



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

BRUNA JUMMES

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS PELO MÉTODO DE  
MULTICAMADAS DE QUITOSANA/ALGINATO CARREGADAS COM  
ANTOCIANINAS**

FLORIANÓPOLIS  
2019



Bruna Jummes

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS PELO MÉTODO DE  
MULTICAMADAS DE QUITOSANA/ALGINATO CARREGADAS COM  
ANTOCIANINAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto

Florianópolis  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Jummes, Bruna

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS PELO MÉTODO DE MULTICAMADAS DE QUITOSANA/ALGINATO CARREGADAS COM ANTOCIANINAS / Bruna Jummes ; orientador, Pedro Luiz Manique Barreto, 2019.

61 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Encapsulação. 3. Multicamadas. 4. Polímeros. 5. Poliestireno. I. Manique Barreto, Pedro Luiz. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Bruna Jummes

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS PELO MÉTODO DE  
MULTICAMADAS DE QUITOSANA/ALGINATO CARREGADAS COM  
ANTOCIANINAS**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Michael Ramos Nunes, Dr.

Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC)

Prof. Giustino Tribuzi, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Profa. Maria Manuela Camino Feltes, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Ciência dos Alimentos.

---

Prof. Dra. Ana Costa de Oliveira Costa

Coordenadora do Programa

---

Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto

Orientador

Florianópolis, 30 de Julho de 2019.

Dedico este trabalho à minha filha, Alice.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre presente em minha vida.

Ao professor Dr. Pedro Luiz Manique Barreto pela oportunidade, orientação, incentivo, amizade em todos esses anos e principalmente por ter acreditado na realização deste trabalho.

A Dr<sup>a</sup>. Carolina Montanheiro Noronha pela amizade e por sempre doar um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível.

Ao Laboratório de Catálise Biométrica do Departamento de Química e ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina pela disponibilização de equipamentos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Reologia e Polímeros Naturais, Matheus, Aline, Ana Paula, Daniele, Bianca, Michelle e Núbia pela amizade, companheirismo, informações, conselhos, sugestões e apoio.

A minha família, amigos e meu companheiro pelo amor, incentivo compreensão e paciência ao longo destes anos.

As minhas amigas Anna Paula, Bruna, Melissa e Vanessa pelo apoio, conselho e amizade, e principalmente Stefânia pelo incentivo e companheirismo de todos os dias.

Aos membros da banca pela disposição.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

A UFSC, Capes e FAPESC.

A todos muito obrigada.

## RESUMO

As antocianinas são pigmentos hidrossolúveis com propriedades antioxidantes. Além disso, o desejo por ingredientes naturais levou ao aumento do uso de antocianinas como corantes naturais em produtos alimentícios. Embora haja um aumento no interesse pelas antocianinas em alimentos funcionais, seu uso como ingrediente é limitado por sua instabilidade. Desta forma, a encapsulação é uma alternativa para proteger este composto bioativo de um ambiente desfavorável. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi desenvolver suspensões de nanocápsulas de quitosana/alginate pelo método camada por camada (LbL) usando molde sacrificial de nanopartículas de poliestireno (100 nm), seguido da encapsulação de antocianina. As interações eletrostáticas entre os grupos amina protonados de quitosana (+59 mV) e os grupos carboxílicos de alginate (-48 mV) são a força de atração que permite a elaboração de camadas bem ordenadas no substrato esférico. A remoção do núcleo se dá pela imersão das nanopartículas em tetrahydrofurano, que, por sua vez, permite a obtenção de nanocápsulas ocas de multicamadas de quitosana/alginate. A encapsulação ocorre por difusão de antocianinas no interior das cápsulas após a sua formação. As nanopartículas obtidas foram caracterizadas em todas as fases de montagem em relação ao tamanho médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta em equipamento Zetasizer Nano Series a 173°, obtendo tamanhos crescentes de partículas, variando de  $182,0 \pm 1,0$  nm para primeira camada (quitosana) e  $221,9 \pm 1,6$  nm quando se acrescenta a segunda camada (alginate). Com a remoção do núcleo de poliestireno (PS), as cápsulas ocas de multicamadas entumecem, apresentando tamanhos de  $394,4 \pm 12,0$  nm. Os resultados de polidispersibilidade foram menores do que 0,280 para estas amostras, indicando uma distribuição unimodal (IP <0,300). Todas as formulações apresentaram uma excelente estabilidade (potencial zeta <  $\pm 30$  mV), incluindo as nanopartículas carregadas com antocianinas, pois apesar de apresentarem um tamanho médio maior do que a cápsula oca (controle) de aproximadamente  $449,0 \pm 7,2$  nm e um índice de polidispersão de  $0,294 \pm 0,023$ , apresentou uma boa estabilidade. Morfologicamente as nanopartículas foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão e apresentaram formato esférico e com estrutura capsular em todas as fases. Para a confirmação da remoção do núcleo, foi realizado espectroscopia de infravermelho, confirmando a diminuição das bandas de PS em nanocápsulas ocas e carregadas. Também foi avaliada a atividade antioxidante das nanopartículas carregadas com antocianinas, mostrando que houve habilidade de sequestrar o radical DPPH e ABTS mesmo utilizando uma concentração de antocianina baixa. Deste modo os resultados mostraram que as nanocápsulas



ocas e carregadas com composto bioativo foram preparadas com sucesso através da técnica de camada por camada (LbL), com polissacarídeos naturais, a quitosana e o alginato, através de um molde sacrificial de nanopartículas de poliestireno.

**Palavras-chave:** Encapsulação. Multicamadas. Polímeros. Poliestireno.

## ABSTRACT

Anthocyanins are water soluble pigments with antioxidant properties. In addition, the desire for natural ingredients has led to the increased use of anthocyanins as natural dyes in food products. Although there is an increasing interest in anthocyanins in functional foods, their use as an ingredient is limited by their instability. Therefore, encapsulation is an alternative to protect this bioactive compound from an unfavorable environment. Therefore, the objective of this work was to develop chitosan / alginate nanocapsule suspensions by layer-by-layer (LbL) method using sacrificial polystyrene nanoparticles (100 nm), followed by anthocyanin encapsulation. The electrostatic interactions between the protonated chitosan amino groups (+59 mV) and the alginate carboxylic groups (-48 mV) are the attractive force that allows the formation of well-ordered layers in the spherical substrate. The removal of the nucleus occurs by immersing the nanoparticles in tetrahydrofuran, which in turn allows the obtainment of hollow chitosan / alginate multilayer nanocapsules. Encapsulation occurs by diffusion of anthocyanins inside the capsules after their formation. The nanoparticles obtained were characterized in all assembly phases in relation to the average particle size, polydispersion index and zeta potential in Zetasizer Nano Series equipment at 173°, obtaining increasing particle sizes, ranging from  $182.0 \pm 1.0$  nm to first layer (chitosan) and  $221.9 \pm 1.6$  nm when the second layer (alginate) is added. With the removal of the polystyrene core (PS), the multilayer hollow capsules swell to a size of  $394.4 \pm 12.0$  nm. Polydispersity results were less than 0.280 for these samples, indicating a unimodal distribution (IP <0.300). All formulations showed excellent stability (zeta potential  $\leq \pm 30$  mV), including anthocyanin-loaded nanoparticles, as despite having an average size larger than the hollow capsule (control) of approximately  $449.0 \pm 7.2$  nm and A polydispersity index of  $0.294 \pm 0.023$  showed good stability. Morphologically the nanoparticles were analyzed by transmission electron microscopy and presented spherical shape and capsular structure in all phases. To confirm the removal of the nucleus, infrared spectroscopy was performed, confirming the decrease of PS bands in hollow and charged nanocapsules. The antioxidant activity of the anthocyanin-loaded nanoparticles was also evaluated, showing that there was an ability to sequester the DPPH and ABTS radical even using a low anthocyanin concentration. Thus, the results showed that the hollow and bioactive compound-loaded nanocapsules were successfully prepared by layer-by-layer (LbL) technique with natural polysaccharides, chitosan and alginate, by a sacrificial mold of polystyrene nanoparticles.

**Keywords:** Encapsulation. Multi-layered. Polymers. Polystyrene.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura básica dos pigmentos de antocianina, onde Rn: pode ser H <sub>2</sub> , OH ou OCH <sub>3</sub> , dependendo do pigmento considerado.....	22
Figura 2: Transformações estruturais de antocianinas em relação ao pH do meio.....	23
Figura 3: Preparação das nanocápsulas ocas.....	28
Figura 4: Esquema da deposição de LBL de polieletrólitos.....	29
Figura 5: Encapsulação por carregamento de cápsulas pré-formadas.....	30
Figura 6: Estruturas moleculares da celulose, quitina e quitosana. .... <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
Figura 7: Estrutura química do alginato de sódio.....	34
Figura 8: Valores do potencial zeta em função do número de camadas depositadas (n).....	43
Figura 9: Microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas.....	48
Figura 10: FTIR do molde de poliestireno e as nanopartículas com multicamadas.....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização das etapas de formação das nanopartículas de multicamadas em molde de PS.....	44
Tabela 2: Caracterização das nanopartículas vazias e carregadas com antocianinas. ....	45
Tabela 3: Estudo da estabilidade das nanopartículas controle (vazia) e carregadas com antocianinas. ....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA	Atividade antioxidante
ABTS	2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)
AC	Antocianinas
AL	Alginato
ANOVA	Análise de variância
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EE	Eficiência de encapsulação
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
PDI/IP	<i>Polydispersity index</i> /Índice de polidispersão
LbL	<i>Layer-by-layer</i> /camada por camada
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
PS	Poliestireno
QT	Quitosana
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
THF	Tetrahidrofurano
Z-ave	<i>Mean particle size</i> /diâmetro médio de partícula
$\zeta$	<i>Zeta potential</i> /potencial zeta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.2 OBJETIVOS .....	18
1.2.1 <i>Objetivo Geral</i> .....	18
1.2.2 <i>Objetivos Específicos</i> .....	18
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>21</b>
2.1 ANTOCIANINAS .....	21
2.1.1 <i>Encapsulação</i> .....	25
2.2 NANOPARTÍCULAS .....	26
2.2.1 <i>Método de montagem LbL</i> .....	27
2.2.2 <i>Quitosana</i> .....	31
2.2.3 <i>Alginato</i> .....	33
2.2.4 <i>Caracterização das nanopartículas</i> .....	35
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
3.1 MATERIAL.....	37
3.2 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS .....	37
3.2.1 <i>LbL em Nanopartículas de Poliestireno</i> .....	37
3.2.2 <i>Retirada do núcleo de PS</i> .....	37
3.2.3 <i>Carregamento do núcleo com o composto bioativo</i> .....	38
3.3 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DA PARTÍCULA (Z-AVE), ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (IP) E POTENCIAL ZETA ( $\zeta$ ).....	38
3.4 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO .....	38
3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) .....	39
3.6 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO .....	39
3.7 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE .....	39
3.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	40
3.8.1 <i>Método DPPH</i> .....	40
3.8.2 <i>Método ABTS</i> .....	40
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	40
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
4.1 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DA PARTÍCULA (Z-AVE), ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (IP) E POTENCIAL ZETA ( $\zeta$ ) CAMADA POR CAMADA (LbL).....	43
4.2 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DA PARTÍCULA (Z-AVE), ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (IP), POTENCIAL ZETA ( $\zeta$ ), EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA) DAS NANOPARTÍCULAS OCAS E CARREGADAS .....	45
4.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	49
4.5 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE .....	51
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>





## 1 INTRODUÇÃO

A auto-oxidação em sistemas alimentares e biológicos é responsável por uma multiplicidade de efeitos adversos e implicações na saúde humana, bem como na estabilidade e preservação dos alimentos. Os antioxidantes desempenham um papel importante para prevenir ou retardar a auto-oxidação e têm atraído muita atenção como estabilizadores de alimentos, suplementos dietéticos e produtos de saúde natural (SHAHIDI; ZHONG, 2010).

