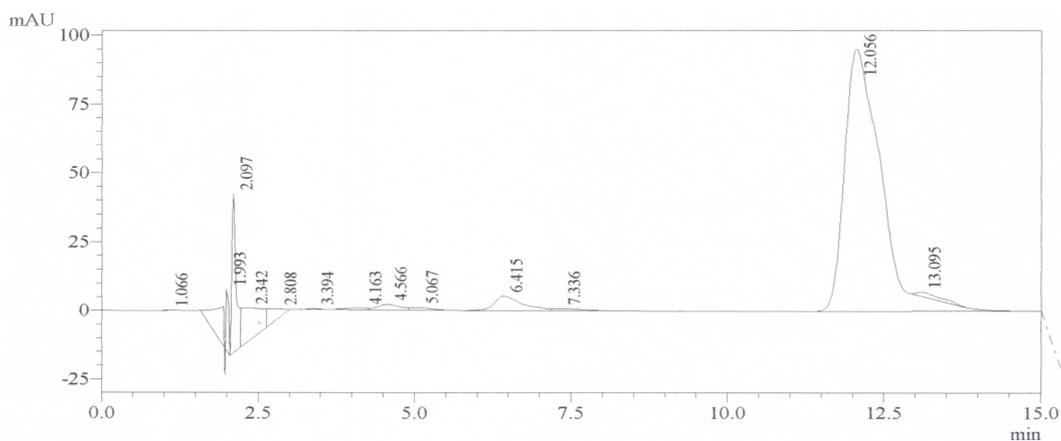


Figura 4.6 - Perfil cromatográfico do padrão de licopeno a 100 ppm. Fase móvel: metanol/THF (90:10 v/v).

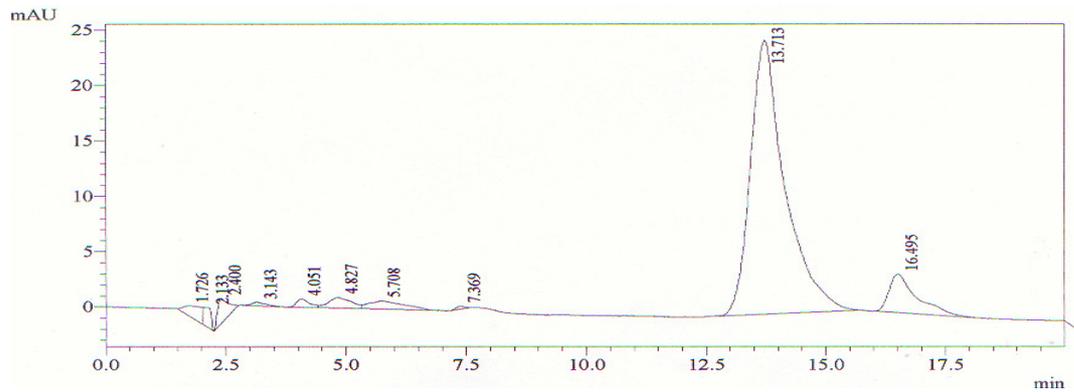


Figura 4.7 - Perfil cromatográfico do extrato de licopeno obtido por extração com CO₂ supercrítico à 80°C e 350 bar. Fase móvel: metanol/THF (90:10 v/v).

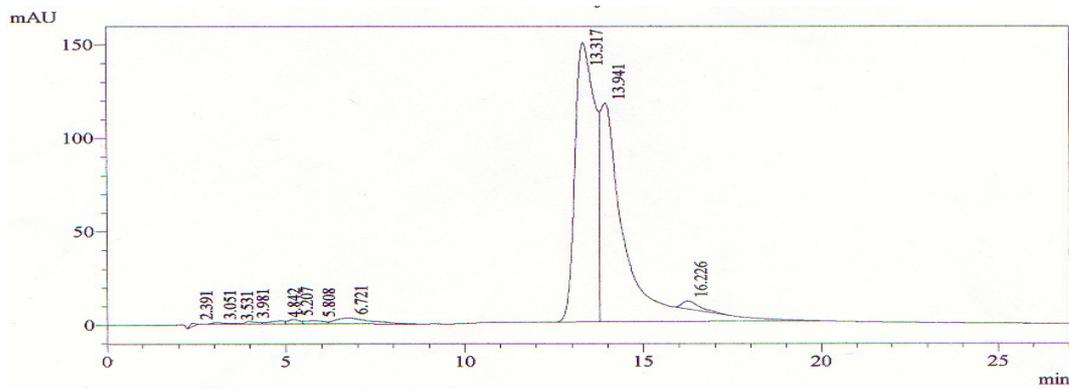


Figura 4.8 - Perfil cromatográfico do extrato de licopeno obtido por extração com CO₂ supercrítico à 40°C e 350 bar. Fase móvel: metanol/THF (90:10 v/v).

Tabela 4.3 – Porcentagem da área correspondente ao pico do licopeno.

Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Área Total (%)
40	200	77,2
40	350	95,1
80	200	91,1
80	350	79,7
60	275	79,6
60	275	77,9
60	275	78,3

4.2.3. Efeitos na Atividade Antioxidante

4.2.3.1. Método de Sequestro de Radicais Livres de DPPH[•]

Os extratos obtidos foram inicialmente avaliados quanto à atividade antioxidante pelo método envolvendo DPPH[•]. A título de exemplo, mostra-se na Figura 4.9 os resultados observados para diferentes concentrações do extrato produzido a 80 °C e a 350 bar. As porcentagens do radical DPPH[•] remanescente nas reações para várias concentrações de licopeno foram calculadas a partir da curva de calibração obtida por regressão linear dos valores de concentração do radical DPPH[•] e de suas absorbâncias a 515 nm (Anexo B, Figura B1).

A partir desta curva foi determinado o coeficiente de eficiência EC₉₅ (mg de licopeno). As curvas de porcentagens do radical remanescente para os outros extratos obtidos estão no Anexo B (Figuras B2 – B7), e os dados de EC₉₅ correspondentes estão indicados na Tabela 4.4.

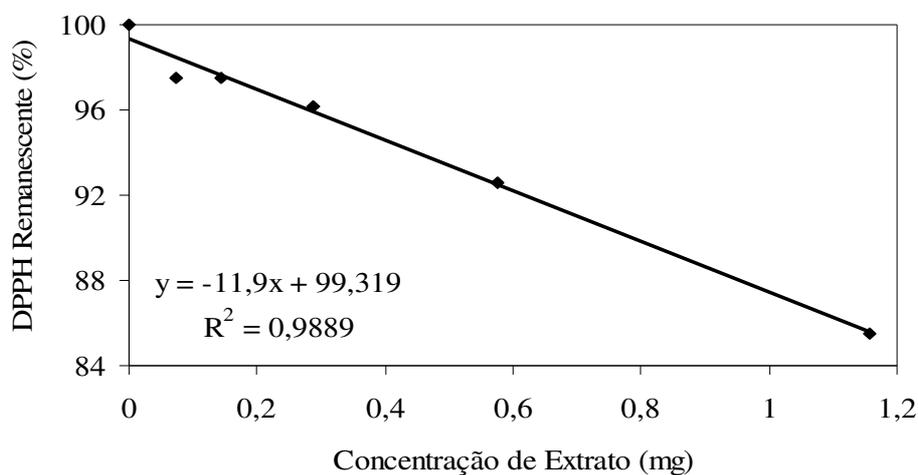


Figura 4.9 - Variação da quantidade remanescente do radical DPPH[•] após reação por 60 min com diferentes concentrações do extrato obtido a 80°C e 350 bar. EC₉₅ = 0,363 mg.

Tabela 4.4 – Valores de coeficiente de eficiência EC₉₅ para os extratos obtidos em diferentes condições de extração (n = 3).

Temperatura (°C)	Pressão (bar)	EC ₉₅ (mg de licopeno)
40	200	0,723 ± 0,005
40	350	0,179 ± 0,006
80	200	0,694 ± 0,006
80	350	0,363 ± 0,006
60	275	0,396 ± 0,005
60	275	0,651 ± 0,005
60	275	0,219 ± 0,005

Considerando-se que quanto menor o valor de EC₉₅, maior é a capacidade antioxidante do material analisado, os resultados indicam que o extrato de licopeno obtido a 40 °C e 350 bar apresentou maior poder antioxidante. O maior valor de EC₉₅ foi obtido para o extrato de licopeno obtido a 40 °C e 200 bar. Possivelmente este resultado esteja relacionado com a extração de diferentes frações ativas nas distintas condições operacionais testadas, conferindo um maior efeito sinérgico ao extrato obtido a 200 bar.

Com base nos dados da Tabela 4.4 observa-se que a capacidade antioxidante dos extratos aumenta com o aumento da pressão (à temperatura constante). O mesmo comportamento não foi verificado com o aumento da temperatura. Nas condições do ponto central foram observados valores discrepantes entre si, destacando-se que elevados desvios não eram incomuns nas réplicas deste ensaio, que dificulta a análise do comportamento do sistema.

No trabalho de Liu *et al.* (2008), o licopeno apresentou relação inversa entre sua concentração e a capacidade de seqüestro de radicais livres. Neste trabalho não foi possível verificar uma relação entre a concentração de licopeno e a atividade antioxidante.

Este teste preliminar foi uma tentativa de determinar o coeficiente de eficiência de 50% (EC₅₀) para cada extrato obtido. Devido à diminuta capacidade absoluta de captura de radicais livres observada, entretanto o que foi obtido foi um EC₉₅, tornando assim o ensaio pouco elucidativo quanto à atividade antioxidante dos extratos. Por essa razão, os extratos ricos em licopeno foram novamente avaliados e seus desempenhos foram então comparados com o do padrão Trolox.

Neste ensaio foi determinada a capacidade antioxidante de cada extrato obtido a diferentes condições de extração, mas diretamente na concentração em que foi extraído, sem serem realizadas diluições. Para determinar a capacidade antioxidante dos extratos foi realizado o cálculo mostrado na equação 8, medindo-se a absorbância a 0; 30 e a 60 min..Os resultados obtidos para este ensaio estão mostrados na Figura 4.10.

$$CA = 1 - \left(\frac{Abs_{amostra}}{Abs_{controle}} \right) * 100 \quad (\text{equação 8})$$

A curva de calibração obtida para o antioxidante de referência Trolox é mostrada no Anexo B (Figura B8), sendo que a percentagem de inibição da reação pelo Trolox foi calculada de acordo com a equação 9.

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{Abs_{60 \text{ min}}}{Abs_{0 \text{ min}}} * 100 \quad (\text{equação 9})$$

O mesmo cálculo foi realizado para os extratos ricos em licopeno. A partir da equação da reta da curva de calibração do Trolox, foi calculada a capacidade antioxidante referente ao Trolox (TEAC) para cada extrato, dados estes mostrados na Tabela 4.5.

Assim como no ensaio anterior, a maior capacidade antioxidante corresponde ao extrato obtido a 40 °C e 350 bar, como pode ser observado na Figura 4.10, com percentagem de inibição de 49,7% referente ao seqüestro de radicais livres. Já Liu *et al.* (2008) obtiveram menos do que 9%, utilizando padrão de licopeno. Segundo Sánchez-Moreno *et al.* (2006), o licopeno, juntamente com a luteína, é o principal responsável pelo sequestro dos radicais livres nas frações orgânicas do tomate, de tal forma que este composto pode ter sido extraído em conjunto com o licopeno, além de outros.

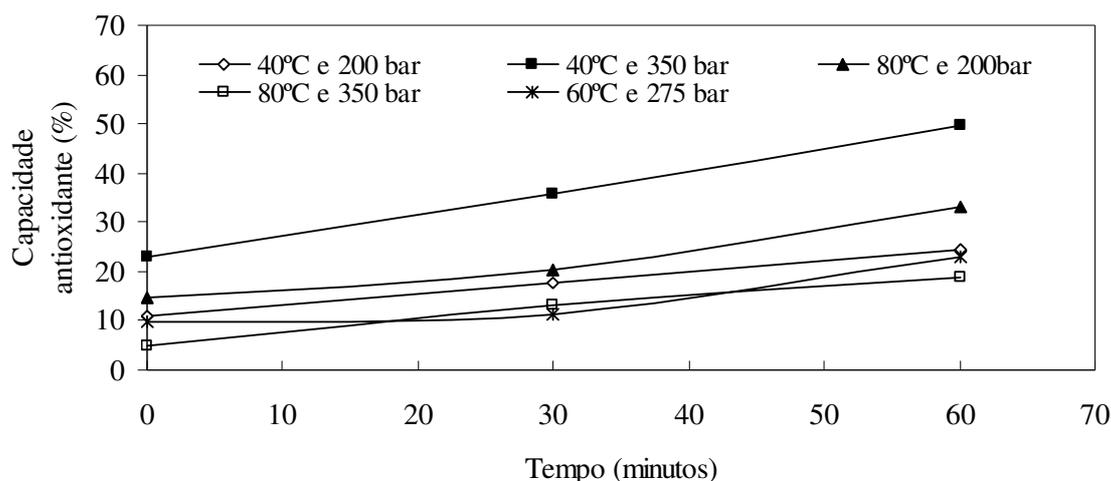


Figura 4.10 – Capacidade antioxidante dos extratos obtidos por extração supercrítica.

Tabela 4.5 – Atividade antioxidante dos extratos obtidos por extração supercrítica analisados após 60 min pelo método do radical DPPH[•] (n = 3).

Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Capacidade Antioxidante (%)	TEAC (mM/g)
40	200	24,6 ± 1,1	6,5 ± 1,2
40	350	49,7 ± 1,5	12,7 ± 1,5
80	200	33,3 ± 1,8	2,2 ± 1,7
80	350	18,9 ± 0,7	2,6 ± 0,5
60	275	22,9 ± 0,2	4,6 ± 0,3
60	275	22,3 ± 0,2	4,3 ± 0,3
60	275	23,5 ± 0,2	4,5 ± 0,3

Os resultados mostrados indicam que o licopeno provavelmente não apresenta efeito individual na atividade antioxidante, mas sim, um efeito sinérgico. Segundo Shi & Maguer (2000) a atividade antioxidante dos extratos é influenciada pela quantidade de licopeno e seus isômeros e pelos efeitos sinérgicos dos carotenóides presentes no extrato.

De acordo com Martínez-Valverde *et al.* (2002), Takeoka *et al.* (2001) e Yi *et al.* (2009), na presença de solventes orgânicos, juntamente com o licopeno, podem ser extraídos vitamina E, lipídios, tocoferóis, sistoterois e outros carotenóides que podem

contribuir para a atividade antioxidante dos extratos. A quantidade destes compostos no extrato tende a diminuir com o aumento da temperatura. Dessa forma, o maior valor de capacidade antioxidante obtido a 40 °C e 350 bar pode indicar que há uma maior quantidade desses compostos no extrato.

No estudo realizado por Yi *et al.* (2009), foi observada uma diminuição na atividade antioxidante do extrato de licopeno com o aumento da temperatura (acima de 70 °C), que foi correlacionada à quantidade de *trans*-licopeno e à proporção *trans/cis*.

4.2.3.2. Oxidação do Rubreno

Uma metodologia alternativa foi empregada para analisar a atividade antioxidante dos extratos obtidos, baseada na capacidade de sequestrar oxigênio singlete, através do ensaio de oxidação do rubreno.

Para determinar a capacidade antioxidante dos extratos obtidos, foi utilizada a equação 8, empregada anteriormente. Da mesma forma, foi realizada uma curva de calibração com o antioxidante Trolox (Anexo B, Figura B9), para determinar a capacidade antioxidante dos extratos equivalente ao Trolox. Os resultados obtidos para os extratos estão indicados na Tabela 4.6.

Assim como para a análise pelo método do radical DPPH, o extrato obtido a 40°C e 350 bar apresentou maior capacidade antioxidante, como pode ser observado na Tabela 4.6. A porcentagem de inibição obtida para esse extrato foi maior do que a encontrada por Oh *et al.* (2006), que foi de aproximadamente 22% (para o suco de tomate), contra 38,2% do presente trabalho.

Os resultados deste trabalho indicam que o extrato rico em licopeno obtido a 40°C e 350 bar possui boa capacidade de sequestro do oxigênio singlete. Este resultado torna-se importante, pois o estresse oxidativo nas células está relacionado com o acúmulo de espécies reativas de oxigênio que podem causar danos irreversíveis principalmente à estrutura das biomoléculas (Celiktas *et al.*, 2007), assim como influenciar na viabilidade das células e na indução da morte por apoptose nas células (Padma *et al.*, 2007).

