

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

Preparação e caracterização de nanocarreadores de beta-lactose à base de  
pectina e lisozima

Magner Pessoa da Silva

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Fabi

São Paulo

2022

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

Preparação e caracterização de nanocarreadores de beta-lactose à base de  
pectina e lisozima

Magner Pessoa da Silva

Versão Original

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Fabi

São Paulo

2022

Magner Pessoa da Silva

Preparação e caracterização de nanocarreadores de beta-lactose à base de  
pectina e lisozima

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dr. João Paulo Fabi  
orientador/presidente

---

1o. Examinador

---

2o. Examinador

---

3o. Examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2022.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S586p Silva, Magner Pessoa da  
Preparação e caracterização de nanocarreadores de beta-lactose à base de pectina e lisozima / Magner Pessoa da Silva. - São Paulo, 2022.  
80 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. Orientador: Fabi, João Paulo

1. Biopolímero. 2. Auto-organização. 3. Lactose. 4. Nanoencapsulação. 5. Calorimetria de varredura diferencial. I. T. II. Fabi, João Paulo, orientador.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela dádiva da vida.

Ao Prof. Dr. João Paulo Fabi, pela oportunidade e apoio durante o processo de definição e orientação.

A Prof. Dra. Iolanda Midea Cuccovia, por colocar à disposição o laboratório e muito contribuiu para o meu crescimento científico e profissional.

A Prof. Prof. Dra. Cristiane R. Guzzo Carvalho, que gentilmente cedeu o tempo de equipamento em laboratório e contribui para o desenvolvimento desse projeto.

Aos funcionários e amigos do laboratório por toda ajuda durante o trabalho.

A Thiécla Rosales, por estar ao meu lado auxiliando na realização do trabalho.

Aos meus amigos, Felipe Santana, Letícia Cardoso e Gabriela Martins, por tornarem os dias difíceis mais leves.

As minhas amigas, Déborah Freitas e Carlene Lucena, por todo o incentivo.

A minha família, por todo o apoio e paciência.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro concedido através do processo nº 141922/2018-4.

À FAPESP, pelo apoio financeiro (processos 2012/23970-2, 2013/07914-8 e 2019/11816-8).

A mim, por não ter desistido.

## RESUMO

SILVA, M. P. **Preparação e caracterização de nanocarreadores de beta-lactose à base de pectina e lisozima.** 2022. 80f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O objetivo deste trabalho foi preparar e caracterizar nanocarreadores via auto-organização a partir da pectina de citros e lisozima para o encapsulamento da  $\beta$ -lactose. Foram estudadas três condições de interação entre os biopolímeros variando a razão molar pectina/lisozima (3:1, 2:1, 1:1, 1:2 e 1:3), o pH e o tempo de aquecimento. A confirmação da interação foi determinada por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e por calorimetria de varredura diferencial (DSC). Os espectros de infravermelho evidenciaram que ligações de hidrogênio foram as principais forças envolvidas na formação dos nanocarreadores e sugeriram a ausência de  $\beta$ -lactose livre na superfície das nanopartículas. Os termogramas evidenciaram que as nanopartículas formadas na presença de  $\beta$ -lactose têm maior estabilidade térmica do que as nanopartículas sem  $\beta$ -lactose. Para ambas as formulações estudadas, na presença e na ausência de  $\beta$ -lactose, a formação das nanopartículas ocorreu entre os valores de pKa e ponto isoelétrico (pI) da pectina e lisozima, respectivamente, sendo a melhor razão de interação pectina/lisozima 1:2, em pH 10, a 80 °C por 30 min. As nanopartículas foram formadas via auto-organização e todas as partículas apresentaram distribuição de tamanho homogênea, formato esférico, diâmetro inferior a 100 nm e carga superficial negativa. A morfologia e o tamanho das partículas pouco alteraram com a incorporação da  $\beta$ -lactose. A eficiência de encapsulação (EE) da  $\beta$ -lactose foi superior a 96% para as concentrações estudadas. Ensaio preliminares *in vitro*, em células epiteliais de câncer de cólon (HCT-116), evidenciaram que as nanopartículas formadas são capazes de adentrar no meio intracelular, possivelmente, por via endocitose.

**Palavras-chave:** Biopolímero, auto-organização, lactose, nanoencapsulação, calorimetria de varredura diferencial.

## ABSTRACT

SILVA, M. P. **Preparation and characterization of beta-lactose nanocarriers based on pectin and lysozyme**. 2022. 80f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

This work aimed to prepare and characterize nanocarriers via self-assembly using citrus pectin and lysozyme for  $\beta$ -lactose encapsulation. Three interaction conditions between the biopolymers were studied, varying the pectin/lysozyme molar ratio (3:1, 2:1, 1:1, 1:2 and 1:3), pH and heating time. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and differential scanning calorimetry (DSC) determined the interaction's confirmation. The infrared spectra showed that hydrogen bonds were the main forces involved in the formation of nanocarriers and suggested the absence of free  $\beta$ -lactose on the surface of the nanoparticles. The thermograms showed that nanoparticles formed in the presence of  $\beta$ -lactose have greater thermal stability than nanoparticles without  $\beta$ -lactose. For both formulations studied, in the presence and absence of  $\beta$  lactose, the formation of nanoparticles occurred between the pKa and isoelectric point (pI) values of pectin and lysozyme, respectively, with the best pectin/lysozyme interaction molar ratio 1:2, at pH 10, at 80 °C for 30 min. Nanoparticles were formed via self-assembly, and all particles presented homogeneous size distribution, spherical shape, diameter less than 100 nm, and negative surface charge. The morphology and size of the particles changed little with the incorporation of  $\beta$ -lactose. The encapsulation efficiency (EE) of  $\beta$ -lactose was higher than 96% for the concentrations studied. Preliminary *in vitro* assays in colon cancer epithelial cells (HCT-116) showed that the nanoparticles formed are capable of entering the intracellular medium, possibly via endocytosis.

**Keywords:** Biopolymer, self-assembly, lactose, nanoencapsulation, differential scanning calorimetry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplos de nanopartículas .....	6
Figura 2 - Polissacarídeos constituintes da pectina .....	17
Figura 3 - Características do câncer .....	20
Figura 4 - Membros da família das galectinas e suas respectivas interações. .....	22
Figura 5 - Formas anoméricas da lactose .....	24
Figura 6 - Esquema estrutural da interação entre a galectina-3 com agentes naturais ligantes e com neutralizadores externos .....	25
Figura 7 - Grau de esterificação da pectina .....	37
Figura 8 - Influência da razão molar de pectina/lisozima no tamanho de partícula e PDI .....	40
Figura 9 - Influência do pH no tamanho de partícula e PDI.....	41
Figura 10 - Influência do tempo de aquecimento no tamanho de partícula e PDI.....	42
Figura 11 - Distribuição do tamanho pela intensidade .....	47
Figura 12 - Curva de titulação isoelétrica das nanopartículas .....	49
Figura 13 - Espectros de FTIR dos compostos isolados e das nanopartículas .....	52
Figura 14 - Termogramas dos compostos isolados e das nanopartículas ...	55
Figura 15 - MEV das nanopartículas liofilizadas .....	57
Figura 16 - MET das nanopartículas secas a temperatura ambiente .....	58
Figura 17 - Estudo de captação celular.....	60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nanopartículas de biomateriais e suas aplicações na encapsulação de diferentes compostos.....	10
Tabela 2 - Características dos componentes isolados e das nanopartículas, em meio aquoso (1,0 mg/mL), com diferentes razões molares de pectina/lisozima (pH 10, 80 °C, 30 min) .....	44
Tabela 3 - Características das nanopartículas de pectina/lisozima encapsulados com $\beta$ -lactose (pH 10, 80 °C, 30 min), em meio aquoso (1,0 mg/mL), com diferentes concentrações de $\beta$ -lactose.....	45
Tabela 4 - Comparação entre o tamanho de partículas hidratadas e desidratadas das nanopartículas de pectina/lisozima (1:2, pH 10, 80 °C, 30 min) obtido por diferentes técnicas. ....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- DLS - *Dynamic Light Scattering*
- DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DRC - Domínio de Reconhecimento de Carboidratos
- DSC - *Differential Scanning Calorimetry*
- EE - Eficiência de Encapsulamento
- FITC - *Fluorescein isothiocyanate*
- FTIR - *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*
- Gal-3 - Galectina-3
- GE - Grau de Esterificação
- HCT-116 - Linhagem de Câncer Colorretal
- INCA - Instituto Nacional do Câncer
- kDa - Quilodalton
- kV - Quilovolts
- MET - Microscopia Eletrônico de Transmissão
- MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
- mV - miliVolts
- nm - nanômetro
- PBS - *Phosphate Buffered Saline*
- PDI - *Polydispersity Index*
- pH - Potencial de Hidrogênio
- pI - Ponto Isoelétrico
- PMC - Pectina Modificada de Citros
- $\zeta$  - Potencial Zeta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1</b>	<b>Nanopartículas</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2</b>	<b>Formação de nanopartículas via auto-organização</b> .....	<b>7</b>
<b>1.3</b>	<b>Aplicações das nanopartículas</b> .....	<b>8</b>
<b>1.4</b>	<b>Caracterização das nanopartículas</b> .....	<b>11</b>
<b>1.4.1</b>	<b>Tamanho</b> .....	<b>11</b>
<b>1.4.2</b>	<b>Potencial zeta</b> .....	<b>12</b>
<b>1.4.3</b>	<b>Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</b> .....	<b>13</b>
<b>1.4.4</b>	<b>Análise térmica</b> .....	<b>13</b>
<b>1.4.5</b>	<b>Morfologia</b> .....	<b>14</b>
<b>1.5</b>	<b>Biopolímeros</b> .....	<b>14</b>
<b>1.5.1</b>	<b>Pectina</b> .....	<b>15</b>
<b>1.5.2</b>	<b>Lisozima</b> .....	<b>18</b>
<b>1.6</b>	<b>O câncer de cólon</b> .....	<b>19</b>
<b>1.6.1</b>	<b>Galectina-3</b> .....	<b>21</b>
<b>1.6.2</b>	<b>Lactose</b> .....	<b>23</b>
<b>1.6.3</b>	<b>Outros oligossacarídeos inibidores de galectina-3</b> .....	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivos geral</b> .....	<b>27</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Materiais</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2</b>	<b>Caracterização da pectina</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Medição do grau de esterificação da pectina</b> .....	<b>28</b>
<b>3.3</b>	<b>Preparação e caracterização das nanopartículas</b> .....	<b>29</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Preparação das nanopartículas de pectina/lisozima via auto-organização</b> .....	<b>29</b>

3.3.2	Incorporação da $\beta$ -lactose .....	30
3.3.3	Eficiência de encapsulamento .....	31
3.3.4	Tamanho de partícula, distribuição de tamanho e potencial zeta .....	32
3.3.5	Titulação isoelétrica .....	32
3.3.6	Espectroscopia no infravermelho .....	33
3.3.7	Calorimetria diferencial de varredura .....	33
3.3.8	Microscopia eletrônica de varredura .....	34
3.3.9	Microscopia eletrônica de transmissão .....	34
3.3.10	Cultura celular .....	35
3.3.11	Estudo de captação celular <i>in vitro</i> .....	36
3.3.12	Análise estatística .....	36
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	37
4.1	Grau de esterificação da pectina .....	37
4.2	Otimização da preparação das nanopartículas .....	38
4.3	Avaliação do tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta .	42
4.4	Estimativa da porcentagem de eficiência de encapsulamento da $\beta$ -lactose .....	45
4.4.1	Tamanho de partícula .....	46
4.5	Estabilidade física das nanopartículas .....	48
4.6	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho .....	49
4.7	Análise térmica .....	53
4.8	Análise da morfologia das nanopartículas .....	55
4.9	Estudo de captação celular .....	59
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	62
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	64

## 1 INTRODUÇÃO

A nanoencapsulação de componentes bioativos de alimentos, nutracêuticos e medicamentos é atualmente utilizada em inúmeras aplicações tecnológicas. Uma grande variedade de materiais de parede, como polissacarídeos, proteínas, lipídios, polímeros sintéticos ou sua combinação, pode ser usada para preparar diferentes tipos de nanocarreadores para encapsulamento, proteção e liberação gradual de moléculas bioativas. Entre vários veículos em nanoescala, a formação de nanopartículas a partir de polissacarídeos naturais é de particular interesse devido a sua abundância na natureza, baixa toxicidade, alta solubilidade em água, biodegradabilidade e biocompatibilidade e excelente capacidade de encapsulamento (ABAEE; MOHAMMADIAN; MAHDI, 2017; WEI; HUANG, 2019; ZHOU et al., 2016).

Existem vários polissacarídeos (por exemplo, amido, celulose, pectina, quitosana, dextranas) com propriedades funcionais distintas que tem a capacidade de auto-organização com proteínas formando estruturas para proteger ingredientes bioativos do ambiente externo ou entregá-los a um alvo biológico específico. Enquanto a maioria das proteínas possui propriedades funcionais e biológicas únicas, os polissacarídeos apresentam grande variação devido a características particulares, como composição de monossacarídeos, tamanho e grau de ramificação, que alteram os mecanismos de interação com outras biomoléculas. Os polissacarídeos têm muitos grupos funcionais (como grupos hidroxila e ácido carboxílico) em sua estrutura que podem ser facilmente modificados para interagir eficientemente com um grande número de ingredientes bioativos, nutracêuticos e medicamentos (DEBELE; MEKURIA; TSAI, 2016; MOHAMMADIAN et al., 2020).

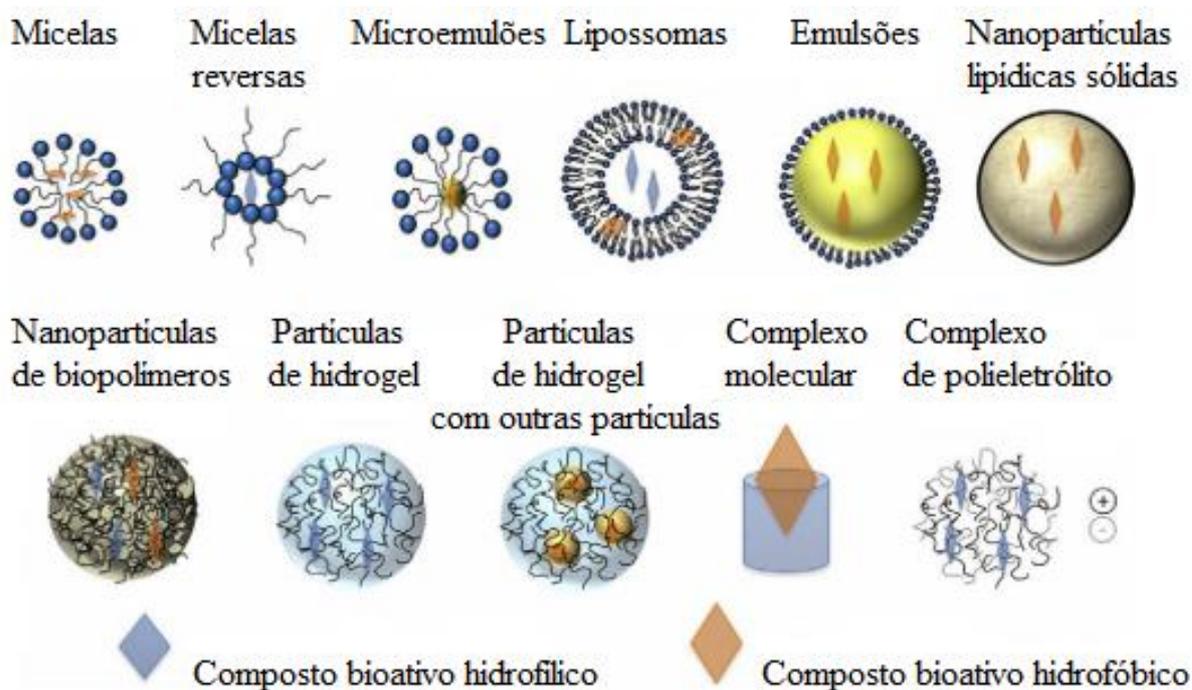
A auto-organização (*self-assembly*) é uma técnica ecologicamente correta, econômica e conveniente na qual as moléculas formam espontaneamente agregados ordenados por meio de ligação não covalente, como interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. A auto-organização de nanopartículas de biopolímeros, em especial polissacarídeo e proteína, pode aumentar a estabilidade química, bioacessibilidade e biodisponibilidade de agentes funcionais. Essas nanoestruturas podem ser usadas como carreadores promissores para a entrega de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos em condições fisiológicas devido à alta estabilidade em uma ampla faixa de pH. A mistura física de polissacarídeos e proteínas pode formar novas estruturas não covalentes por meio de métodos de gelificação a partir da desnaturação térmica das proteínas. Em primeiro momento, o polissacarídeo é misturado com uma proteína. As estruturas polissacarídeo/proteína não covalentes resultantes são aquecidos no ponto isoelétrico da proteína, acima de sua temperatura de desnaturação térmica, para formar sistemas solúveis estáveis (sistema monofásico) ou sistemas insolúveis (sistema bifásico). A formação do tipo de sistema depende de fatores intrínsecos, como tipos de biopolímeros, cargas positivas ou negativas, hidrofobicidade ou hidrofiliicidade, estrutura molecular ou peso molecular e flexibilidade molecular, e fatores extrínsecos, como razão molar entre biopolímeros, concentração de biopolímeros, força iônica, pH e temperatura (LI et al., 2015; WEI; HUANG, 2019; ZHANG et al., 2021).

## **1.1 Nanopartículas**

Na indústria de alimentos, a nanotecnologia é um campo emergente com potencial de revolucionar o desenvolvimento de sistemas alimentares funcionais, melhorando as condições de processamento de alimentos e

permitindo a obtenção de produtos alimentares de alta qualidade, mais seguros e saudáveis. As nanopartículas são dispositivos nanométricos, geralmente desenvolvidos numa escala inferior a 1000 nm de diâmetro, podendo apresentar diferentes morfologias e propriedades a depender do material utilizado em sua construção (Figura 1) (DEBELE; MEKURIA; TSAI, 2016; FASOLIN et al., 2019).

Figura 1 - Exemplos de nanopartículas



Sistemas de entrega coloidal que podem ser usados para encapsular, proteger e fornecer ingredientes alimentares funcionais, com a localização mais provável do composto bioativo com base em sua hidrofiliicidade ou hidrofobicidade. Adaptado de (JOYE; DAVIDOV-PARDO; MCCLEMENTS, 2014).

Devido as suas propriedades físico-químicas e biológicas, as nanopartículas vêm sendo utilizadas com sucesso na encapsulação e liberação controlada de compostos bioativos, micronutrientes (por exemplo, vitaminas e minerais) e nutraceuticos (por exemplo, flavonoides e carotenoides). O tamanho reduzido das nanopartículas lhes confere uma grande área de superfície e pode contribuir com a bioacessibilidade e com o

aumento da biodisponibilidade desses compostos no organismo. A bioacessibilidade pode ser definida como o componente do alimento ingerido que foi digerido, absorvido pelas células do epitélio intestinal e foi pré-metabolizado no intestino e depois metabolizado pelo fígado. Enquanto que a biodisponibilidade refere-se à fração dos nutrientes ou compostos ingeridos que atingem a circulação sistêmica e fica disponível para utilização nas funções fisiológicas normais (FASOLIN et al., 2019; THAKUR et al., 2020; WOOD, 2005).