Os antioxidantes sintéticos e os naturais são amplamente utilizados em produtos alimentícios, no entanto, alguns antioxidantes sintéticos tornaram seu uso controverso devido aos potenciais efeitos adversos sobre a saúde humana. As fontes naturais de antioxidantes tais como as antocianinas, têm sido aplicadas extensivamente na indústria de alimentos (SHAHIDI; ZHONG, 2010; MOZAFARI et al., 2006).

As antocianinas são pigmentos solúveis em água e responsáveis por muitas das cores vivas observadas na natureza (SANTOS-BUELGA; GONZÁLEZ-PARAMÁS, 2019). Nas últimas décadas, as antocianinas atraíram muitas atenções por suas funcionalidades bem conhecidas, que estão ligadas a uma série de benefícios para a saúde e a sua alta capacidade antioxidante. Extratos de frutas e vegetais ricos em antocianinas foram bem investigados e adotados como ingredientes ativos em aplicações de fortificação de alimentos (CASTAÑEDA- OVANDO et al., 2009).

No entanto, a estabilidade, bem como a funcionalidade das antocianinas, depende em grande parte da estrutura química delas e dos fatores ambientais, tornando a utilização das antocianinas limitada, pois esse composto é instável ao aquecimento e ao oxigênio (RODRIGUEZ-AMAYA, 2018). Esses impedimentos para a aplicação da antocianina podem ser contornados aplicando-se as tecnologias da nanoencapsulação a fim de protegê-lo de um ambiente desfavorável (YOO et al., 2006).

A encapsulação consiste no carregamento de substâncias quimicamente instáveis em matrizes poliméricas, mantendo sua estabilidade e promovendo a sua liberação no momento e na taxa desejada. A técnica de montagem camada por camada (Layer-by-Layer - LbL) tornou-se um método primário para a preparação de diferentes sistemas nanoestruturados com multicamadas, e consiste na deposição alternada de polieletrólitos com cargas opostas em torno de um molde carregado, sendo depositadas até obter a espessura da película desejada. As nanocápsulas de multicamadas podem ser obtidas utilizando um molde coloidal, como as nanopartículas de poliestireno, por exemplo (YE et al., 2005; ITOH, 2004). Ao final do processo, os moldes são removidos para obterem-se cápsulas ocas, que podem

ser aplicadas em vários campos, como por exemplo: transportar, proteger e liberar compostos bioativos ou como ingredientes funcionais (fármacos, antimicrobianos, antioxidantes e aromatizantes) a um local de ação específico (RIVERA et al., 2015).

Estas nanocápsulas de multicamadas possuem aplicações promissoras na liberação de compostos bioativos nas indústrias farmacêuticas e alimentares. Contudo, para que estas aplicações sejam possíveis, a biofuncionalidade e o uso de materiais não tóxicos são as principais condições a serem atendidas. Sua aplicação pode ser no carreamento, proteção e liberação de compostos ativos ou ingredientes funcionais a um sítio específico de ação. Os biopolímeros e polieletrólitos naturais e biodegradáveis com cargas opostas tais como quitosana (QT) e alginato (AL), têm sido muito utilizados na formação destas nanocápsulas (PINHEIRO et al., 2015; RIVERA et al., 2015).

Desta forma, o intuito primário deste trabalho foi o desenvolvimento de nanocápsulas através da montagem LbL de quitosana/alginato em moldes de nanopartículas de poliestireno (PS) (diâmetro  $\approx$  100 nm), seguida da remoção deste núcleo de PS. A incorporação de antocianina foi realizada, por difusão, nas nanocápsulas ocas e sua caracterização foi avaliada como potencial para liberação do núcleo antociânico.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento e a caracterização de nanocápsulas biodegradáveis através do método de multicamadas (LbL) de quitosana/alginato em nanopartículas de poliestireno, seguido de um carregamento de antocianina.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Obtenção de nanopartículas com multicamadas de quitosana/alginato com núcleo molde de nanopartículas de poliestireno e remoção deste molde;
- Carregamento das antocianinas por difusão, para o núcleo da partícula;
- Caracterização por espalhamento de luz dinâmico (DLS) das suspensões contendo as nanopartículas para avaliação da estabilidade físico-química;
- Avaliação da eficiência de encapsulação das suspensões;
- Avaliação morfológica das nanopartículas;

- Avaliação por espectroscopia de infravermelho das nanopartículas ocas e carregadas;
- Avaliação da atividade antioxidante por DPPH e ABTS.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ANTOCIANINAS

As antocianinas (do grego: *anthos*, flor e *kyanos*, azul) (MANHITA; TEIXEIRA; COSTA, 2006), apresentam um esqueleto estrutural de carbonos C6-C3-C6, totalizando 15 carbonos em sua estrutura básica, são classificadas quimicamente como compostos fenólicos pertencentes à família dos flavonoides. Fazem parte do grupo de pigmentos responsáveis por grande parte das cores em flores, frutas, folhas, caules e raízes de plantas, ficando atrás apenas da clorofila (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2010). Elas também são consideradas o maior grupo de pigmentos solúveis em água do reino vegetal, sendo assim, de fácil incorporação. Também são solúveis em etanol e não apresentam toxicidade, o que os torna interessante para sua utilização como corantes, principalmente pela diversidade de cores que variam de rosa e laranja a vermelha, roxa e azul. (PETERSON; DWYER, 2000; SANTOS-BUELGA; GONZÁLEZ-PARAMÁS, 2019; TEIXEIRA; STRINGHETA; OLIVEIRA, 2008).

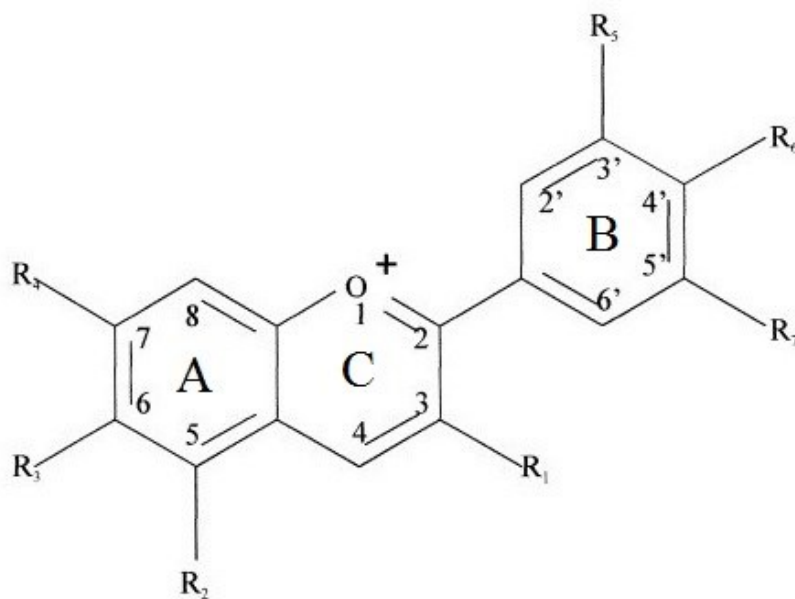
Nas plantas, as antocianinas desempenham várias funções, por exemplo, atuam como bloqueadores solares que protegem a planta contra a foto-oxidação, eliminam radicais livres gerados durante o metabolismo normal das plantas e atraem animais para polinização e dispersão de sementes, através de suas cores vivas e intensas. (CELLI; TAN; SELIG, 2019; DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2010).

Atualmente, mais de 700 estruturas de antocianinas foram encontradas em fontes naturais, e mais de 200 já foram identificadas (SANTOS-BUELGA; GONZÁLEZ-PARAMÁS, 2019). Este composto ganhou ainda mais interesse pelos pesquisadores à medida que se acumulavam estudos de seus potenciais benefícios à saúde humana, surgindo aplicações deste pigmento como corantes naturais e composto bioativo, para serem explorados pelas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (PINA et al., 2012).

A estrutura química básica das antocianinas é derivada do cátion flavilium (cátion 2-fenilbenzopirílio), que é formado por dois anéis aromáticos unidos por uma unidade de três carbonos, condensada por um oxigênio (Figura 1). Na natureza, elas ocorrem glicosiladas, sendo as agliconas conhecidas como antocianidinas, cuja forma básica é a do cátion flavilium. Além do grupo de açúcares, a molécula de antocianina pode ter, frequentemente, uma ligação a um grupo de ácidos orgânicos e outros substituintes (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2010).

Existem 19 antocianidinas de ocorrência natural, mas apenas seis costumam ocorrer nos alimentos (pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina), variando no número e grau de metilação dos grupos hidroxila no anel B. O número e a localização das porções de açúcar ligadas (glicosilação), bem como a natureza e o número de ácidos alifáticos ou aromáticos ligados a eles (acilação), levam à multiplicidade de antocianinas hoje conhecidas. (RODRIGUEZ-AMAYA, 2018; SINOPOLI; CALOGERO; BARTOLOTTA, 2019).

Figura 1: Estrutura básica dos pigmentos de antocianina, onde R<sub>n</sub>: pode ser H<sub>2</sub>, OH ou OCH<sub>3</sub>, dependendo do pigmento considerado.