Tabela 4.6 - Atividade antioxidante dos extratos obtidos por extração supercrítica e analisados após 40 min pelo método de oxidação de rubreno (n=3).

Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Capacidade de Seqüestro de Oxigênio Singlete (%)	TEAC (mM/g)
40	200	13,6 ± 0,2	10,4 ± 0,4
40	350	38,2 ± 1,1	61,3 ± 1,3
80	200	26,3 ± 0,2	7,9 ± 0,2
80	350	26,1 ± 0,4	7,5 ± 0,5
60	275	7,6 ± 0,1	6,2 ± 0,2
60	275	8,1 ± 0,1	6,2 ± 0,2
60	275	8,5 ± 0,1	6,1 ± 0,2

Dessa forma, a adição de extratos ricos em licopeno à cultura de células, tem potencial de melhorar a viabilidade das células S2, e minimizar e/ou retardar a morte das células por apoptose, como será discutido a seguir.

4.3 – Análise da Adição de Extrato Rico em Licopeno no Cultivo de Células de *Drosophila melanogaster* S2

4.3.1. Atividade Citotóxica nas Células S2

O estudo da citotoxicidade de novos materiais representa o primeiro estágio na avaliação da atividade de compostos com potencial para aplicações biológicas. Este tipo de estudo vem sendo empregado nas etapas de pré-seleção para detectar se o material em questão provoca a morte das células ou resulta outros efeitos negativos nas funções celulares, ou ainda se estimula o bom desempenho celular.

Foi realizado um estudo preliminar com o extrato obtido a 80 °C e 350 bar solubilizado em DMSO, visto que maior rendimento em licopeno foi obtido nesta condição.

Os resultados obtidos para este ensaio são mostrados no Anexo C (Figuras C1 e C2 e Tabela C1). Este extrato não apresentou efeito satisfatório, mostrando atividade citotóxica nas maiores concentrações. Um novo ensaio foi então realizado com o intuito de testar o THF como veículo liberador de licopeno, além do DMSO, mas utilizando-se o extrato rico em licopeno obtido por extração supercrítica a 40°C e 350 bar, que apresentava maior atividade antioxidante com relação ao seqüestro de radicais livres e também de oxigênio singlete, visto que tal efeito era desejado nas células, e não atividades diminutas conforme se observou para o extrato obtido a 80 °C e 350 bar que havia sido utilizado no ensaio preliminar.

O THF tem sido utilizado em estudos de cultura de células para elucidar os mecanismos de ação do licopeno (Bertram *et al.* 1997; Conney *et al.* 1993, Huang *et al.* 2005; Tang *et al.* 2005; Yeh *et al.* 2005), e por esta razão foi selecionado para este estudo além do DMSO.

O estudo do efeito citotóxico do extrato dissolvido nos solventes DMSO e THF e subsequentemente diluído em meio de cultura a várias concentrações de células de *Drosophila melanogaster* S2 foi realizado a partir da análise da viabilidade das culturas após distintos períodos pelo método do MTT. Os resultados estão indicados na Figura 4.11. A curva de calibração obtida para a análise da viabilidade pelo método do MTT é apresentada no Anexo C (Figura C3) e os dados obtidos mostram uma adequada regressão linear na faixa de concentrações avaliada para a linhagem celular analisada.

A porcentagem de inibição do crescimento celular atribuída exclusivamente ao licopeno (descontando-se, portanto, o efeito do DMSO e do THF isolados) foi calculada e está indicada na Tabela 4.7 para todas as concentrações testadas.

Conforme se observa na Figura 4.11, na maioria das diluições testadas os solventes isolados apresentaram maior citotoxicidade que quando em conjunto com o licopeno, o que aponta já por si um efeito protetor do licopeno. O extrato rico em licopeno dissolvido em DMSO mostrou toxicidade significativa apenas na diluição de 1/40 (0,364 mg/mL) nos períodos de exposição de 24 e 72 horas. Nas outras concentrações com frequência foram observados valores de inibição negativos (representados na Tabela 4.7 como < 0,0), o que sugere um efeito discreto de estimulação ao crescimento das células resultante da adição de

licopeno, maior que da citotoxicidade advindo dos solventes. Esta observação aponta, por exemplo, para outras potenciais aplicações do licopeno além da pretendida no presente trabalho, como a sua utilização em protocolos de congelamento e/ou descongelamento de células preservadas por criogenia em conjunto com DMSO como agente crioprotetor.

O DMSO, apesar de ser ele próprio citotóxico a altas concentrações, é bastante utilizado como agente crioprotetor e para veiculação de drogas em ensaios de citotoxicidade. O efeito citotóxico do DMSO pode estar relacionado com sua grande capacidade de transporte e difusão em membranas, sendo esta uma importante propriedade deste solvente, que poderia ter favorecido a maior penetração deste composto no interior das células, provocando assim citotoxicidade acentuada.

Segundo Rand-Luby *et al.* (1996), muitas substâncias podem ser mais facilmente transportadas através de membranas biológicas quando associadas ao DMSO. A temperatura de cultivo (28°C) também pode ter influenciado os altos valores de toxicidade do DMSO, visto que Yankah *et al.* (1995) observaram efeitos tóxicos deste solvente a temperaturas menores que 50°C.

O comportamento de estímulo ao crescimento das células S2 também foi verificado em várias concentrações de extrato rico em licopeno solubilizado em THF. Os resultados indicam que o extrato rico em licopeno dissolvido em THF apresenta menor efeito citotóxico durante as primeiras 48 horas. Após isso, maior poder citotóxico às células S2 foi observado quando da dissolução do licopeno em THF, especialmente na mesma concentração em que o extrato rico em licopeno dissolvido em DMSO apresentou maior toxicidade.

Uma das desvantagens do THF é que ele oxida prontamente o meio de cultura, o que pode levar à instabilidade do licopeno, resultando em citotoxicidade (Huang *et al.* 2005; Tang *et al.* 2005; Yeh *et al.* 2005). Em adição, licopeno dissolvido em THF tem baixa associação celular, fornecendo resultados com alto desvio padrão (Shahrzad *et al.* 2002).

A análise citotóxica do extrato rico em licopeno dissolvido em DMSO ou THF mostrou que a diluição de 1/40 (0,364 mg/mL) é citotóxica para ambos os solventes, efeito este pronunciado após 72 horas de cultivo, sendo então selecionada a utilização de concentrações abaixo desta ns próximos ensaios realizados.

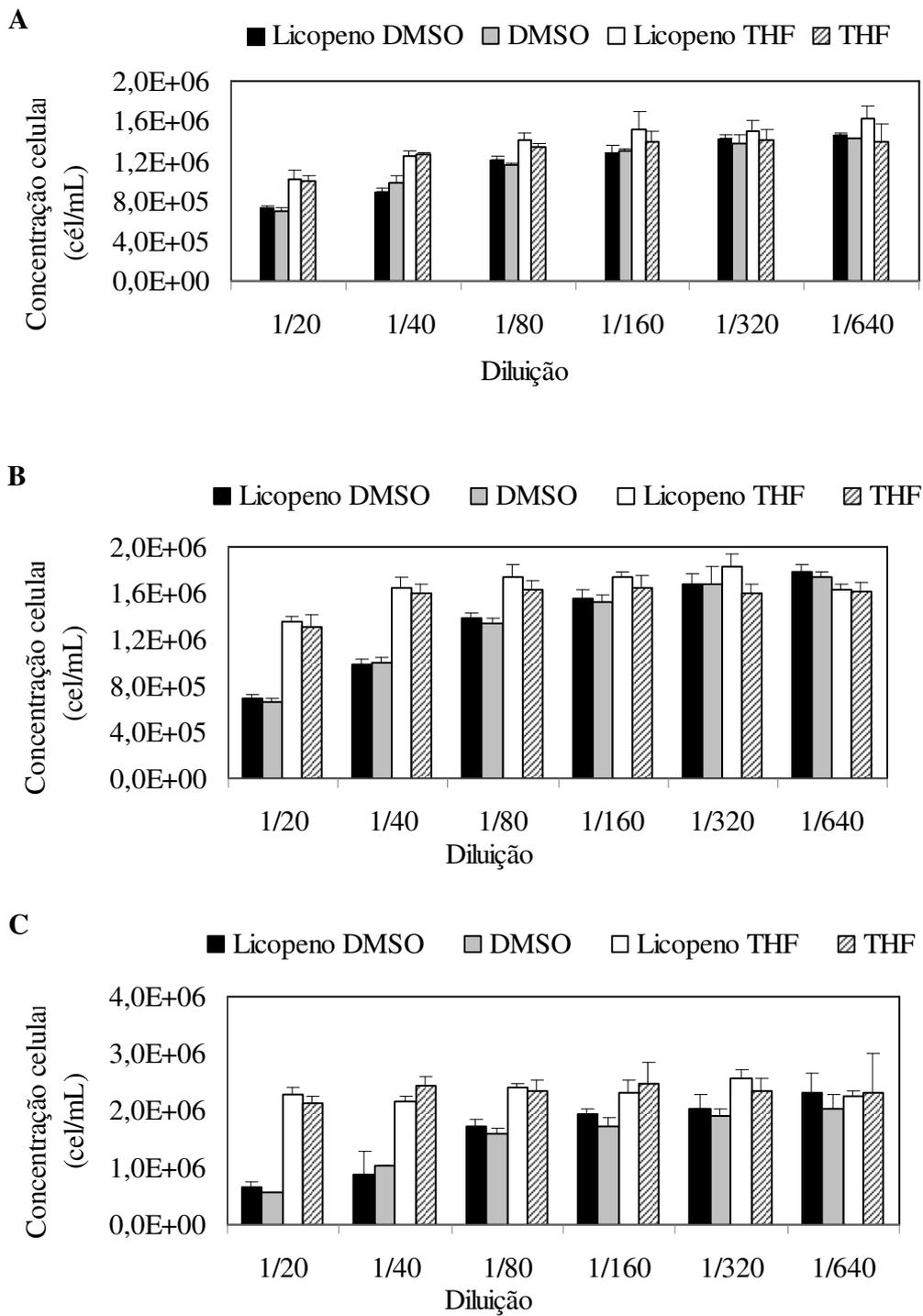


Figura 4.11 - Inibição da proliferação das células S2 expostas aos solventes DMSO e THF e ao licopeno dissolvido nestes solventes após 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas.

Tabela 4.7 – Inibição do crescimento celular de células S2 em contato com licopeno em diferentes solventes por diversos períodos (n = 3).

Diluição	Concentração de Licopeno (mg/mL)	Grau de Inibição (%)					
		24 horas		48 horas		72 horas	
		DMSO	THF	DMSO	THF	DMSO	THF
1/640	0,023	< 0,0	< 0,0	< 0,0	< 0,0	< 0,0	2,3
1/320	0,045	< 0,0	< 0,0	0,2	< 0,0	< 0,0	< 0,0
1/160	0,091	0,4	< 0,0	< 0,0	< 0,0	< 0,0	7,2
1/80	0,182	< 0,0	< 0,0	< 0,0	< 0,0	< 0,0	< 0,0
1/40	0,364	6,6	1,1	0,4	< 0,0	6,2	12,6
1/20	0,728	< 0,0	< 0,0	< 0,0	< 0,0	< 0,0	< 0,0

4.4. Avaliação do Potencial Antiapoptótico dos Extratos de Licopeno

Para avaliar o potencial antiapoptótico do extrato rico em licopeno, obtidos por extração supercrítica a 40 °C e 350 bar, nas culturas de células de *Drosophila melanogaster* S2 foram realizadas análises de microscopia de fluorescência e de citometria de fluxo.

4.4.1. Efeitos na Cinética de Crescimento Celular

Foram realizadas duas cinéticas de crescimento celular para avaliar o efeito da adição do licopeno disperso em DMSO ou THF no cultivo de células de *Drosophila melanogaster* S2.

No primeiro ensaio as células foram inoculadas em frascos Schott com $5,0 \times 10^5$ células viáveis/mL em fase exponencial, com agitação de 100 rpm e 28°C. O licopeno foi adicionado ao meio de cultura, no início do cultivo, na concentração de 0,182 mg/mL, concentração esta que não mostrou citotoxicidade às células S2, de acordo com os

resultados discutidos anteriormente. Os ensaios foram realizados em triplicata, e a concentração e a viabilidade celular foram analisadas. Os resultados estão apresentados nas Figuras 4.12 e 4.13.

As células que receberam o extrato rico em licopeno disperso em DMSO apresentaram crescimento mais lento que o mostrado pelo ensaio controle. Houve razoável proximidade nos valores máximos de concentração celular para o ensaio controle e para as células cultivadas com extrato rico em licopeno disperso em DMSO. As células cultivadas com THF apresentaram concentração celular muito próxima da do inóculo, que praticamente não variou. Não se observou neste ensaio a ocorrência de uma fase exponencial de crescimento, e após 48 horas de cultivo, conforme mostra a Figura 4.13 a viabilidade começou a decair, enquanto que o ensaio controle e o contendo o extrato rico em licopeno disperso em DMSO apresentaram viabilidade maior do que 90% durante todo o cultivo.

A concentração celular máxima obtida para as células cultivadas na ausência de extratos ativos (controle) e na presença de extrato rico em licopeno disperso em DMSO e em THF foi de cerca de $4,8 \times 10^6$ células viáveis/mL, $3,30 \times 10^6$ células viáveis/mL e $3,4 \times 10^5$ células viáveis/mL no nono, décimo e sexto dia de cultura, respectivamente.

Observou-se uma fase lag com duração de um dia para o ensaio controle, e quatro dias para o extrato rico em licopeno disperso em DMSO, como pode ser visto na Figura 4.12. A fase exponencial no ensaio controle durou aproximadamente cinco dias, e para as células cultivadas com extrato rico em licopeno disperso em DMSO a duração foi de cerca de seis dias.

As taxas máximas de crescimento celular foram de $0,0125 \text{ h}^{-1}$ para o controle e $0,0065 \text{ h}^{-1}$ para o extrato rico em licopeno disperso em DMSO, com tempos de duplicação iguais a 55,30 h e 106,72 h, respectivamente.

Apesar de o THF ser utilizado para estudos de cultura de células, o seu uso no cultivo de células S2 não apresentou efeito satisfatório. Destaca-se que o ensaio de citotoxicidade para esta amostra resultou em inibição após 72 horas de cultivo celular. Comportamento similar foi verificado neste ensaio, no qual a viabilidade das células passou a diminuir já após 48 horas de cultivo.

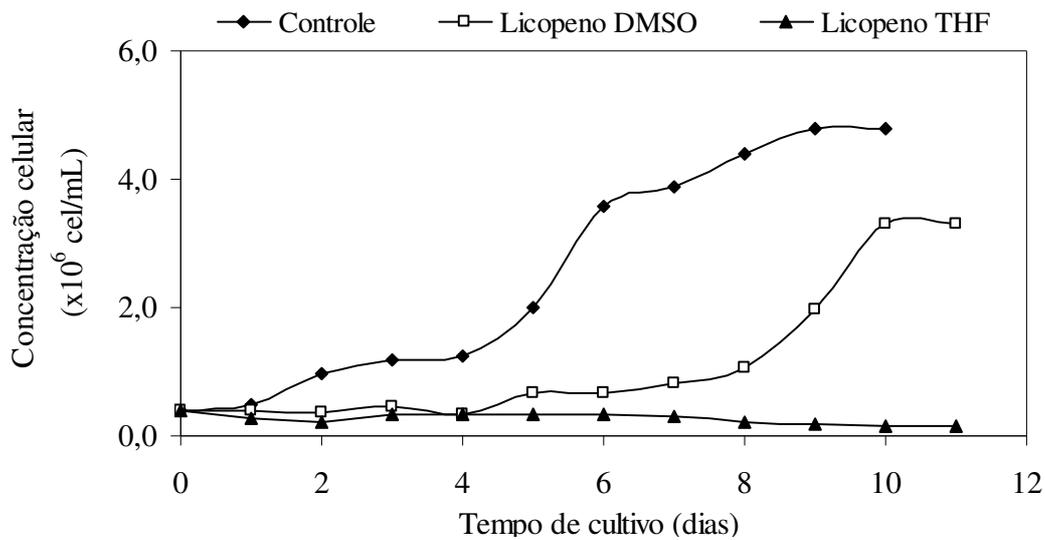


Figura 4.12 - Cinética de crescimento das células *Drosophila melanogaster* S2, com inóculo de concentração igual a $5,0 \times 10^5$ células viáveis/L em meio Sf 900 II, na presença ou não de extrato rico em licopeno solubilizado em DMSO ou THF.