## **1.2 Formação de nanopartículas via auto-organização**

Proteínas e polissacarídeos são geralmente usados simultaneamente pela indústria de alimentos com o propósito de melhorar as propriedades funcionais de produtos alimentícios. Esses biopolímeros auxiliam na estrutura, textura e estabilidade dos produtos a serem desenvolvidos. A mistura desses biopolímeros pode promover um sistema de gelificação com diferentes características sensoriais a depender das características dos biopolímeros usados e das condições ambientais de processamento. Assim, nanopartículas de polissacarídeo/proteína podem ser formadas a partir da combinação de diferentes tipos de biopolímeros (LE; RIOUX; TURGEON, 2017).

A formação de nanopartículas via auto-organização é um método amplamente utilizado para produzir nanopartículas de biopolímeros a partir de misturas de proteínas e polissacarídeos. Esse método consiste na formação de uma nova estrutura ordenada, através da auto-organização de cada um dos componentes individuais (átomos, moléculas, colóides e polímeros) de maneira predefinidas que resultam na auto-organização espontânea desses componentes em uma estrutura de ordem superior. Em resumo, uma proteína e um polissacarídeo iônico são misturados em

condições de pH em que possuem cargas opostas, possibilitando uma auto-organização espontânea dos componentes e permitindo a formação de uma nova estrutura mais complexa que os componentes isolados. As nanopartículas são comumente obtidas através da interação eletrostática intermolecular de cargas opostas disponíveis, geralmente têm dimensões na faixa de nanoescala ( $10^{-9}$  m), e podem ser usados para encapsular e entregar diferentes compostos químicos e moléculas bioativas. (DEBELE; MEKURIA; TSAI, 2016; JAFARI; MCCLEMENTS, 2017; JIN et al., 2016; OZIN et al., 2009). Por ser um método onde a formação das nanopartículas ocorre por interação de cargas opostas dos políons, não há necessidade de utilizar determinados agentes ligantes (como componentes orgânicos), reduzindo assim uma possível toxicidade e/ou efeitos colaterais dos reagentes.

### **1.3 Aplicações das nanopartículas**

Biopolímeros naturais, como polissacarídeos e proteínas, vêm sendo amplamente utilizados em diferentes áreas. As propriedades funcionais desses biomateriais permitem seu uso na indústria alimentícia, farmacêutica e biomédica. Em virtude dessas propriedades funcionais é possível usar esses biomateriais como ingredientes para auxiliar no desenvolvimento de produtos alimentícios com novas formulações e aprimorando parâmetros relacionados à estabilidade, estrutura, viscoelasticidade, textura e sabor (LIU et al., 2012; ZHOU et al., 2016).

A formulação de nanopartículas possibilita melhorar as características funcionais dos biopolímeros nativos. Assim, diversos setores industriais têm utilizado a nanoencapsulação como uma tecnologia promissora, principalmente para o encapsulamento, proteção e entrega direcionada de compostos bioativos, podendo ser útil também para controlar a taxa de

liberação e entrega direcionada de agente terapêutico (REHMAN et al., 2019).

O encapsulamento de diversos ingredientes (vitaminas, nutrientes, minerais, antioxidantes, antimicrobianos, prebióticos e probióticos) tem sido empregado com o propósito de melhorar a solubilidade e as características sensoriais (mascarar sabores desagradáveis), preservar a atividade, impedir reações oxidativas ou até melhorar a bioacessibilidade e a biodisponibilidade de compostos bioativos. Recentemente, a indústria de alimentos vem investindo consideravelmente no desenvolvimento de alimentos funcionais enriquecidos com nanopartículas como uma alternativa tecnológica para o aumento do valor nutricional dos alimentos ou para a suplementação alimentar (DE SOUZA SIMÕES et al., 2017; FASOLIN et al., 2019; JAFARI; MCCLEMENTS, 2017). A Tabela 1 apresenta algumas das aplicações de nanopartículas desenvolvidas a partir de biomateriais empregadas em diferentes áreas.

Tabela 1 - Nanopartículas de biomateriais e suas aplicações na encapsulação de diferentes compostos.

<b>Nanopartículas</b>	<b>Composto</b>	<b>Setor</b>	<b>Referência</b>
Cloridrato de quitosana/ Carboximetil-amido	Curcumina	Farmacêutico/ Medicina	(LI et al., 2019)
Quitosana- Ácido ferúlico	Óleo essencial de Lippia Origanoides Kunth	Farmacêutico/ Medicina	(ALMEIDA et al., 2018)
Pectina/ Proteína do leite	Óleo essencial laranja em nanoemulsão	Alimentício/ Farmacêutico	(KWAN; DAVIDOV- PARDO, 2018)
Quitosana- Ácido benzoico	Óleo essencial de alecrim	Farmacêutico/ Medicina	(HADIAN et al., 2017)
Pectina/ Quitosana	Mesalamina, curcumina, progesterona	Farmacêutico/ Medicina	(NEUFELD; BIANCO- PELED, 2017)
Ovabulmina/ Dextrano	Curcumina	Farmacêutico/ Medicina	(FENG et al., 2016)
Proteína de soja/ Dextrano	Riboflavina	Alimentício/ Farmacêutico	(JIN et al., 2016)
Albumina de soro bovino/Pectina	Vitamina C	Alimentício/ Farmacêutico	(PENG et al., 2016)
Albumina de soro bovino/Quitosana	Doxorrubicina hidrocloreto	Farmacêutico/ Medicina	(WANG et al., 2016)
Proteína do ovo/ Pectina	Curcumina	Farmacêutico/ Medicina	(ZHOU et al., 2016)
Quitosana/ Ácido benzoico	Óleo essencial de tomilho	Alimentício/ Farmacêutico	(KHALILI et al., 2015)
Lisozima/ Carboximetilcelulose	Metotrexato	Farmacêutico/ Medicina	(LI et al., 2015)
Lisozima/ Pectina	Metotrexato	Farmacêutico/ Medicina	(LIN et al., 2015)
$\beta$ -lactoglobulina/ Pectina	Ácidos graxos poliinsaturados $\omega$ -3	Alimentício/ Farmacêutico	(ZIMET; LIVNEY, 2009)

Fonte: Elaborada pelo autor.

## 1.4 Caracterização das nanopartículas

### 1.4.1 Tamanho

As propriedades estruturais e morfológicas de nanopartículas à base de biopolímeros, como tamanho, índice de polidispersidade e carga superficial, diferem significativamente dependendo dos materiais e condições de preparação utilizados em sua fabricação. O pequeno tamanho e a área de superfície das partículas desempenham um papel crucial porque influenciam a clareza óptica, estabilidade física, propriedades físico-químicas, eficiência de encapsulamento, características de liberação controlada e atividade biológica de sistemas de nanopartículas na entrega controlada de compostos (JOYE; DAVIDOV-PARDO; MCCLEMENTS, 2014). Geralmente, esses sistemas nanoparticulados apresentam uma menor toxicidade quando em relação a outras estruturas de maior tamanho (KHOSA; REDDI; SAHA, 2018).

O Espalhamento dinâmico de luz (DLS) é uma técnica tradicional comumente aplicada para estudar o comportamento de difusão de macromoléculas em solução na faixa de um único nanômetro a alguns micrômetros. O método não é invasivo, requer pequenos volumes de amostra e fornece caracterização de partículas rápida e precisa (reprodutível) (STETEFELD; MCKENNA; PATEL, 2016).

O índice de polidispersidade (PDI) é adimensional e usado para descrever o grau de não uniformidade da distribuição de tamanho das partículas. O valor de PDI varia de 0 a 1, onde 0 refere-se a partículas homogêneas (monodispersas), ou seja, partículas não interagentes entre si e de tamanhos perfeitamente uniformes, e 1 refere-se a altamente heterogêneas (polidispersas), ou seja, distribuição extensa dos tamanhos das partículas. Partículas com valores de PDI até 0,05 são consideradas altamente monodispersas. No entanto, partículas com valores de PDI superiores a 0,7

indicam que a amostra é altamente heterogênea, e a técnica DLS pode não ser adequada para análise de amostras polidispersas. Em sistemas baseados em biopolímeros, valores de PDI até 0,2 são considerados aceitáveis e indicam uma população monodispersa de materiais nanoparticulados (DANAEI et al., 2018).

#### **1.4.2 Potencial zeta**

O potencial zeta ( $\zeta$ ) representa a carga superficial das nanopartículas e pode ser determinado medindo a velocidade da partícula se movendo em uma célula sob a influência de um campo elétrico aplicado (mobilidade eletroforética/eletroacústica) medida por um analisador de potencial zeta. Geralmente, coloides com alto potencial zeta em módulo (positivo ou negativo) proporcionam boa estabilidade. Valores de potencial zeta ( $|\zeta| > 30$  mV) sugerem um sistema altamente estável, sem tendência à agregação, pois as forças eletrostáticas atrativas disponíveis no sistema são superadas pelas forças repulsivas (BHATTACHARJEE, 2016; KHOSA; REDDI; SAHA, 2018).

Vários fatores podem influenciar as medidas de potencial zeta de suspensões, como pH, concentração de aditivos e força iônica, que afetam sua estabilidade, principalmente em dispersões aquosas. Assim, uma curva de titulação do potencial zeta das partículas em dispersão em função do pH é frequentemente empregada para determinar o ponto isoelétrico (ou ponto da somatória de cargas igual a zero) e a carga superficial sob diferentes condições. Em valores de pH próximos ao ponto isoelétrico, os sistemas coloidais perdem a estabilidade e se aglomeram ou floculam (BHATTACHARJEE, 2016; CLOGSTON; PATRI, 2011; HONARY; ZAHIR, 2013).

### **1.4.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica vantajosa para a caracterização estrutural de géis relacionados às interações intermoleculares presentes em biopolímeros. A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) revela a composição dos vários grupos funcionais que podem ser detectados analisando todo o espectro das amostras. Além disso, a técnica de FTIR também pode ser utilizada para explorar as interações intra e intermoleculares entre as moléculas de proteínas, polissacarídeos e nanopartículas à base de biopolímeros enriquecidos com compostos bioativos (KAROYO; WILSON, 2017; MOHAN et al., 2016).

### **1.4.4 Análise térmica**

A calorimetria de varredura diferencial (DSC) permite investigar o comportamento térmico e as propriedades físicas de amostras puras, suas misturas e interações com outras substâncias em função da temperatura e/ou tempo de aquecimento. Fundamentalmente, o DSC permite a medição da energia absorvida (processo endotérmico) ou liberada (processo exotérmico) por uma amostra após aquecimento, resfriamento ou manutenção isotérmica a uma temperatura constante. O DSC tem sido amplamente utilizado para materiais poliméricos, pois pode medir facilmente a transição de fase térmica do material. Além disso, o DSC pode ser utilizado para medir diversas propriedades como temperatura de transição vítrea, temperatura de fusão, temperatura de desnaturação, temperatura de decomposição, entalpia de desdobramento em biomoléculas, entre outras (NEUFELD; BIANCO-PELED, 2017; ROSALES et al., 2021; ULLAH et al., 2019).

### 1.4.5 Morfologia

A análise morfológica das nanopartículas, em geral, está relacionada às características externas, como distribuição do tamanho dos poros, forma e morfologia de agregação das partículas. Duas técnicas essenciais nesta área são a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Dependendo do poder de resolução da MEV (alta resolução  $\geq 0,4$  nm), seu ambiente e a amostra, é possível medir o tamanho e a distribuição de tamanho das nanopartículas a partir do tamanho de 1 nm com excelente visualização de estruturas simples (VLADÁR; HODOROABA, 2020). A MET tem sido considerada o “padrão ouro” para caracterização geral de nanopartículas. A MET é uma técnica flexível que gera imagens na faixa de tamanho de 1 a 100 nm, permitindo determinar as propriedades físicas das nanopartículas (tamanho, forma, topologia de superfície, estrutura cristalina e morfologia geral), e também fornece informações sobre a morfologia da agregação e composição química de uma grande variedade de amostras (MAST et al., 2020).

## 1.5 Biopolímeros

Biopolímeros são biomoléculas poliméricas compostas por unidades monoméricas que, através de ligação covalente, formam macromoléculas. O prefixo “bio” implica que eles são materiais produzidos por organismos vivos, como plantas, árvores e micro-organismos, ou obtidos sinteticamente a partir de fontes biológicas, como carboidratos, lipídeos, proteínas, e aminoácidos (HERNÁNDEZ; WILLIAMS; COCHRAN, 2014; MOHAN et al., 2016).

Os biopolímeros são classificados em diferentes parâmetros, sendo os principais relacionados à biodegradabilidade (biodegradável e não-biodegradável) e às unidades monoméricas. Dependendo da natureza que

fazem parte de sua composição, os biopolímeros podem ser classificados em três grupos: (i) polissacarídeos, formados por açúcares (ex. celulose, presente na parede celular das plantas); (ii) proteínas, formados por aminoácidos (ex. ovalbumina, proteína encontrada na clara do ovo); e (iii) ácidos nucleicos, formados por nucleotídeos (ex. DNA, material genético de um organismo vivo) (MOHAN et al., 2016).

### **1.5.1 Pectina**

As pectinas são heteropolissacarídeos complexos naturais compostos de resíduos de poli (ácido  $\alpha$ -1-4 galacturônico) com graus variáveis de metilação de resíduos de ácido carboxílico e acetilação, além de uma variedade de açúcares neutros, como ramnose, galactose e arabinose. Possui ampla aplicação em diversas tecnologias devido à sua utilização como agente gelificante, emulsificante ou estabilizante e, por sua natureza não tóxica, biocompatível e biodegradável, vem sendo utilizado com sucesso em diversas aplicações em indústrias, produtos farmacêuticos, nutracêuticos, administração de medicamentos, engenharia de tecidos, embalagens de alimentos e cosméticos (MINHAS et al., 2016; NOREEN et al., 2017).

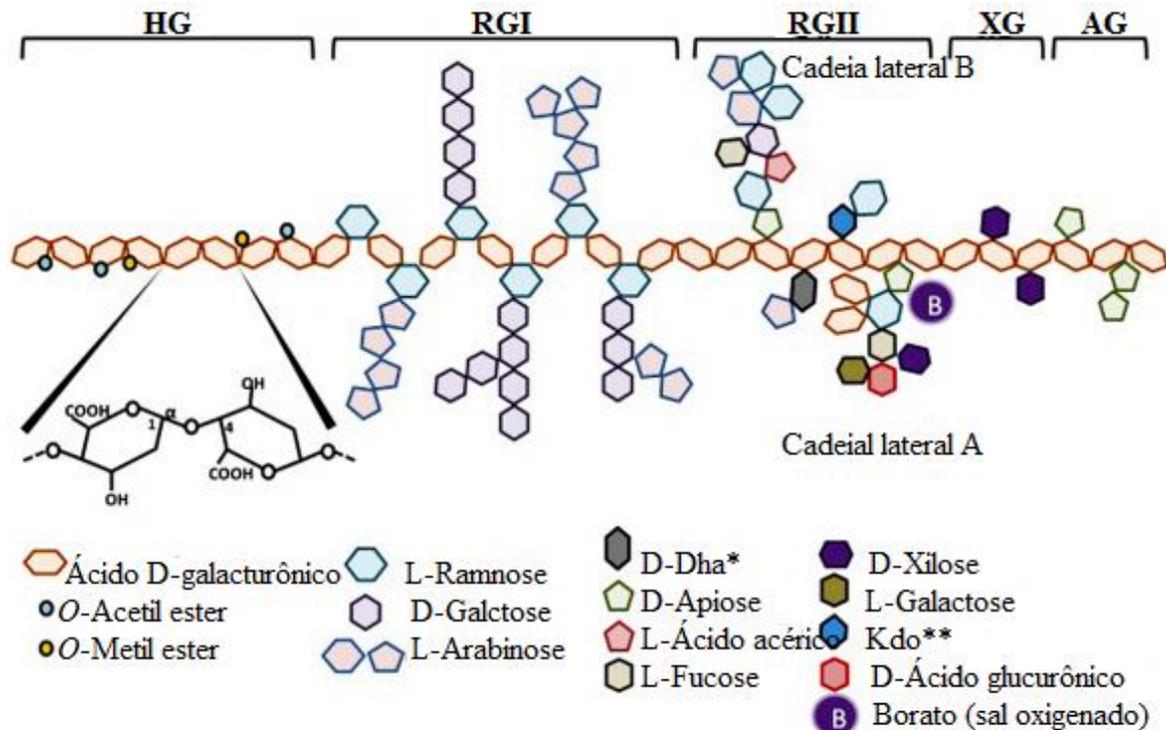
Por ser um polissacarídeo natural amplamente encontrado na natureza, a pectina também vem sendo considerada como um biopolímero promissor na área da nanotecnologia, em micro e nano formulações, atuando como dispositivo de transporte, entrega e liberação controlada de diversos compostos no organismo e com potencial para auxiliar no tratamento de diversas patologias incluindo o câncer (POSOTTO et al., 2015). A pectina é estável em pH baixo e resistente a proteases e amilases ativas no trato gastrointestinal superior, sendo amplamente usada na administração de medicamentos específicos do cólon. Além disso, em pH mais elevado, ela é

dissociada, expandida e facilmente metabolizada pela microbiota intestinal (MINHAS et al., 2016).

Estruturalmente, a pectina é composta por pelo menos 17 tipos diferentes de monossacarídeos, com ácido D-galacturônico como componente principal, seguido pela D-galactose e L-arabinose. O grau de esterificação (GE) é um termo importante que influencia várias propriedades da pectina e pode ser definido como a porcentagem do grupo carboxílico esterificado. Com base no GE, a pectina pode ser classificada como: (i) pectina de alto teor de metoxilação (ATM >50%), e (ii) pectina de baixo teor de metoxilação (BTM >50%). Além disso, o GE varia de acordo com a fonte de pectina (REHMAN et al., 2019). Portanto, as características estruturais da pectina, provenientes do tipo de planta e condição de extração empregada, determinam a sua propriedade funcional e, conseqüentemente, a sua aplicabilidade tecnológica.

Os principais conjuntos de polissacarídeos presentes nas pectinas são os homogalacturonanos (HG), os ramnogalacturonanos do tipo I (RG-I) e os galacturonanos substituídos (GS), compostos por diversos grupos como ramnogalacturonanos do tipo II (RG-II), xilogalacturonanos (XG) e apiogalacturonanos (AG) (LECLERE; CUTSEM; MICHIELS, 2013). A Figura 2 exemplifica a estrutura da pectina.

Figura 2 - Polissacarídeos constituintes da pectina



\*D-Dha = Ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heptulosarico

\*\*Kdo = Ácido 3-deoxi-D-manoocto-2-ulosônico

HG, homogalacturonano; RGI, ramnogalacturonano do tipo I; RGII, ramnogalacturonano do tipo II; XG, xilogalacturonano; e AG, apiogalacturonano. Adaptado de (LECLERE; CUTSEM; MICHIELS, 2013).

É importante ressaltar que cada pectina apresenta características estruturais diferenciadas, tendo em vista que vários são os fatores que podem influenciar na composição química desse biopolímero assim como nas suas propriedades funcionais. De qualquer modo, por todos os benefícios supracitados, a pectina se apresenta como biomaterial ideal a ser utilizado como matriz de micro e nano encapsulação de diversos compostos com potencial de aplicação em diferentes áreas.