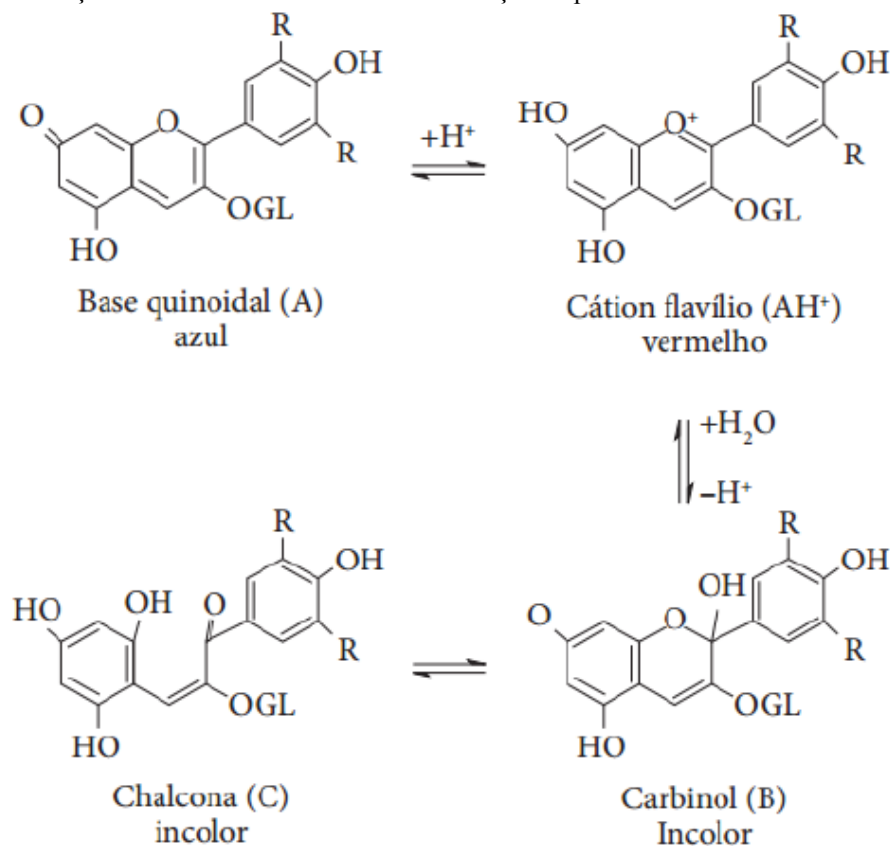


Fonte: Adaptado de Delgado-Vargas; Jiménez; Paredes-López, 2010.

As antocianinas apresentam muitas ligações duplas que são facilmente excitadas, expressando assim suas cores como resultado desta excitação da molécula em luz visível (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). As propriedades fotofísicas das antocianinas em solução são muito sensíveis ao pH. Em solução ácida, as antocianinas apresentam coloração vermelha, com o aumento deste pH a intensidade da cor diminui. Em solução alcalina, a cor azul aparece, porém se torna mais instável. A cinética dessas mudanças é um dos principais fatores para determinar a cor final de tais sistemas (SINOPOLI; CALOGERO; BARTOLOTTA, 2019).

Em meio aquoso como nos alimentos, as antocianinas sofrem transformações estruturais reversíveis com o pH, manifestadas na mudança de cor e, por isso, podem se apresentar em 4 formas estruturais diferentes em equilíbrio químico, dependendo do pH em meio aquoso (Figura 2). Em pH abaixo de 2, o cátion *flavylium* ( $AH^+$ ) (vermelho) predomina. Em pH 3 a 6, ocorre uma rápida hidratação do cátion *flavylium* em C2 para formar a pseudobase carbinol (B) (incolor), que pode sofrer abertura do anel a uma chalcona (C) (incolor – pouco amarela). Em condições ligeiramente ácidas a neutras, a desprotonação do cátion *flavylium* gera a base quinoidal (A) (azul) (RODRIGUEZ-AMAYA, 2018).

Figura 2: Transformações estruturais de antocianinas em relação ao pH do meio.



Fonte: Adaptado de Levi et al., 2004.

Além do pH, a cor da antocianina será expressa dependendo de fatores como a coexistência de compostos incolores (co-pigmentos, tipicamente flavonas e flavonóides), da temperatura de armazenamento, da estrutura química, da concentração de oxigênio, da presença de luz, solventes, enzimas, proteínas e íons metálicos. Outro fator é quando elas estão isoladas, tornando-se altamente instáveis e muito suscetíveis à degradação (RODRIGUEZ-AMAYA, 2018). Ainda, a fonte da qual é extraída, confere a cada tipo de

antocianina uma propriedade de matiz e estabilidade. Naturalmente a coloração das antocianinas é diretamente influenciada pela substituição dos grupos hidroxila e metoxila na molécula. A maior presença de grupos de metilação conferem, em geral, cor mais avermelhada e maior estabilidade. Na direção contrária, com o aumento das hidroxilações, tendem a tornar a coloração azulada (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2010).

Resumidamente, o meio ácido faz com que o cátion *flavilium* não seja desprotonado, preservando assim a estrutura. Em pH mais alto ocorre a desprotonação das antocianinas e com isso o oxigênio fica mais reativo ficando mais fácil de ocorrer associação com outra molécula, o que pode dar origem às antocianinas poliméricas (LIMA et al., 2006).

Além de conferirem cor, o principal emprego biológico atribuído às antocianinas é a atividade antioxidante, devido à sua capacidade de doar prótons a radicais livres altamente reativos. A atividade antioxidante das antocianinas é dada pela sua estrutura química: o número e a organização dos grupos fenila, a disponibilidade de grupos de doação de elétrons e de retirada de elétrons na estrutura do anel, o grau de conjugação estrutural e a sua carga positiva (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009). As antocianinas ocorrem para impedir a geração de mais radicais e proteger as células contra danos oxidativos, que é frequentemente associada ao envelhecimento e várias doenças causadas pelo estresse oxidativo (SUI et al., 2019).

O estresse oxidativo está ligado ao aumento do número de radicais livres ou à diminuição da concentração de antioxidantes. Ele mostra uma ruptura na estabilidade das moléculas pró-oxidantes e antioxidantes. Os pró-oxidantes/radicais livres contêm mais de um elétron desemparelhado, que é instável e muito reativo para reação com outras espécies. Em geral, as rotas metabólicas contínuas no sistema humano produzem esses radicais livres que atacam especialmente amidos, gorduras, proteínas e ácido nucléico (NEHA et al., 2019; SINOPOLI; CALOGER; BARTOLOTTA, 2019).

Estes radicais livres causam uma abundância de espécies reativas de Oxigênio (ROS) e danificam o tecido, resultando em várias doenças, incluindo doenças cardíacas, doenças do fígado, câncer, doenças neurodegenerativas e envelhecimento (KIM, 2015).

Os antioxidantes evitam doenças relacionadas ao estresse oxidativo, neutralizando o efeito deteriorador das ROS. Os antioxidantes apaziguam os radicais livres e desempenham um papel crucial na conservação das melhores funções celulares. Um grande número de antioxidantes naturais e sintéticos foi encontrado (NEHA et al, 2019).



Narayan e colaboradores (1999) descreveram que as antocianinas são um potente antioxidante comparado com outros antioxidantes clássicos como butilato hidroxí anisol, butilato hidroxí tolueno e alfa tocoferol (vitamina E). Este composto natural, quando adicionado a alimentos, além de conferir a coloração a eles, propicia a prevenção contra auto-oxidação e peroxidação de lipídeos em sistemas biológicos.

A utilização de antocianinas como corantes alimentares e antioxidantes naturais tem sido limitada pela sua baixa estabilidade e interação com outros compostos na matriz alimentar. Algumas aplicações comerciais de antocianinas incluem: doces, produtos de confeitaria, refrigerantes, refrescos, pós para refrescos, coberturas de bolos, gelatinas e geleias, devido à estabilidade sob temperaturas de refrigeração (MARKAKIS, 1982).

O extrato da casca da uva tem sido usado como corante por um longo tempo. Estudos buscam melhores fontes e aprimoram a eficiência e estabilidade da extração. Uma vez que a acilação melhora a estabilidade da cor e do pigmento, são procuradas fontes adequadas de antocianinas aciladas, como rabanetes, batatas vermelhas, repolho roxo, cenoura preta e batata-doce roxa (GIUSTI; WROLSTAD, 2003; RODRIGUEZ-AMAYA, 2018).

O teor e a composição de antocianinas em frutos são afetados por cultivar/variedade, maturidade, práticas de cultivo, área de cultivo, estação/clima, processamento e armazenamento, além da possibilidade da existência de misturas de antocianinas. Em geral, o total de antocianinas varia entre 20 mg a 2 g por cada 100 g de frutos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; RODRIGUEZ-AMAYA, 2018). Amarowicz e colaboradores (2009) pesquisaram a influência do processamento e armazenamento pós-colheita no teor de flavonóides (incluindo antocianinas), concluindo que o efeito de armazenamento e processamento no teor de polifenol é insignificante em comparação às diferentes variedades de plantas.

Os métodos de estabilização incluem adição de copigmentos, exclusão de O<sub>2</sub> e encapsulação (CAVALCANTI; SANTOS; MEIRELES, 2011). A encapsulação de antocianinas tem sido muito estudada para o desenvolvimento de corantes naturais com estabilidade, solubilidade, dispersibilidade e biodisponibilidade melhorada (RODRIGUEZ-AMAYA, 2018).

### **2.1.1 Encapsulação**

A maioria dos compostos naturais são biologicamente instáveis e de alta volatilidade frente às condições adversas do processamento e armazenamento de alimentos. O método de

encapsulação foi introduzido a fim de melhorar a estabilidade desses compostos e sua biodisponibilidade. A encapsulação reduz a reatividade dos compostos com o ambiente (água, luz e oxigênio) e diminui a evaporação ou a taxa de transferência para o ambiente exterior, a fim de proporcionar a proteção necessária contra a sua oxidação, fotólise ou interação com outros componentes de formulação do meio, e também a incorporação de agentes antimicrobianos e antioxidantes auxiliando na proteção de produtos alimentares contra o crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes (EL ASBAHANI, 2015; LIOLIOS, 2009).

A encapsulação é um processo de empacotamento em partículas e consiste no carregamento desses compostos em matrizes poliméricas, mantendo sua estabilidade química e promovendo a liberação em momento e em taxa particular de cada sistema. O material encapsulado é denominado de recheio ou núcleo, e o material que forma a partícula, de encapsulante, cobertura ou parede. Na indústria de alimentos, encontram-se aplicações no revestimento de compostos de sabor, pigmentos, acidulantes, nutrientes, enzimas, conservantes e vários outros aditivos. Essas partículas podem ser classificadas por tamanho em três categorias: macro, micro e nanopartículas (AZEREDO, 2005; NEDOVIC et al., 2011).

## 2.2 NANOPARTÍCULAS

O uso potencial da nanotecnologia tem crescido, ao longo da última década, com muitas aplicações prósperas em muitos setores, e seu rápido desenvolvimento transformou muitas áreas da ciência dos alimentos, especialmente aquelas envolvendo processamento, embalagem, armazenamento, transporte, funcionalidade e outros aspectos da segurança alimentar (BAZANA; CODEVILLA; MENEZES, 2019). As micro e nano estruturas têm recebido muita atenção sendo muito aplicadas como sistemas portadores de compostos bioativos. Estes compostos se beneficiam do procedimento de encapsulação, pois retarda e/ou evita o processo de degradação até o produto ser administrado no alvo desejado (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; RIVERA, 2015).

Segundo Casanova (2010) e seus colaboradores, as nanopartículas são termodinamicamente instáveis e possuem uma tendência natural de crescer e se agregar. Portanto, o maior desafio consiste no preparo de nanocompostos mais estáveis e monodispersos tanto em relação à forma quanto ao tamanho de suas partículas, que possam ser dispersos, manipulados, depositados sobre substratos, ou perder suas propriedades.