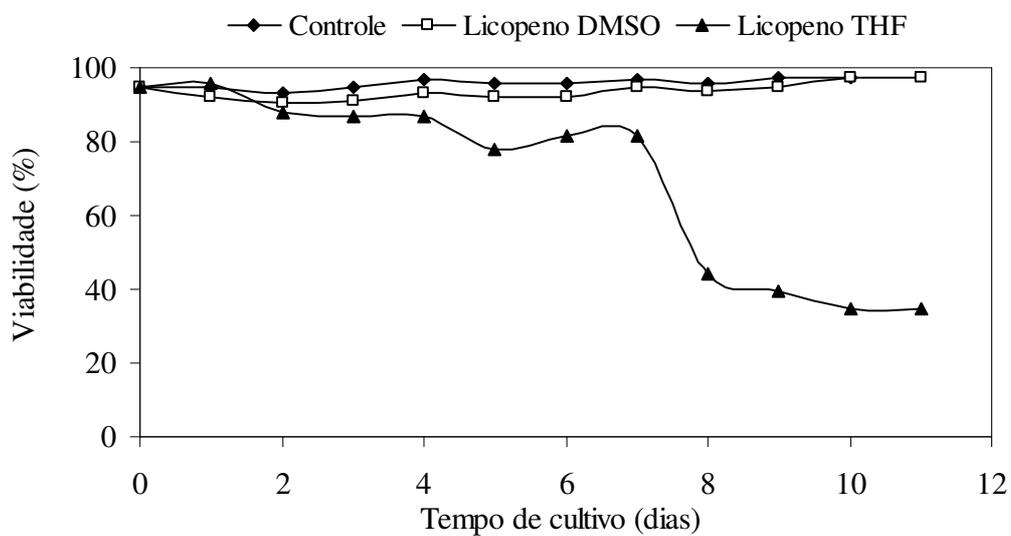


Figura 4.13 - Viabilidade das células *Drosophila melanogaster* S2, com inóculo de concentração igual a $5,0 \times 10^5$ células viáveis/L em meio Sf 900 II, na presença ou não de extrato rico em licopeno solubilizado em DMSO ou THF.

Em razão da baixa concentração celular em todas as amostras, comparada com as concentrações obtidas por Batista (2007) e Galesi (2007) nas mesmas condições

experimentais do controle, iguais a $1,5 \times 10^7$ células viáveis/mL e $2,08 \times 10^7$ células viáveis/mL respectivamente, foi realizado um novo ensaio cinético, empregando um inóculo com o dobro da concentração, mas sem incluir o extrato rico em licopeno dissolvido em THF, visto que este extrato resultou em elevada citotoxicidade às células no cultivo anterior. Nesta segunda cinética também foi estudado o efeito isolado do solvente DMSO. Os ensaios foram realizados em duplicata, e a concentração, viabilidade celular e a prevenção da apoptose foram analisadas. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 4.14 e 4.15.

Com relação ao crescimento celular, a linhagem S2 continuou apresentando desempenho pouco satisfatório, apesar da facilidade do cultivo deste tipo célula relatada na literatura. Analisando os resultados mostrados nas Figuras 4.14 e 4.15, observa-se que as células cultivadas com extrato rico em licopeno disperso em DMSO apresentaram um discreto aumento na viabilidade celular com relação às outras duas amostras (controle e solvente DMSO), sendo que no 18º dia de cultivo, estas células ainda apresentavam viabilidade acima de 90%.

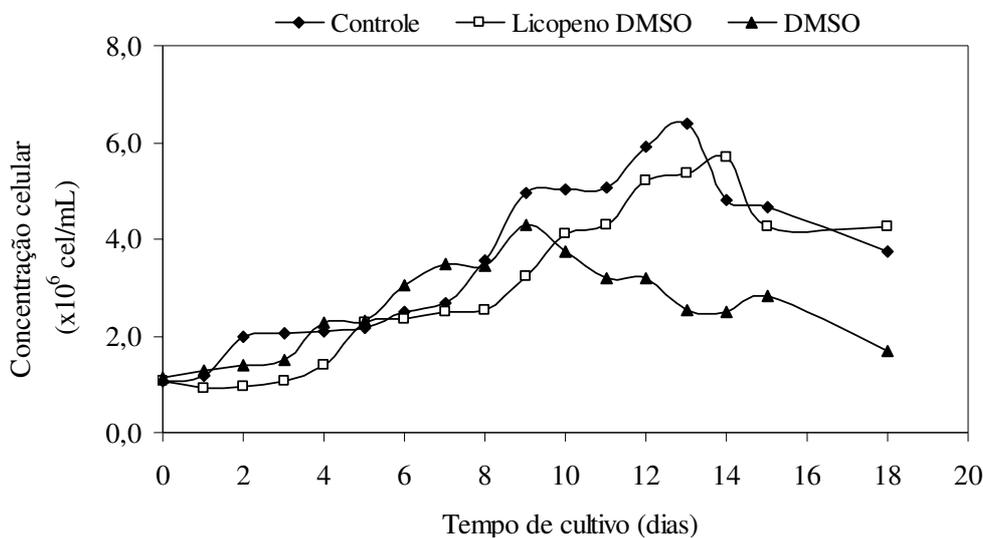


Figura 4.14 – Cinética de crescimento celular para as células *Drosophila melanogaster* S2, com inóculo de concentração igual a $1,0 \times 10^6$ células viáveis/L na presença ou não de extrato rico em licopeno solubilizado em DMSO, ou de DMSO somente.

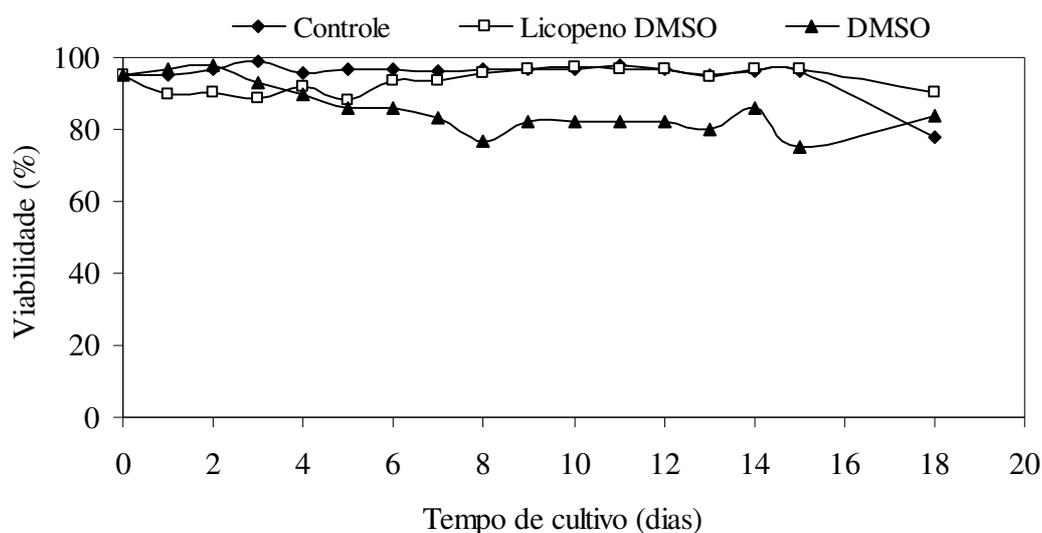


Figura 4.15 - Viabilidade das células *Drosophila melanogaster* S2, com inóculo de concentração igual a $1,0 \times 10^6$ células viáveis/L na presença ou não de extrato rico em licopeno solubilizado em DMSO.

Essa maior viabilidade pode ser conseqüência do crescimento celular mais lento nesta amostra, cujo máximo de $5,70 \times 10^6$ células/mL foi obtido no 14º dia (336 horas), causando assim uma maior disponibilidade de nutrientes e resultando em um período maior de elevada viabilidade. Entretanto, os resultados de viabilidade celular foram determinados empregando azul de Trypan, o qual indica apenas o número de células vivas e mortas, sem identificar se estão de fato viáveis ou não.

A máxima concentração celular obtida no controle foi de $6,40 \times 10^6$ células/mL no 13º (312 horas) dia de cultivo. Já para o solvente DMSO, a concentração celular máxima foi de $4,29 \times 10^6$ células/mL no 9º dia (216 horas).

As taxas máximas de crescimento celular foram de $0,0060 \text{ h}^{-1}$ para o controle, $0,0062 \text{ h}^{-1}$ para o extrato rico em licopeno disperso em DMSO e $0,0063 \text{ h}^{-1}$ para o solvente DMSO, com tempos de duplicação iguais a 116,47 h; 112,34 h e 110,67 h, respectivamente.

4.4.2. Avaliação da apoptose por microscopia de fluorescência

Durante o ensaio de análise do comportamento cinético ao longo do crescimento celular, foram também coletadas amostras para avaliação do efeito antiapoptótico do extrato rico em licopeno disperso em DMSO. Os resultados obtidos são mostrados nas Figuras 4.16 a 4.20.

Observa-se na Figura 4.16 que, após 9 dias as células contendo extrato rico em licopeno disperso em DMSO apresentaram maior porcentagem de células viáveis não apoptóticas. Antes deste período praticamente não se observou diferença entre o controle e as amostras contendo licopeno dissolvido em DMSO. Com relação às células viáveis apoptóticas ilustradas na Figura 4.17, a porcentagem de células neste estágio foi menor para as células contendo extrato rico em licopeno disperso em DMSO praticamente durante todo o cultivo, o que significa que, mesmo sendo pequena, houve uma proteção às células. Dessa forma o potencial antiapoptótico do licopeno foi demonstrado.

Analisando a Figura 4.18 observa-se que no cultivo contendo extrato rico em licopeno disperso em DMSO a porcentagem de células não viáveis apoptóticas manteve-se maior que o ensaio controle na maior parte dos dias, porém, a porcentagem de células necróticas foi menor, a partir do quinto dia, como pode ser visto na Figura 4.19, o que pode indicar também um possível efeito antinecrótico. Na Figura 4.20 são mostradas as baixas frações observadas de células livres de cromatina, entretanto estes resultados não foram conclusivos, visto que não houve correlação clara entre as amostras.

O aspecto típico das células S2 durante o cultivo para análise da apoptose pode ser visualizado na Figura 4.21.

De acordo com os resultados, observa-se que o extrato rico em licopeno disperso em DMSO exerceu um efeito protetor às células S2, mantendo as células em estado viável por tempo maior.

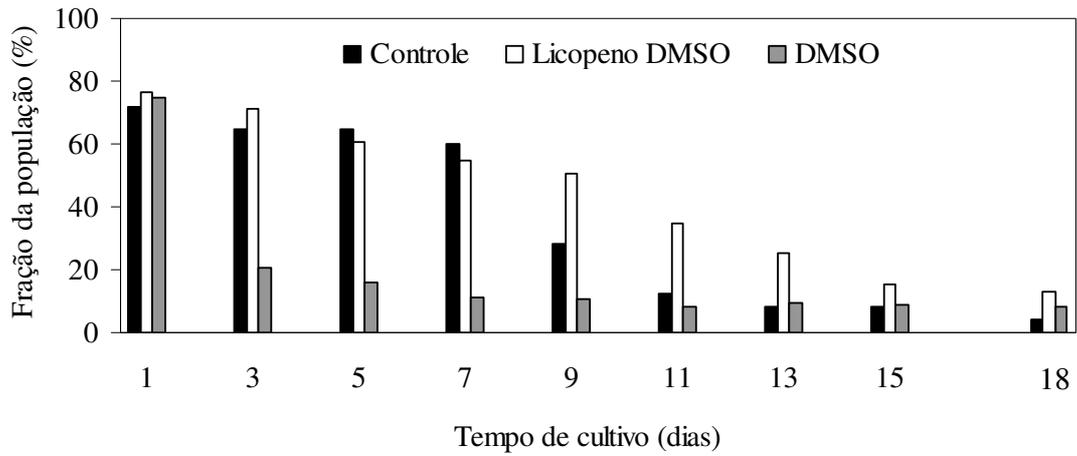


Figura 4.16 – Perfil de células viáveis não apoptóticas (VNA) no ensaio cinético.

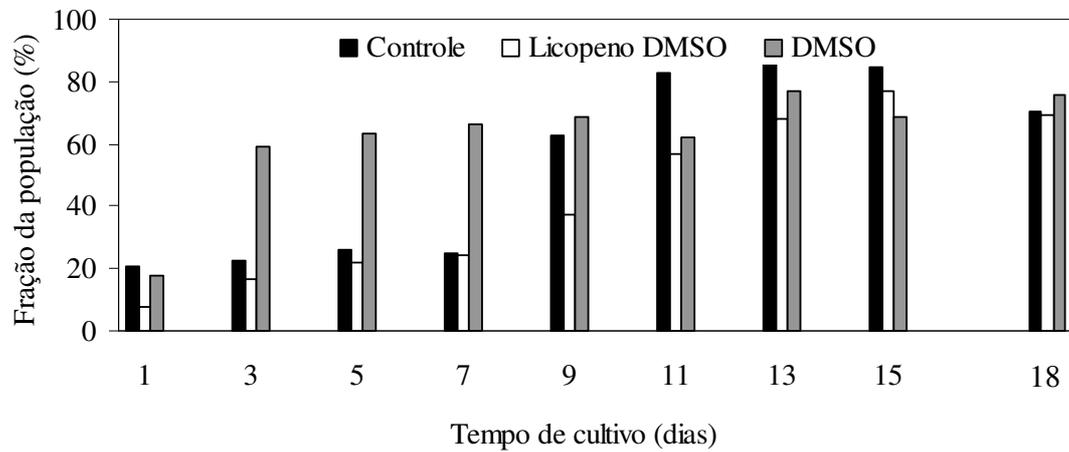


Figura 4.17 – Perfil de células viáveis apoptóticas (VA) no ensaio cinético.

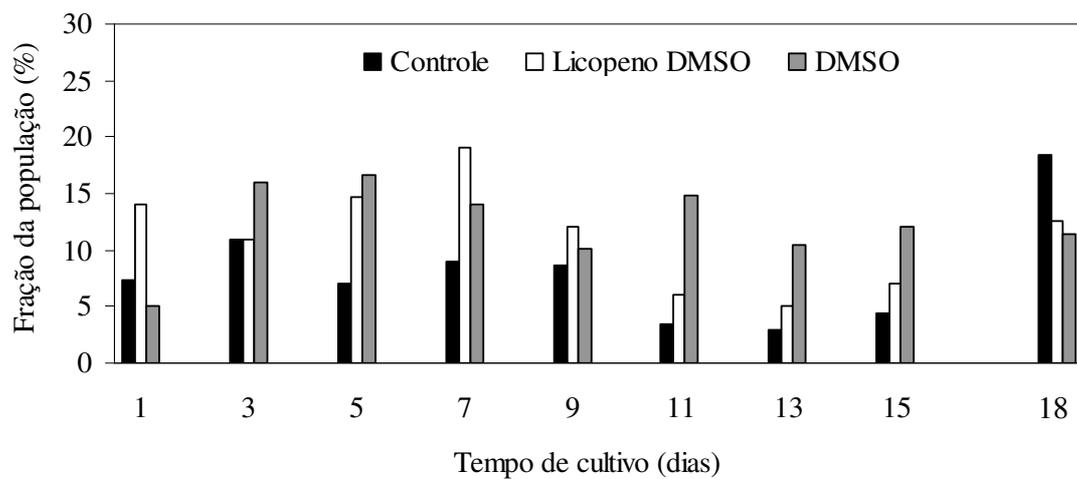


Figura 4.18 – Perfil de células não viáveis apoptóticas (NVA) no ensaio cinético.

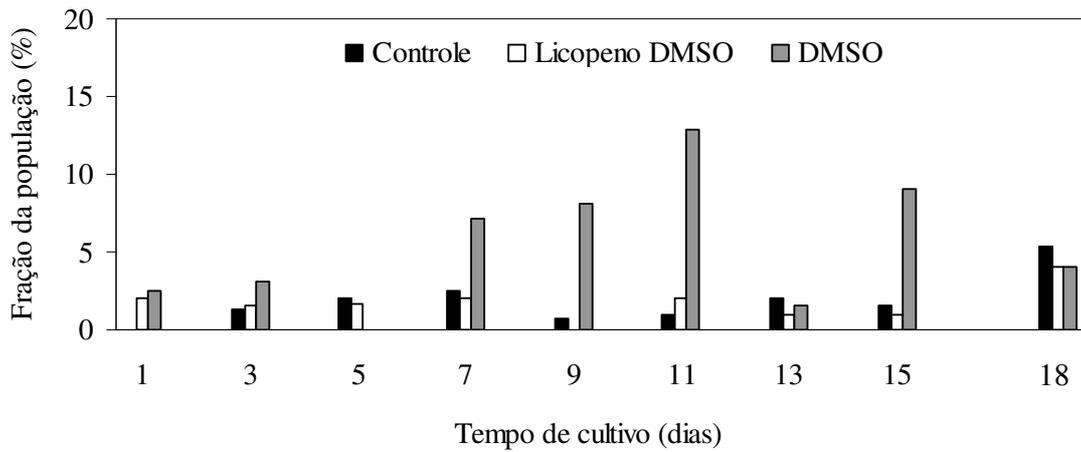


Figura 4.19 – Perfil de células não viáveis necróticas (NEC) no ensaio cinético.