### 1.5.2 Lisozima

As lisozimas são enzimas com propriedades antimicrobianas, projetadas para degradar a camada protetora da membrana celular de bactérias. Elas são amplamente encontradas em todo o reino animal, podendo ser produzidas por vírus, bactérias, fungos, plantas, e presente em vários tecidos e fluidos de aves e mamíferos. A lisozima encontra-se em maior concentração na clara do ovo (3,5%). Essa enzima é responsável por hidrolisar a ligação  $\beta$ -1,4-glicosídica entre o ácido N-acetilmurâmico e N-acetil-d-glucosamina (componente estrutural encontrado na parede celular bacteriana) sendo eficaz, principalmente, contra bactérias Gram-positivas (ABEYRATHNE; LEE; AHN, 2013; AMINLARI; MOHAMMADI HASHEMI; AMINLARI, 2014; SUN; XIAO; HUANG, 2019).

Estruturalmente a lisozima é formada por um polipeptídeo de cadeia única contendo 129 resíduos de aminoácidos (14,3 kDa), e ponto isoelétrico (pI) entre 10,5-11. A estrutura tridimensional desta proteína é estabilizada por quatro pontes de dissulfeto que contribuem para a sua termoestabilidade (1–100 °C), sendo capaz de resistir à ebulição por 1–2 min, e manter a estabilidade durante os processos de liofilização e secagem térmica. A lisozima também é capaz de se manter ativa na presença de solventes e quando redissolvida em água e em uma ampla faixa de pH (de 4 a 10) (CARRILLO et al., 2014; SILVETTI et al., 2017).

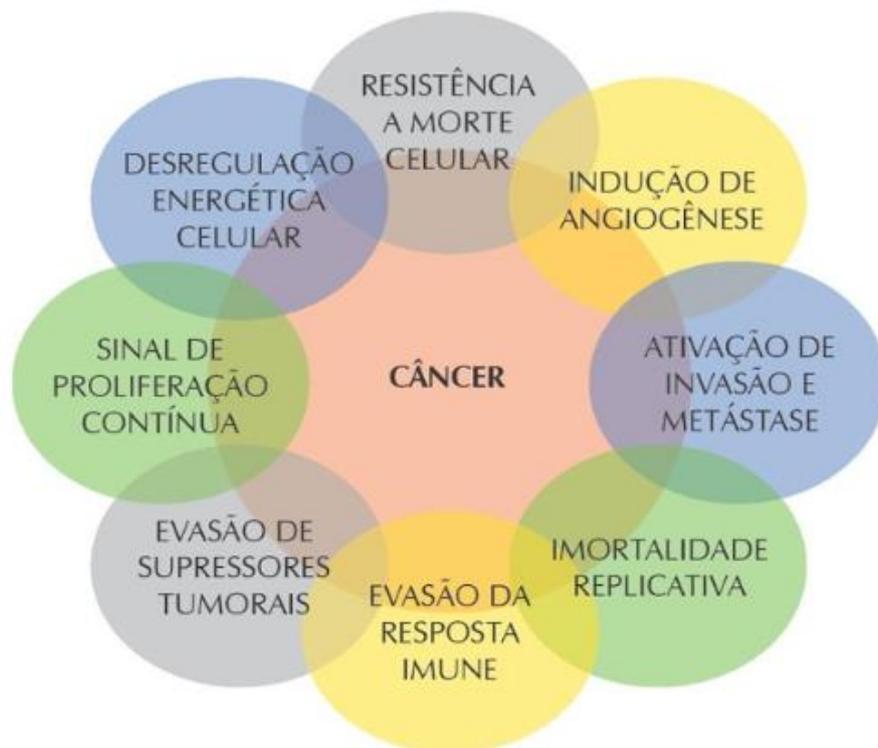
A segurança e a estabilidade tecnológica da lisozima a torna um conservante ideal para aplicações em alimentos, assim como prolongar a vida útil dos produtos e aumentar a segurança dos alimentos. Na indústria alimentícia, por exemplo, ela vem sendo utilizada no processamento de queijos, com o propósito de acelerar o amadurecimento e prevenir o crescimento de *Clostridium tyrobutyricum*, contaminante presente no leite usado na produção de queijo, responsável pelo “estufamento tardio” e pelos

sabores desagradáveis. A lisozima também é utilizada para controlar o crescimento das bactérias do ácido láctico no vinho e na cerveja e, mais recentemente, vem sendo empregada em formulações de alimentos infantis para estimular o sistema imunológico dos bebês. Os peptídeos derivados a partir dessa proteína também representam uma fonte de princípios ativos com propriedades biotecnológicas e promotoras de saúde, com propriedades anti-inflamatória, anticâncer, e analgésica, podendo ser usados como ingredientes benéficos na formulação de alimentos funcionais e nutracêuticos, possibilitando a sua aplicação nas mais diversas áreas (GYAWALI; IBRAHIM, 2014; SARKAR et al., 2020; SILVETTI et al., 2017).

## **1.6 O câncer de cólon**

O câncer é um termo que se refere, basicamente, às doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células em um determinado órgão do corpo humano, prejudicando o seu funcionamento, e podendo se espalhar para outros órgãos (metástase). Atualmente, o câncer é uma das principais causas de mortalidade no mundo. Apesar de a maioria dos cânceres apresentarem características muito diferentes decorrentes, principalmente, de sua origem genética, já foram descritas oito características comuns à maioria dos cânceres (Figura 3) (DEBELE; MEKURIA; TSAI, 2016; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019a; SAITO et al., 2015).

Figura 3 - Características do câncer



Principais parâmetros responsáveis por alterar o funcionamento da célula normal e dar origem ao câncer. Fonte: (SAITO et al., 2015).

O câncer de intestino, também chamado colorretal (cólon e reto), é considerado o terceiro câncer mais comum em todo o mundo, e apresentou uma incidência estimada de aproximadamente 1,8 milhão de novos casos diagnosticados e índice de mortalidade superior a 880,000 para o ano de 2018 (ARAGHI et al., 2019). No Brasil, foi estimada a incidência de mais de 40,000 novos casos anuais de câncer de cólon e reto, sendo este considerado o segundo tipo mais comum no público masculino (9,1%) e feminino (9,2%), atrás apenas de câncer de próstata (29,2%) e mama feminina (29,7%). É importante salientar que o câncer colorretal vem aumentando o número de incidência a cada ano, principalmente em países emergentes ou em desenvolvimento, em decorrência de fatores específicos relacionados ao estilo de vida, incluindo alimentação inadequada e obesidade

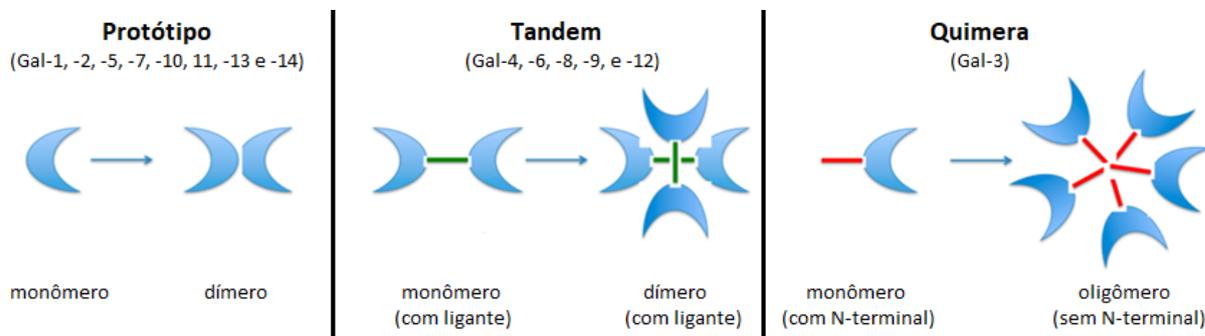
(ARAGHI et al., 2019; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019b).

### 1.6.1 Galectina-3

As galectinas são um grupo de proteínas de origem animal da família das lectinas com a capacidade de se ligar a  $\beta$ -galactosídeos através de domínios de reconhecimento de carboidratos (DRC) compostos por cerca de 130 aminoácidos. As galectinas podem ser encontradas tanto no meio intercelular, quanto na superfície celular, como também no meio extracelular. No interior das células podem ser encontradas no citoplasma, nas mitocôndrias, no núcleo, nos compartimentos endossomais e na parte interna da membrana plasmática (VLADOIU; LABRIE; ST-PIERRE, 2014; YANG; RABINOVICH; LIU, 2008).

Atualmente foram identificados quinze tipos de galectinas nos mamíferos. De acordo com sua estrutura, as galectinas podem ser classificadas em três diferentes grupos: (i) protótipo (Galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 e 15) que apresenta apenas um DRC; (ii) tandem (Galectinas 4, 6, 8, 9 e 12) que apresentam dois DRCs unidos por um peptídeo ligante; e (iii) quimera composto apenas pela Galectina-3 (Gal-3), com um único DRC conectado a um domínio N-terminal rico em aminoácidos hidrofílicos, principalmente prolina e glicina. Além disso, a Gal-3 é a única capaz de formar uma estrutura de pentâmero (Figura 4) (RABINOVICH; CROCI, 2012).

Figura 4 - Membros da família das galectinas e suas respectivas interações.



Grupo protótipo, com apenas um DRC; grupo tandem, com dois DRCs e um peptídeo ligante; e grupo quimera, com um DRC e um domínio N-terminal rico em prolina, glicina, alanina e tirosina. Adaptado de SCIANACCHITANO et al. (2018).

Nos adultos, a Gal-3 é expressa de forma ubíqua no tecido hematopoiético, timo, linfonodos, pele, trato respiratório, trato digestivo, trato reprodutivo e trato urinário. A expressão da Gal-3 nos tecidos é regulada pelo desenvolvimento; é mais abundante durante a embriogênese e o desenvolvimento em comparação com a vida adulta. Ainda, durante os estágios iniciais da embriogênese, seu padrão de expressão é mais específico, localizado predominantemente nos epitélios, rins, condrócitos e fígado, demonstrando assim a função dessa proteína no desenvolvimento e crescimento de determinados órgãos (DONG et al., 2018; SUTHAHAR et al., 2018).

A Gal-3 desempenha papéis importantes na proliferação celular, adesão, diferenciação, angiogênese e apoptose. Além disso, existem evidências crescentes de que a Gal-3 pode atuar como mediadora da transformação, migração, invasão e metástase das células tumorais. A Gal-3 pode ser usada como um biomarcador de diagnóstico ou prognóstico para certos tipos de doenças cardíacas, renais e câncer. Estudos sugerem cada vez mais que o nível da Gal-3 é significativamente elevado nos tecidos

cancerígenos, indicando que essa proteína pode desempenhar um papel oncogênico importante no desenvolvimento e progressão do câncer em vários tipos de câncer, como câncer colorretal, câncer de ovário, câncer de pâncreas, câncer de mama, carcinoma hepatocelular, câncer de próstata, câncer de cabeça e pescoço, entre outros (AJANI et al., 2018; DONG et al., 2018; VLADOIU; LABRIE; ST-PIERRE, 2014; WANG et al., 2018).

O aumento demasiado da expressão da Gal-3 em células cancerígenas promove a ativação de vias sinalizadoras de maneira inapropriada, especialmente as vias correspondentes aos receptores de proteínas EGF (fator de crescimento epidérmico) e TGF $\beta$  (fator de transformação de crescimento beta). Com o elevado nível de Gal-3, diminui-se a capacidade de apoptose celular, aumentando a chance do processo inflamatório e da proliferação exacerbada de células tumorais. Além disso, a Gal-3 também pode modular os receptores VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e bFGF (fator de crescimento fibroblástico básico), mediadores da angiogênese e, conseqüentemente, promover o crescimento de novos vasos sanguíneos e aumentar as chances de metástases (HU; JIANG; XU, 2012; MARKOWSKA; LIU; PANJWANI, 2010; SUTHAHAR et al., 2018).

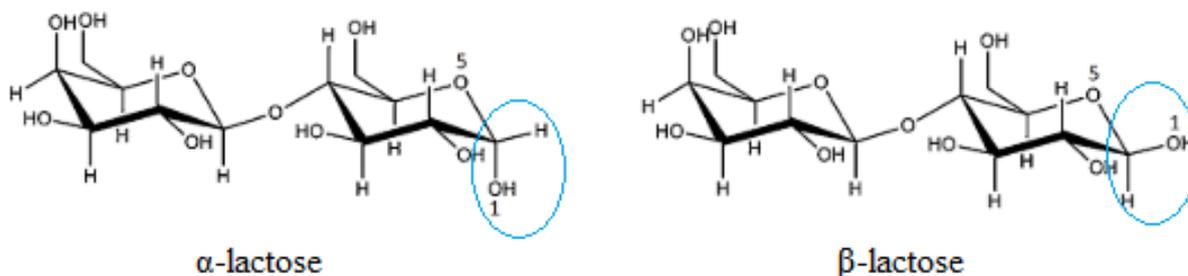
### **1.6.2 Lactose**

A lactose é um carboidrato dissacarídeo encontrado apenas no leite dos mamíferos (e derivados) e é composto por dois monossacarídeos: galactose e glicose, ligados por uma ligação  $\beta$ -1,4-glicosídica (ligação beta entre o carbono 1 da galactose e o carbono 4 da glicose). No setor alimentício, a lactose é utilizada como aditivo comercial devido as suas propriedades de textura e sabor, podendo ser usada em formulações de produtos para lactantes, uso dietético especial, indústria de laticínios, indústria de confeitaria, indústria de panificação, misturas preparadas, e

muitos outros. Além disso, a lactose é um excipiente presente em muitas formulações farmacêuticas como medicamentos e nutracêuticos por apresentar inúmeras propriedades vantajosas como baixo custo, natureza inerte, segurança e baixa higroscopicidade (ALTAMIMI et al., 2019; BURRINGTON, 2007; LÓPEZ-PABLOS et al., 2018).

A lactose apresenta duas formas anoméricas, a  $\alpha$ -lactose e a  $\beta$ -lactose. Essas formas existem como consequência de uma mudança de orientação dos grupos hidrogênio e hidroxila ao redor do centro quiral no carbono C1 da glicose, na forma cíclica da molécula, presente na estrutura da lactose (Figura 5), fazendo com que as duas formas possuam diferentes propriedades biológicas e tecnológicas (ALTAMIMI et al., 2019; JAWAD et al., 2014).

Figura 5 - Formas anoméricas da lactose



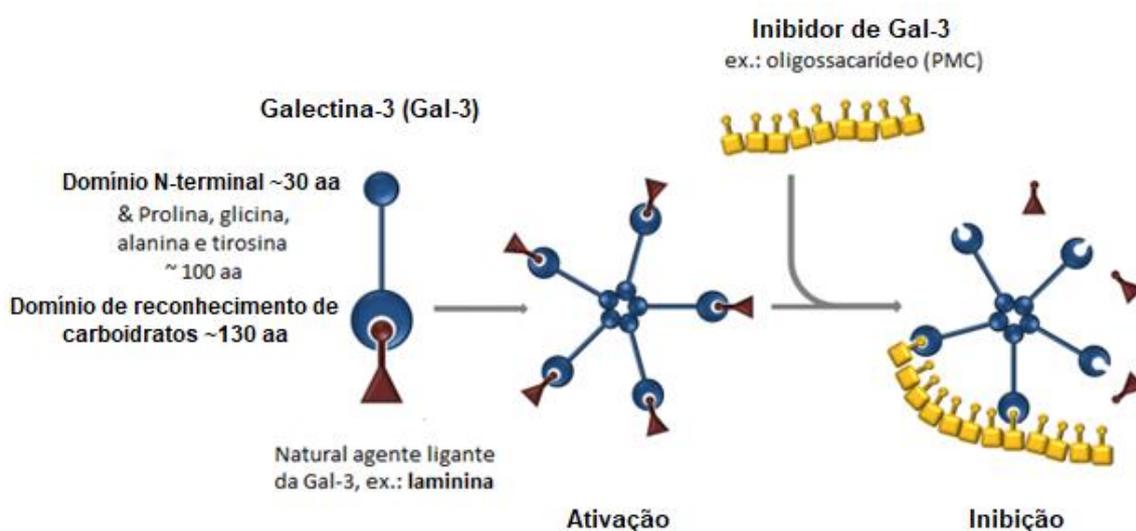
Espécies de lactose que existem durante a mutarrotação. Adaptado de (ALTAMIMI et al., 2019).

Estudos prévios demonstraram que açúcares de baixo peso molecular como a  $\beta$ -lactose e a N-Acetil-Lactosamina são capazes de interagir e inibir a Gal-3. No entanto, a administração desses inibidores naturais por via oral é um fator limitante, uma vez que no trato gastrointestinal eles serão metabolizados (seja por enzimas endógenas, seja pela microbiota intestinal), não possuindo então qualquer possível efeito anticâncer local ou sistêmico caso ingeridos por via oral (DINGS et al., 2018; SUTHAHAR et al., 2018).

### 1.6.3 Outros oligossacarídeos inibidores de galectina-3

Uma outra maneira de diminuir os efeitos deletérios da alta expressão da Gal-3 nas células é fazer com que o excesso dessa proteína seja inibido por algum tipo de ligante específico, evitando que ocorra a interação da Gal-3 extracelular com as células, diminuindo assim os seus efeitos biológicos de inflamação, proliferação, adesão, migração e metástase celular. Estudos demonstraram que a pectina modificada de citros (PMC) de baixo peso molecular e rica em galactose é capaz de interagir com a Gal-3 extracelular e, em um sistema de *feedback* negativo, reduzir os níveis de expressão de Gal-3 *in vivo* em camundongos e humanos (SCIACCHITANO et al., 2018). No entanto, ainda não se sabe como e se esse polissacarídeo ultrapassa a membrana citoplasmática para inibir a Gal-3 intracelular. A Figura 6 ilustra como a PMC interage e inibe a Gal-3.

Figura 6 - Esquema estrutural da interação entre a galectina-3 com agentes naturais ligantes e com neutralizadores externos



A proteína da matriz extracelular, laminina, liga-se a Gal-3 e causa sua ativação. Em presença de agentes ligantes neutralizadores externos, como a pectina modificada de citros, a Gal-3 sofre mudanças conformacionais e perde a sua atividade. Adaptado de (DE BOER et al., 2014).

Portanto, o desenvolvimento de um sistema de carreamento com componentes presentes nos alimentos, com capacidade de encapsular, proteger da degradação, entregar e liberar de maneira controlada os inibidores de Gal-3 no interior celular, por via endossomal ou alguma outra via, é uma oportunidade emergente para auxiliar de forma adjuvante no tratamento do câncer de cólon. Nesse contexto, a utilização de nanopartículas produzidas a partir de biopolímeros naturais, de baixa toxicidade, com baixo potencial alergênico, baixo custo, com capacidade de formação de gel e que sejam resistentes à digestão pelas enzimas humanas do trato gastrointestinal, é de grande interesse para o desenvolvimento de novos produtos como, por exemplo, suplementos alimentares para atuarem como adjuvantes ao tratamento do câncer de cólon.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos geral

Desenvolver nanocarreadores de  $\beta$ -lactose via auto-organização, tendo como material de base a proteína globular lisozima e o polissacarídeo pectina de citros.