As nanopartículas poliméricas são sistemas carregadores de compostos ativos que apresentam diâmetro inferior a 1  $\mu\text{m}$  (1.000 nm). As nanocápsulas e as nanoesferas são incluídas no termo nanopartícula, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. As nanocápsulas são constituídas por um revestimento polimérico disposto ao redor de um núcleo aquoso ou oleoso, podendo o composto estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado as nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica, onde o composto ativo pode ficar retido ou adsorvido (SCHAFFAZICK et al., 2003; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Dentre as partículas poliméricas, destacam-se as nanocápsulas, pois possuem alta capacidade de encapsulamento de substâncias, principalmente as lipofílicas, sendo capazes de controlar a sua liberação, aumentar a estabilidade de armazenamento e de gerar respostas adequadas por períodos de tempo prolongado (SCHAFFAZICK et al., 2003; GUTERRES et al., 2007).

As nanocápsulas apresentam uma vantagem em relação a outros sistemas, que é a de conferir proteção do composto ativo que foi incorporado frente à degradação química, uma vez que esta substância ativa fica retida no interior de uma matriz sólida ou de um revestimento polimérico que também tem a função de controlar a liberação da substância ativa ao meio de dispersão (DINGLER et al., 1999).

### **2.2.1 Método de montagem LbL**

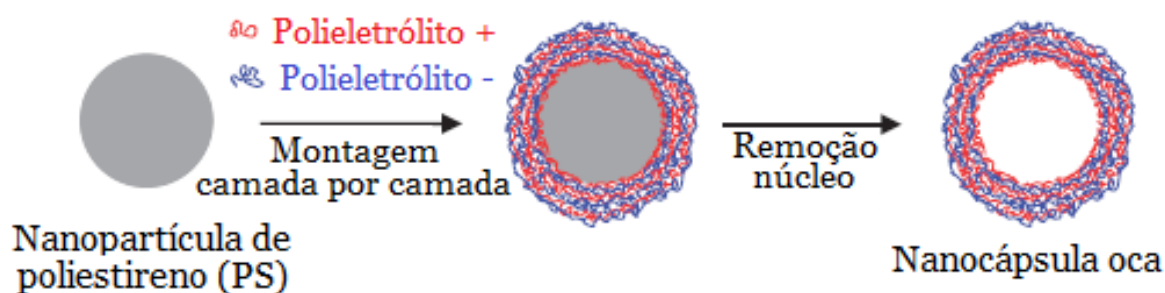
A técnica de montagem camada a camada (Layer-by-layer - LbL) foi introduzida pela primeira vez por Iler (1966), e depois revisada por Decher e Schmitt (1992). O método LbL inicialmente consistiu na deposição alternada de materiais carregados opostamente, principalmente polieletrólitos, sobre um substrato sólido plano macroscópico, carregado através de interações eletrostáticas. Além do uso desses substratos sólidos planos macroscópicos, outros tipos de substratos com várias naturezas, formas e tamanhos químicos são utilizados como modelos, incluindo partículas coloidais, lipossomas ou vesículas e interfaces fluidas (GUZMÁN, 2017). Esta técnica expandiu-se rapidamente e tornou-se um método primário para a preparação de diferentes sistemas micro e nanoestruturados com multicamadas (WANG; ANGELATOS; CARUSO, 2008).

A técnica mais simples para a fabricação de cápsulas pelo método LbL foi a introduzida por Sukhorukov e colaboradores (1998), que revestiram micropartículas com uma multicamada de dois polieletrólitos. Isto pode levar à formação de cápsulas de núcleo-cápsula

e cápsulas ocas. Neste último caso, a partícula atua como um modelo sacrificial que, após o tratamento químico adequado, é removido. A técnica clássica (Figura 3) baseia-se na deposição alternada dos polieletrólitos em torno da superfície das partículas molde, em meios aquosos com passos de limpeza e centrifugação intermediários para remover o excesso de polieletrólito não adsorvido, evitando assim a formação de complexos interpolieletrólíticos nos meios durante a adição dos polieletrólitos subsequentemente carregados de forma oposta. Uma vez adicionado o número desejado de camadas, as cápsulas ocas podem ser obtidas por meio de uma dissolução química do núcleo utilizando um agente apropriado que não afeta a integridade do invólucro, ao mesmo tempo que é capaz de dissolver o núcleo. Este tratamento depende da natureza química do molde, e alguns exemplos clássicos utilizados são: ácido clorídrico para partículas de resina de melamina-formaldeído, ácido fluorídrico para partículas de óxido de silício e tetrahidrofurano quando partículas de poliestireno são usados como molde (ITOH, 2004; YE et al., 2005; BAGARIA; WONG, 2011; GUZMÁN, 2017).

Após a remoção dos moldes, obtêm-se então cápsulas ocas, que podem ser aplicadas em vários campos, como por exemplo: transportar, proteger e liberar compostos bioativos ou ingredientes funcionais (fármacos, antimicrobianos, antioxidantes e aromatizantes) a um local de ação específico (LIU et al., 2012; RIVERA, 2015).

Figura 3: Preparação das nanocápsulas ocas.



Fonte: Adaptado de Itoh et al, 2004.

A elaboração de revestimento de polieletrólito em camada por camada é o resultado de um complexo equilíbrio de interações: polieletrólito - polieletrólito, polieletrólito - solvente e polieletrólito - superfície. Essas interações resultam da interação de diferentes aspectos, incluindo a qualidade do solvente, e fatores eletrostáticos e entrópicos (GUZMÁN, 2017).

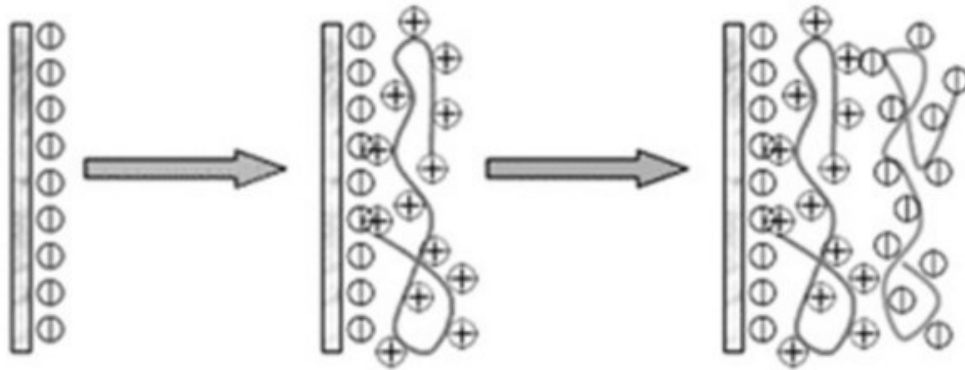
Sabe-se que, nos revestimentos formados por moléculas carregadas, polímero ou partículas, a força motriz para a montagem é a inversão de carga após a deposição de duas

camadas consecutivas. Isto significa que a deposição de uma camada de material carregado não ocorre até a neutralização da carga da superfície, mas continua até que certo grau de carga oposta apareça nesta superfície, levando a sob recompensação da carga das camadas anteriores (Figura 4) (GUZMÁN, 2011; GROSBERG; NGUYEN; SHKLOVSKII, 2002).

O grau de inversão de carga depende fortemente do par polieletrólítico específico, mas não apresenta qualquer dependência significativa das condições de montagem (força iônica, pH). O grau de sobrecompensação é máximo na superfície das camadas e decai exponencialmente em direção à região interna das multicamadas (SCHLENOFF; DUBAS, 2001).

A inclusão dos passos de lavagem e limpeza entre os repetitivos ciclos de adsorção das camadas permite a remoção do material que não é fortemente adsorvido sobre a multicamada, evitando assim a formação de complexos interpolieletrólíticos em solução que possam precipitar durante todos os ciclos de deposição. A importância dos passos de lavagem depende muito da natureza dos polieletrólitos montados: polieletrólitos fortes estão quase irreversivelmente ligados à película e não são afetados pelas lavagens, enquanto que os polieletrólitos fracos não estão fortemente ligados à estrutura e podem ser facilmente removidos da estrutura (HOOGVEEN et al., 1996; GUZMÁN et al., 2017).

Figura 4: Esquema da deposição de LBL de polieletrólitos.



Fonte: Adaptado de Guzmán et al. (2017).

Este método de automontagem tem atraído muita atenção, pois a permeabilidade da sua cobertura pode ser controlada por mudanças nas condições ambientais tais como temperatura, pH e presença de solventes orgânicos. Estas propriedades permitem, assim, a encapsulação eficiente de substâncias em seu interior, bem como a liberação controlada da substância encapsulada (ITOH, 2004).

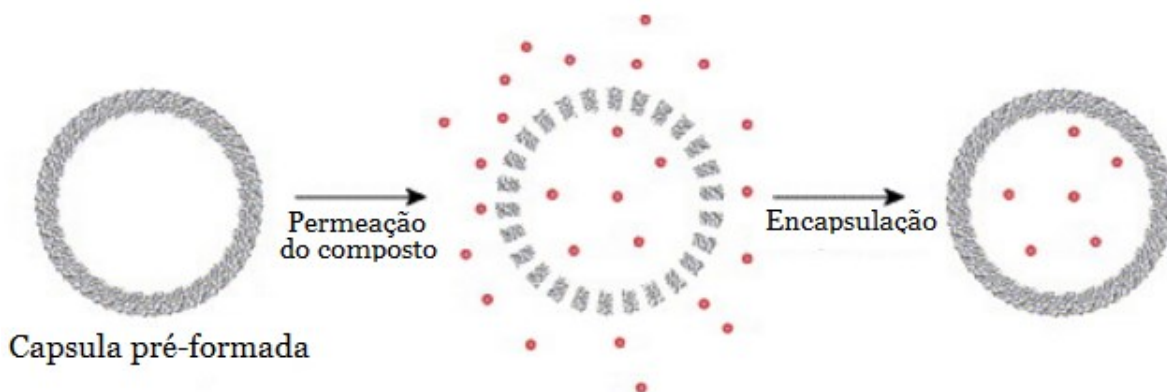
Estas nanocápsulas de multicamadas possuem aplicações promissoras na liberação de compostos bioativos nas indústrias farmacêuticas e alimentares. Contudo, para que estas aplicações sejam possíveis, a biofuncionalidade, o uso de materiais não tóxicos e que sejam biopolímeros são as principais condições a serem atendidas, para então serem chamadas de cápsulas biogênicas (PINHEIRO et al, 2015; RIVERA et al, 2015).

Cápsulas biogênicas são cápsulas ocas de um tipo de estrutura especial de polieletrólito feita de materiais naturais puros, tais como lipídios, proteínas, enzimas e polímeros naturais. As modificações de revestimento e as moléculas utilizadas podem alcançar significativamente a funcionalidade destas cápsulas. Devido aos componentes biologicamente “amigáveis” e à biocompatibilidade bem definida, permite-se então que as cápsulas biogênicas tenham um grande potencial para aplicações em biomedicina, catálise e micro e nanodispositivos (XUAN et al., 2017).