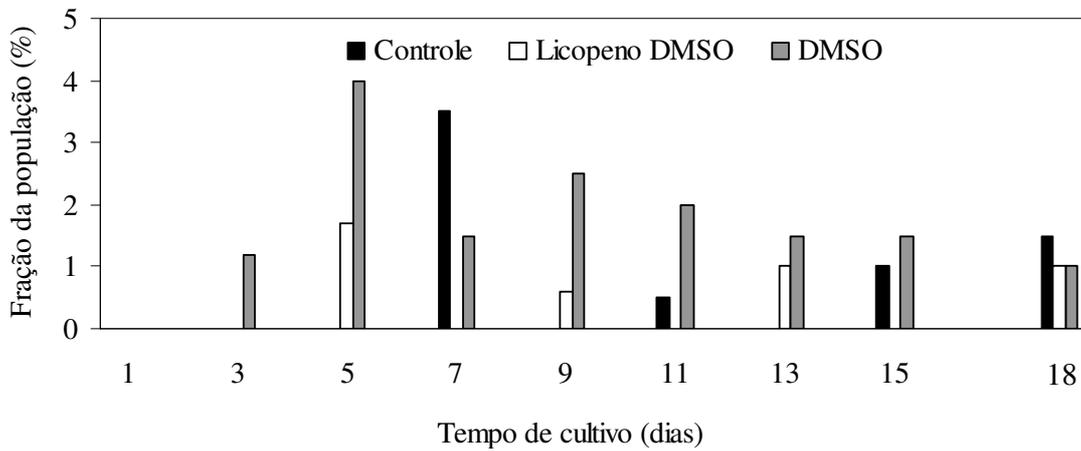


Figura 4.20 – Perfil de células livres de cromatina (LC) no ensaio cinético.

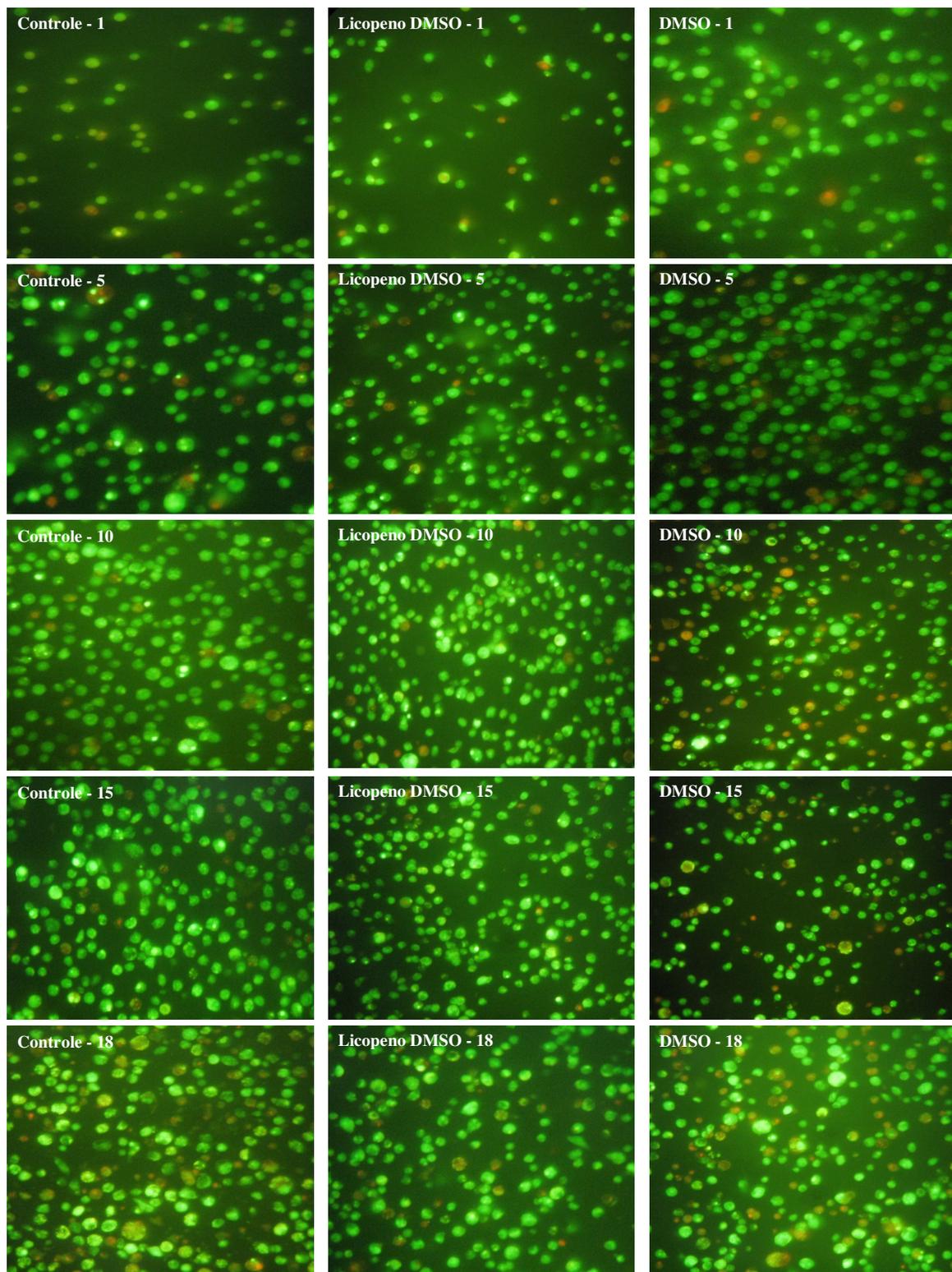


Figura 4.21 – Aspecto típico das células de *Drosophila melanogaster* S2 cultivadas com e sem adição de licopeno e DMSO durante o estudo de comportamento durante o crescimento celular nos dias 1, 5, 10, 15 e 18.

4.4.3. Estudo da apoptose por citometria de fluxo

As células S2 foram incubadas por 16 horas com e sem a adição do agente apoptótico H_2O_2 e de extrato rico em licopeno dissolvido em DMSO. Após o período de incubação, os resultados obtidos mostraram que as células S2 no ensaio controle ocuparam faixas relativamente largas de FSC e SSC conforme mostrado na Figura 4.22, provavelmente por serem células com tamanhos relativamente heterogêneos e com alta complexidade interna.

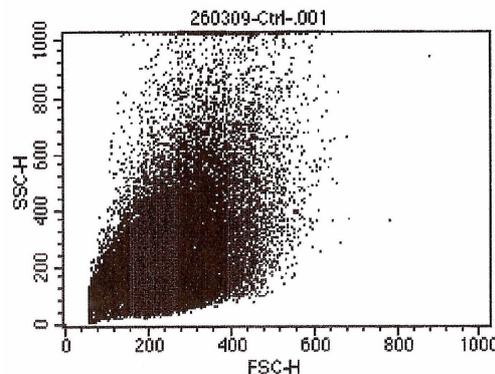


Figura 4.22 - Representação gráfica das características físicas das células de *Drosophila melanogaster* S2 determinadas por citometria de fluxo. A intensidade do espalhamento frontal (Forward Scatter Height, FSC-H) representa o tamanho das células e a do espalhamento lateral (Side Scatter Height, SSC – H) a complexidade interna.

Quando a célula inicia o processo de apoptose ela externaliza a fosfatidilserina, que está presente na porção interna da membrana citoplasmática de células ínteras. A proteína anexina V tem afinidade pela fosfatidilserina e, dessa forma, pode ser feita a marcação das células apoptóticas desde os estágios iniciais. Quanto maior a fluorescência, maior é a porcentagem de células apoptóticas. Na Figura 4.23 observam-se os histogramas das células S2 após 16 horas de cultivo.

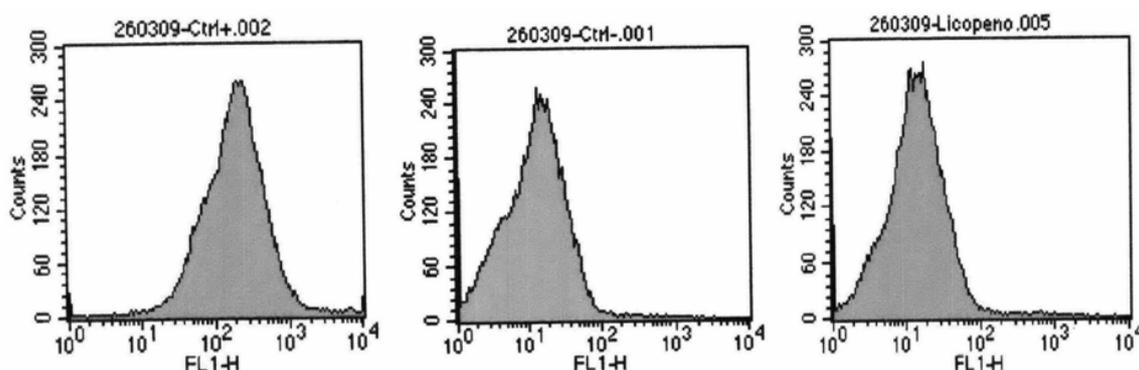


Figura 4. 23 – Histogramas obtidos por citometria de fluxo para avaliação do potencial anti-apoptótico do extrato rico em licopeno na cultura de células de *Drosophila melanogaster* S2. (A) controle positivo (células cultivadas na presença de 20 mM de H₂O₂); (B) controle negativo (células na ausência de H₂O₂ e de extrato); (C) células na presença de 20 mM de H₂O₂ e de extrato rico em licopeno disperso em DMSO (0,182 mg/mL).

Os índices médios de fluorescência para os controles negativo e positivo e para as células cultivadas com extrato rico em licopeno são apresentados na Tabela 4.8. A população de células com adição de peróxido de hidrogênio e cultivadas na presença do extrato rico em licopeno disperso em DMSO mostrou perfil e valor médio de intensidade de fluorescência próximos aos apresentados pela cultura do controle negativo.

Tabela 4.8 – Análise das células S2 quanto à apoptose

Amostra	Concentração (células/mL)	Fluorescência Média *	Morte por apoptose(%)
Controle positivo	1,8 x 10 ⁶	269,18	100
Controle negativo	1,6 x 10 ⁶	17,6	6,5
Extrato rico em licopeno	1,5 x 10 ⁶	20,79	7,7

*: média da fluorescência proporcional à morte por apoptose

Assim, conclui-se também por esta metodologia que o extrato rico em licopeno mostrou efeito protetor nas células S2, tendo potencial de uso também no cultivo de outras células em condições nas quais intenso estresse oxidativo se faz presente.

5. CONCLUSÕES

O rendimento da extração supercrítica é melhorado com a substituição parcial da água contida no suco de tomate por etanol antes da extração.

A extração de licopeno a partir do suco de tomate pela substituição parcial da água por etanol permitiu obter rendimento máximo de licopeno (76,9%) na condição de 80°C e 350 bar, observando-se que apenas a temperatura apresentou efeito significativo.

A análise por CLAE indicou que o licopeno é provavelmente o principal composto presente no extrato obtido, com picos de 82,7% em média, e tempo de retenção de aproximadamente 14 minutos. A fase móvel metanol:THF (90:10 v/v) mostrou-se como a mais eficiente na separação dos picos, dando indicativo das frações de licopeno nas formas *cis* e *trans*.

O estudo da atividade antioxidante mostrou que o extrato rico em licopeno obtido a 40°C e 350 bar apresentou maior capacidade antioxidante pelos dois métodos testados, seqüestro de radicais livres (DPPH) e de oxigênio singlete (rubreno), com valores de TEAC de 12,7 e 61,3 mM/g de amostra, respectivamente.

A adição do extrato rico em licopeno disperso em DMSO obtido à 40°C e 350 bar mostrou, através de ensaios *in vitro*, toxicidade às células S2 na concentração de 0,364 mg/mL, e, quando dissolvido em THF mostrou potencial mais tóxico nesta mesma concentração, após 72 horas de cultivo. O extrato rico em licopeno foi capaz de proteger as células dos efeitos deletérios do DMSO e do THF.

A adição do extrato rico em licopeno obtido à 40°C e 350 bar à cultura agitada de células de *Drosophila melanogaster* S2 provocou pequenas alterações na cinética de crescimento celular quando o extrato foi dissolvido em DMSO na concentração de 0,182 mg/mL, aumentando discretamente a viabilidade celular, mas com menor máximo de concentração celular. Entretanto, quando este extrato foi dissolvido em THF, a toxicidade observada foi maior, chegando a inibir o crescimento celular.

Na análise por fluorescência observou-se que o extrato rico em licopeno disperso em DMSO exerceu efeito protetor às células S2, mantendo as células viáveis por um período maior.

Nas análises por citometria de fluxo, as células de *Drosophila melanogaster* S2 ocuparam faixas relativamente largas de FSC e SSC, provavelmente por serem células com tamanhos relativamente heterogêneos e com alta complexidade interna. Os resultados dos ensaios de citometria mostraram o potencial antiapoptótico do extrato rico em licopeno obtido à 40°C e 350 bar na cultura das células de *Drosophila melanogaster* S2. O extrato apresentou elevada atividade antiapoptótica, protegendo as células do agente apoptótico externo (H₂O₂), com apenas 7,7% de morte por apoptose comparado com o controle positivo (100%).

5.1. Sugestões para trabalhos futuros

Sugere-se a partir dos resultados apresentados nesta dissertação:

1. Realizar novas caracterizações por CLAE, visando determinar de forma mais precisa os picos referentes às frações *cis* e *trans* do licopeno e identificar outros picos representativos das amostras.
2. Analisar novas concentrações do extrato rico em licopeno para determinar a concentração tóxica às células S2 no intervalo de 0,364 mg/mL e 0,182 mg/mL.
3. Dar continuidade ao estudo do efeito da adição do extrato rico em licopeno em células S2 por citometria de fluxo.
4. Realizar a análise do comportamento metabólico das células S2 na presença do extrato contendo licopeno, principalmente com relação ao consumo de glicose e glutamina e à produção de lactato e amônio.
5. Estudar o efeito da temperatura na degradação do licopeno.
6. Testar a extração supercrítica utilizando tomate in natura na presença de etanol.
7. Comparar os resultados da atividade antiapoptótica com licopeno padrão.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abushita, A. A.; Daood, H. G.; Biacs, P. A. Change in carotenoids and antioxidant vitamins in tomato as a function of varietal and technological factors. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 2075-2081, 2000.
- Agathos, S. N. Production scale insect cell culture. *Biotechnol. Adv.*, **9**, 51-68, 1991.
- Agostini, M.; Di Marco, B.; Delfino, D.V. Oxidative stress and apoptosis in immune diseases. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, **15**, 157-164, 2002.
- Alves, P. M. M.; Carrondo, M. J. T.; Cruz, P. E. Introdução à Tecnologia de Cultivo de Células Animais, In: *Tecnologia do Cultivo de Células Animais de Biofármacos a Terapia Gênica*, Moraes, A.M.; Augusto, E.F.P.; Castilho, L.R., Editora Roca Ltda., 03, 2008.
- Arab, L.; Steck, S. Lycopene and Cardiovascular Disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, **71** (suplemento), 1691S-1695S, 2000.
- ATCC, Disponível em < <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL1963&Template=cellBiology>> acesso em junho de 2009.
- ATCC, Disponível em < <http://www.atcc.org/Attachments/2273.pdf>> acesso em março de 2008.
- Augusto, E. F. P.; Oliveira, M. S. Processos com células animais. In: *Biotecnologia Industrial, Processo Fermentativos e Enzimáticos*, São Paulo, Editora Edgard Blucher LTDA., **3**, 548, 570-571, 2001.
- Barba, A. I. O.; Hurtado, M. C.; Mata, M. C. S.; Ruiz, F. V.; Tejada, M. L. S Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β -carotene in vegetables. *Food Chem.*, **95**, 328-336, 2006.
- Batista, F. R. X, Formulação de Meio de Cultura Livre de Proteínas Animais para Células de *Drosophila melanogaster* Produtoras da Glicoproteína G do Vírus da Raiva. Tese (Doutor em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, 2007.