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Estudar o efeito da razão molar de pectina/lisozima e as condições operacionais de pH e tratamento térmico utilizados na obtenção de nanopartículas de biopolímeros;
- ✓ Preparar e caracterizar as nanopartículas via auto-organização, de acordo com as melhores condições operacionais previamente determinadas;
- ✓ Investigar a estabilidade das nanopartículas;
- ✓ Incorporar a  $\beta$ -lactose nas nanopartículas e determinar a eficiência de encapsulamento;
- ✓ Realizar ensaios de mediação de endocitose *in vitro* das nanopartículas com  $\beta$ -lactose encapsulada, fazendo uso da utilização de células epiteliais de câncer de colón (HCT-116).

### 3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1 Materiais

Lisozima (MM = 14.3 kDa, pureza  $\geq 90\%$ , Lote n° SLBZ2146), pectina de citros (ácido galacturônico  $\geq 74\%$ , lote n° SLBV5461),  $\beta$ -lactose (MM = 342, anômero  $\alpha$ -lactose  $\leq 30\%$ , pureza  $\geq 99\%$ , lote n° SLBF3695V), e kit teste para lactose (MAK017-1KT, lote n° 4D11K06240) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Luis, USA). Ácido clorídrico (HCl, lote n° 17689) e hidróxido de sódio (NaOH, lote n° 227086) foram adquiridos da Labsynth<sup>®</sup> Ltda (São Paulo, Brasil). Para a realização do ensaio *in vitro* com as células epiteliais de câncer de colón, as linhagens celulares (HCT-116) foram obtidas do Banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ, Brasil); meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), meio essencial mínimo Eagle (MEM), penicilina, estreptomicina, tripsina-EDTA, soro fetal bovino (PBS) e isotiocianato de fluoresceína (FITC) foram adquiridos comercialmente. Foi utilizado para o experimento água ultrapura com condutividade de 6,7  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (Milli-Q<sup>®</sup> Direct 16, Germany).

#### 3.2 Caracterização da pectina

##### 3.2.1 Medição do grau de esterificação da pectina

O grau de esterificação (GE) da pectina de citros obtida comercialmente foi determinado por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (KYOMUGASHO et al., 2015; MUHAMMAD et al., 2020) com auxílio do *software* OriginPro V8.5. A intensidade de transmitância das bandas situadas em torno de 1740  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente aos grupos carboxílicos esterificados (C=O) e 1630-1600  $\text{cm}^{-1}$ , relativa aos grupos carboxílicos livres (COO-) foram usadas para calcular o GE da pectina dado pela Equação 1:

$$\%GE = GCE/TGC \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

GCE = Grupos Carboxílicos Esterificados;

TGC = Total de Grupos Carboxílicos (esterificados e livres).

### **3.3 Preparação e caracterização das nanopartículas**

#### **3.3.1 Preparação das nanopartículas de pectina/lisozima via auto-organização**

As nanopartículas de pectina/lisozima foram fabricadas seguindo métodos relatados em estudos anteriores (LIN et al., 2015; ZHOU et al., 2018). Para o preparo das soluções, as amostras de cada biopolímero foram pesadas usando uma balança analítica (Shimadzu, AY 220, Filipinas) e as soluções foram agitadas com auxílio de um agitador magnético com aquecimento (Kasvi, K40-1810H, Coreia). O pH das soluções foi previamente ajustado com auxílio de um medidor de pH (Akso, AK95, Brasil). Resumidamente, os biopolímeros, pectina e lisozima, foram dissolvidos em água deionizada na concentração de 1,0 mg/mL sob agitação magnética moderada constante e em temperatura ambiente. Após total dissolução dos biopolímeros, o pH de cada dispersão foi ajustado para 7,0 usando solução de NaOH ou HCl 0,5 M. As soluções dos biopolímeros foram usadas para preparar cinco razões molares de pectina/lisozima (3:1, 2:1, 1:1, 1:2 e 1:3). As nanopartículas foram formadas vertendo-se a dispersão de pectina na dispersão de lisozima, a temperatura ambiente, sob agitação magnética moderada (400 rpm) por 1 hora, seguida de aquecimento a 80 °C em banho-maria. Os efeitos da variação de pH (5,0-10,7) e do tempo de aquecimento (15, 30, 45, 60 e 75 min) na formação das nanopartículas foram estudados para determinar a condição ótima de preparo das nanopartículas.

As suspensões resultantes foram armazenadas a 4 °C sem prévia diluição ou filtração e/ou liofilizadas para posterior caracterização. A estabilidade física das nanopartículas formadas sob condições de preparo otimizados (razão de mistura pectina/lisozima 1:2, pH 10,0, 80 °C, 30 min) foi testada em diferentes pH (2,0-12,0) à temperatura ambiente por titulação com solução de NaOH ou HCl 0,5 M. Foi observada apenas a formação de partículas solúveis para todas as condições testadas na preparação das nanopartículas formadas.

### 3.3.2 Incorporação da $\beta$ -lactose

Para a incorporação da  $\beta$ -lactose nas nanopartículas, 20 mg de  $\beta$ -lactose em pó foram completamente dissolvidos em 2 mL na solução estoque de lisozima (1 mg/mL). A solução de  $\beta$ -lactose foi então diluída na solução estoque de lisozima de modo a se obter uma concentração final de  $\beta$ -lactose nas nanopartículas de pectina/lisozima de 100  $\mu$ g/mL, 200  $\mu$ g/mL, 300  $\mu$ g/mL e 400  $\mu$ g/mL, respectivamente. As nanopartículas carregadas com  $\beta$ -lactose foram formadas a partir da adição da solução estoque de pectina (1 mg/mL, pH 7,0) à solução de lisozima contendo as concentrações de  $\beta$ -lactose previamente definidas. O sistema foi mantido sob agitação magnética moderada (400 rpm) por 1 h em temperatura ambiente. Posteriormente, o pH da mistura foi ajustado para 10, seguido de aquecimento a 80 °C e mantida a agitação moderada por mais 30 min. Após resfriamento do sistema a temperatura ambiente, o pH da solução foi ajustado para 7,4 e as nanopartículas foram armazenadas a 4 °C para posterior utilização em ensaios *in vitro* em células epiteliais de câncer de cólon (HCT-116). O tamanho das nanopartículas pouco sofreu alteração com a incorporação de  $\beta$ -lactose para qualquer uma das condições testadas. Assim, a concentração

de  $\beta$ -lactose de 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  foi selecionada para o preparo das nanopartículas de pectina/lisozima encapsuladas com  $\beta$ -lactose.

### 3.3.3 Eficiência de encapsulamento

As soluções de nanopartículas carregadas com  $\beta$ -lactose foram ultrafiltradas e concentradas com auxílio de ultrafiltro de 10 kDa (MWCO Amicon) através de centrifugação a 1500 rpm (Eppendorf, Centrifuge 5810 R, Germany), por 30 minutos, a 4 °C. A concentração de  $\beta$ -lactose nas soluções percoladas foi determinada meio de kit de ELISA específico para quantificação de lactose e realizada usando um espectrofotômetro Shimadzu® UV-1800 a 587 nm. A porcentagem de  $\beta$ -lactose encapsulada foi calculada a partir da equação da reta, obtida por meio de curva de calibração, relacionando a fluorescência com a concentração ( $r^2 = 0,9994$ ). A seguinte fórmula foi usada para calcular a porcentagem da eficiência de encapsulamento (EE):

$$EE = \frac{\beta\text{lactose Total} - \beta\text{lactose Livre}}{\beta\text{lactose Total}} \times 100\%$$

Para determinação do diâmetro hidrodinâmico, da distribuição do tamanho de partícula e da carga superficial das nanopartículas de pectina/lisozima encapsuladas com  $\beta$ -lactose concentradas, as amostras foram previamente diluídas em água destilada (1 mg/mL) e armazenadas a 4 °C até a medição por espalhamento dinâmico de luz. Para análises de espectroscopia, estabilidade térmica e imagens por microscopias, as soluções das nanopartículas de pectina/lisozima, na ausência e encapsuladas com  $\beta$ -lactose, preparadas sob condições otimizadas, foram centrifugadas nos mesmos parâmetros descritos anteriormente, e posteriormente acondicionadas em ultra freezer a -80 °C por 24 h. Em seguida, o concentrado congelado foi transferido imediatamente para um liofilizador de bancada

(Terroni, Enterprise I, Brasil) para secagem por 72 h e, finalmente, armazenado em dessecador com sílica de gel até a sua utilização.

### **3.3.4 Tamanho de partícula, distribuição de tamanho e potencial zeta**

O diâmetro hidrodinâmico (d.nm), o índice de polidispersividade (PDI) e o potencial zeta ( $\zeta$ ) das soluções padrão de lisozima e pectina e das nanopartículas preparadas, na ausência e encapsulados com  $\beta$ -lactose, foram determinados por DLS usando o Zetasizer (Malvern Instruments, Nano-ZS, Reino Unido) equipado com um laser de hélio-neon (He-Ne) em um comprimento de onda de 632,8 nm. A concentração usada para realizar a análise por DLS dos biopolímeros individuais e das nanopartículas foi de 1,0 mg/mL sem diluição ou após posterior filtração adicional, no caso das encapsuladas com  $\beta$ -lactose nanopartículas, em pH neutro para as soluções padrão de pectina e lisozima e em mesmo pH de preparo das nanopartículas formadas. As medidas foram realizadas a 25 °C com ângulo de espalhamento fixo de 173° ( $n = 3$ ). O tamanho médio das partículas foi calculado usando a equação de Stokes-Einstein. O potencial zeta foi calculado a partir da mobilidade eletroforética da amostra utilizando o modelo matemático de Smoluschwsky. O equipamento utilizado foi gentilmente cedido pela Prof. Dra. Iolanda Midea Cuccovia (do Departamento de Bioquímica, no Instituto de Química - USP) sob supervisão da aluna de pós-graduação Laura Mortara.

### **3.3.5 Titulação isoelétrica**

A dispersão das nanopartículas de pectina/lisozima (razão 1:2, pH 10, 80°C, 30 min) preparadas na presença de  $\beta$ -lactose (400  $\mu$ g/mL) teve seu pH ajustado (2,0-13,0) com NaOH e/ou HCl 0,5 M, com auxílio de um titulador acoplado ao Zetasizer projetado para automatizar a medição de potencial zeta

em função do pH. As aferições foram realizadas a temperatura ambiente, em triplicata, com intervalo entre cada aferição de aproximadamente 1 minuto. A análise foi realizada na Central Analítica, no Instituto de Química – USP, pelo técnico responsável.

### **3.3.6 Espectroscopia no infravermelho**

As transições de confirmação das amostras secas e liofilizadas de pectina, lisozima,  $\beta$ -lactose, das nanopartículas de pectina/lisozima e das nanopartículas encapsuladas com  $\beta$ -lactose preparadas em condições otimizadas, bem como a mistura física dessas amostras foram caracterizadas por FTIR. As análises foram realizadas em um espectrômetro FTIR (Bruker, Alpha, Alemanha) utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr) e leitura na faixa de 4000-500  $\text{cm}^{-1}$ . Os dados foram coletados e interpretados usando o software OriginPro V8.5. O equipamento utilizado foi gentilmente cedido pelo técnico especialista do Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia, no Instituto de Química - USP, Dr. Alceu Totti.

### **3.3.7 Calorimetria diferencial de varredura**

A análise térmica, por calorimetria diferencial de varredura (DSC), foi realizada para investigar qualquer diferença térmica que possivelmente ocorreu devido às interações entre a  $\beta$ -lactose e os biopolímeros encapsulantes. A análise por DSC foi realizada usando um calorímetro (TA Instruments, Q200, EUA). Aproximadamente 3 mg das amostras secas e liofilizadas de pectina, lisozima,  $\beta$ -lactose, das nanopartículas de pectina/lisozima, e das nanopartículas encapsuladas com  $\beta$ -lactose, preparadas em condições otimizadas, foram pesadas em cadinho hermético de alumínio, usando uma balança de precisão (Mettler Toledo, Mx5, EUA). As amostras foram aquecidas na faixa de 20-250  $^{\circ}\text{C}$  a uma taxa de aumento

de 10 °C/min e 50 mL/min de nitrogênio como gás de arraste, e um cadinho vazio e selado foi usado como referência. O software Universal V4.5® (TA Instruments, EUA) foi utilizado para coleta e interpretação dos dados. A análise foi realizada na Central Analítica, no Instituto de Química – USP, pelo técnico responsável.

### **3.3.8 Microscopia eletrônica de varredura**

A morfologia das nanopartículas foi primeiramente analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As micrografias das nanopartículas de lisozima/pectina e das nanopartículas encapsuladas com  $\beta$ -lactose (400  $\mu\text{g/mL}$ ) foram geradas por MEV (FEI Quanta 650FEG). Para isso, as nanopartículas, preparadas sob condições otimizadas e previamente liofilizadas, foram revestidas com uma camada de platina, visto que esses materiais não são condutores, através de um metalizador em atmosfera de argônio e micrografadas via detector de elétrons secundários com tensão de aceleração de 5 kV. A magnitude de aumento das imagens variou entre 30,000 e 70,000 vezes. O tamanho médio das partículas observadas nas micrografias por MEV foi determinado com auxílio do *software* ImageJ. A análise foi realizada no Departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo da Escola Politécnica - USP, pelo técnico responsável.

### **3.3.9 Microscopia eletrônica de transmissão**

As dispersões das nanopartículas de lisozima/pectina e das nanopartículas encapsuladas com  $\beta$ -lactose (400  $\mu\text{g/mL}$ ) preparadas em condições otimizadas foram, posteriormente, analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (FEI Tecnai G20 200 Kv) com magnitude de 9,600 e 19,000 vezes. Para o preparo dos grids (rede de cobre 400 mesh revestido com filme de carbono) aplicou-se o *glow discharge*, plasma

formado pela passagem de corrente elétrica através de um gás de baixa pressão (15 mA, 25 segundos), por meio do instrumento easiGlow (PELCO, Reino Unido). Enquanto isso, em um para-filme foram pipetados, separadamente, uma gota de 20  $\mu$ L de amostra, duas gotas de 20  $\mu$ L de água ultrapura Milli-Q e uma gota de 10  $\mu$ L de acetado de uranila 2%. Em seguida, com auxílio de uma pinça, aplicou-se o grid sobre a gota com a amostra das nanopartículas por aproximadamente 1 min. O excesso de amostra foi retirado com auxílio de papel macio e o grid acondicionado nas gotas de água, sequencialmente, aplicando-o e secando-o. Por fim, o grid foi aplicado na gota de uranila 2% por cerca de 1 min, secado naturalmente e guardado até a visualização das amostras em microscopia. O tamanho médio das partículas observadas nas micrografias por MET foi determinado com auxílio do *software* ImageJ. O tempo de equipamento utilizado foi gentilmente cedido pela Prof. Dra. Cristiane R. Guzzo Carvalho (do Departamento de Microbiologia, no Instituto de Ciências Biomédicas - USP), sob supervisão de seu aluno de pós-graduação, Gabriel de Araújo. A análise foi realizada pelo técnico responsável.

### **3.3.10 Cultura celular**

O cultivo e o tratamento celular foram efetuados conforme recomendações da American Type Culture Collection (ATCC®, Manassas, VA, EUA). As linhagens celulares (HCT-116) foram tratadas em meio DMEM (Gibco®, Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 1% de penicilina, e 1% de estreptomicina, em estufa umidificada com uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Foi feito o monitoramento periodicamente do crescimento das linhagens celulares, com troca do meio de cultura a cada dois dias. Foi feito

novo cultivo com a transferência das linhagens para novos frascos de cultura após as células atingirem 80-90% de confluência.

### **3.3.11 Estudo de captação celular *in vitro***

A captação intracelular das nanopartículas encapsuladas com  $\beta$ -lactose (400  $\mu\text{g/mL}$ ) foi estudada *in vitro* usando células HCT-116 e visualizadas por microscopia óptica. A dispersão das nanopartículas foi marcada com FITC 500  $\mu\text{g/mL}$ , previamente preparado em tampão carbonato pH 9,6, buscando atingir a concentração final de 2  $\mu\text{g/mL}$ , sob agitação moderada por 1 h na ausência de luz a 25 °C. Posteriormente, as nanopartículas foram centrifugadas em ultrafiltro (10 kDa) a 1500 rpm por 30 min a fim de remover o FITC que não reagiu e estava em excesso (LI et al., 2015). Para geração de imagens epi fluorescentes, cerca de  $10^5$  células foram cultivadas em placas de fundo de vidro com 1 mL de meio de crescimento e incubadas a 37 °C por 24 h. O meio de cultura foi substituído por meio fresco contendo as nanopartículas marcadas com FITC em diferentes grupos (6 h, 12 h e 24 h). Após a conclusão do tratamento, as células foram lavadas com PBS e levadas para observação de imagens epi fluorescentes em microscópio invertido (Nikon Eclipse Ts2-FL). Filtros de FITC (Ex/Em 495/519 nm) foram usados para capturar imagens de coloração verde.

### **3.3.12 Análise estatística**

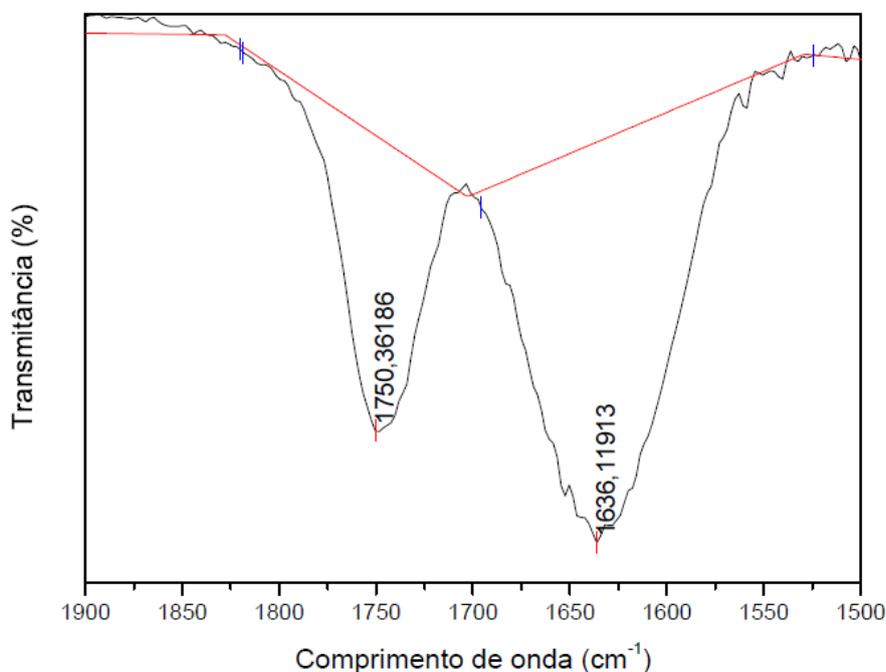
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A análise de variância unidirecional (ANOVA) foi conduzida com o teste de comparação múltipla de Tukey para determinar a diferença significativa entre as amostras. O valor do nível de significância ( $p$ ) foi fixado em 0,05.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Grau de esterificação da pectina

A determinação do grau de esterificação da amostra de pectina de citros obtida comercialmente foi realizada por meio da integração das bandas características dos grupos carboxílicos esterificados (COOR) e grupos carboxílicos livres (COO<sup>-</sup>) dispostos no espectro de FTIR (Figura 7), utilizando-se a Equação 1 descrita no procedimento experimental.

Figura 7 - Grau de esterificação da pectina



Bandas de transmitância utilizadas para o cálculo do GE da amostra de pectina. Fonte: Elaborada pelo autor.