Os biopolímeros e polieletrólitos naturais com cargas opostas tais como quitosana (QT) e alginato (AL), têm sido muito utilizados na formação destas nanocápsulas. Recentemente, os materiais baseados em QT ou ALG têm recebido grande interesse de pesquisadores por causa de suas características biologicamente “amigáveis” e uma fácil pós-modificação (YANG et al., 2007; XUAN et al., 2017)

Algumas técnicas têm sido propostas para introduzir os compostos bioativos dentro das nanocápsulas (JOHNSTON et al., 2006) Em geral, o composto bioativo pode ser carregado durante a preparação das cápsulas, por adsorção do mesmo à superfície de uma partícula que pode ser subsequentemente revestida, utilizando a técnica LbL (SHU et al., 2010) ou após a formação das cápsulas, por difusão do composto bioativo a partir do meio envolvente em que as cápsulas estão dispersas (Figura 5) (YE et al., 2005).

Figura 5: Encapsulação por carregamento de cápsulas pré-formadas.



Fonte: Adaptado de Johnston et al., 2006.

Na técnica de difusão, quando o revestimento da cápsula de polieletrólito é montado a partir de materiais que respondem ao sal ou pH, os poros dentro do revestimento podem ser abertos, permitindo então, que o composto bioativo se difunda nas cápsulas. Esta técnica permite o carregamento de uma gama de materiais desde que o tamanho / peso molecular da molécula difusora permita a sua permeação através dos poros da cápsula (JOHNSTON et al., 2006).

A liberação prolongada do composto bioativo, ou seja, lentamente durante um determinado período, pode ser feita por difusão lenta destas moléculas através de uma parede de cápsula intacta, mas cada vez mais permeável, ou por liberação gradual das moléculas através de uma parede da cápsula que se degrada lentamente. Estímulos ambientais como o pH e a força iônica podem ser usados para desencadear as mudanças na parede necessárias para a liberação (JOHNSTON et al., 2006).

### **2.2.2 Quitosana**

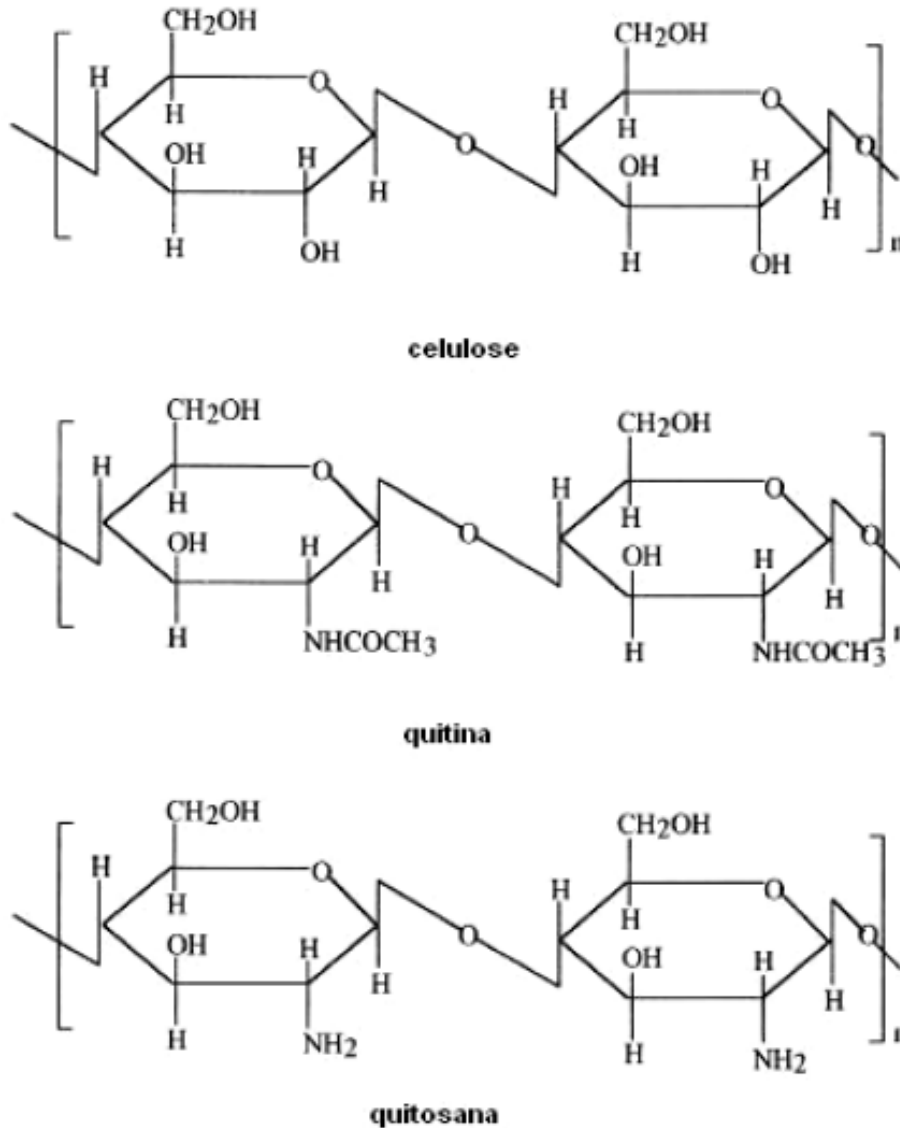
A quitina é um polissacarídeo natural identificado pela primeira vez em 1884. Este biopolímero é sintetizado por um número enorme de organismos vivos, e considerando a quantidade de quitina produzida no mundo, é o polímero mais abundante após a celulose. A quitina ocorre na natureza como microfibrilas cristalinas ordenadas, formando componentes estruturais no exoesqueleto de crustáceos, como camarões, lagostas e caranguejos ou nas paredes celulares de fungos e leveduras. A quantidade de quitina encontrada nesses animais varia não somente no tipo de animal, mas também nas partes em que se encontram (ILLUM et al, 2001; RINAUDO, 2006).

Esse polissacarídeo é separado de outros componentes da carapaça por um processo químico que envolve as etapas de desmineralização e desproteínização das carapaças com soluções diluídas de HCl e NaOH, seguida de descoloração. A quitina obtida, o biopolímero contendo grupos acetil ( $\text{NHCOCH}_3$ ), é desacetilada com solução concentrada de NaOH, produzindo assim, a quitosana (RINAUDO, 2006; AZEVEDO et al., 2007)

A quitosana é um biopolímero do tipo polissacarídeo catiônico, possui uma estrutura molecular quimicamente similar à fibra vegetal de celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais. As estruturas de celulose, quitina e quitosana são mostradas na Figura 6, comparando assim as estruturas moleculares da celulose e da quitosana, onde os grupos hidroxila (OH) estão dispostos na estrutura geral do carboidrato para a celulose e grupos amino ( $\text{NH}_2$ ) para a quitosana. É solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero

catiônico, com a protonação (adição de prótons) do grupo amino ( $\text{NH}_3^+$ ), que confere propriedades especiais diferenciadas em relação às fibras vegetais (AZEVEDO et al., 2007).

Figura 6: Estruturas moleculares da celulose, quitina e quitosana.



Fonte: Adaptado de Azevedo et al, 2007.

Propriedades tais como, biodegradabilidade, biocompatibilidade, bioatividade, atoxicidade, bioadesividade, propriedades de absorção e atividade antimicrobiana e antifúngica, têm contribuído para a ampla divulgação e investigação da quitosana como um biomaterial, tornando-o assim um dos biopolímeros mais populares para o desenvolvimento de sistemas de administração de compostos bioativos para uma vasta gama de aplicações (MOURA et al., 2006; LUO; WANG, 2014).

Dentre as diferentes aplicações da quitosana, destacam-se a sua capacidade de inibir o crescimento de alguns fungos, sendo eficaz na inibição da germinação de esporos e do seu



crescimento radial. Segundo Goy et al. (2009), muitos estudos utilizando a quitosana como agente antifúngico têm sido realizados, na maioria deles o biopolímero é aplicado contra leveduras e fungos associados a alimentos e deterioração de plantas. Para esses, a quitosana é responsável pela ativação de vários processos biológicos no tecido vegetal onde quitinases são induzidas sobre o parasita.

O mecanismo de ação da quitosana contra fungos envolve a interação do polissacarídeo com a parede celular do microrganismo interferindo diretamente em seu crescimento. Além disso, estudos relatam que oligômeros de quitosana se difundem dentro das hifas fúngicas interferindo na atividade das enzimas responsáveis pelo crescimento do fungo. Sendo assim, a intensidade de ação de degradação da parede celular dos fungos é dependente do pH do meio, do grau de desacetilação da quitosana e da concentração desse polímero (GOY et al., 2009).

Além da capacidade antifúngica, a quitosana também é conhecida pela sua atividade antibacteriana, usando como mecanismo de ação a interação entre moléculas de quitosana carregadas positivamente e membranas de células microbianas carregadas negativamente. Esta interação eletrostática resulta numa dupla perturbação: i) promovendo alterações nas propriedades da permeabilidade da parede da membrana, provocando assim desequilíbrios osmóticos internos e conseqüentemente inibindo o crescimento de microrganismos, e ii) pela hidrólise dos peptidoglicanos na parede do microrganismo, levando ao vazamento de eletrólitos intracelulares (HWANG, 2004; GOY et al., 2009).

Em alguns estudos, a quitosana tem sido relatada como inibitória para o crescimento de algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (ZHENG; ZHU, 2003; PINHEIRO et al, 2015).

### **2.2.3 Alginato**

O alginato é um biopolímero aniônico de ocorrência natural, biocompatível, não tóxico, biodegradável e geralmente extraído de algas marrons (*Phaeophyceae*), por tratamento com soluções alcalinas aquosas (NaOH). O extrato é filtrado e adicionado cloreto de sódio ou de cálcio no filtrado para precipitar o alginato. Após purificação e conversão adicional, é produzido um pó de alginato de sódio solúvel em água (DRAGET; TAYLOR, 2001; LEE; MOONEY, 2012).

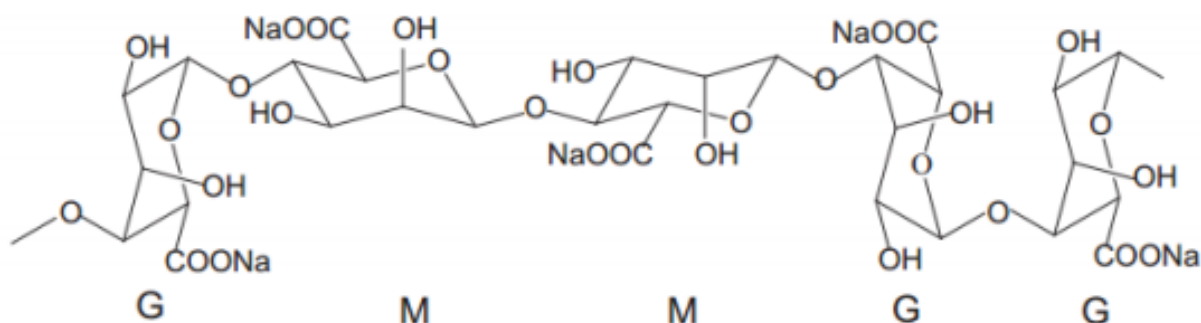
A biossíntese bacteriana pode fornecer um alginato com estruturas químicas e propriedades físicas mais definidas do que as que as obtidas a partir de algas marinhas. O alginato bacteriano pode ser produzido a partir de *Azotobacter* e *Pseudomonas*. O caminho da

biossíntese de alginato é geralmente dividido em (i) síntese de substrato precursor, (ii) polimerização e transferência de membrana citoplasmática, (iii) transferência e modificação periplasmática, e (iv) exportação através da membrana externa. O progresso recente na regulação da biossíntese de alginato em bactérias e a relativa facilidade de modificação desses microrganismos permitem a produção de alginato com características ideais e amplas aplicações (REMMINGHORST; REHM, 2006; LEE; MOONEY, 2012).