- Baysal, T.; Ersus, S.; Starmans, D. A. J. Supercritical CO₂ extraction of β-carotene and lycopene from tomato paste waste. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5507-5511, 2000.
- Benting, J.; Lecat, S.; Zacchetti, D.; Simons, K. Protein Expression in Drosophila Schneider Cells. *Anal. Biochem.*, **278**, 59-68, 2000.
- Blandini, F.; Mangiagalli, A.; Cosentino, M.; Marino, F.; Samuele, A.; Rasini, E.; Fancellu, R.; Martignoni, E.; Riboldazzi, G.; Calandrella, D.; Frigo, G. M.; Nappi, G. Peripheral markers of apoptosis in Parkinson's disease: the effect of dopaminergic drugs. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1010**, 675– 678, 2003.
- Bramley, P. M. Is lycopene beneficial to human health? *Phytochem.* **54**, 233-236, 2000.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluated Antioxidant Activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **28**, 25-30, 1995.
- Brighty, D. W.; Rosenberg, M. A Cis-Acting Repressive Sequence that Overlaps the Responsive Element of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Regulates Nuclear Retention of *env* mRNAs Independently of Known Splice Signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 8314-8318, 1994.
- Britton, G. General carotenoid methods. *Methods Enzymol.*, **111**, 113-149, 1985.
- Brunner, G. Gas Extraction. An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes, *Springer*, 1994.
- Butler, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **68**, 283-291, 2005
- Cadoni, E.; Giorgi, M.R.; Medda, E.; Poma, G. Supercritical CO₂ extraction of lycopene and β-carotene from ripe tomatoes. *Dyes Pigments*, **44**, 27-32, 2000.
- Cantuti-Castelvetri, I.; Shukitt-Hale, B.; Joseph, J. Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. *International J Develop Neurosci*, **18**, 367-381, 2000.
- Capasso, F. Abstracts from a scientific meeting on natural antioxidants: current status and future prospects organized by the Italian society of herbal science, 3 December 2005, Naples, Italy. *Phytother. Res.*, **20**, 322 - 332, 2006.
- Caris-Veyrat, C.; Amiot, M.J.; Tyssandier, V.; Grasselly, D.; Buret, M.; Mikolajczak, M.;

- Guilland, J.C.; Bouteloup-Demange, C.; Borel, P. Influence of organic versus conventional agricultural practice on the antioxidant microconstituent content of tomatoes and derived purees; consequences on antioxidant plasma status in humans, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 6503-6509, 2004.
- Celiktas, O. Y.; Bedir, E.; Sunkan, F. V. In vitro antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide. *Food Chem.*, **101**, 1457 - 1464, 2007.
- Cha, H. J.; Shin, H. S.; Lim, H. J.; Cho, H. S.; Dalal, N. N.; Pham, M. Q.; Bentley, W. E. Comparative production of human interleukin-2 fused with green fluorescent protein in several recombinant expression system. *Biochem. Eng. J.*, **24**, 225-233, 2005.
- Chasse, G.A.; Mak, M.L.; Deretey, E.; Farkas, I.; Torday, L.L.; Papp, J.G.; Sarma, D.S.R.; Agarwal, A.; Chakravarthi, S.; Agarwal, S.; Rao, A.V.; An *ab Initio* computational study on selected lycopene isomer. *J. Mol. Struct.-Theochem.*, **571**, 27-37, 2001.
- Chen, N.; Gong, J.; Chen, X.; Meng, W.; Huang, Y.; Zhao, F.; Wang, L.; Zhou, Q. Caspases and inhibitor of apoptosis proteins in cutaneous and mucosal melanoma: expression profile and clinicopathologic significance. *Hum. Pathol.*, **40**, 950-956, 2009.
- Ciurlia, L.; Bleve, M. Rescio, L. Supercritical carbon dioxide co-extraction of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* L.) and hazelnuts (*Corylus avellana* L.): A new procedure in obtaining a source of natural lycopene. *J. Supercrit. Fluids*, **49**, 338-344, 2009.
- Clifford, T. Fundamentals of Supercritical Fluids, Oxford University Press: New York, EUA, 210, 1999.
- Clinton, S.K. Lycopene: Chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutr. Rev.*, **53**, 35-51, 1998.
- Collins, A.R.; Olmedilla, B.; Southon, S.; Granado, F.; Duthie, S.J. Serum carotenoids and oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis*, **19**, 2159-2162, 1998.
- Cotter, T.G.; Al-Rubeai, M. Cell death (apoptosis) in cell culture systems. *TIBTECH*, **13**, 150-155, 1995.
- Dauksas, E.; Venskutonis, P.R.; Sivik, B.; Nillson, T. Effect of fast CO₂ pressure changes

- on the yield of lovage (*Levisticum officinale* Koch.) and celery (*Apium graveolens* L.) extracts, *J. Supercrit. Fluids*, **22**, 20–2101, 2002.
- De Ritter, E.; Purcell, A.E. In: Bauernfeind, J.C. Carotenoids as Colorant an Vitamin A Precursos, Academic Press, London, New York, 815, 1981.
- Dewanto, V.; Wu, X.; Adom, K.K.; Liu, R.H. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3010-3014, 2002.
- Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys*, **274**, 532-538, 1989.
- Dickson, A.J. Apoptosis regulation and its applications to biotechnology. *TIBTECH*, **16**, 339-342, 1998.
- Dimitrios, B. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends Food Sci. Tech.*, **17**,. 505 - 512, 2006.
- Djeridane, A.; Yousfi1, M.; Nadjemi, B.; Vidal, N.; Lesgards, J. F.; Stocker, P. Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol.*, **224**, n. 6, 801 – 809, 2007.
- Dorman, H. J. D.; Peltoketo, A.; Hiltunen, R.; Tikkanen M. J. Characterization of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chem.*, **83**, **2**, 255 - 262, 2003.
- Evan, G.; Littlewood, T. A Matter of Life and Cell Death. (Review) *Science*, **28**, 1317-1322, 1998.
- Fardelone, L. C., Branchi, B. A. O setor de biofármacos e as oportunidades para o Brasil. *Rev. FAE*, **9**, 29-38, 2006.
- Ferguson, L.R. Micronutrients, dietary questionnaires and cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **51**, 337-344, 1997.
- Fish, W.W.; Perkins-Veazie, P.; Collins, J.K. A quantitative assay for lycopene that utilizes reduced volumes of organic solvents, *J. Food Compos. Anal.*, **15**, 309-317, 2002.
- Flygare, J. A.; Vucic, D. Development of novel drugs targeting inhibitors of apoptosis. *Future Oncol.* **5**, 141-144, 2009.

- Freshney, R. I. *Animal Cell Culture. A Practical Approach.*, 2^o ed. Oxford University Press, p 329, 1992.
- Freshney, R.I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique.* New York, Wiley-Liss. 1994.
- Fuente, J.C.; Oyarzún, B.; Quezada, N.; del Valle, J.M. Solubility of carotenoid pigments (lycopene and astaxanthin) in supercritical carbon dioxide. *Fluid Phase Equilib.*, **247**, 90-95, 2006.
- Fuhrman, B.; Volkova, N.; Rosenblat, M.; Aviram, M. Lycopene synergistically inhibits LDL oxidation in combination with vitamin E, glabridin, rosmarinic acid, carnolic acid, or galic. *Antioxid. Redox Signal*, **2**, 491-505, 2000.
- Galesi, A. L. L., Cultivo de células de *Drosophila melanogaster* em diferentes formulações de meios de cultura livres de soro visando a produção da glicoproteína do vírus da raiva. Tese (Doutor em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, 2007.
- Galesi, A. L.; Aguiar, M. A.; Astray, R. M.; Augusto, E. F. P.; Moraes, A. M. Grow of recombinant *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cells producing rabies vírus glycoprotein in bioreactor employing serum-free médium. *Cytotechnology*, **57**, 73-81, 2008.
- Giovannucci, E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J. Natl. Canc. Inst.*, **91**, 317-331, 1999.
- Giovannucci, E.; Rimm, E.B.; Liu, Y.; Stampfer, M.J.; Willet, W.C. A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.*, **94**, 391-398, 2002.
- Gómez-Prieto, M.S.; Caja, M.M.; Herraiz, M.; Santa-Maria, G. J. Supercritical fluid extraction of *all-trans-Lycopene* from Tomato, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 3–7, 2003
- Goswami, J.; Sinskey, A.J.; Steller, H.; Stephanopoulos, G.N.; Wang, D.I.C. Apoptosis in batch cultures of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.*, **62**, 632–640, 1999.
- Green, D.R. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell*, **94**, 695–698, 1998.
- Griffiths, B. Products from animal cells. In: Butler, M. *Mammalian cell biotechnology: a*

- practical approach. Inglaterra, IRL Press, 207, 1991.
- Huang, H.; Yi, X.; Zhang, Y. Improvement of Vero cell growth in glutamate-based culture by supplementing ammoniagenic compounds. *Process Biochem.*, **41**, 2386-2392, 2006.
- Ikonomou, L., Schneider, Y.J., Agathos, S.N. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **6**, 1-20, 2003.
- Invitrogen, Drosophila Expression System For the stable expression and purification of heterologous proteins in Schneider 2 cells, disponível em <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/des_man.pdf>, acesso em junho de 2009.
- Ivey-Hoyle, M.; Rosenberg, M. Rev-Dependent Expression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp160 in *Drosophila melanogaster* Cells. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 6152-6159, 1990.
- Johansen, H., van der Straten, A., Sweet, R., Otto, E., Maroni, G., and Rosenberg, M. Regulated Expression at High Copy Number Allows Production of a Growth Inhibitory Oncogene Product in *Drosophila* Schneider Cells. *Genes Develop.*, **3**, 882-889, 1989.
- Johanson, K., Appelbaum, E., Doyle, M., Hensley, P., Zhao, B., Abdel-Meguid, S. S., Young, P., Cook, R., Carr, S., Matico, R., Cusimano, D., Dul, E., Angelichio, M., Brooks, I., Winborne, E., McDonnell, P., Morton, T., Bennett, D., Sokoloski, T., McNulty, D., Rosenberg, M., and Chaiken, I. Binding Interactions of Human Interleukin 5 with its Receptor α Subunit: Large Scale Production, Structural, and Functional Studies of *Drosophila*-Expressed Recombinant Proteins. *J. Biol. Chem.*, **270**, 9459-9471, 1995.
- Jorge, S. A. C.; Santos, A. S.; Spina, A.; Pereira, C. A. Expression of the hepatitis B virus surface antigen in *Drosophila* S2 cells. *Cytotechnology*, **57**, 51-59, 2008.
- Jubelt, B.; Lipton, H. L. Enterovirus infections, In: *Handbook for Clinical Neurology*, **12**: Viral Disease, R.R. McKendall, 308, 1989
- Kähkönen, M. P.; Hopia, A. I.; Vuorela, H. J.; Rauha, J-P.; Pihlaja, K.; Kujala, T. S.; Heinonen, M. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J. Agr. Food Chem.*, **47**, 3954 - 3962, 1999.

- Kirkpatrick, R. B., Ganguly, S., Angelichio, M., Griego, S., Shatzman, A., Silverman, C., and Rosenberg, M. Heavy Chain Dimers as well as Complete Antibodies are Efficiently Formed and Secreted from *Drosophila* Via a BiP-Mediated Pathway. *J. Biol. Chem.* **270**, 19800-19805, 1995.
- Kirkpatrick, R. B., Matico, R. E., McNulty, D. E., Strickler, J. E., and Rosenberg, M. An Abundantly Secreted Glycoprotein from *Drosophila melanogaster* is Related to Mammalian Secretory Proteins Produced in Rheumatoid Tissues and by Activated Macrophages. *Gene* **153**, 147-154, 1995.
- Koury, J. C.; Donangelo, C. M. Zinc, oxidative stress and physical activity. *Brazilian J Nutrition*, **16**, n. 4, 433 - 441, 2003.
- Krantz, D. E., and Zipursky, S. L. *Drosophila* Chaoptin, a Member of the Leucine-rich Repeat Family, is a Photoreceptor Cell-Specific Adhesion Molecule. *Embo. J.* **9**, 1969-1977, 1990.
- Kretzmer, G. Industrial processes with animal cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **59**, 135-142, 2002.
- Lee, M.T.; Chen, B.H. Separation of Lycopene and its cis Isomers by Liquid Chromatography, *Chromatographia*, **54**, 613-617, 2001
- Lee, M.T.; Chen, B.H. Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. *Food Chem.* **78**, 425-432, 2002.
- Lehr, R. V., Elefante, L. C., Kikly, K. K., O'Brien, S. P., and Kirkpatrick, R. B. A Modified Metal-Ion Affinity Chromatography Procedure for the Purification of Histidine-Tagged Recombinant Proteins Expressed in *Drosophila* S2 Cells. *Protein Exp. Purification* **19**, 362-368, 2000.
- Léo, P.; Galesi, A.L.L.; Suazo, C.A.T.; Moraes, A.M. Células animais: Conceitos Básicos, In: *Tecnologia do Cultivo de Células Animais de Biofármacos a Terapia Gênica*, Moraes, A.M.; Augusto, E.F.P.; Castilho, L.R., Editora Roca Ltda., p 27 e 35, 2008.
- Li, B.; Tsing, S.; Kosaka, A. H.; Nguyen, B.; Osen, E. G.; Bach, C.; Chan, H.; Barnett, J. Expression of Human Dopamine β -Hydroxylase in *Drosophila* Schneider 2 Cells. *Biochem. J.*, 313, 57-64, 1996.

- Lim, H. J., Cha, H. J. Observation and modeling of induction effect on human transferring production from stably transfected *Drosophila* S2 cell culture. *Enzyme and Microb Tec.*, **39**, 208-214, 2006.
- Lin, C.H.; Chen, B.H. Determination of carotenoids in tomato juice by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1012**, 103-109, 2003.
- Lin, C.H.; Chen, B.H. Stability of carotenoids in tomato juice during storage. *Food Chem.*, **90**, 837-846, 2005.
- Liu, D.; Shib, J.; Ibarra, A. C.; Kakudac, Y.; Xueb, S.J., The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and β -carotene mixtures on the DPPH free radical, *LWT*, **41**, 1344-1349, 2008.
- Lynn, D.E. Methods for maintaining insect cell cultures. *J. Insect Sci.*, **29**, 1-6, 2002.
- Macey, M. G. Flow cytometry - clinical applications. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1994.
- Martínez-Valverde, I.; Periago, M. J.; Provan, G.; Chesson, A. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J. Sci. Food Agric.*, **82**, 323-330, 2002.
- Matos, H.R.; Di Mascio, P.; Medeiros, M.H.G. Protective effect of lycopene on lipid peroxidation and oxidative DNA damage in cell culture. *Arch. Biochem. Biophys.*, **383**, 56-59, 2000.
- McCarroll, L.; King, L. A. Stable Insect Cell Culture for Recombinant Protein Production. *Curr. Opin. Biotech.*, **8**, 590-594, 1997.
- Mccoys, M. Enzymes Ascendant, *Chem. Eng. News*, 23, 2004.
- Mellado, M.C.M, Castilho, L.R. Proteínas Recombinantes Terapêuticas. In: *Tecnologia do Cultivo de Células Animais de Biofármacos a Terapia Gênica.*, Moraes, A.M.; Augusto, E.F.P.; Castilho, L.R., Editora Roca Ltda., p 387-388, 2008.
- Mendonça, R.Z., Palomares, L.A., Ramírez, O.T. An insight into insect cell metabolism through selective nutrient manipulation. *J. Biotechnol.*, **72**, 61-75, 1999.
- Menezes-Acosta, A.; Mendonça, R.Z.; Merchant, H.; Covarrubias, L.; Ramirez, O.T.