A porcentagem do GE encontrado para a amostra de pectina comercial de citros foi de aproximadamente 30%, indicando que é uma pectina de baixo teor de metoxilação ( $GE \leq 50\%$ ). Portanto, a molécula dispõe de um maior número de grupos carboxílicos livres quando comparado a pectina de alto teor de metoxilação ( $GE \geq 50\%$ ), o que sugere que ela possui mais sítios

reativos por unidade de comprimento e pode ser necessária uma proporção de mistura diferente ou uma concentração mais elevada de outras macromoléculas para promover interações eletrostáticas mais fortes (LE; RIOUX; TURGEON, 2017).

No trabalho de (LIN et al., 2015), a interação entre os grupos de ácidos carboxílicos ionizados da pectina com os grupos amina da lisozima, em pH neutro, ocorreu na razão molar 1:1. No entanto, a pectina utilizada era de alto grau de esterificação (GE 72-76%). Portanto, para o presente trabalho é esperado uma maior razão molar de lisozima em relação à pectina, de modo que seja favorecida uma maior interação eletrostática entre as cargas negativas da pectina e as positivas da lisozima, em determinado pH, e a consequente formação de nanopartículas de pectina/lisozima de melhor biocompatibilidade e resposta à variação de pH do meio.

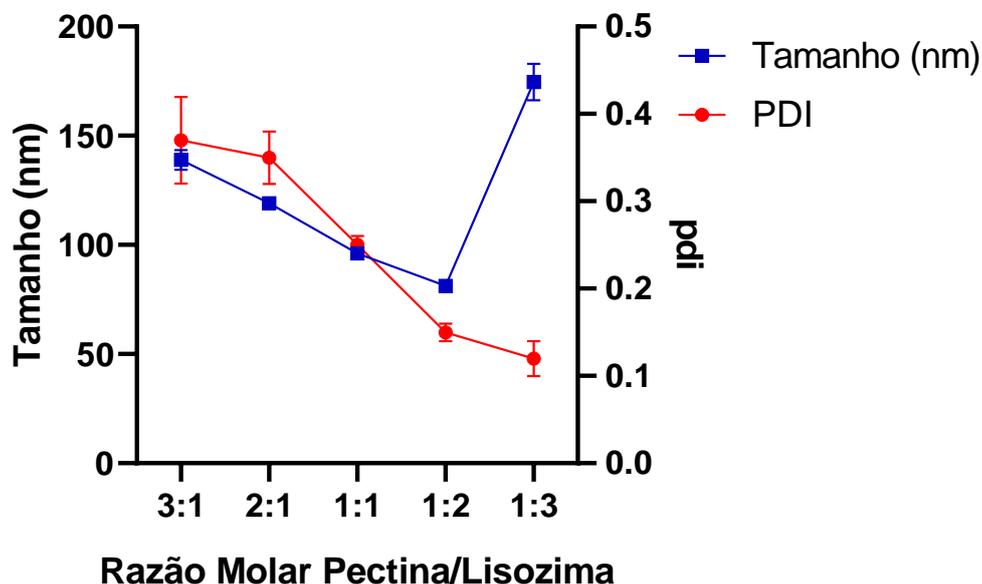
## **4.2 Otimização da preparação das nanopartículas**

A lisozima apresenta cargas positivas abaixo de seu pI (pH < 10,7), enquanto a pectina dispõe de cargas negativas em uma ampla faixa de pH (~ 2,0-12,0). O pH 7 foi considerado como uma região intermediária contendo uma maior disponibilidade de cargas positivas e negativas, relativamente importantes na promoção de interações eletrostáticas entre esses biopolímeros (AMARA et al., 2016; LIN et al., 2015). Portanto, é esperado que os segmentos de grupos amina ( $\text{NH}^{3+}$ ) carregados positivamente presentes nas moléculas da lisozima interajam com os segmentos carregados negativamente das moléculas da pectina, em especial o grupo carboxilato ( $\text{COO}^-$ ), responsáveis por promover a interação intermolecular entre pectina e lisozima (principalmente interações do tipo eletrostáticas). O processo de aquecimento acima da temperatura de desnaturação térmica da proteína pode também romper as ligações dissulfeto (S-S) possibilitando novas interações

intermoleculares covalentes (dissulfeto) e não-covalentes (interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas) entre macromoléculas, favorecendo a formação esférica de nanopartículas de pectina/lisozima (MUNIALO; EUSTON; DE JONGH, 2018).

A Figura 8 mostra a influência da razão molar de pectina/lisozima (3:1, 2:1, 1:1, 1:2 e 1:3) em relação ao tamanho de partícula e ao PDI das nanopartículas encapsuladas em pH 7, a 80 °C por 30 min. Em relação às diferentes razões molares estudadas, foi observada uma diminuição no tamanho de partículas de maneira gradativa até atingir o valor mínimo na razão 1:2, sugerindo uma maior interação entre as moléculas de lisozima e as moléculas de pectina. Na razão 1:3, onde a lisozima está em uma maior quantidade, as partículas apresentaram valores máximo de tamanho, provavelmente devido a maior densidade de cargas positivas da lisozima que estavam disponíveis no sistema, levando à formação de agregados devido à auto associação da proteína livre. Assim, a razão molar de pectina/lisozima foi ajustada em 1:2 para obter uma distribuição de tamanho otimizada e um menor valor de PDI. As nanopartículas formadas apresentaram tamanho de partículas relativamente pequeno, que pode ser atribuído a alta densidade de carga negativa, responsável por promover a estabilidade coloidal e evitar a agregação das partículas em dispersão.

Figura 8 - Influência da razão molar de pectina/lisozima no tamanho de partícula e PDI

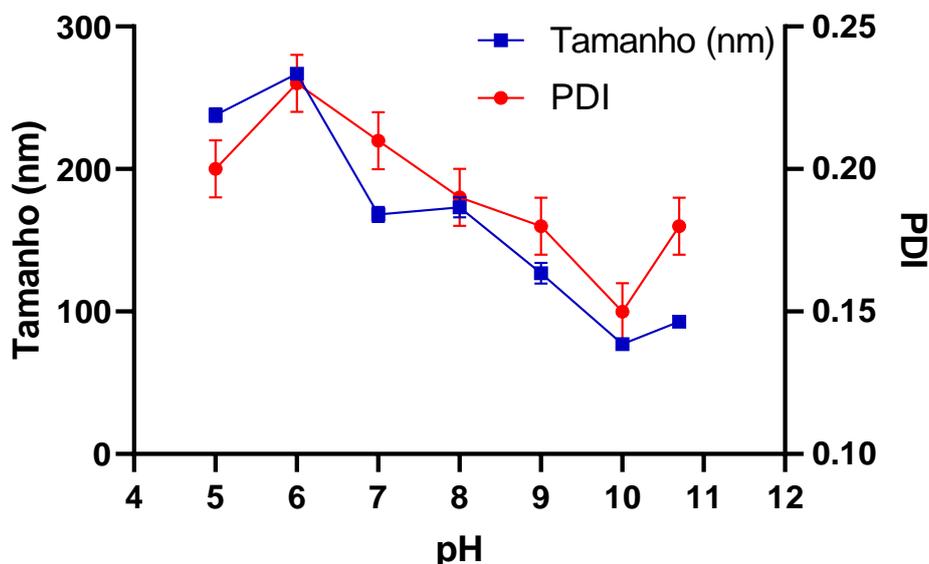


Nanopartículas produzidas via auto-organização em função da razão molar de pectina/lisozima: 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, e 1:3 (pH 7, 80 °C, 30 min). Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 9 mostra a influência do pH em relação ao tamanho de partícula e ao PDI das nanopartículas de pectina/lisozima preparadas (razão 1:2, 80 °C, 30 min). Em pH 10, as partículas apresentaram menor tamanho e menor valor de PDI devido à associação mais significativa da interação entre pectina e lisozima na formação das nanopartículas durante o processo de aquecimento. Na faixa de pH 7-10, a desprotonação dos grupos carboxílicos da pectina, causada pelo aumento do pH, supera a protonação da lisozima, promovendo o aumento dos valores negativos do potencial zeta e a consequente repulsão eletrostática entre as partículas, impedindo a formação de grandes agregados (ROSALES et al., 2021). Por outro lado, em pH 10,7, o tamanho médio das partículas aumentou ligeiramente, provavelmente devido à auto agregação da lisozima. À medida que o pH caiu de 10 para 5, o tamanho médio e o PDI das partículas apresentaram valores elevados, evidenciando a presença de grandes agregados que permaneceram ou foram

formados após o aquecimento. Portanto, o pH 10 foi escolhido como valor de pH ideal para formação das nanopartículas de pectina/lisozima.

Figura 9 - Influência do pH no tamanho de partícula e PDI

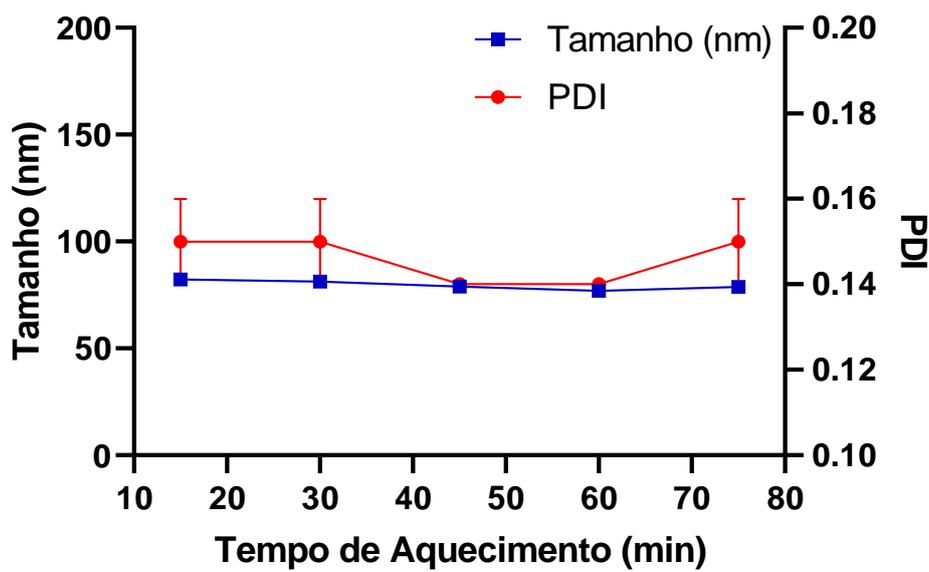


Nanopartículas de pectina/lisozima (razão 1:2, 80 °C, 30 min) produzidos via auto-organização em função do pH. Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 10 mostra a influência do tempo de aquecimento (15, 30, 45, 60, 75 min) em relação ao tamanho de partícula e ao PDI das nanopartículas de pectina/lisozima formadas na razão molar 1:2, 80 °C por 30 min em pH 10, e esse efeito foi semelhante para todas as razões molares testadas. Durante o processo de aquecimento, o tamanho e os valores de PDI das partículas não se alteraram. No entanto, o tempo de aquecimento de 30 min foi selecionado para a preparação das nanopartículas por não ser um tratamento térmico extensivo. Ainda, o período de aquecimento foi suficiente para promover o desdobramento parcial da proteína, o que resultou na exposição de seus resíduos apolares, levando à formação de nanopartículas não covalentes com frações pécicas não esterificadas. Esses resultados estão de acordo quando comparados com a literatura (AMARA et

al., 2016; CHANG; LI, 2002; LI et al., 2015; LIN et al., 2015; ZHU et al., 2013).

Figura 10 - Influência do tempo de aquecimento no tamanho de partícula e PDI



Nanopartículas de pectina/lisoizima (razão 1:2, pH 10, 80 °C) produzidos via auto-organização em função da variação da temperatura. Fonte: Elaborado pelo autor.

### 4.3 Avaliação do tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta

Os valores de partícula, índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta para as nanopartículas produzidas, a partir da interação eletrostática entre pectina/lisoizima de diferente razão molar (3:1, 2:1, 1:1, 1:2, e 1:3), formados em pH 10 a 80 °C por 30 min, estão apresentados na Tabela 2. As nanopartículas formadas apresentaram distribuição de tamanho unimodal (distribuição de tamanho de partículas com valores mais frequentes e formação de um único pico claro e estreito representando essa distribuição) e sem presença de agregados visíveis. Deve-se observar ainda que a maior concentração de pectina apresentou potencial zeta mais negativo, porém

resultou em maior tamanho médio de partícula e maior valor de PDI. Assim, a razão molar pectina/lisozima 1:2 evidenciou menores valores de tamanho e PDI, levando a valores negativos do potencial zeta e a consequente repulsão eletrostática entre as partículas, evitando a agregação e a sedimentação.

O potencial zeta representa a carga superficial das partículas. Partículas com valores superiores a  $\pm 30$  mV são tipicamente consideradas estáveis devido à repulsão das partículas, diminuindo sua tendência a agregação e/ou sedimentação (BHATTACHARJEE, 2016; KHOSA; REDDI; SAHA, 2018). Conforme observado na Tabela 2, uma maior concentração molar de pectina resultou em um potencial zeta mais negativo, assim como em um maior aumento no tamanho médio das nanopartículas e em um maior valor de PDI. A partir do grau de esterificação da pectina, determinado por FTIR, foi possível calcular a razão de carga molar entre a pectina e a lisozima (ANTONOV et al., 2019). As razões de carga molar calculadas [relação pectina/lisozima, K(-/+)] apresentados na Tabela 2 corroboram com o que foi observado para os valores de potencial zeta. Uma razão de carga molar próxima a 1 poderia retornar uma agregação das nanopartículas devido à atração eletrostática. As razões de carga molar negativa com valores de potencial zeta negativos indicam as possíveis estabilidades coloidais para todas as razões estudadas.

Tabela 2 - Características dos componentes isolados e das nanopartículas, em meio aquoso (1,0 mg/mL), com diferentes razões molares de pectina/lisozima (pH 10, 80 °C, 30 min).

Biopolímeros	Tamanho (nm)	PDI	$\zeta$ (mV)	Carga molar
Pectina	600.40 $\pm$ 11.55	0.24 $\pm$ 0.01	- 43.87 $\pm$ 0.75	- 1,098
Lisozima	177.50 $\pm$ 15.21	0.15 $\pm$ 0.01	+ 7.14 $\pm$ 0.48	+ 14
3:1	138,97 $\pm$ 4,56 <sup>b</sup>	0,37 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	- 44,87 $\pm$ 1,48 <sup>e</sup>	- 244
2:1	119,10 $\pm$ 1,44 <sup>c</sup>	0,35 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	- 41,88 $\pm$ 1,76 <sup>d</sup>	- 163
1:1	96,01 $\pm$ 2,29 <sup>d</sup>	0,25 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	- 35,85 $\pm$ 2,79 <sup>c</sup>	- 81
1:2	81,20 $\pm$ 0,34 <sup>e</sup>	0,15 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	- 29,70 $\pm$ 0,53 <sup>b</sup>	- 41
1:3	174,60 $\pm$ 8,36 <sup>a</sup>	0,12 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	- 26,65 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup>	- 27

\* As soluções de pectina e lisozima (1 mg/mL) foram medidas em pH neutro sem aquecimento.

\*\* Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. O valor compartilhando diferentes letras sobrescritas na mesma coluna foram estatisticamente diferentes em  $p < 0,05$  (n=3). Fonte: Elaborado pelo autor.

No trabalho do nosso grupo publicado, relatamos a viabilidade no preparo das nanopartículas de lisozima/pectina via auto-organização, por outro tipo de metodologia, que foram aplicados com sucesso no encapsulamento de antocianinas com interações do tipo eletrostáticas. As nanopartículas ofereceram a possibilidade de associar antocianinas de amora (*Rubus* spp.) com eficiência de encapsulamento de 73,3% após a otimização do preparo. A metodologia de superfície de resposta (RSM) foi conduzida para estudar a relação entre a preparação e a otimização dos parâmetros e confirmou a razão molar pectina/lisozima 1:2 como condição ideal de preparação das nanopartículas (ROSALES et al., 2021).

#### 4.4 Estimativa da porcentagem de eficiência de encapsulamento da $\beta$ -lactose

Os valores de tamanho de partícula, PDI e potencial zeta, bem como os valores percentuais de eficiência de encapsulamento (EE) de diferentes concentrações de  $\beta$ -lactose (100  $\mu\text{g/mL}$ , 200  $\mu\text{g/mL}$ , 300  $\mu\text{g/mL}$  e 400  $\mu\text{g/mL}$ ) para as nanopartículas de pectina/lisozima preparados via auto-organização (razão 1:2, pH 10, 80 °C, 30 min) são apresentados na Tabela 3. A EE de  $\beta$ -lactose alcançado foi superior a 96%, indicando que o método é eficiente o suficiente para preparar nanopartículas com pouca perda de materiais. Além disso, o tamanho das partículas não alterou de forma significativa com a incorporação de  $\beta$ -lactose mesmo em concentrações mais elevadas. Portanto, a maior concentração (400  $\mu\text{g/mL}$ ) de  $\beta$ -lactose estudada foi escolhida como sendo a ideal para preparar as nanopartículas exatamente devido a encapsular uma maior quantidade de  $\beta$ -lactose sem prejuízos às características das nanopartículas.

Tabela 3 - Características das nanopartículas de pectina/lisozima encapsulados com  $\beta$ -lactose (pH 10, 80 °C, 30 min), em meio aquoso (1,0 mg/mL), com diferentes concentrações de  $\beta$ -lactose.