O alginato de sódio (Figura 7) pode ser caracterizado como um copolímero, constituído por dois tipos de ácido poliurônico, o ácido  $\beta$ -D-manurônico (bloco M) e ácido  $\alpha$ -L-gulurônico (bloco G) dispostas num padrão irregular em blocos de proporções variáveis de blocos GG, MG e MM e unidos por ligações (1-4)-glicosídicas, de composição e sequência variada (MARTINS et al., 2007; YANG; XIE; HE, 2011).

Este copolímero hidrofílico é insolúvel em etanol, em soluções hidroalcoólicas contendo mais de 30% (v/v) de etanol e em outros solventes orgânicos. Sabe-se que a solubilidade do alginato é influenciada pelo pH do meio. Os valores de pKa (constante de dissociação do ácido) das unidades ácido manurônico (M) e ácido gulurônico (G) do alginato é de 3,38 e 3,65, respectivamente. Quando o pH é inferior ao pKa do alginato, este sofre precipitação levando à formação do ácido algínico, o qual é insolúvel em água. Quando o valor do pH se encontra acima desse valor, o alginato torna-se carregado negativamente. Ele é quimicamente estável em valores de pH entre 5,0 e 10,0, sendo que valores muito ácidos causam sua descarboxilação. A viscosidade do polímero varia de acordo com os valores de pH, sendo que, a viscosidade aumenta à medida que o pH diminui. A massa molar do alginato comercial gira em torno de 32.000 e 400.000 g/mol (LEE; MOONEY, 2012).

Figura 7: Estrutura química do alginato de sódio. Estrutura química de bloco G e bloco M em alginato.



Fonte: Adaptado de Yang, Xie e He, 2011.

Uma das excelentes propriedades do alginato é sua habilidade em formar hidrogéis irreversíveis e estáveis ao calor quando processados com cátions divalentes. Diante dessas propriedades, o alginato de sódio tem sido usado em diversas áreas tecnológicas como indústria alimentícia, farmacêutica e agrícola, e para a formação de materiais híbridos combinado com polímeros catiônicos, tal como a quitosana, por meio de polimerização ou interação iônica (REIS et al, 2006).

#### **2.2.4 Caracterização das nanopartículas**

A caracterização das nanopartículas se torna necessárias para controlar a estabilidade dessas partículas, avaliando o comportamento em relação ao seu tamanho, potencial zeta, índice de polidispersão, eficiência de encapsulação, liberação do composto e comportamento referente à estabilidade térmica. A tendência à agregação e sedimentação das nanopartículas, resultando assim na formação de precipitados e problemas de instabilidade química do polímero ou das demais matérias-primas, são algumas das principais disfunções que podem acontecer durante o armazenamento destes sistemas, e pode ser monitorada pela determinação de mudanças na distribuição de tamanho de partículas (GUTERRES et al., 1995; SCHAFFAZICK et al., 2003).

O espalhamento de luz é um método eficaz para caracterização estrutural de polímeros e nanopartículas em solução, pois a intensidade e a distribuição angular da luz espalhada dependem do tamanho e da forma das partículas que provocam o espalhamento em solução. No espalhamento de luz dinâmico, medem-se as flutuações da intensidade do espalhamento em função do tempo, acessando o movimento Browniano das moléculas e relacionando-o ao tamanho de partículas. (WRIEDT, 2012).

Em geral, as nanopartículas obtidas através de diferentes métodos, após a preparação, apresentam uma distribuição unimodal, com um baixo índice de polidispersão. Os métodos usuais para a determinação da distribuição de tamanho das nanopartículas consistem em espectroscopia de correlação de fótons e MEV ou MET (SCHAFFAZICK et al., 2003).

No caso das nanocápsulas, um fator importante, que influencia o diâmetro das partículas, é a natureza do composto utilizado como núcleo. Os resultados são atribuídos às diferenças de viscosidade, hidrofobicidade ou tensão interfacial das substâncias empregadas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

O potencial zeta avalia a estabilidade das dispersões coloidais em suspensão seguindo a regra de que os valores de potencial zeta maiores do que  $\pm 30$  mV indicam partículas

altamente carregadas (negativa ou positivamente), proporcionando dispersões estáveis devido à repulsão eletrostática imposta pelas cargas (MEHNERT; MÄDER, 2012).

A eficiência de encapsulação depende de alguns fatores determinantes como: tipo de revestimento utilizado, a interação deste com o composto ativo, sua natureza química e polaridade. Desta forma, a eficiência de encapsulação em compostos hidrofílicos pode atingir valores máximos de 100 %, e em casos de compostos lipofílicos, esses resultados podem ser superiores a 70 %. As técnicas utilizadas para determinar a eficiência de encapsulação podem ser técnicas analíticas de separação, identificação e quantificação como cromatografia de alta eficiência (CLAE) ou técnicas de identificação e quantificação por espectroscopia do UV-visível (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2011).

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) tem sido muito empregada na obtenção de informações relativas à forma e ao tamanho das nanopartículas, e oferecem dados sobre a morfologia da amostra como diferença estrutural, propriedades da superfície e porosidade. O TEM pode permitir também a diferenciação entre nanocápsulas e nanoesferas, possibilitando, inclusive, a determinação da espessura da parede das nanocápsulas. A técnica de criofratura também tem sido empregada para auxiliar a análise morfológica destes sistemas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

O termo análise térmica abrange um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física da substância é medida em função da temperatura, enquanto a substância é submetida a um sistema controlado de aquecimento ou de resfriamento. A calorimetria exploratória diferencial é uma técnica de análise térmica na qual se mede a diferença de energia fornecida à amostra e a um material de referência, em função da temperatura, enquanto a substância e o material são submetidos a uma variação controlada de temperatura (BROWN, 1998).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

A quitosana (QT) de alto peso molecular e o alginato de sódio (AL) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, Brasil. As nanopartículas de poliestireno foram obtidas na Polysciences, Inc. (Polybead<sup>®</sup> poliestireno de 0,10  $\mu\text{m}$ , Warrington, PA, EUA). O ácido acético utilizado da Vetec, Brasil. Antocianina (AC) comercial (AC-2-12R-WS-P; Christian Hansen, Brasil). Os reagentes que foram utilizados na execução deste trabalho foram todos de grau analítico.

#### 3.2 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

##### 3.2.1 LbL em Nanopartículas de Poliestireno

Os polissacarídeos iônicos foram montados por técnica de deposição de LbL sobre as nanopartículas de poliestireno (PS) carregadas negativamente. Esta técnica de acumulação de multicamadas foi realizada de acordo com Ye e seus colaboradores (2005), com algumas adaptações. A primeira camada foi depositada, gota a gota, 1 mL de solução de quitosana (1 mg/mL, pH 3) contendo 0,3% em volume de ácido acético em 1 mL da suspensão de partículas de poliestireno (0,5% v/v) sob agitação magnética suave e incubado em repouso durante 15 min à temperatura ambiente. O polissacárido em excesso foi removido por dois ciclos repetidos de centrifugação (11.000 rpm, 20 min)/lavagem/redispersão em água/sonicação (40 KHz, 60 min). O método de centrifugação é a técnica mais utilizada para separar os polieletrólitos adsorvidos dos polieletrólitos livres, juntamente com os passos de lavagem após cada deposição também foram realizados para minimizar a ocorrência de agregados de polieletrólitos formados em solução ao invés de se formarem no molde de PS, enquanto que o passo de sonicação foi implementado para dispersar as nanocápsulas em solução e minimizar a sua agregação. Este procedimento foi repetido, desta vez com solução de alginato de sódio (1 mg/mL, pH 7) como polieletrólito.

##### 3.2.2 Retirada do núcleo de PS

A fim de remover o núcleo de partículas de poliestireno (PS), as nanocápsulas de quitosana/alginato foram tratadas com THF durante 12 h, e em seguida a suspensão foi

centrifugada a 12.000 rpm durante 15 min para remover o solvente. Este processo de dissolução foi repetido duas vezes para assegurar a remoção completa do núcleo de PS, e as nanocápsulas resultantes foram lavadas três vezes com água, centrifugadas e redispersas em água destilada.

### **3.2.3 Carregamento do núcleo com o composto bioativo**

Foi utilizado o método de difusão de antocianinas no interior das cápsulas após a sua formação, de acordo com Ye e seus colaboradores (2005). Foi adicionada 1,0 mL de antocianinas (AC) diluídas em pH 3 e outra solução em pH 7, às nanocápsulas de quitosana/alginato e ficaram durante um período de 2 h de incubação em repouso, para o composto difundir no interior da cápsula.

As suspensões resultantes foram armazenadas em frasco âmbar em uma temperatura de  $6 \pm 2$  °C simulando processo de refrigeração.

### **3.3 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DA PARTÍCULA (Z-AVE), ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (IP) E POTENCIAL ZETA ( $\zeta$ )**

O Z-ave, IP e  $\zeta$  de todas as fases das nanopartículas foram obtidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS), utilizando um equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) realizadas a 25 °C a um ângulo de 173°. Para as medições, as amostras foram colocadas em célula de eletroforese.

### **3.4 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO**

A eficiência de encapsulação (EE) foi definida pela diferença entre o teor de composto ativo livre (não encapsulado) e o teor aprisionado dentro da matriz polimérica (encapsulado), de acordo com a metodologia descrita por de Carvalho et al. (2013). A concentração de antocianinas livre foi determinada utilizando o método de separação de membrana com Ultra Amicon Filtros Centrífugos de membrana 30k Ultracel (Millipore, Irlanda). As amostras foram centrifugadas a 6000 rpm durante 30 min. A antocianina não encapsulada permeará a membrana filtrante, e o composto encapsulado ficará retido na unidade de filtro. O composto não encapsulado (sobrenadante) obtido no filtrado foi analisado e quantificado por espectrofotômetro Hitachi, L-1800 (Tóquio, Japão), em um comprimento de onda de 530 nm.