- Comparative characterization of cell death between Sf9 insect cells and hybridoma cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, **72**, 441-457, 2001.
- Mercille, S.; Massie, B. Induction of apoptosis in oxygen-deprived cultures of hybridoma cells, *Cytotechnology*, **15**, 117-128, 1994a.
- Mercille, S.; Massie, B., Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells, *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 1140-1154, 1994b.
- Mitsuhashi, J. In: Invertebrate Cell System Applications (Mitsuhashi J. ed.), CRC Press, 3-20, 1989.
- Molowa, D. T., Mazanet, R. The state of biopharmaceutical manufacturing. *Biotechnol Annu. Rev.*, **9**, 285-302, 2003.
- Moritz, B.; Tramonte, V. L. C. Bioavailability of lycopene. *Rev. Nutr.* **19**, 265-273, 2006
- Mortensen, A.; Skibsted, L.; Sampson, J.; Rice-Evans, C.; Everett, S.A. Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. *FEBS Letters*, **418**, 91-97, 1997.
- Nardello, V.; Marti, M. J.; Pierlot, C.; Aubry, J. M. Photochemistry without Light: Oxidation of Rubrene in a Microemulsion with a Chemical Source of Singlet Molecular Oxygen ($^1\text{O}_2$, $^1\Delta_g$). *J. Chem. Ed.*, **76**, 1285- 1288, 1999.
- Nilsen, S., Castellino, F. J. Expression of human plasminogen in *Drosophila* Schneider S2 cells. *Protein Exp. and Purification*, **16**, 136-143, 1999.
- Nunes, V.A.; Gozzo, A.J.; Cruz-Silva, I.; Juliano, M.A.; Viel, T.A.; Godinho, R.O.; Meirelles, F.V.; Sampaio, M.U.; Sampaio, C.A.M.; Araújo, M.S. Vitamin E prevents cell death induced by mild oxidative stress in chicken skeletal muscle cells. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, **141**, 225-240, 2005.
- Oh, Y. S.; Jang, E. S.; Bock, J. Y.; Yoon, S. H.; Jung, M. Y. Singlet Oxygen Quenching Activities of Various Fruit and Vegetable Juices and Protective Effects of Apple and Pear Juices against Hemolysis and Protein Oxidation Induced by Methylene Blue Photosensitization. *Food Chem. Toxicol.*, **71**, c260 – c 268, 2006.
- Oliver, J.; Palou, A. J. Chromatographic determination of carotenoids in foods (Review). *Chromatogr. A*, **881**, 543 - 555, 2000.

- Ollanketo, M.; Hartonen, K.; Riekkola, M.L.; Holm, Y.; Hiltunen, R. Supercritical carbon dioxide extraction of Lycopene in tomato skins. *Eur. Food Res. Technol.*, **212**, 561–565, 2001.
- Padma, V. V.; Christie, S. A. D.; Ramkuma, K. M. Induction of Apoptosis by Ginger in hep-2 Cell Line is mediated by Reactive Oxygen Species. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **100**, 302-307, 2007.
- Palozza, P.; Sheriff, A.; Serini, S.; Boninsegna, A.; Maggiano, N.; Ranelletti, F.O.; Calviello, G.; Cittadini, A. Lycopene induces apoptosis in immortalized fibroblasts exposed to tobacco smoke condensate through arresting cell cycle and down-regulating cyclin D1, pAKT and pBad, *Apoptosis*, **10**, 1445-1456, 2005.
- Pamboukian, M. M. Estudo da Atividade Respiratória de Linhagens Selvagens e Transfectadas de Células de Insetos Através de Cultivos em Biorreatores. Dissertação (Mestre em Engenharia Química), Escola Politécnica da Universidade São Paulo, 2007.
- Pavlou, A. K. Marketspace: trends in biotherapeutics. *J. Commer. Biotechnol.*, **9**, 358-363, 2003.
- Pellegrini, M.P.; Pinto, R.C.V.; Castilho, L.R. Mecanismos de Crescimento e Morte de Células Animais Cultivadas *in vitro* In: Tecnologia do Cultivo de Células Animais de Biofármacos a Terapia Gênica., Moraes, A.M.; Augusto, E.F.P.; Castilho, L.R., Editora Roca Ltda., 143 e 149, 2008.
- Perkins-Veazie, P.; Collins, J.K. Flesh quality and lycopene stability of fresh-cut watermelon, *Postharvest Biol. Tec.*, **31**, 159–166, 2004.
- Phelps, C.L.; Smart, N.G.; Wai, C.M. Past, present and possible future applications of supercritical fluid extraction technology. *J. Chem. Educ.*, **73**, 1163, 1996.
- Pól, J.; Hyotylainen, T.; Ranta-Aho, O.; Riekkola, M.L. Determination of lycopene in food by on-line SFE coupled to HPLC using a single monolithic column for trapping and separation. *J. Chromatogr. A*, **1052**, 25-31, 2004.
- Poulin, L. Étude de la relation structure-fonction de la protéine BI-1 chez *Saccharomyces cerevisiae*. Disponível em: <<http://archimede.bibl.ulaval.ca/archimede/files/e235f8ac->

- 2655-401a-9b75-4fa1da41ccb2/23101.html>, 2005. Acesso em setembro de 2008.
- Raffo, A.; Leonardi, C.; Fogliano, V.; Ambrosino, P.; Salucci, M.; Gennaro, L.; Bugianesi, R.; Giuffrida, F.; Quaglia, G.; Nutritional value of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Cv. Naomi F1) harvested at different ripening stages, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 6550-6556, 2002.
- Rand-Luby, L.; Pommier, R. F.; Williams, S. T. et al. Improved outcome of surgical flaps treated with topical dimethylsulfoxide. *Ann. Surg.*, **224**, 583-590, 1996.
- Rao, A.V.; Agarwal, S. Bioavailability and *in vivo* antioxidant properties of lycopene from tomato products and their possible role in the prevention of cancer, *Nutr. Cancer*, **31**, 199-203, 1998.
- Rao, A.V.; Agarwal, S. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease, *J. Am. Coll. Nutr.*, **19**, 563-569, 2000.
- Rao, A.V.; Waseem, Z.; Agarwal, S. Lycopene content of tomatoes and tomato products and their contribution to dietary lycopene. *Food Res. Intern.*, **31**, 737-741, 1998
- Reddy, L.; Odhav, B.; Bhoola, K. Aflatoxin B-1-induced toxicity in HepG2 cells inhibited by carotenoids: morphology, apoptosis and DNA damage. *Biol. Chem.*, **387**, 87-93, 2006.
- Reverchon, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products, *J. Supercrit. Fluids*, **10**, 1-37, 1997.
- Reverchon, E.; De Marco, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *J. Supercrit. Fluids*, **38**, 146-166, 2006.
- Robinson, J. P. Handbook of flow cytometry methods. New York: Willey-Liss, Inc. 1993.
- Rozzi, N.L.; Singh, R.K.; Vierling, R.A.; Watkins, B.A. Supercritical fluid extraction of lycopene from tomato processing byproducts. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2638-2643, 2002.
- Sabio, E; Lozano, M.; Espinosa, V.M.; Mendes, R.L.; Pereira, A.P.; Palavra, A.F.; Coelho, J.A.; Lycopene and β -Carotene Extraction from Tomato Processing Waste Using Supercritical CO₂. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **42**, 6641-6646, 2003.

- Sahlin, E.; Savage, G.P.; Lister, C.E. Investigation of the antioxidant properties of tomatoes after processing, *J. Food Compos. Anal.*, **17**, 635–647, 2004.
- Saito, Y.; Shiga, A.; Yoshida, Y.; Furuhashi, T.; Fujita, Y.; Niki, E. Effects of a Novel Gaseous Antioxidative System Containing a Rosemary Extract on the Oxidation Induced by Nitrogen Dioxide and Ultraviolet Radiation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 781–786, 2004.
- Sánchez-Moreno, C.; Plaza, L.; Ancos, B.; Pilar-Cano, M. Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *Sci. Food Agric.*, **83**, 430-439, 2003.
- Schimmer, A. D. Inhibitor of Apoptosis Proteins: Translating Basic Knowledge into Clinical Practice. *Cancer Res*, **64**, 7183-7190, 2004.
- Schoefs, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. *Trends Food Sci. Technol.*, **13**, 361-371, 2002.
- Scott, A. Biologics. *Chem. Eng. News*, 21-25, 2004
- Setiawan, B.; Sulaeman, A.; Giraud, D.W.; Driskell, J.A. Carotenoid content of selected Indonesian fruits, *J. Food Compos. Anal.*, **14**, 169-176, 2001.
- Shapiro, H. M. Practical flow cytometry. New York: Alan R. Liss, Inc. 1985.
- Sharma, S.K.; Le Maguer, M. Kinetics of lycopene degradation in tomato pulp solids under different processing and storage conditions. *Food Res. Int.*, **29**, 309-315, 1996b.
- Sharma, S.K.; Le Maguer, M. Lycopene in tomatoes and tomato pulp fractions. *Ital. J. Food Sci.*, **8**, 107-113, 1996a.
- Shi, J.; Le Maguer, M. Lycopene in Tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.*, **40**, 1-42, 2000.
- Shi, J.; Le Maguer, M.; Kakuda, Y.; Liptay, A.; Francie, N. Lycopene degradation and isomerization in tomato dehydration. *Food Res. Int.*, **32**, 15-21, 1999.
- Shi, J.; Yi, C.; Xue, S. J.; Jiang, Yueming; Ma, Y.; Li, D. Effects of modifiers on the profile of lycopene extracted from tomato skins by supercritical CO₂. *J. Food Eng.*, **93**, 431-436, 2009.

- Shin, H. S., Cha, H. J. Statistical optimization for immobilized metal affinity purification of secreted human erythropoietin from *Drosophila* S2 cell. *Protein Expres Purif*, **28**, 331-339, 2003.
- Silva, A. M., Schneider, V. C., Pereira, C. A. M. Propriedades químicas e farmacológicas do licopeno. *Rev. Elet. Farmac.*, **6**, 36 – 44, 2009.
- Smith, R.M. Supercritical fluids in separation science - the dreams, the reality and the future, *J. Chromatogr. A*, **856**, 83–115, 1999.
- Souza, M.C.; Freire, M.S.; Castilho, L.R. Influence of culture conditions on Vero cell propagation on non-porous microcarriers. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, **48**, 71-77, 2005.
- Stahl, W.; Sies, H. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med*, **24**, 345-351, 2003.
- Swiech, K. Caracterização Cinética e Fisiológica de Células de *Drosophila Melanogaster* S2 para Produção de Glicoproteína do Vírus da Raiva (GPV) Recombinante Tese (Doutor em Engenharia Química), Universidade Federal de São Carlos, 2007.
- Takeoka, G.; Dao, L.; Flessa, S.; Gillespie, D.M.; Jewell, W.T.; Huebner, B.; Bertow, D.; Ebeler, S.E. Processing effects on lycopene content and antioxidant activity of tomatoes, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 3713-3717, 2001.
- Tavares, C.A.; Amaya, D.B.R. Carotenoid composition of brazilian tomatoes and tomato products, *Lebensm.-Wiss. Technol.*, **27**, 219-224, 1994.
- Tey, B.T.; Singh, R.P.; Piredda, L.; Piacentini, M.; Al-Rubeai, M. Bcl-2 mediated suppression of apoptosis in myeloma NS0 cultures. *J. Biotechnol.*, **79**, 147-159, 2000.
- Topal, U.; Sasaki, M.; Goto, M.; Hayakawa, K. Extraction of Lycopene from Tomato Skin with Supercritical Carbon Dioxide: Effect of Operating Conditions and Solubility Analysis. *J. Agric. Food. Chem.*, **54**, 5604-5610, 2006.
- Torfs, H., Shariatmadari, R., Guerrero, F., Parmentier, M., Poels, J., Poyer, W. V., Swinnen, E., Loof, A. D., Akerman, K., and Broeck, J. V. (2000). Characterization of a Receptor for Insect Tachykinin-Like Peptide Agonists by Functional Expression in a Stable *Drosophila* Schneider 2 Cell Line. *J. Neurochem.* **74**, 2182-2189.
- Vági, E.; Simándi, B.; Vásárhelyiné, K.P.; Daood, H.; Kéry, À.; Doleschall, F. Nagy, B.

- Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids, tocopherols and sitosterols from industrial tomato by-products. *J. Supercrit Fluids.*, **40**, 218-226, 2007.
- Valle, M.A., Kester, M.B., Burns, A.L., Marx, S.J., Spiegel, A.M., Shiloach, J. Production and purification of human menin from *Drosophila melanogaster* S2 cells using stirred tank reactor. *Cytotechnology*, **35**, 127-135, 2001.
- Vasapollo, G.; Longo, L.; Rescio, L.; Ciurlia, L. Innovative supercritical CO₂ extraction of lycopene from tomato in the presence of vegetable oil as co-solvent. *J. Supercrit Fluids*, **29**, 87–96, 2004.
- Verma, R., Boleti, E., George, A. J. T. Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression system. *J Immunol Methods*, **216**, 165-181, 1998.
- Walsh, G. Biopharmaceuticals benchmarks – 2003. *Nat. Biotechnol*, **21**, 865-887.
- Walsh, G. Biopharmaceuticals: recent approvals and likely directions. *Trends Biotechnol*, **23**, 553-558, 2005.
- Werts, K.; Siles, U.; Goralczyk, R. Lycopene: modes of action to promote prostate health, *Arch. Biochem. Biophys.*, **430**, 127 –134, 2004.
- Woodall, A.A.; Britton, G.; Jackson, M.J. Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: relationship between carotenoid structure and protective ability. *Biochimia et Biophysica Acta*, **1336**, 575-586, 1997.
- Xu, Y.Q.; Leo, M.A.; Lieber, C.S. Lycopene attenuates alcohol-induced apoptosis and oxidative stress in HepG2 cells overexpressing CYP2E1, *Gastroenterology*, **124**, A719-A719, Suppl. S 2003.
- Yamaguchi, M.; Uchiyama, S. Effect of carotenoid on calcium content and alkaline phosphatase activity in rat femoral tissues in vitro: the unique anabolic effect of beta-cryptoxanthin. *Biol Pharm Bull*, **26**, 1188-1191, 2003.
- Yankah, A. C.; Meskishvili, V. A.; Weng, Y.; et. al. Accelerated degeneration of allografts in the first two year of life. *Ann Thorac. Surg.*, Berlin, **60**, 71-77, 1995.
- Yaping, Z.; Suping, Q.; Wenli, Y.; Zheng, X.; Hong, S.; Side, Y.; Dapu, W. Antioxidant

- activity of lycopene extracted from tomato paste towards trichloromethyl peroxy radical CCl_3O_2 . *Food Chem*, **77**, 209-212, 2002.
- Yi, C.; Shi, J.; Xue, S. J.; Jiang, Y.; Li, D. Effects of supercritical fluid extraction parameters on lycopene yield and antioxidant activity, *Food Chem*, **113**, 1088-1094, 2009.
- Yokomizo, A.Y. Expressão do gene da glicoproteína do vírus da raiva (GPV/PV) em células de *Drosophila melanogaster* (S2). Tese (Doutor em Biotecnologia), Programa de Pós-Graduação Interunidades USP/IPT/Instituto Butantan, 2006.
- Yokomizo, A.Y.; Jorge, S.A.C.; Astray, R.M.; Fernandes, I.; Ribeiro, O.G.; Horton D.S.P.Q; Tonso, A.; Tordo, N., Pereira, C.A. Rabies virus glycoprotein expression in *Drosophila* S2 cells. I. Functional recombinant protein in stable cotransfected cell line. *Biotechnol J*, **2**, 1-8, 2007.