$\beta$ -lactose ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>	EE (%) <sup>b</sup>	Tamanho (nm) <sup>c</sup>	PDI <sup>c</sup>	$\zeta$ (mV) <sup>c</sup>
100	97,97 $\pm$ 0,12	83,27 $\pm$ 3,30	0,14 $\pm$ 0,01	- 31,87 $\pm$ 2,53
200	96,77 $\pm$ 0,83	81,78 $\pm$ 2,68	0,15 $\pm$ 0,01	- 30,75 $\pm$ 1,24
300	96,20 $\pm$ 0,10	95,13 $\pm$ 6,56	0,18 $\pm$ 0,02	- 31,47 $\pm$ 1,31
400	96,47 $\pm$ 0,31	84,71 $\pm$ 3,15	0,16 $\pm$ 0,01	- 31,40 $\pm$ 2,96

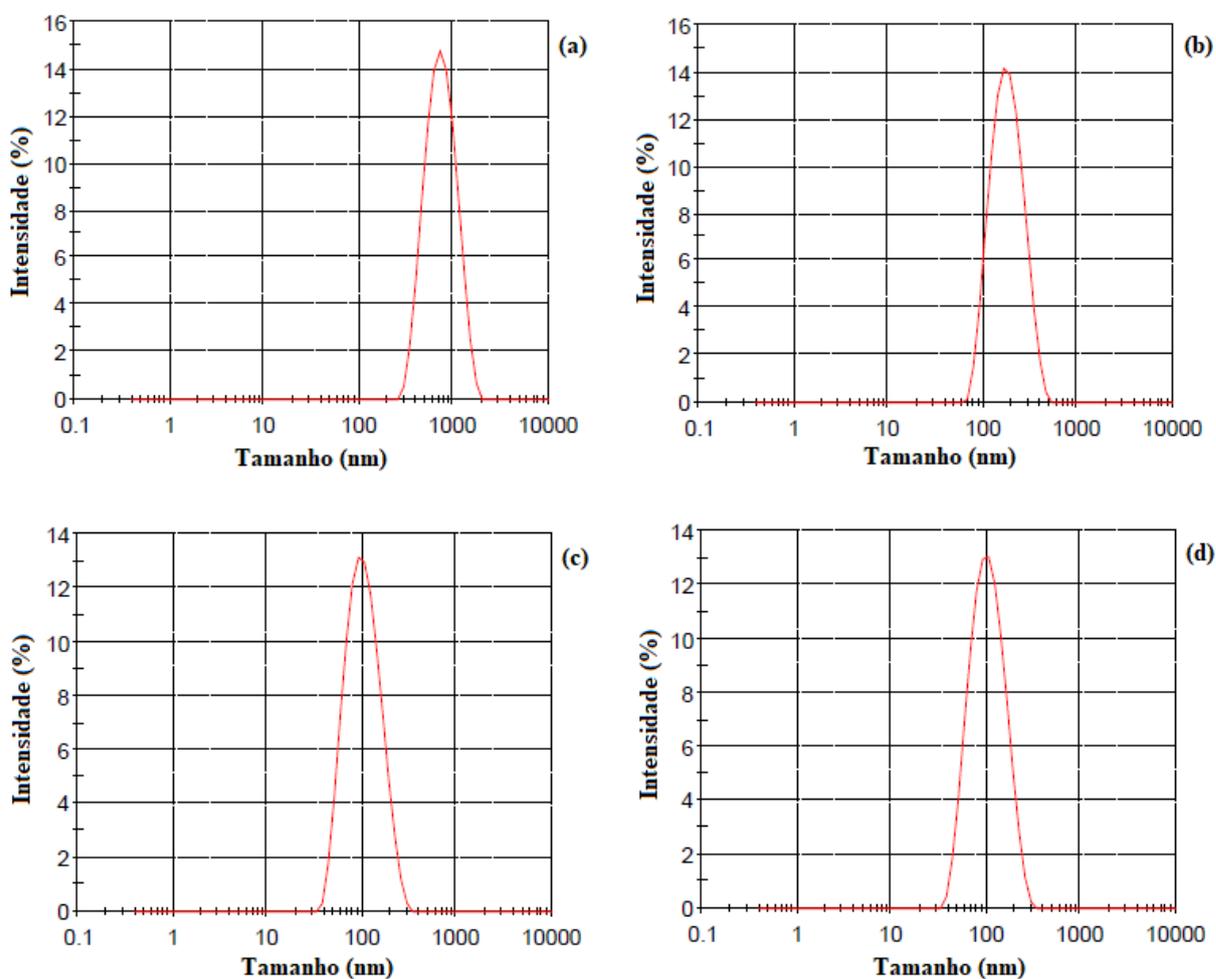
<sup>a</sup> Concentração de  $\beta$ -lactose nas nanopartículas. <sup>b</sup> ( $\beta$ -lactose encapsulada/total de  $\beta$ -lactose) x 100% determinado por espectrometria UV. <sup>c</sup> Tamanho, PDI e potencial zeta determinados por DLS. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.4.1 Tamanho de partícula

A distribuição do tamanho (nm) de partículas das soluções estoque da pectina, da lisozima, das nanopartículas sem  $\beta$ -lactose e das nanopartículas encapsuladas com  $\beta$ -lactose (400  $\mu\text{g/mL}$ ), foi determinada por DLS e encontra-se disponível na Figura 11. Os perfis de intensidade em função do tamanho de partícula de cada uma das amostras foram analisados a temperatura ambiente em pH neutro para os compostos isolados e em pH de preparo otimizado para as nanopartículas. A pectina (Figura 11A) apresentou um único pico, com tamanho médio de  $600,4 \text{ nm} \pm 11,55$ , e PDI de  $0,238 \pm 0,005$ , que foi atribuído ao tamanho do polissacarídeo isolado, visto que não houve a presença de demais picos. A ausência de outros picos sugere uma amostra livre de impurezas e sem evidência de auto agregação nessa faixa de pH. A Figura 11B refere-se à distribuição de tamanho da lisozima. A amostra da lisozima também apresentou um pico unitário com tamanho médio de  $177,5 \text{ nm} \pm 15,21$  e PDI de  $0,153 \pm 0,004$ . Assim como para a pectina, a presença do pico unimodal para a lisozima foi atribuído ao tamanho da proteína isolada, sem sinais de autoagregação e/ou de impurezas na amostra. A dispersão das nanopartículas de pectina/lisozima (razão 1:2, pH 10, 80 °C, 30 min) (Figura 11C) não apresentou valores de tamanho correspondentes às soluções de pectina e lisozima isolados. No entanto, assim como àqueles, também apresentou um pico único com tamanho médio de  $93,73 \pm 0,59$ . O PDI apresentou um valor de  $0,145 \pm 0,001$ , sugerindo uma distribuição de tamanho de partículas monodispersa e com elevada homogeneidade. O valor obtido atribuído ao tamanho das partículas é bem inferior ao encontrado para ambos os biopolímeros isolados. Dessa maneira, é possível sugerir que, nas condições analisadas, foi possível a interação entre pectina e lisozima na formação de um novo biomaterial. A Figura 11D refere-se a dispersão das nanopartículas encapsuladas com  $\beta$ -lactose (400  $\mu\text{g/mL}$ ) e apresentou

valores similares aos obtidos para as amostras de nanopartículas sem  $\beta$ -lactose, com a presença de um único pico de tamanho médio de  $93,76 \pm 0,145$  nm, e PDI de  $0,139 \pm 0,002$ . Esses dados sugerem que a presença da  $\beta$ -lactose não influenciou de modo significativo na interação entre a pectina e a lisozima durante o processo de formação das nanopartículas contribuindo para a manutenção da estabilidade e das características físicas das nanopartículas.

Figura 11 - Distribuição do tamanho pela intensidade

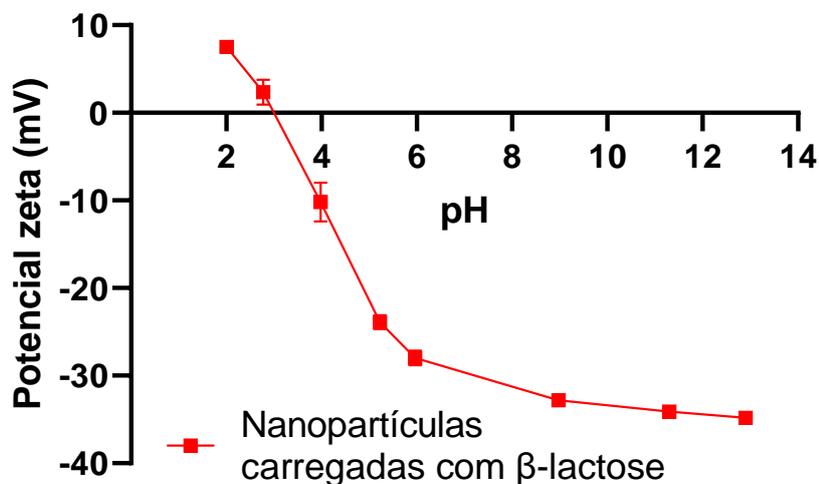


Tamanho de partícula em pH neutro da (A) pectina e (B) lisozima, e (C) nanopartículas de pectina/lisozima e (D) nanopartículas encapsuladas com  $\beta$ -lactose ( $400 \mu\text{g/mL}$ ) (1:2, pH 10,  $80^\circ\text{C}$ , 30 min). Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.5 Estabilidade física das nanopartículas

O potencial zeta foi realizado para caracterizar a densidade de carga das nanopartículas de pectina/lisozima (razão 1:2, pH 10, 80 °C, 30 min) por titulação em diferentes faixas de pH (2-12) com o potencial zeta sendo analisado simultaneamente, e os resultados são apresentados na Figura 12. À medida que o pH aumentou, a carga superficial das partículas mudou de positiva para negativa a partir do pH 3 (valor de pH em que as partículas se encontraram eletricamente neutras) e que foi correlacionado ao pKa da pectina. Na região de pH 3-6, a densidade de carga negativa aumentou significativamente, decorrente do início da ionização dos grupos carboxílicos da pectina. Na faixa de pH 6-12, maiores valores absoluto de potencial zeta foram obtidos ( $|\zeta| > 30$  mV). Esse aumento da carga negativa foi atribuído a desprotonação dos grupos carboxílicos presentes na superfície das moléculas de pectina, devido ao aumento do pH, e que supera a protonação da lisozima e evidencia uma região de formação de nanopartículas estável a agregação e previne a sedimentação (ROSALES et al., 2021).

Figura 12 - Curva de titulação isoelétrica das nanopartículas



Efeito do pH final no potencial zeta das nanopartículas encapsuladas com  $\beta$ -lactose (400  $\mu\text{g/mL}$ ) formadas pelo aquecimento da mistura de pectina/lisozima (1:2, pH 10, 80°C, 30 min). Fonte: Elaborado pelo autor.

Os biopolímeros pectina e lisozima podem interagir formando um complexo iônico, principalmente em meio básico pH 10, onde ocorre maior interação entre os grupos carboxílicos ionizados da pectina ( $\text{pK}_a \sim 2,9-3,2$ ) e os grupos amino ionizados presentes na lisozima ( $\text{pI} \sim 10,0-11,0$ ), resultando na formação de nanopartículas de pectina/lisozima de menor tamanho. Além disso, é possível inferir, a partir dos valores negativos de potencial zeta, que a formação dessas nanopartículas dispõe de um núcleo constituído pela proteína lisozima e revestido pelo polissacarídeo pectina (MOHAMMADIAN et al., 2020).

#### 4.6 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

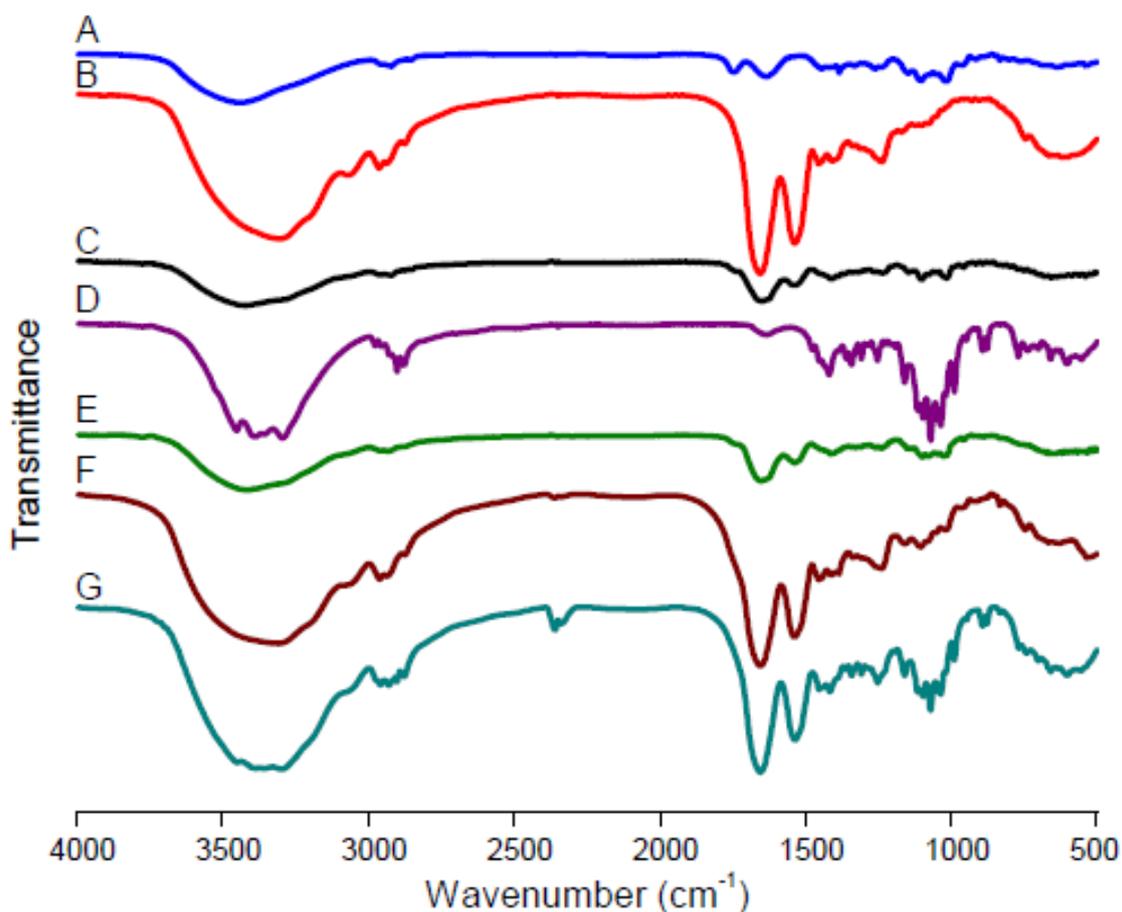
O estudo de espectroscopia por FTIR foi utilizado para investigar a presença de grupos funcionais característicos assim como auxiliar na compreensão do processo de interação intermolecular entre a  $\beta$ -lactose e os biopolímeros utilizados na formulação das nanopartículas de

pectina/lisozima (Figura 13). O espectro de FTIR da amostra comercial de pectina (Figura 13A) foi caracterizado a partir da banda em torno de  $3442\text{ cm}^{-1}$  atribuído ao estiramento O–H dos grupos hidroxila e a forte ligação de hidrogênio. A banda em  $2923\text{ cm}^{-1}$  refere-se às vibrações C–H da cadeia de hidrocarbonetos. As duas regiões de maior interesse para a pectina em  $1750\text{ cm}^{-1}$  e  $1636\text{ cm}^{-1}$  correspondem aos grupos éster carbonila (C=O) não ionizado e a banda de estiramento de íons carboxilato (COO-), respectivamente. Outras bandas de transmitância com padrões de intensidade moderada observadas abaixo de  $1500\text{ cm}^{-1}$  são geralmente difíceis de interpretar porque muitos modos de vibração complexos se sobrepõem nessa região (BHUYAN et al., 2018; MA et al., 2020; NEUFELD; BIANCO-PELED, 2017). Para a amostra de lisozima (Figura 13B), a região do espectro de FTIR que está associado com a estrutura da proteína refere-se ao estiramento do grupo C=O (presente em amida primária) em aproximadamente  $1656\text{ cm}^{-1}$ . Uma segunda banda, em cerca de  $1538\text{ cm}^{-1}$ , é atribuída a uma combinação da banda de estiramento C–N com uma banda de vibração N–H presente em amidas secundárias. Ainda relacionado às amidas secundárias, é evidenciado na região de  $3306\text{ cm}^{-1}$  uma banda de estiramento N–H (SUN; XIAO; HUANG, 2019). O espectro de FTIR das nanopartículas de pectina/lisozima (Figura 13C) revelou estruturas semelhantes, mas com intensidades menores, quando comparados aos espectros da pectina e da lisozima isolados, na região de  $1500$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$ , correspondentes às amidas I e II e aos grupos carbonila e carboxila livre, assim como o estiramento dos grupos N–H e O–H. Os picos atribuídos aos grupos carboxílicos da pectina na região de  $1630$ - $1750\text{ cm}^{-1}$  desapareceram ou se fundiram com a banda da amida I da lisozima, apresentando um único pico em  $1650\text{ cm}^{-1}$ . A redução na intensidade da banda referente à amida II, presente na lisozima em  $1536\text{ cm}^{-1}$ , indicam uma desnaturação parcial da proteína, levando a interações hidrofóbicas induzidas pelo aquecimento

(ZHOU et al., 2016). Esses dados sugerem que a formação das nanopartículas ocorreu por meio de ligações não covalentes, como interações eletrostáticas, entre grupos carboxílicos da pectina e grupos amino da lisozima. Além disso, a redução na intensidade da banda da lisozima e o deslocamento dos grupos O–H, de 3442 para 3423  $\text{cm}^{-1}$ , indica que a formação das nanopartículas foi influenciada tanto por interações eletrostáticas quanto por ligações de hidrogênio entre os grupos O–H da pectina e grupamento N–H da lisozima (LI et al., 2017; SANTOS; DE CARVALHO; GARCIA-ROJAS, 2018). As bandas de transmitância características da estrutura da  $\beta$ -lactose (Figura 13D) mostraram uma banda larga encontrada na faixa de 3600–3200  $\text{cm}^{-1}$  correspondente à vibração de estiramento simétrico O–H dos grupos hidroxila. O pico em 3000–2800  $\text{cm}^{-1}$  é característico do estiramento C–H presente nas configurações de galactose e glicose. As vibrações dos grupos C–H, O–H e CH<sub>2</sub> são encontradas na faixa de 1600–1200  $\text{cm}^{-1}$ . A banda em 1200–1070  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída à vibração de flexão da ligação glicosídica (C–O–C). O pico em 1142–953  $\text{cm}^{-1}$  é atribuído à vibração de estiramento do grupo C–O da ligação glicosídica. As vibrações de deformação da ligação glicosídica são geralmente encontradas na faixa de 633–477  $\text{cm}^{-1}$  (LÓPEZ-PABLOS et al., 2018). As nanopartículas encapsuladas com  $\beta$ -lactose (400  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentaram padrão semelhante ao observado pelo espectro de FTIR referente à formulação das nanopartículas de pectina/lisozima sem  $\beta$ -lactose (Figura 13E). Essa evidência sugere que a  $\beta$ -lactose, provavelmente, está incorporada no interior das nanopartículas e não adsorvida na superfície, uma vez que seus picos característicos não são evidenciados ou estão cobertos pelas outras bandas das demais amostras (DUTTA et al., 2019). O espectro FTIR da mistura física de pectina e lisozima (Figura 13F) parece ser a superposição de ambos os compostos, quando comparados com as amostras isoladas, porém com menor intensidade. Portanto, não fornece

evidência direta de interações entre os dois biopolímeros. No espectro FTIR da mistura física de pectina, lisozima e  $\beta$ -lactose (Figura 13G), não foram observadas diferenças significativas nas localizações dos picos. As bandas características da  $\beta$ -lactose foram semelhantes às observadas para a amostra pura, sugerindo não haver evidências de interações da  $\beta$ -lactose com os demais compostos.