A eficiência de encapsulação da antocianina (AC) foi expressa em porcentagem, como apresentado na Equação 1.

$$EE\% = \frac{(Teor\ total\ de\ AC - Teor\ inicial\ de\ AC)}{Teor\ inicial\ de\ AC} \times 100 \quad (1)$$

### 3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A morfologia das nanopartículas por MET foi avaliada utilizando um microscópio JEOL modelo JEM -1011 (Tóquio, Japão) operando a 70 kV . As soluções contendo as nanopartículas foram previamente diluídas (1:1) em água ultrapura Milli-Q®, e cerca de 5 µL de cada amostra foi depositado sobre grids de cobre revestidos com carbono (200 mesh). Após secagem à temperatura ambiente, as grades foram observadas no microscópio eletrônico de transmissão.

### 3.6 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

Para confirmar a remoção do núcleo de poliestireno (PS) e a deposição dos polieletrólitos no molde de PS, foram realizadas as análises de espectroscopia em infravermelho nas amostras de nanopartículas carregadas (antocianinas) e nanopartículas controle (vazias), em quitosana, alginato e poliestireno, com um espectrômetro Frontier FT-IR/NIR (Perkin Elmer, Boston, MA, EUA) na região de 650-4000 cm<sup>-1</sup> com resolução de 1 cm<sup>-1</sup>. Todas as leituras foram realizadas à temperatura ambiente.

### 3.7 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE

A estabilidade físico-química das nanopartículas encapsuladas e nanopartículas vazias foram realizadas nos tempos 1, 30 e 60 dias quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta (conforme descrito no item 2.3). As nanopartículas foram armazenadas a uma temperatura 6 ± 2 °C ao abrigo de luz (em vidros âmbar) durante todo o armazenamento.

## 3.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

### 3.8.1 Método DPPH

A atividade antioxidante (AA) foi determinada pela capacidade dos compostos presentes nas amostras em inibir o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) de acordo com o método descrito por Brand-Williams et al. (1998), seguindo as modificações de Mensor et al. (2001). Resumidamente, a solução de DPPH ( $0,6 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) foi diluída em etanol para se obter um valor de absorvância de 0,500 a 600 em 515 nm. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de amostra em 2,9 mL de solução de DPPH ajustada e após 30 min a absorvância foi determinada a 115 nm em espectrofotômetro Hitachi, L-1800 (Tóquio, Japão). Trolox foi usado como padrão. A análise foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos em TEAC  $\mu\text{mol mL}^{-1}$  (capacidade antioxidante equivalente a  $\mu\text{mol Trolox mL}^{-1}$ ) e média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.8.2 Método ABTS

Outro método para a determinação da atividade antioxidante (AA) é o ensaio usando o radical (ABTS<sup>•+</sup> [2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)]) que foi realizado de acordo com Re et al. (1999) com modificações. Resumidamente, 10 mL de radical ABTS ( $7 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foi misturado com 10 mL de persulfato de potássio ( $2,45 \text{ mmol L}^{-1}$ ), a solução foi homogeneizada e armazenada em frasco âmbar ao abrigo da luz por no mínimo 16 h. A solução de ABTS foi diluída com etanol para se obter um valor de absorvância de ( $0,700 \pm 0,02$ ) a 734 nm. Em seguida, foram adicionados 60  $\mu\text{L}$  de extrato de soluções de amostra em 2,84 mL de solução ABTS ajustada e após 6 min a absorvância em 734 nm foi determinada com um espectrofotômetro Hitachi, L-1800 (Tóquio, Japão). Trolox foi usado como padrão. A análise foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos em TEAC  $\mu\text{mol mL}^{-1}$  (capacidade antioxidante equivalente a  $\mu\text{mol Trolox mL}^{-1}$ ) e média  $\pm$  desvio padrão.

## 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram expressos com médias e desvio padrão das determinações realizadas em triplicata. Os resultados foram submetidos à análise de variância e a



comparação de médias foi realizada pelo Teste de Tukey com nível de significância de 5%, utilizando-se o programa STATISTICA 7.0.

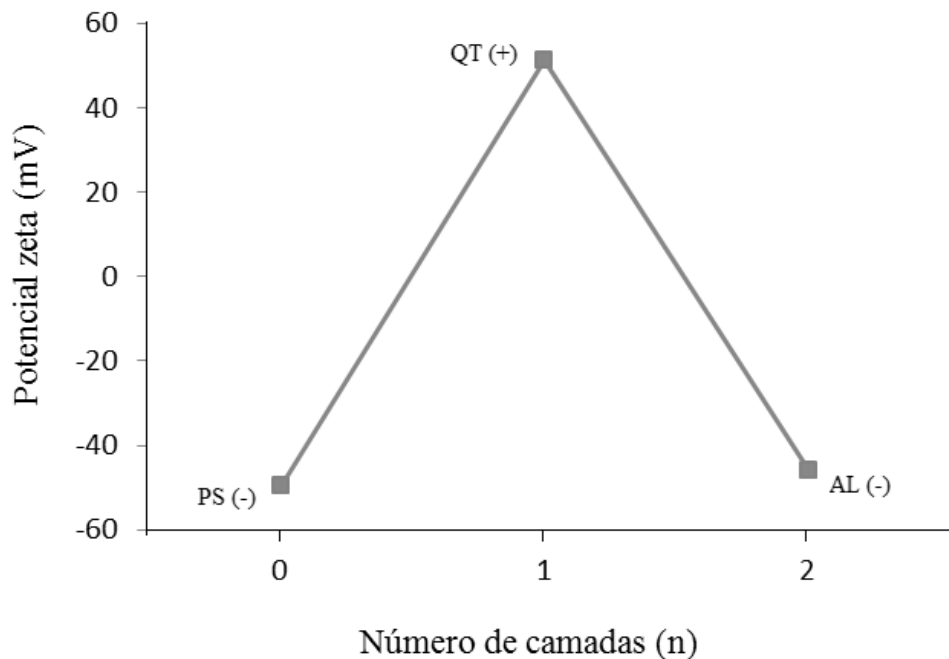


## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DA PARTÍCULA (Z-AVE), ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (IP) E POTENCIAL ZETA ( $\zeta$ ) CAMADA POR CAMADA (LbL)

A deposição de camada por camada é uma técnica que possui interações eletrostáticas, portanto tem que ser de conhecimento a carga dos polieletrólitos para que haja interação bem sucedida entre a superfície das nanopartículas de PS (com carga negativa conhecida). Sendo assim, para confirmar as cargas opostas das soluções de QT e AL, foi determinado o potencial zeta de cada camada. Observou-se que as soluções QT (pH = 3) e AL (pH = 7) apresentam cargas superficiais de  $+59,03 \pm 2,32$  mV e  $-48,08 \pm 2,94$  mV, respectivamente, confirmando que estes biopolímeros são polieletrólitos e podem interagir por forças eletrostáticas (RIVERA et al, 2015).

Figura 8: Valores do potencial zeta em função do número de camadas depositadas (n).



PS: Nanopartícula de poliestireno (molde). QT: Nanopartícula com quitosana (PS-QT). AL: Nanopartícula com quitosana/alginato (PS-QT-AL). Fonte: Autor.

A Figura 8 mostra o potencial zeta ( $\zeta$ ) do processo de deposição alternada de uma camada de quitosana (QT) e uma camada de alginato (AL), respectivamente, nas nanopartículas de poliestireno (PS).

Os moldes de nanopartículas de PS possuem uma carga negativa, devido à presença de grupos ésteres de sulfato (PINHEIRO et al., 2015), cuja superfície se torna um valor positivo, devido à deposição da primeira camada do polieletrólito catiônico (QT). Subsequentemente, quando o polieletrólito aniônico (AL) foi adicionado à solução, o valor de potencial zeta torna-se negativo novamente. Esta troca alternada é um indicativo da automontagem bem sucedida destes biopolímeros QT e AL em moldes sacrificiais de PS. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores utilizando quitosana (QT) e alginato (AL), com moldes de poliestireno (PS) (RIEVRA et al., 2015) e moldes de  $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  (LIU et al., 2012).

O potencial zeta ( $\zeta$ ) também é uma forma de avaliar a estabilidade das suspensões nanoparticuladas. Seguindo a regra de que os valores de potencial zeta maiores do que  $\pm 30$  mV indicam partículas altamente carregadas (negativamente ou positivamente), proporcionando dispersões fisicamente estáveis devido à repulsão eletrostática imposta pelas cargas e impedem a ocorrência de fenômenos de agregação entre eles (HATANAKA et al., 2010; LIU et al., 2012).

Portanto, de acordo com a Tabela 1, os valores de potencial zeta ( $\zeta$ ) indicam que as nanopartículas apresentaram uma boa estabilidade, confirmando que o método utilizado de automontagem garantiu estabilidade às mesmas, como também houve uma interposição das camadas durante a técnica LbL.

Tabela 1: Caracterização das etapas de formação das nanopartículas de multicamadas em molde de PS.

<b>Amostra</b>	<b><math>\zeta</math> (mV)</b>	<b>IP</b>	<b>Z-ave (nm)</b>
<b>NPT-PS</b>	$-48,0 \pm 1,4$	$0,075 \pm 0,021$	$102,7 \pm 1,2$
<b>NPT-QT</b>	$53,1 \pm 1,1$	$0,200 \pm 0,008$	$182,0 \pm 1,0$
<b>NPT-QT/AL</b>	$-44,4 \pm 1,5$	$0,184 \pm 0,008$	$221,9 \pm 1,6$

NPT-PS: Nanopartícula de poliestireno (PS). NPT-QT: Nanopartícula com quitosana (PS-QT). NPT-QT/AL: Nanopartícula com quitosana/alginato (PS-QT-AL). Z-ave: diâmetro médio de partícula. IP: índice de polidispersão.  $\zeta$ : potencial zeta. -: medidas não realizadas. Fonte: Autor.

No tamanho médio das partículas (Z-ave) foi observado, em geral, um crescimento particulado, das nanopartículas após o processo de deposição camada por camada, o que pode ser atribuído à adsorção dos polieletrólitos ao redor dos moldes de poliestireno (YE et al., 2005). Estes resultados indicam que houve um crescimento gradual de multicamadas QT/AL em torno do poliestireno, apontando para a formação de nanopartículas multicamadas (PS-QT-AL) (RIVERA et al, 2015).

O índice de polidispersão (IP) é um parâmetro utilizado para verificar a homogeneidade na distribuição do tamanho das partículas. Os valores de IP entre 0 e 0,300 indicam uma distribuição de tamanho relativamente homogêneo, e em valores menores que 0,200 garantem estabilidade da dispersão coloidal, sem formação de aglomerados ou precipitados (CHU;WANG;YU, 1991). No presente estudo os resultados de IP (tabela 1) apresentaram valores em até  $0,200 \pm 0,008$ , o que indica uma distribuição homogênea em todas as fases de formação de partícula.