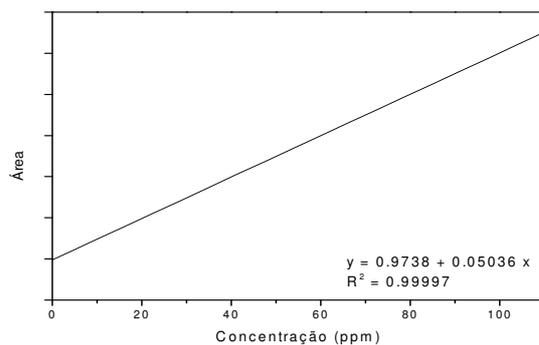
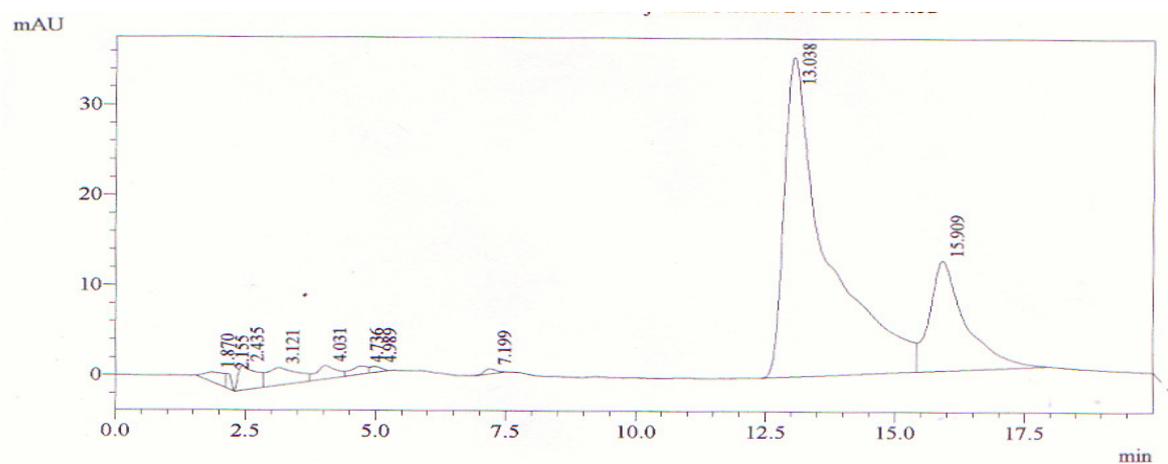
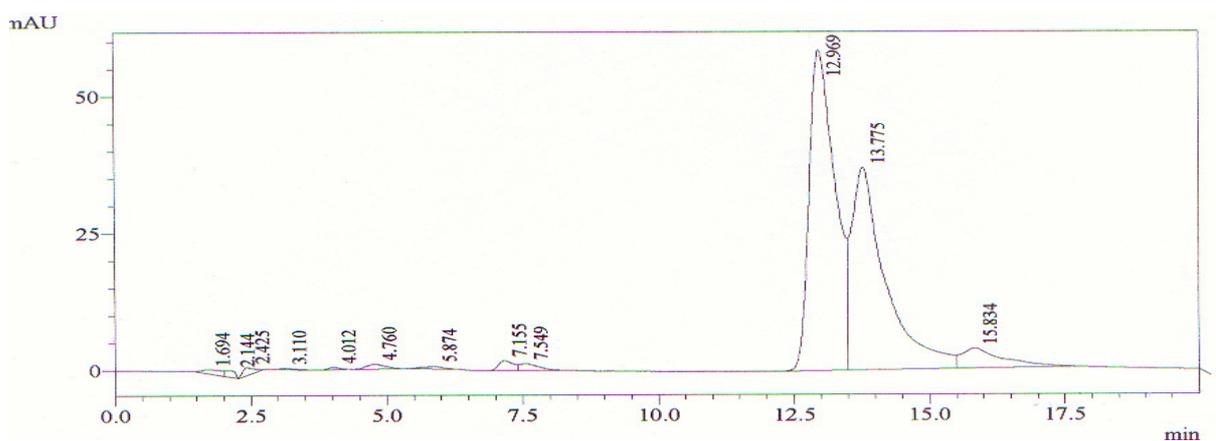


Figura A7 – Curva de calibração do licopeno padrão.

Figura A8 - Perfil cromatográfico do extrato de licopeno obtido por extração com CO₂ supercrítico à 40°C e 200 bar. Fase móvel: metanol/THF (90:10 v/v).Figura A9 - Perfil cromatográfico do extrato de licopeno obtido por extração com CO₂ supercrítico à 80°C e 200 bar. Fase móvel: metanol/THF (90:10 v/v).

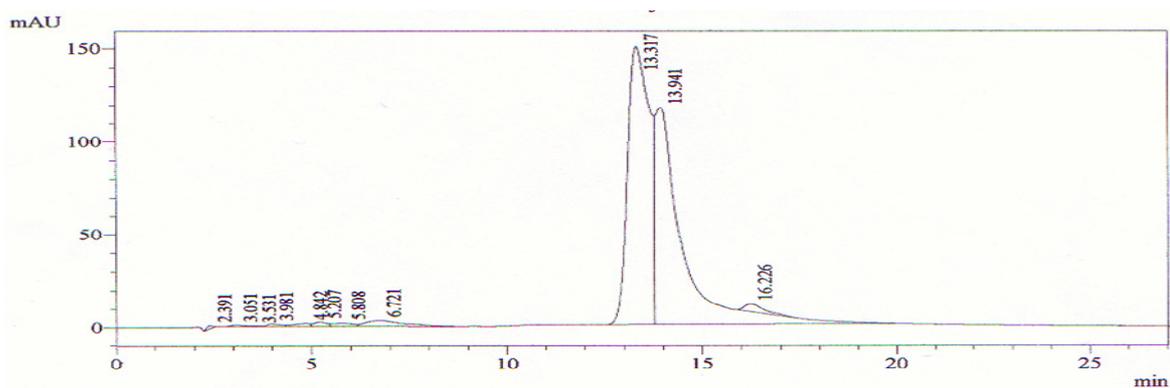


Figura A10 - Perfil cromatográfico do extrato de licopeno obtido por extração com CO₂ supercrítico à 40°C e 350 bar. Fase móvel: metanol/THF (90:10 v/v).

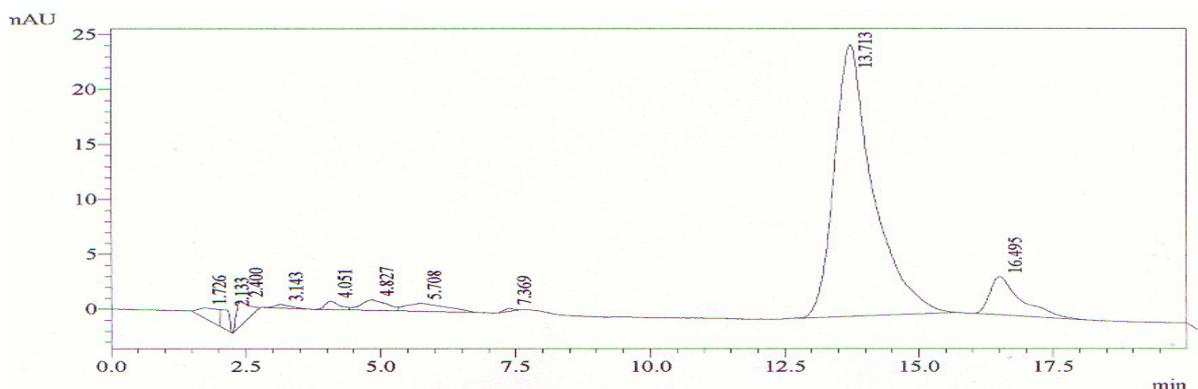


Figura A11 - Perfil cromatográfico do extrato de licopeno obtido por extração com CO₂ supercrítico à 80°C e 350 bar. Fase móvel: metanol/THF (90:10 v/v).

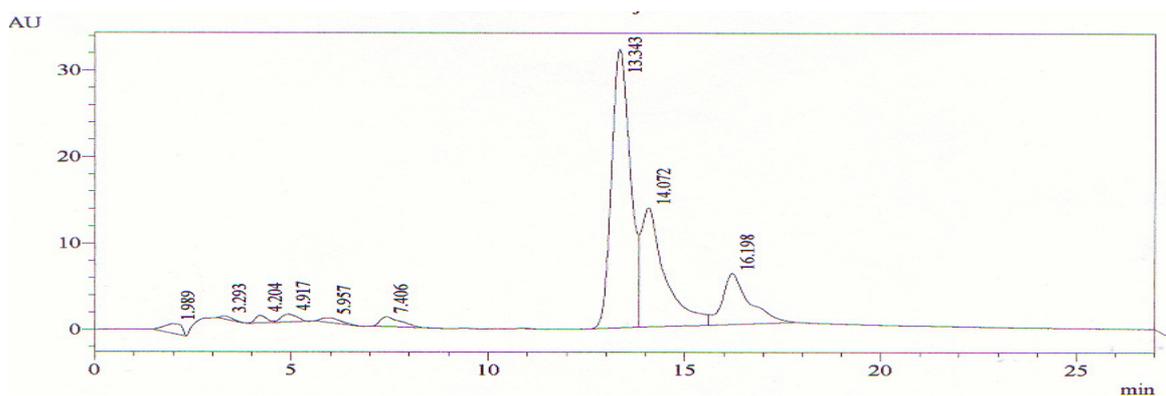


Figura A12 - Perfil cromatográfico do extrato de licopeno obtido por extração com CO₂ supercrítico à 60°C e 275 bar, 1^a repetição. Fase móvel: metanol/THF (90:10 v/v).

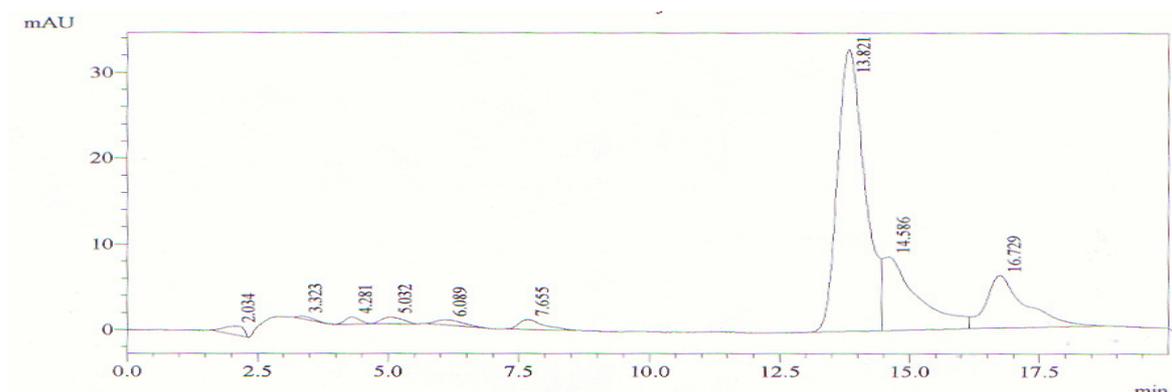


Figura A13 - Perfil cromatográfico do extrato de licopeno obtido por extração com CO₂ supercrítico à 60°C e 275 bar, 2^a repetição. Fase móvel: metanol/THF (90:10 v/v).

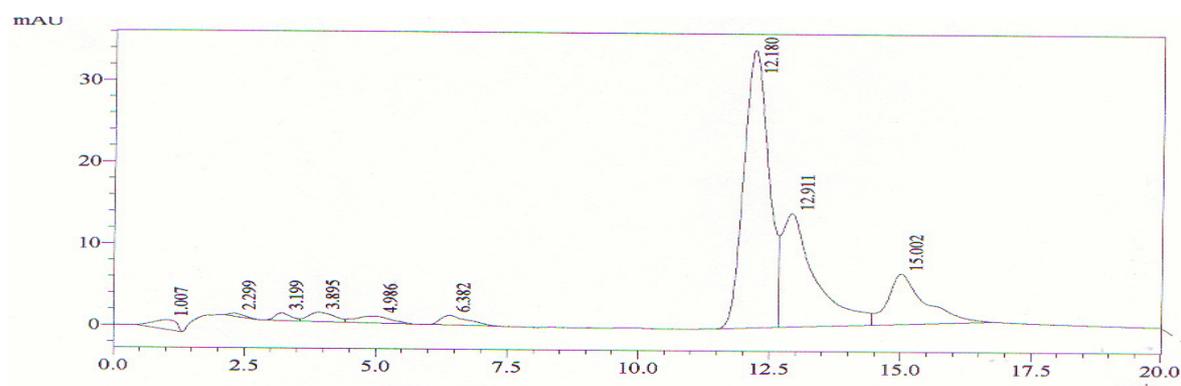


Figura A14 - Perfil cromatográfico do extrato de licopeno obtido por extração com CO₂ supercrítico à 60°C e 275 bar, 3^a repetição. Fase móvel: metanol/THF (90:10 v/v).

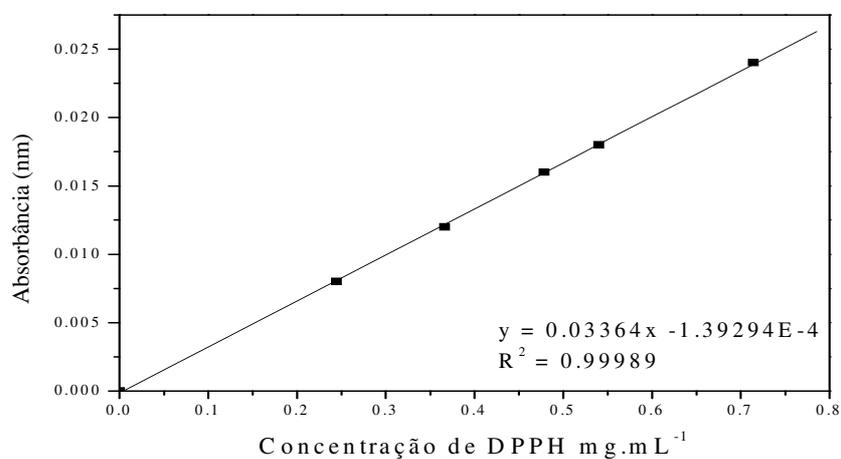
Anexo B. Resultados Complementares Referentes à Seção 4.2.3

Figura B1 – Curva de calibração do DPPH• para determinação da atividade antioxidante dos extratos.

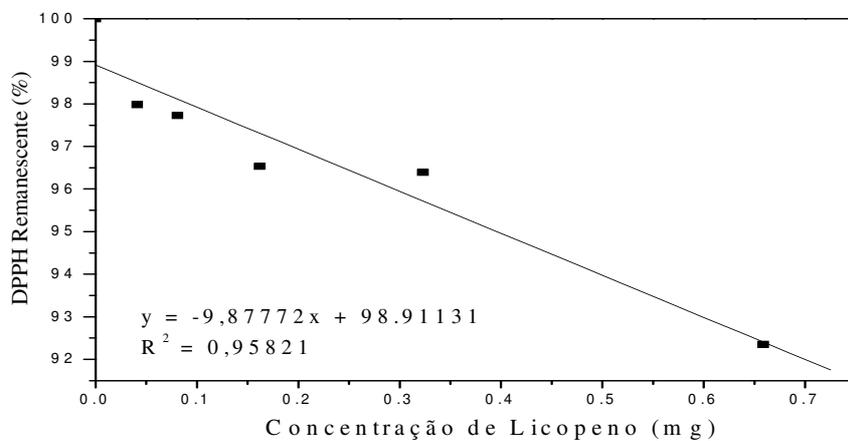


Figura B2 - Variação da quantidade remanescente do radical DPPH• após reação por 60 min com diferentes concentrações do extrato obtido a 60°C e 275 bar, após 60 minutos de reação. $EC_{95} = 4,952$ mg.

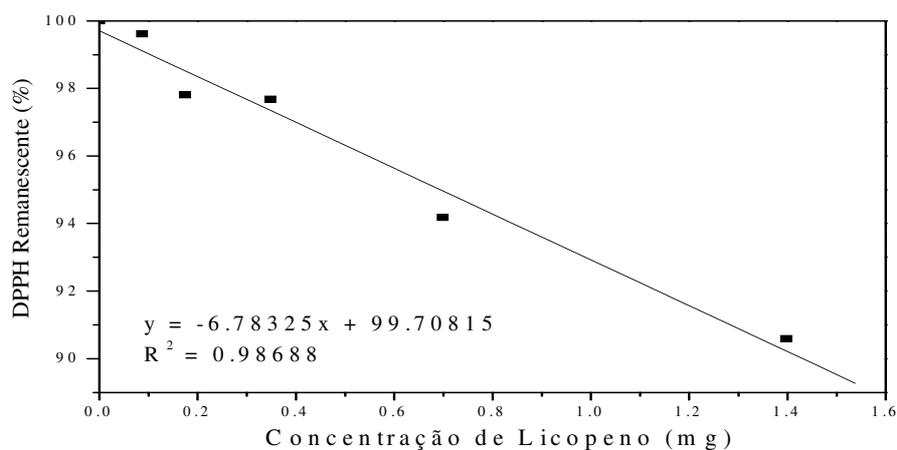


Figura B3 - Variação da quantidade remanescente do radical DPPH[•] após reação por 60 min com diferentes concentrações do extrato obtido a 80°C e 200 bar, após 60 minutos de reação. EC₉₅ = 7,328 mg.