Figura 13 - Espectros de FTIR dos compostos isolados e das nanopartículas



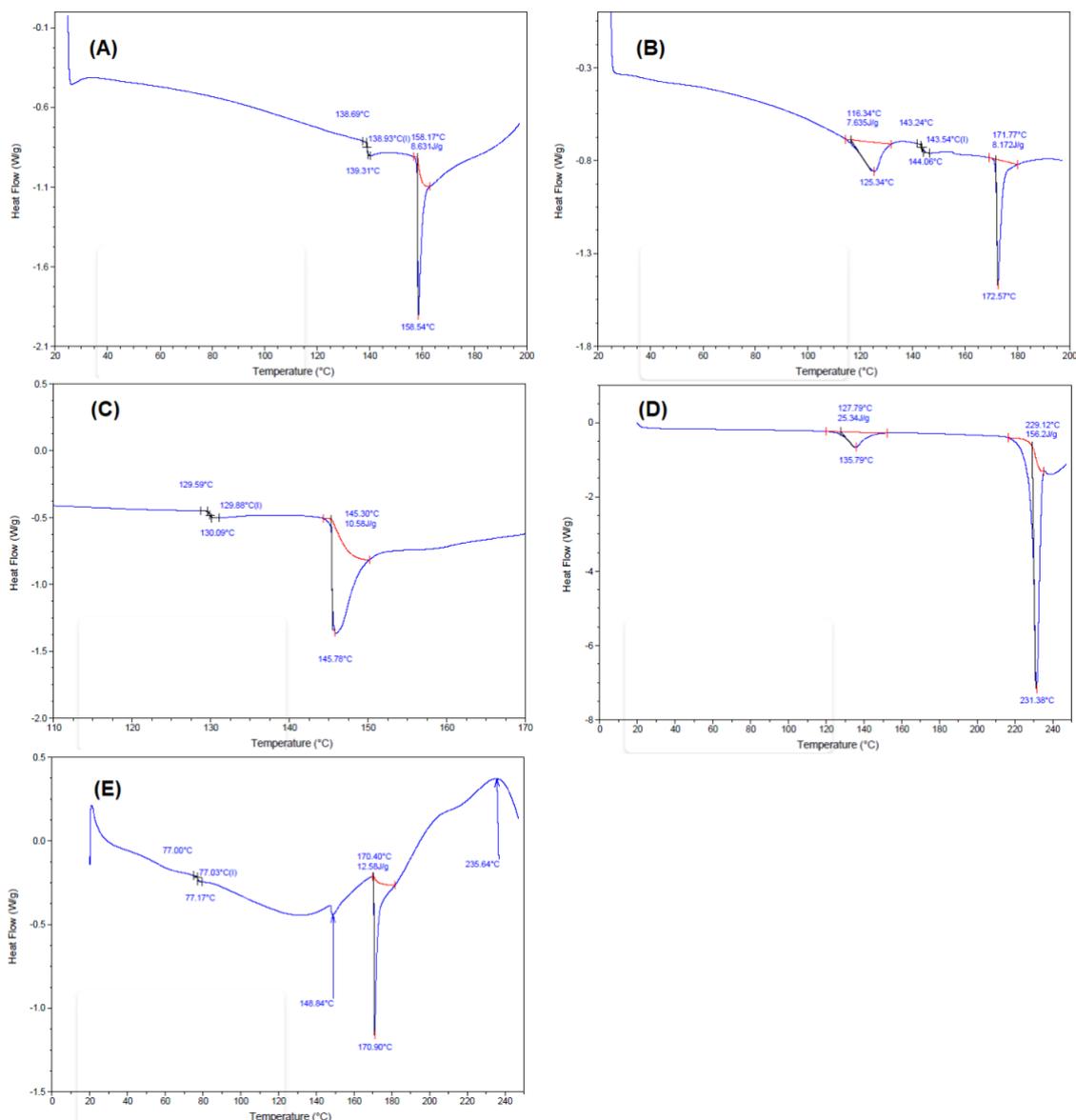
Espectros de FTIR das amostras liofilizadas (A) pectina, (B) lisozima, (C) nanopartículas de pectina/lisozima, (D)  $\beta$ -lactose, e (E) nanopartículas encapsuladas com  $\beta$ -lactose (400  $\mu\text{g/mL}$ ), (F) mistura física de pectina e lisozima, (G) mistura física de pectina, lisozima e  $\beta$ -lactose. As nanopartículas foram preparadas sob condições otimizadas (1:2, pH 10, 80°C, 30 min). Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.7 Análise térmica

Os termogramas obtidos por DSC dos compostos puros, assim como para as nanopartículas de pectina/lisozima, na ausência e encapsulados com  $\beta$ -lactose (400  $\mu\text{g}/\text{m}$ ), ajudaram a investigar as interações entre  $\beta$ -lactose e os biopolímeros (Figura 14). A curva calorimétrica da pectina (Figura 14A) apresentou um pico inicial em 139 °C, que pode estar associado à temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ). O pico endotérmico agudo em 158 °C pode estar associado ao seu ponto de fusão intrínseco ( $T_m$ ). Também revelou um pico exotérmico em torno de 205°C, que corresponde à decomposição das cadeias poliméricas (MUHAMMAD et al., 2020; NEUFELD; BIANCO-PELED, 2017; ULLAH et al., 2019). O termograma da lisozima (Figura 14B) apresentou um pico endotérmico em 125 °C, que pode estar associado ao processo de desnaturação da proteína. Na faixa de 150-170 °C, o segundo estágio pode ser correlacionado com a decomposição endotérmica da fase líquida da amostra. O termograma da  $\beta$ -lactose (Figura 14C) é caracterizado por um pico endotérmico em torno de 135 °C, característico da desidratação do monômero  $\alpha$ -lactose que também estava presente na amostra de lactose, seguido de um pico endotérmico agudo em 231 °C, que corresponde ao seu ponto de fusão intrínseco, acompanhado de um fenômeno exotérmico relacionado à decomposição do composto (ALTAMIMI et al., 2019). É importante ressaltar que o termograma confirma que a  $\beta$ -lactose não sofre decomposição por aquecimento a 80 °C durante a preparação das nanopartículas. O termograma das nanopartículas de pectina/lisozima (Figura 14D), mostrou que o pico endotérmico da lisozima desapareceu, indicando que a proteína interagiu com as cadeias da pectina e sugerindo que um novo biopolímero foi formado com um padrão diferente dos compostos isolados. As nanopartículas apresentaram um pico endotérmico a 145 °C, que pode ser atribuído ao ponto de fusão do produto recém-desenvolvido

tendo uma temperatura de desnaturação intermediária entre a temperatura dos dois biopolímeros utilizados na preparação. Além disso, a entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ) das nanopartículas (10,58 J/g) foi maior que a da pectina (8,63 J/g) e lisozima (7,63 J/g), o que sugere uma interação entre esses biopolímeros. No caso das nanopartículas encapsuladas com  $\beta$ -lactose (400  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 14E), um pico endotérmico é visível em torno de 170 °C, que pode ser atribuído a temperatura de fusão intrínseca do produto formado, e com um aumento do valor de  $\Delta H_m$  comparado às nanopartículas sem  $\beta$ -lactose (12,58 J/g). Esse maior aumento no ponto de fusão é um indicativo de que a  $\beta$ -lactose foi incorporada com sucesso nas nanopartículas e que este, por sua vez, apresenta uma maior estabilidade térmica em relação às nanopartículas de pectina/lisozima fabricados na ausência de  $\beta$ -lactose. Esses resultados estão de acordo quando comparados com a literatura (SANTOS; DE CARVALHO; GARCIA-ROJAS, 2018; ULLAH et al., 2019).

Figura 14 - Termogramas dos compostos isolados e das nanopartículas



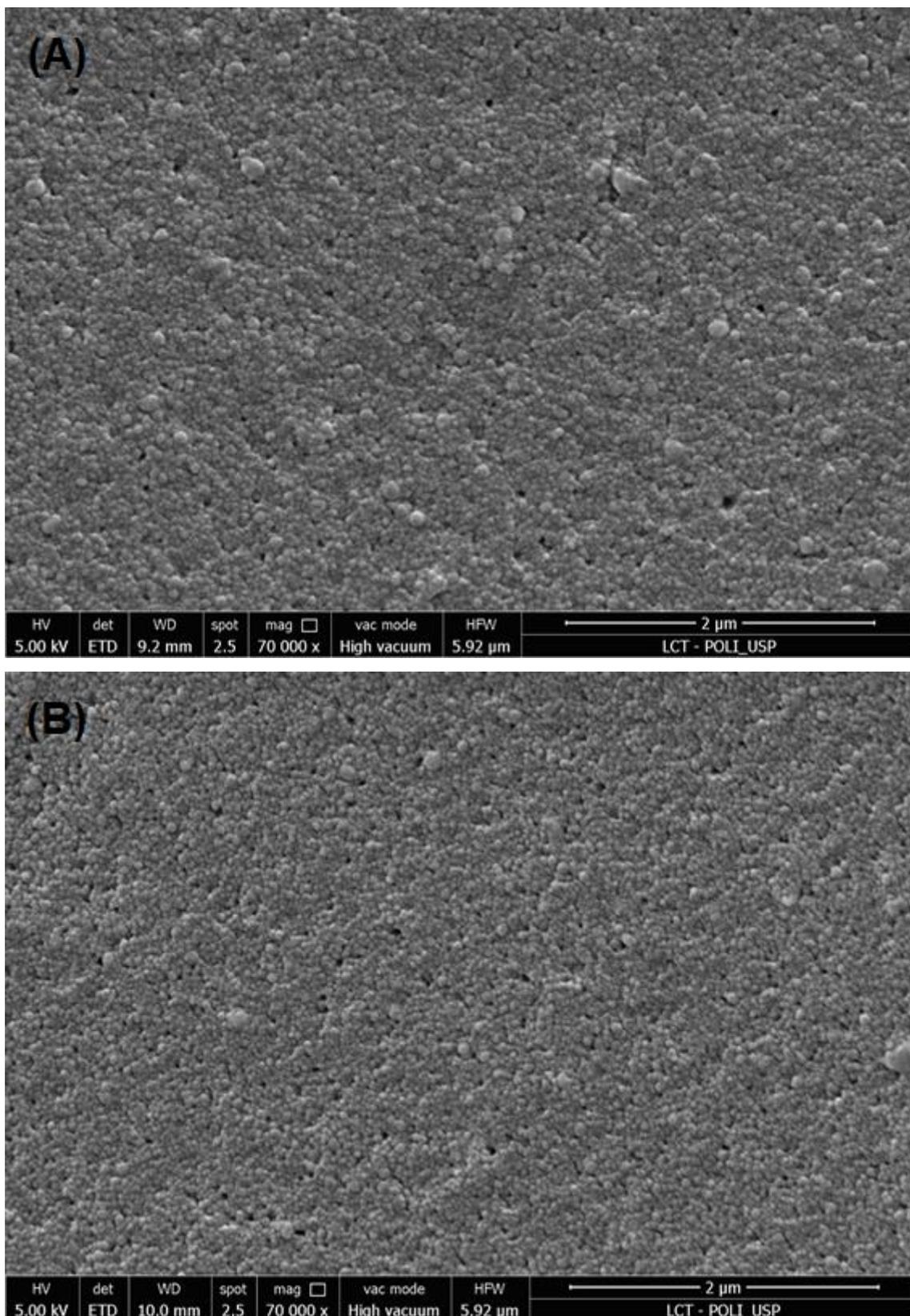
Termogramas de: (A) pectina, (B) liozima, (C) nanopartículas de pectina/liozima (D)  $\beta$ -lactose, e (E) nanopartículas encapsuladas com  $\beta$ -lactose (400  $\mu$ g/mL). Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.8 Análise da morfologia das nanopartículas

A morfologia de superfície das nanopartículas foi observada por microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e de transmissão (MET), conforme apresentado nas Figuras 15 e 16, respectivamente. Pode-se notar que a estrutura superficial das nanopartículas de pectina/liozima (Figura

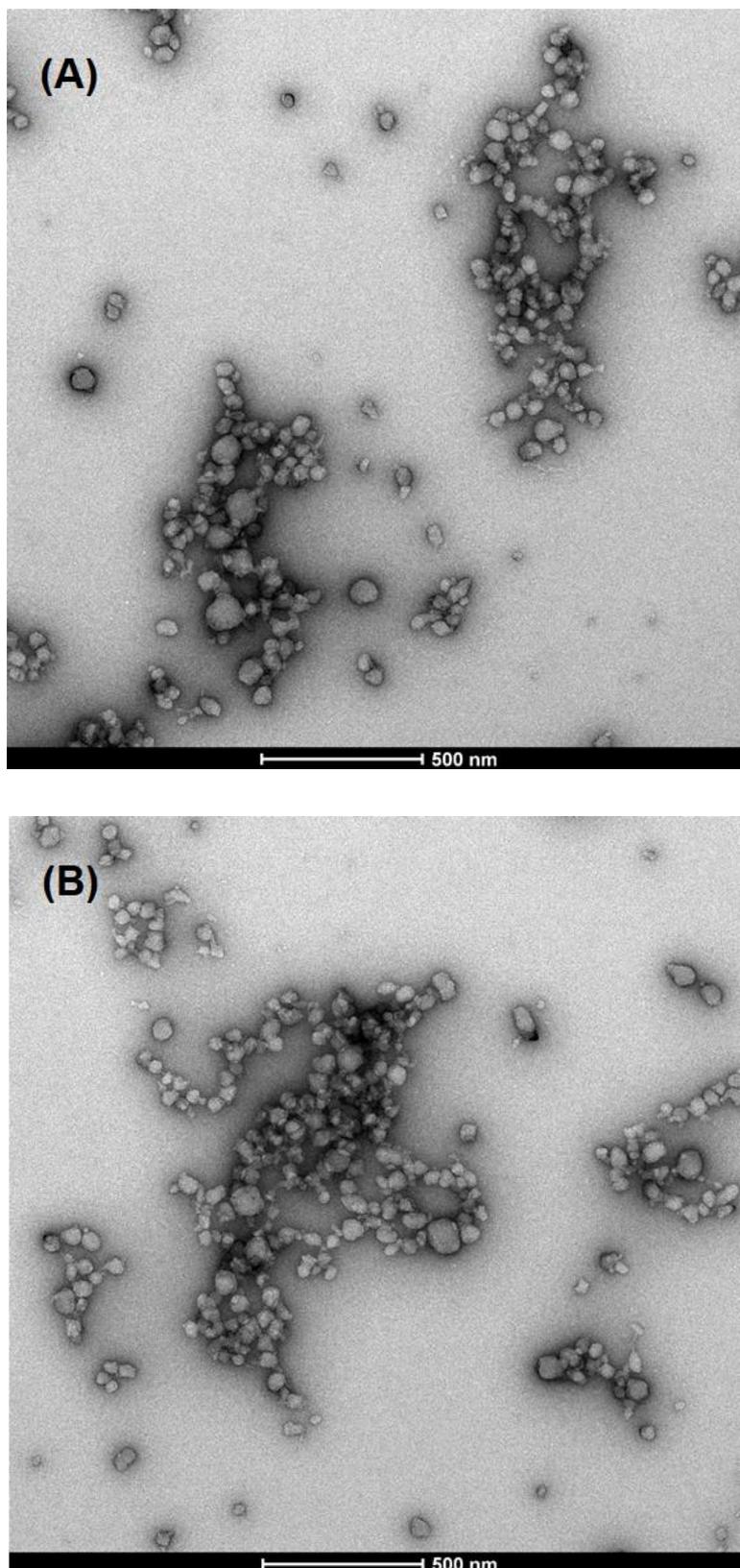
15A) e das nanopartículas encapsuladas com  $\beta$ -lactose (Figura 15B) visualizadas por MEV, para amostras previamente liofilizadas, mostrou uma abundância de nanopartículas agregadas e compactas, no entanto, ainda sim é possível observar nanopartículas em formato esférico e superfície lisa. Esse fenômeno de agregação foi atribuído ao processo de secagem. À medida que a evaporação do líquido prossegue, a agregação acontece devido ao aumento da concentração das partículas. A partir das imagens geradas por MET, as nanopartículas de pectina/lisozima (Figura 16A) e as nanopartículas encapsuladas com  $\beta$ -lactose (Figura 16B), desidratadas pelo processo de secagem a temperatura ambiente, evidenciaram nanopartículas mais dispersas e levemente irregulares, o que pode ter ocorrido durante o processo de secagem, mas de aparência esférica e com uma superfície relativamente lisa.

Figura 15 - MEV das nanopartículas liofilizadas



Micrografias de (A) nanopartículas de pectina/lisozima e (B) nanopartículas encapsuladas com  $\beta$ -lactose (400  $\mu\text{g/mL}$ ) com magnitude de 70,000x preparados sob condições otimizadas (razão 1:2, pH 10, 80  $^{\circ}\text{C}$ , 30 min). Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16 - MET das nanopartículas secas a temperatura ambiente



Micrografias de (A) nanopartículas de pectina/lisozima e (B) nanopartículas encapsuladas com  $\beta$ -lactose (400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) com magnitude de 19,000x preparados sob condições otimizadas (razão 1:2, pH 10, 80  $^{\circ}\text{C}$ , 30 min). Fonte: Elaborado pelo autor.

O tamanho médio das nanopartículas gerados por MEV e MET foi significativamente menor que o encontrado por DLS (Tabela 4). Essa diferença de tamanho médio das nanopartículas é decorrente de diferentes técnicas de análise, sendo que o DLS determina o diâmetro hidrodinâmico das partículas em meio aquoso, o que contribui com o intumescimento das amostras e, conseqüentemente, maiores tamanhos de partículas são observados. Por outro lado, quando as amostras são submetidas a análise por MEV e/ou MET, elas passam pelo processo de secagem e não apresentavam mais a influência da hidratação pela água. Portanto, o MEV e o MET determinam o diâmetro das partículas desidratadas, o que contribui com a redução de tamanho das partículas (LI et al., 2015; LIN et al., 2015; MAST et al., 2020; VLADÁR; HODOROABA, 2020).

Tabela 4 - Comparação entre o tamanho de partículas hidratadas e desidratadas das nanopartículas de pectina/lisozima (1:2, pH 10, 80 °C, 30 min) obtido por diferentes técnicas.

Nanopartículas	DLS <sup>a</sup>	MEV <sup>b</sup>	MET <sup>b</sup>
Sem $\beta$ -lactose	81,20 $\pm$ 0,34	55,51 $\pm$ 13,73	51,13 $\pm$ 13,78
Com $\beta$ -lactose	84,71 $\pm$ 3,15	56,14 $\pm$ 9,36	52,43 $\pm$ 10,35

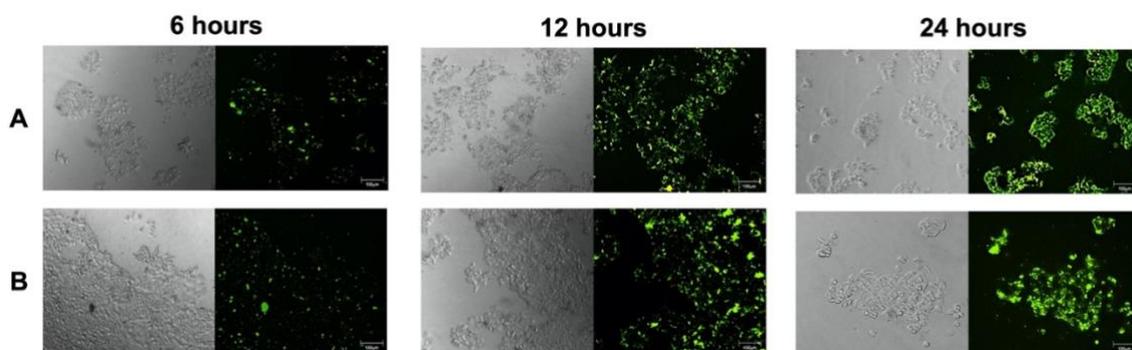
<sup>a</sup> DLS determinou o diâmetro hidrodinâmico em solução aquosa (1,0 mg/mL). <sup>b</sup> MEV e MET determinaram o tamanho das partículas liofilizadas e secas a temperatura ambiente, respectivamente. Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.9 Estudo de captação celular

A captação celular *in vitro* de nanopartículas foi avaliada por um microscópio invertido para geração de imagens epi fluorescentes de nanopartículas de pectina/lisozima encapsuladas com  $\beta$ -lactose (400 $\mu$ g/mL) marcadas com FITC. Células de câncer colorretal HCT-116 foram usadas para medir a captura das nanopartículas devido à descrição de vários

trabalhos que usaram essas células para esse fim (DUTTA et al., 2019; JAHANGIRI et al., 2021). A Figura 17 mostra imagens epi fluorescentes de células HCT-116 após incubação na presença das nanopartículas com FITC por 6, 12 e 24 h, respectivamente. Em 6 h, foram observados alguns pontos de fluorescência dispersos nas células particularmente distribuídos no citoplasma. A intensidade da fluorescência verde apareceu significativamente aumentada após 12 e 24 h de incubação. A intensidade da fluorescência verde aumentou com o prolongamento do tempo de incubação, sugerindo que as nanopartículas podem ser capturadas, provavelmente, via endocitose de maneira contínua (DUTTA et al., 2019; LIN et al., 2015). A observação da captura das nanopartículas pelas células com relação tempo-dependência, demonstra uma possível aplicação futura dessa metodologia para o encapsulamento de drogas ou componentes anticancerígenos para entrega em células cancerosas.