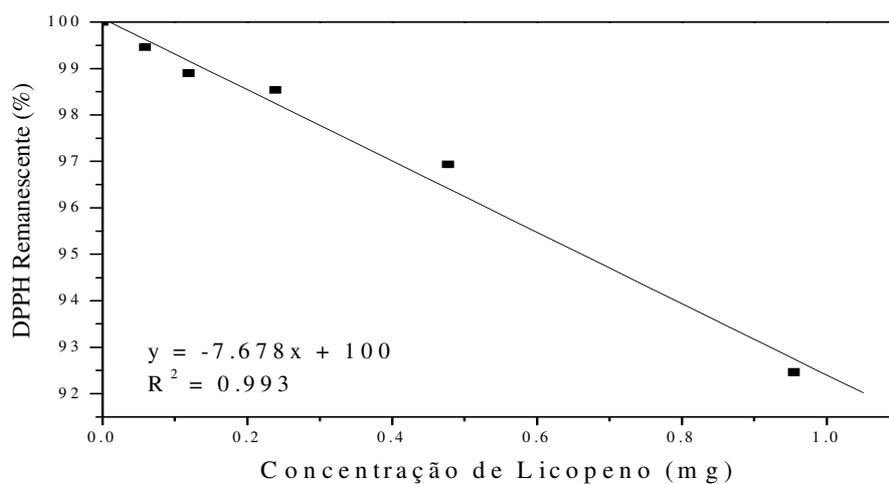


Figura B4 - Variação da quantidade remanescente do radical DPPH[•] após reação por 60 min com diferentes concentrações do extrato obtido a 60°C e 275 bar, após 60 minutos de reação. EC₉₅ = 6,523 mg.

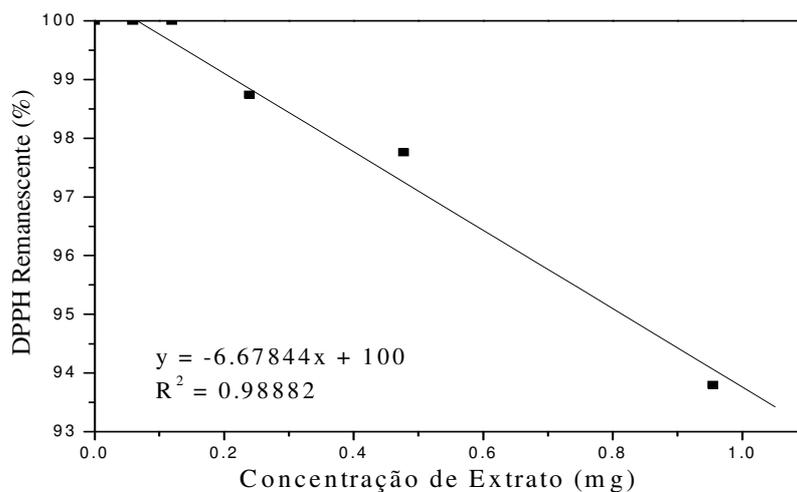


Figura B5 - Variação da quantidade remanescente do radical DPPH• após reação por 60 min com diferentes concentrações do extrato obtido a 40°C e 200 bar, após 60 minutos de reação. EC₉₅ = 7,375 mg.

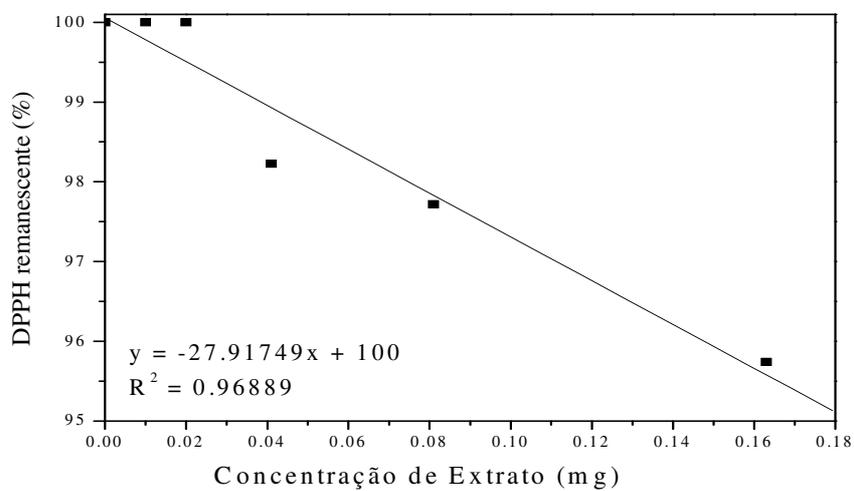


Figura B6 - Variação da quantidade remanescente do radical DPPH• após reação por 60 min com diferentes concentrações do extrato obtido a 40°C e 350 bar, após 60 minutos de reação. EC₉₅ = 1,795 mg.

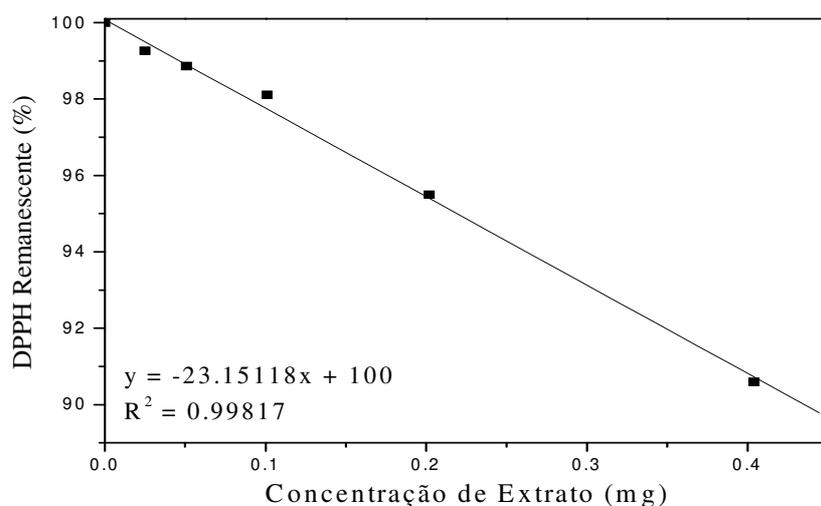


Figura B7 - Variação da quantidade remanescente do radical DPPH[•] após reação por 60 min com diferentes concentrações do extrato obtido a 60°C e 275 bar, após 60 minutos de reação. EC₉₅ = 2,163 mg.

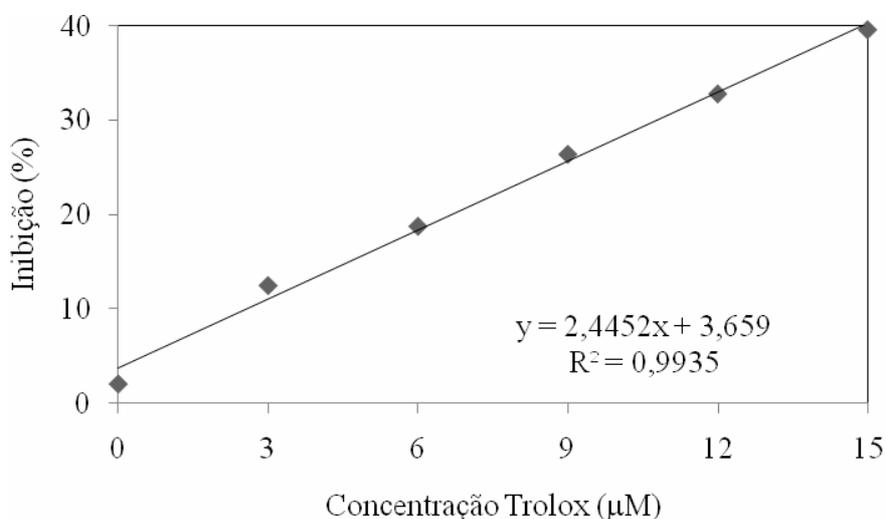


Figura B8 – Curva de calibração obtida para o padrão Trolox para a determinação da atividade antioxidante através da redução do radical DPPH.

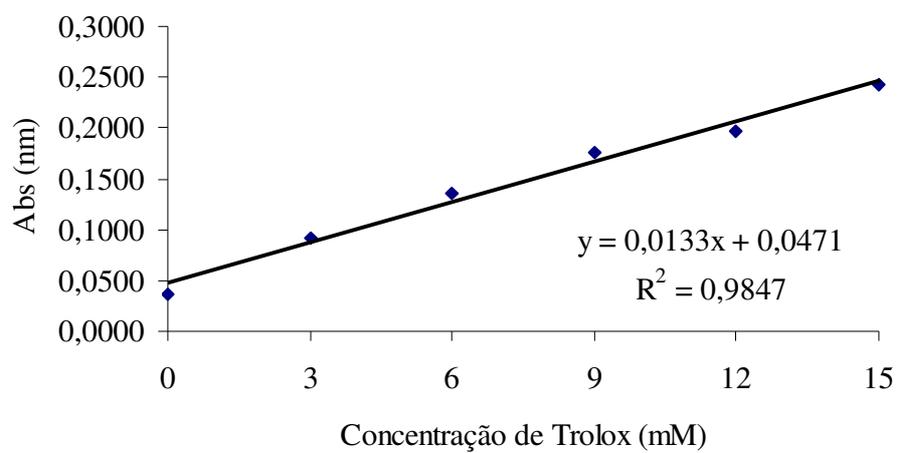


Figura B9 – Curva de calibração obtida para o padrão Trolox para a determinação da atividade antioxidante através da oxidação do rubreno.

Anexo C. Resultados Complementares Referentes à Seção 4.3

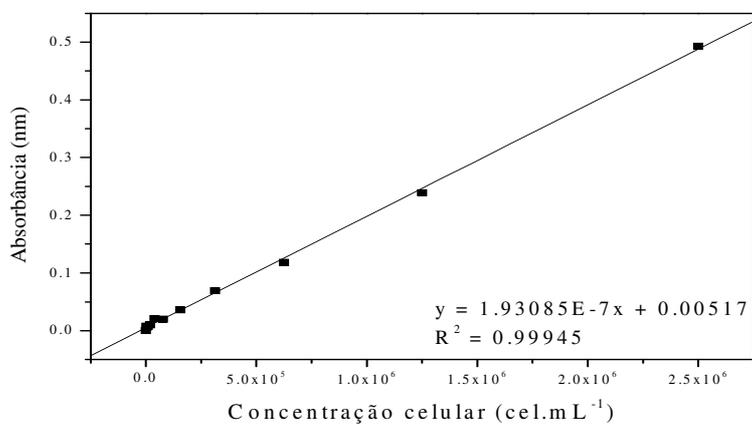


Figura C1 – Curva de calibração do MTT para análise da viabilidade celular do extrato de licopeno.

Tabela C1 – Inibição do crescimento celular de células S2 em contato com licopeno obtido à 80 C e 350 bar em diversos tempos. (n=3)

Concentração de Licopeno (mg/mL)	Inibição após 24 horas (%)	Inibição após 48 horas (%)	Inibição após 72 horas (%)
0,023	2,57	0,51	10,50
0,045	-3,66	-9,01	6,74
0,091	8,54	-23,69	31,02
0,182	-0,13	-6,89	12,56
0,364	16,17	2,50	5,44
0,728	12,87	5,85	8,46

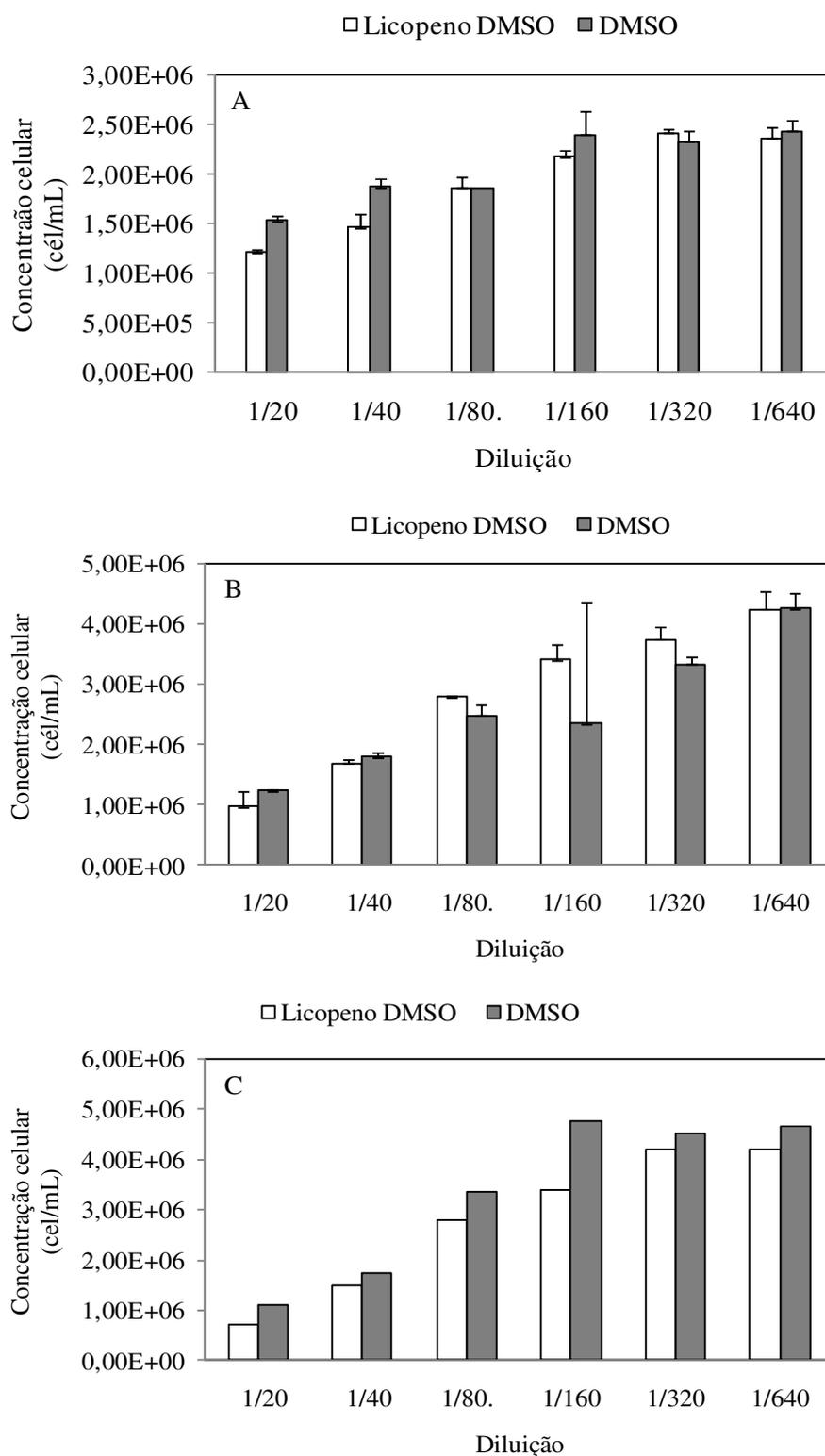


Figura C2 – Inibição da proliferação das células S2 expostas ao solvente DMSO e ao licopeno dissolvido em DMSO em culturas de células S2 após 24 (a), 48 (b) e 72 (c) horas. Concentração de licopeno na amostra antes das diluições: 14,55mg/mL.

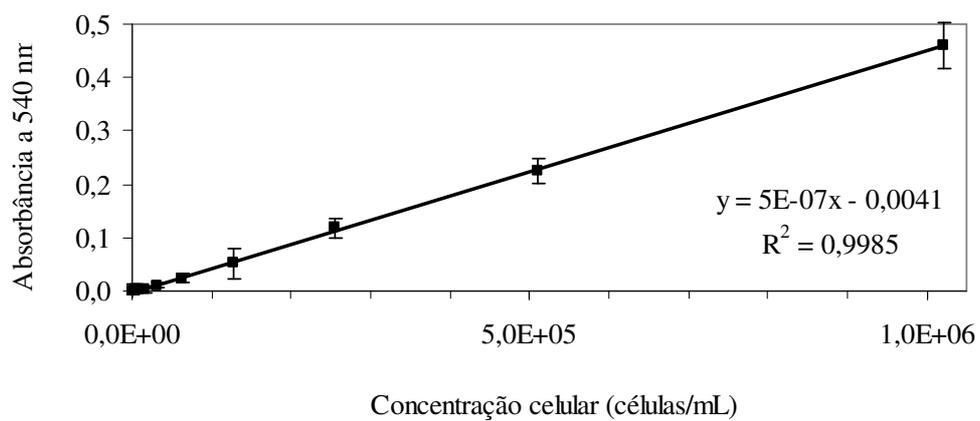


Figura C3 – Curva de calibração do MTT para análise da viabilidade celular do extrato de licopeno