Figura 17 - Estudo de captação celular



Imagens de microscopia de células HCT-116 tratadas com (A) nanopartículas de pectina/lisozima e (B) nanopartículas encapsuladas com  $\beta$ -lactose após marcação com FITC por 6 h, 12 h e 24 h, respectivamente. Fonte: Elaborado pelo autor.

Nossa metodologia aqui descrita cria uma prova de conceito para encapsular pequenas moléculas não iônicas a partir de duas matrizes alimentares naturais para possíveis aplicações futuras. Um exemplo seria o encapsulamento da  $\beta$ -lactose para entregar a molécula ao cólon sem ser

metabolizada pelas lactases intestinais e entrar nas células cancerígenas do cólon. A  $\beta$ -lactose é um inibidor natural e barato da galectina-3, uma proteína pró-metastática (PEDROSA; LOPES; FABI, 2020). Um desses benefícios poderia ser a redução da carcinogênese através da interação da  $\beta$ -lactose internalizada com o domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) da galectina-3 localizada no citoplasma de células de câncer colorretal. No entanto, trabalhos adicionais devem ser feitos para concluir essa possível afirmação, como experimentos de digestibilidade, bioacessibilidade, efeitos anticancerígenos e assim por diante.

## 5 CONCLUSÕES

Na presente tese, foi demonstrado o sucesso da preparação, de forma inédita, de nanopartículas de pectina/lisozima, na ausência e encapsulados com  $\beta$ -lactose, com a interação ocorrendo por cargas opostas entre esses biopolímeros. Os dados obtidos por DLS mostraram comportamento semelhante entre as nanopartículas produzidas, na ausência e na presença de  $\beta$ -lactose, sugerindo uma dispersão coloidal estável para ambas as formulações. As imagens geradas por MEV e MET, para as nanopartículas encapsulados com  $\beta$ -lactose, também foram bem semelhantes às imagens geradas para as nanopartículas sem  $\beta$ -lactose, isto é, foram evidenciadas partículas de estrutura regular esférica e tamanho médio inferior ao obtido por DSL. Estudos mais aprofundados por FTIR e DSC sugerem que a interação entre pectina e lisozima deu origem a um novo biopolímero, sendo que a interação eletrostática teve predomínio na formação das nanopartículas, porém, ligações de hidrogênio também contribuíram de maneira significativa com essa interação. Os dados gerados na presente tese proporcionam uma excelente oportunidade para futuras aplicações dessas nanopartículas como sistema de encapsulamento tanto de ingredientes bioativos hidrofílicos como de ingredientes hidrofóbicos com diferentes propriedades funcionais. No setor alimentício, algumas das tendências da nanoencapsulação que podem fazer uso dessas nanopartículas de biopolímeros estão relacionadas às qualidades sensoriais (explorar sensações por liberação controlada de aromas e sabores, estender características sensoriais de ingredientes); saudabilidade e bem estar (fortificação e enriquecimento de alimentos, probióticos, prebióticos); conveniência e praticidade (desenvolvimento de ingredientes para aplicação em produtos desidratados); qualidade e confiabilidade (garantia do teor de nutrientes em alimentos, perfil e/ou durabilidade de sabores); e sustentabilidade e ética

(diminuição da utilização de compostos sintéticos, menor emprego de ingredientes, garantia do anunciado).

## REFERÊNCIAS

- ABAE, A.; MOHAMMADIAN, M.; MAHDI, S. Whey and soy protein-based hydrogels and nano-hydrogels as bioactive delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 70, p. 69–81, 2017.
- ABEYRATHNE, E. D. N. S.; LEE, H. Y.; AHN, D. U. Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents-A review. **Poultry Science**, v. 92, n. 12, p. 3292–3299, 2013.
- AJANI, J. A. et al. Galectin-3 expression is prognostic in diffuse type gastric adenocarcinoma, confers aggressive phenotype, and can be targeted by YAP1/BET inhibitors. **British Journal of Cancer**, v. 118, n. 1, p. 52–61, 2018.
- ALMEIDA, R. R. et al. Chitosan nanogels condensed to ferulic acid for the essential oil of *Lippia origanoides* Kunth encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 188, p. 268–275, 2018.
- ALTAMIMI, M. J. et al. Variability in the  $\alpha$  and  $\beta$  anomer content of commercially available lactose. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 555, p. 237–249, 2019.
- AMARA, C. BEN et al. Using complex coacervation for lysozyme encapsulation by spray-drying. **Journal of Food Engineering**, v. 183, p. 50–57, 2016.
- AMINLARI, L.; MOHAMMADI HASHEMI, M.; AMINLARI, M. Modified Lysozymes as Novel Broad Spectrum Natural Antimicrobial Agents in Foods. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 6, p. 1–14, 2014.
- ANTONOV, Y. A. et al. Complexation of pectins varying in overall charge with lysozyme in aqueous buffered solutions. **Food Hydrocolloids**, v. 94, p. 268–278, 2019.
- ARAGHI, M. et al. Changes in colorectal cancer incidence in seven high-income countries: a population-based study. **The Lancet Gastroenterology and Hepatology**, v. 4, n. 7, p. 511–518, 2019.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016.
- BHUYAN, M. et al. Pure and Applied Chemistry Synthesis of pectin-N , N-dimethyl acrylamide hydrogel by gamma radiation and application in drug delivery ( in vitro ). **Journal of Macromolecular Science, Part A**, v. 1325, p. 369–376, 2018.

- BURRINGTON, K. J. Food Applications for Whey Permeate. **Dairy Pipeline**, v. 17, n. 2, 2007.
- CARRILLO, W. et al. Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by heat and enzymatic treatments against oenological lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 10, p. 1732–1739, 2014.
- CHANG, J.; LI, L. The unfolding mechanism and the disulfide structures of denatured lysozyme. **FEBS Letters**, v. 511, p. 73–78, 2002.
- CLOGSTON, J. D.; PATRI, A. K. Zeta potential measurement. **Methods in Molecular Biology**, v. 697, p. 63–70, 2011.
- DANAEI, M. et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 2018.
- DE BOER, R. . et al. Galectin-3 : A Modifiable Risk Factor in Heart Failure. **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 28, p. 237–246, 2014.
- DE SOUZA SIMÕES, L. et al. Micro- and nano bio-based delivery systems for food applications: In vitro behavior. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 243, p. 23–45, 2017.
- DEBELE, T. A.; MEKURIA, S. L.; TSAI, H. Polysaccharide based nanogels in the drug delivery system: Application as the carrier of pharmaceutical agents. **Materials Science & Engineering C**, v. 68, p. 964–981, 2016.
- DINGS, R. P. M. et al. Galectins as Molecular Targets for Therapeutic Intervention. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 1, p. 1–22, 2018.
- DONG, R. U. I. et al. Galectin - 3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy ( Review ). p. 599–614, 2018.
- DUTTA, D. et al. Nanoencapsulated betulinic acid analogue distinctively improves colorectal carcinoma in vitro and in vivo. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–20, 2019.
- FASOLIN, L. H. et al. Emergent food proteins – Towards sustainability , health and innovation. **Food Research International**, v. 125, p. 108586, 2019.
- FENG, J. et al. Improved bioavailability of curcumin in ovalbumin-dextran nanogels prepared by Maillard reaction. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 55–68, 2016.
- GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents.

- Food Control**, v. 46, p. 412–429, 2014.
- HADIAN, M. et al. Encapsulation of *Rosmarinus officinalis* essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antibacterial activity in beef cutlet against *Salmonella typhimurium* during refrigerated storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 394–401, 2017.
- HERNÁNDEZ, N.; WILLIAMS, R. C.; COCHRAN, E. W. The battle for the “green” polymer. Different approaches for biopolymer synthesis: Bioadvantaged vs. bioreplacement. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 12, n. 18, p. 2834–2849, 2014.
- HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 255–264, 2013.
- HU, Z.; JIANG, X.; XU, Y. Downregulation of galectin-3 by EGF mediates the apoptosis of HepG2 cells. p. 157–165, 2012.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 5. ed. Rio de Janeiro, RJ: INCA, 2019a.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020 Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: INCA, 2019b.
- JAFARI, S. M.; MCCLEMENTS, D. J. Nanotechnology Approaches for Increasing Nutrient Bioavailability. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 81, p. 1–30, 2017.
- JAHANGIRI, S. et al. Potential anti - tumor activity of 13 . 56 MHz alternating magnetic hyperthermia and chemotherapy on the induction of apoptosis in human colon cancer cell lines HT29 and HCT116 by up - regulation of Bax , cleaved caspase 3 & 9 , and cleaved PARP proteins. **Cancer Nanotechnology**, v. 12, n. 34, p. 21, 2021.
- JAWAD, R. et al. Stability of Sugar Solutions : A Novel Study of the Epimerization Kinetics of Lactose in Water. **molecular pharmaceutics**, v. 11, p. 2224–2238, 2014.
- JIN, B. et al. Self-assembled modified soy protein/dextran nanogel induced by ultrasonication as a delivery vehicle for riboflavin. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 282, 2016.
- JOYE, I. J.; DAVIDOV-PARDO, G.; MCCLEMENTS, D. J. Nanotechnology for increased micronutrient bioavailability. **Trends in Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 168–182, 2014.

- KAROYO, A. H.; WILSON, L. D. Physicochemical Properties and the Gelation Process of Supramolecular Hydrogels: A Review. **Gels**, v. 3, n. 1, p. 1–18, 2017.
- KHALILI, S. T. et al. Encapsulation of Thyme essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 502–508, 2015.
- KHOSA, A.; REDDI, S.; SAHA, R. N. Biomedicine & Pharmacotherapy Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 598–613, 2018.
- KWAN, A.; DAVIDOV-PARDO, G. Controlled release of flavor oil nanoemulsions encapsulated in filled soluble hydrogels. **Food Chemistry**, v. 250, n. August 2017, p. 46–53, 2018.
- KYOMUGASHO, C. et al. FT-IR spectroscopy, a reliable method for routine analysis of the degree of methylesterification of pectin in different fruit- and vegetable-based matrices. **Food Chemistry**, v. 176, p. 82–90, 2015.
- LE, X. T.; RIOUX, L. E.; TURGEON, S. L. Formation and functional properties of protein-polysaccharide electrostatic hydrogels in comparison to protein or polysaccharide hydrogels. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 239, p. 127–135, 2017.
- LECLERE, L.; CUTSEM, P. VAN; MICHIELS, C. Anti-cancer activities of pH- or heat-modified pectin. **frontiers in pharmacology**, v. 4, n. October, p. 1–8, 2013.
- LI, X. et al. Fabrication of chitosan hydrochloride and carboxymethyl starch complex nanogels as potential delivery vehicles for curcumin. **Food Chemistry**, v. 293, p. 197–203, 2019.
- LI, Z. et al. Self-assembled lysozyme/carboxymethylcellulose nanogels for delivery of methotrexate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 166–172, 2015.
- LI, Z. et al. Effect of substitution degree on carboxymethylcellulose interaction with lysozyme. **Food hydrocolloids**, v. 62, p. 222–229, 2017.
- LIN, L. et al. Construction of pH-sensitive lysozyme/pectin nanogel for tumor methotrexate delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 126, p. 459–466, 2015.
- LIU, L. S. et al. Hydrogels from biopolymer hybrid for biomedical, food, and functional food applications. **Polymers**, v. 4, n. 2, p. 997–1011,

2012.

- LÓPEZ-PABLOS, A. L. et al. Preparation and Characterization of High Purity Anhydrous  $\beta$ -Lactose from  $\alpha$ -Lactose Monohydrate at Mild Temperature. **International Journal of Polymer Science**, v. 2018, 2018.
- MA, X. et al. Comparison of citrus pectin and apple pectin in conjugation with soy protein isolate (SPI) under controlled dry-heating conditions. **Food Chemistry**, v. 309, p. 125501, 2020.
- MARKOWSKA, A. I.; LIU, F.; PANJWANI, N. Galectin-3 is an important mediator of VEGF- and bFGF-mediated angiogenic response. v. 207, n. 9, p. 1981–1993, 2010.
- MAST, J. et al. Characterization of nanomaterials by transmission electron microscopy: Measurement procedures. **Characterization of Nanoparticles**, p. 29–48, 2020.
- MINHAS, M. U. et al. Synthesis and Characterization of Biodegradable Hydrogels for Oral Delivery of 5-Fluorouracil Targeted to Colon: Screening with Preliminary In Vivo Studies. **Advances in Polymer Technology**, v. 37, n. 1, p. 221–229, 2016.
- MOHAMMADIAN, M. et al. Nanostructured food proteins as efficient systems for the encapsulation of bioactive compounds. **Food Science and Human Wellness**, v. 9, p. 199–213, 2020.
- MOHAN, S. et al. Biopolymers – Application in Nanoscience and Nanotechnology. **Recent Advances in Biopolymers**, p. 47–72, 2016.
- MUHAMMAD, N. W. F. N. A. F. et al. Physicochemical properties of dragon fruit peel pectin and citrus peel pectin: a comparison. **Food Research International**, v. 4, p. 266–273, 2020.
- MUNIALO, C. D.; EUSTON, S. R.; DE JONGH, H. H. J. Protein gels. **Proteins in Food Processing**, p. 501–521, 2018.
- NEUFELD, L.; BIANCO-PELED, H. Pectin-chitosan physical hydrogels as potential drug delivery vehicles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 852–861, 2017.
- NOREEN, A. et al. Pectins functionalized biomaterials; a new viable approach for biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 254–272, 2017.
- OZIN, G. A. et al. Nanofabrication by self-assembly. **Materials Today**, v. 12, n. 5, p. 12–23, 2009.
- PEDROSA, L. D. F.; LOPES, R. G.; FABRI, J. P. The acid and neutral

fractions of pectins isolated from ripe and overripe papayas differentially affect galectin-3 inhibition and colon cancer cell growth. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 2681–2690, 2020.

- PENG, H. et al. Preparation and self-assembly mechanism of bovine serum albumin-citrus peel pectin conjugated hydrogel: A potential delivery system for vitamin C. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 39, p. 7377–7384, 2016.
- POSOCCO, B. et al. Polysaccharides for the delivery of antitumor drugs. **Materials**, v. 8, n. 5, p. 2569–2615, 2015.
- RABINOVICH, G. A.; CROCI, D. O. Review Regulatory Circuits Mediated by Lectin-Glycan Interactions in Autoimmunity and Cancer. **Immunity**, v. 36, n. 3, p. 322–335, 2012.
- REHMAN, A. et al. Pectin polymers as wall materials for the nano-encapsulation of bioactive compounds. **Trends in Food Science and Technology**, v. 90, p. 35–46, 2019.
- ROSALES, T. K. O. et al. Nanoencapsulation of anthocyanins from blackberry (*Rubus* spp.) through pectin and lysozyme self-assembling. **Food Hydrocolloids**, v. 114, p. 106563, 2021.
- SAITO, R. D. F. et al. **Fundamentos de oncologia molecular**. 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015.
- SANTOS, M. B.; DE CARVALHO, C. W. P.; GARCIA-ROJAS, E. E. Heteroprotein complex formation of bovine serum albumin and lysozyme: Structure and thermal stability. **Food Hydrocolloids**, v. 74, p. 267–274, 2018.
- SARKAR, S. et al. Protein nanocomposites: Special inferences to lysozyme based nanomaterials. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 111474, 2020.
- SCIACCHITANO, S. et al. Galectin-3 : One Molecule for an Alphabet of Diseases , from A to Z. **International Journal of Molecular Sciences**, 2018.
- SILVETTI, T. et al. Use of Hen Egg White Lysozyme in the Food Industry. **Egg Innovations and Strategies for Improvements**, p. 233–242, 2017.
- STETEFELD, J.; MCKENNA, S. A.; PATEL, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical Reviews**, v. 8, n. 4, p. 409–427, 2016.

- SUN, X.; XIAO, J. X.; HUANG, G. Q. Recovery of lysozyme from aqueous solution by polyelectrolyte precipitation with sodium alginate. **Food Hydrocolloids**, v. 90, p. 225–231, 2019.
- SUTHAHAR, N. et al. Galectin-3 activation and inhibition in heart failure and cardiovascular disease: An update. **Theranostics**, v. 8, n. 3, p. 593–609, 2018.
- THAKUR, N. et al. Recent updates on bioaccessibility of phytonutrients. **Trends in Food Science & Technology**, v. 97, n. August 2019, p. 366–380, 2020.
- ULLAH, K. et al. Pectin-based (LA-co-MAA) semi-IPNS as a potential biomaterial for colonic delivery of oxaliplatin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 569, p. 118557, 2019.
- VLADÁR, A. E.; HODOROABA, V. Characterization of nanoparticles by scanning electron microscopy. **Characterization of Nanoparticles**, p. 7–27, 2020.
- VLADOIU, M. C.; LABRIE, M.; ST-PIERRE, Y. Intracellular galectins in cancer cells : Potential new targets for therapy ( Review ). p. 1001–1014, 2014.
- WANG, Y. et al. Nanogels fabricated from bovine serum albumin and chitosan via self-assembly for delivery of anticancer drug. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 146, p. 107–113, 2016.
- WANG, Y. et al. Prognostic role of galectin-3 expression in patients with solid tumors: A meta-analysis of 36 eligible studies. **Cancer Cell International**, v. 18, n. 172, 2018.
- WEI, Z.; HUANG, Q. Assembly of Protein – Polysaccharide Complexes for Delivery of Bioactive Ingredients: A Perspective Paper. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2019.
- WOOD, R. J. Bioavailability: definition, general aspects and fortificants. In: CABALLERO, B., ALLEN, L., PRENTICE, A. (Ed.). . **Encyclopedia of Human Nutrition**. 2nd. ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2005. p. 195–201.
- YANG, R.; RABINOVICH, G. A.; LIU, F. Galectins : structure , function and therapeutic potential. v. 10, n. June, p. 1–24, 2008.
- ZHANG, Q. et al. Nanostructures of protein-polysaccharide complexes or conjugates for encapsulation of bioactive compounds. **Trends in Food Science & Technology**, v. 109, p. 169–196, 2021.
- ZHOU, M. et al. Low density lipoprotein/pectin complex nanogels as potential oral delivery vehicles for curcumin. **Food Hydrocolloids**, v.

57, p. 20–29, 2016.

ZHOU, M. et al. Chemical crosslinking improves the gastrointestinal stability and enhances nutrient delivery potentials of egg yolk LDL/polysaccharide nanogels. **Food Chemistry**, v. 239, p. 840–847, 2018.

ZHU, K. et al. Nanogels fabricated by lysozyme and sodium carboxymethyl cellulose for 5-fluorouracil controlled release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, n. (1-2), p. 721–727, 2013.

ZIMET, P.; LIVNEY, Y. D. Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 4, p. 1120–1126, 2009.