#### 4.2 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DA PARTÍCULA (Z-AVE), ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (IP), POTENCIAL ZETA ( $\zeta$ ), EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA) DAS NANOPARTÍCULAS OCAS E CARREGADAS

Os resultados da caracterização das nanopartículas sem o núcleo de PS (ocas) e encapsuladas com antocianinas estão descritos na Tabela 2. Os valores de potencial zeta ( $\zeta$ ) indicaram que as nanopartículas apresentaram uma boa estabilidade, mesmo quando o núcleo de PS foi removido e logo após a adição de um composto bioativo para o seu interior (antocianinas). Esta carga final negativa foi atribuída aos grupos carboxílicos do alginato (AL), indicando que a última camada de AL foi preservada mesmo com o processo de remoção do núcleo (RIVERA et al., 2015). Após a remoção do PS, foi observada uma diminuição no valor absoluto do potencial zeta, resultado já relatado, devido à remoção do núcleo de PS por incubação com THF (RIVERA et al., 2015). Isso pode ser explicado pelo efeito deste solvente que, na remoção do núcleo, poderia ter danificado algumas das nanopartículas, causando uma diminuição na sua carga superficial (YE et al., 2005).

Tabela 2: Caracterização das nanopartículas vazias e carregadas com antocianinas.

<b>Amostra</b>	<b><math>\zeta</math> (mV)</b>	<b>IP</b>	<b>Z-ave (nm)</b>	<b>EE (%)</b>
<b>NPT-Vazia</b>	- 34,4 $\pm$ 1,4	0,279 $\pm$ 0,036	394,4 $\pm$ 12,0	-
<b>NPT-A3</b>	- 33,0 $\pm$ 1,0	0,796 $\pm$ 0,110	763,8 $\pm$ 57,9	43,92 $\pm$ 3,64
<b>NPT-A7</b>	- 31,7 $\pm$ 0,1	0,294 $\pm$ 0,023	449,0 $\pm$ 7,2	37,40 $\pm$ 2,61

NPT-Vazia: nanopartícula sem núcleo (QT-AL). NPT-A3: nanopartícula carregada com antocianina pH 3 (QT-AL-AC). NPT-A7: nanopartícula carregada com antocianina pH 7 (QT-AL-AC). Z-ave: diâmetro médio de partícula. IP: índice de polidispersão.  $\zeta$ : potencial zeta. EE: eficiência de encapsulação, -: medidas não realizadas. Fonte: Autor

O tamanho médio das partículas ( $Z$ -ave) apresentou um grande aumento, comparando com as nanopartículas de multicamadas com molde de PS ( $221,9 \pm 1,6$ ). Após a remoção completa do núcleo, a parede da nanocápsula (nanopartícula oca) inchou novamente até atingir o estado de equilíbrio, aumentando, portanto seu tamanho médio. Este comportamento pós-inchaço deve ser resultante da pressão osmótica de dentro e fora das partículas (LIU et al., 2012). O aumento do tamanho nas nanopartículas carregadas com antocianinas pode ser explicado pelo fato de que as antocianinas são moléculas grandes e mais complexas, o que pode explicar o crescimento particulado.

Como já mencionado acima, os valores de IP entre 0 e 0,300 indicam uma distribuição de tamanho relativamente homogêneo, sendo assim, como apresentado na Tabela 2, os resultados para nanopartículas ocas (vazias) e nanopartículas encapsuladas com antocianinas em pH 7 apresentaram valores dentro do intervalo; exceto para as partículas encapsuladas com antocianinas em pH 3, indicando uma distribuição heterogênea (CHU;WANG;YU, 1991). Isto pode ser explicado pelo fato de que a quitosana (QT) é solúvel em pH baixo, podendo assim ter dissolvido o biopolímero e causando fragmentação destas partículas.

A eficiência de encapsulação (EE) é um parâmetro importante para avaliar a capacidade da cápsula em reter o composto ativo. Além disso, sabe-se que o número de camadas depositadas e o composto ativo encapsulado têm influência na EE das nanopartículas de multicamadas (RIVERA et al, 2015).

Os resultados obtidos de EE pelo método de difusão das antocianinas no interior das nanopartículas ocas após sua formação (Tabela 2) demonstraram uma boa eficiência, quando comparado ao estudo de Pinheiro e colaboradores (2015). Estes autores encapsularam pelo mesmo método, a poli-L-lisina (PLL) em nanopartículas de multicamadas já formadas, e obtiveram valores menores ( $26,01 \pm 5,5\%$ ), mostrando que a encapsulação de antocianinas em nanopartículas de QT/AL apresentou uma eficiência maior que o esperado. Mas estes mesmos autores testaram outro método de encapsulação, a adsorção de PLL nas nanopartículas de poliestireno que foram subsequentemente revestidas com multicamadas, seguindo com a remoção do PS. Este segundo método mostrou uma eficiência de encapsulação de  $45,1 \pm 1,5\%$ , indicando que este método foi mais eficiente do que o adotado neste presente estudo.

Foram realizados dois ensaios de antocianinas, em uma amostra de nanopartículas vazias (ocas) foram adsorvidos antocianinas em pH 7 (A7) e em outra amostra antocianinas em pH 3 (A3). De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2, podemos observar que a amostra NPT-A3 obteve um índice de polidispersão muito alto, indicando que as partículas não tiveram homogeneidade no seu tamanho de partícula, que, no entanto apresentaram

tamanho médio muito maior do que a amostra NPT-A7. Isto pode ser atribuído ao fato de que em pH 3 as moléculas de antocianinas podem ter ancorado também na superfície da molécula, provocando agregação e aumento de tamanho.

Sendo assim, para a continuidade do estudo foi adotado que a antocianina utilizada para encapsular as nanopartículas de quitosana/alginato será em pH 7, e ao longo do trabalho será chamada de NPT-AC.

As nanopartículas carregadas com antocianinas foram avaliadas quanto a sua atividade antioxidante e os valores foram expressos em porcentagem de inibição do radical DPPH e ABTS.

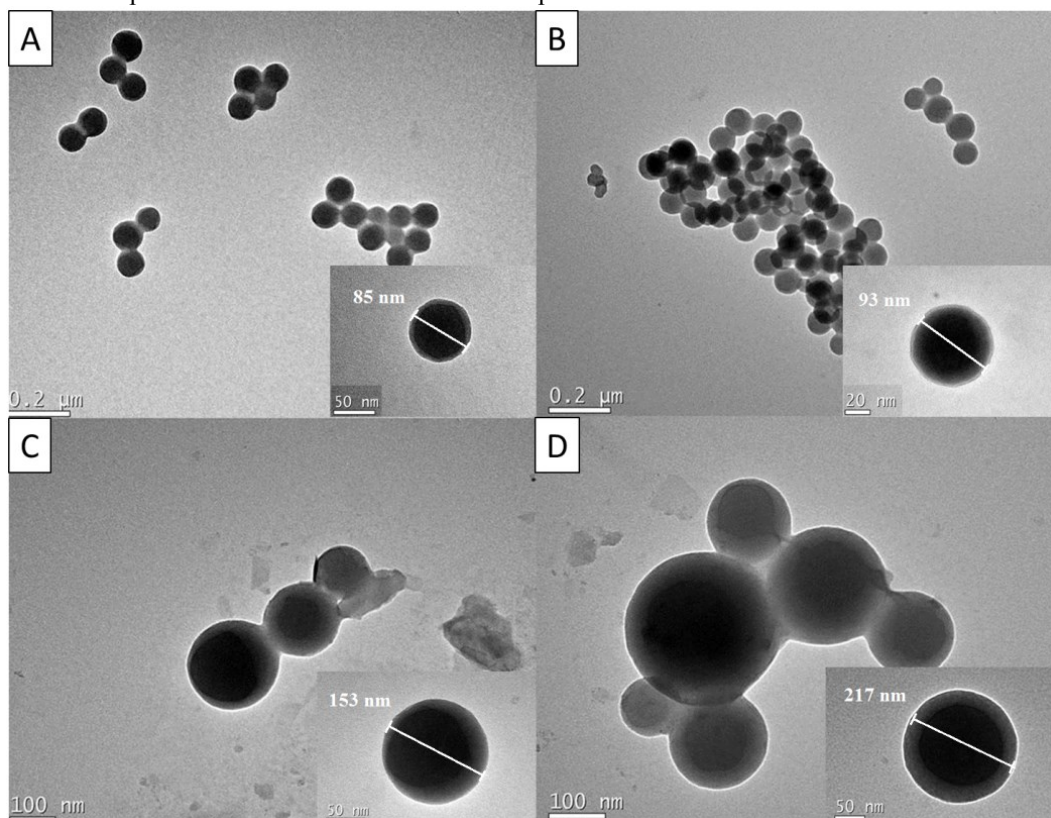
Para a atividade antioxidante (AA) das nanopartículas foi observado que houve um resultado promissor na captura dos radicais e promoção de uma atividade antioxidante, apresentando  $100,60 \pm 6,24$  TEAC ( $\mu\text{mol/mL}$ ) para DPPH e  $58,83 \pm 13,81$  TEAC ( $\mu\text{mol/mL}$ ) para ABTS, respectivamente. A baixa concentração de antocianinas nas nanopartículas pode ter causado uma redução do valor em relação a sua AA, mas sabemos que o fato de ter uma concentração mais baixa, causou mesmo assim uma inibição dos radicais.

#### 4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

As características morfológicas das nanopartículas foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão, que estão apresentadas na Figura 9. Esta análise gera uma imagem bidimensional formada a partir dos elétrons transmitidos através da amostra (CRUCHO; BARROS, 2017).

As nanopartículas obtidas mantiveram a forma esférica do molde de PS e não houve ruptura da parede da nanocápsula (nanopartícula vazia) (C). Além disso, o diâmetro das nanopartículas aumentou após o processo de deposição de cada camada, o que pode ser atribuído à adsorção dos polieletrólitos ao redor das nanopartículas de PS, como já relatado em amostras em estado líquido em DLS. Ye e colaboradores (2005) relataram um comportamento similar, onde a deposição de cinco bicamadas de CH/AL resultou em um aumento da espessura média de suas nanopartículas.

Figura 9: Microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas.



A) NPT-QT: Nanopartícula de PS revestida com uma camada de quitosana (PS-QT); B) NPT-QT/AL: Nanopartícula de PS com uma camada de quitosana e uma de alginato (PS-QT-AL); C) NPT-Vazia: Nanopartícula com duas camadas sem núcleo (QT-AL); D) NPT-AC: Nanopartícula com duas camadas e com antocianina adsorvida (QT-AL-AC). Fonte: Autor.

As amostras analisadas apresentaram um tamanho particulado inferior aos resultados obtidos em DLS medido no equipamento Zetasizer Nano Series. Isso pode ser explicado pelo fato de que o espalhamento de luz dinâmico avalia o raio hidrodinâmico das partículas em uma suspensão, enquanto no MET fornece a área da superfície com base na quantidade de elétrons incidentes transmitidos através de uma amostra, ou seja, os valores obtidos por DLS normalmente são superiores quando comparados aos de MET (BHATTACHARJEE et al., 2016).

Na figura 9C, mostra uma nanocápsula oca (vazia) aparentemente maior que as nanopartículas apresentadas na figura 9A e B, correspondentes às partículas antes da remoção no núcleo. Este aumento no diâmetro sugere o inchaço das nanopartículas durante a remoção do núcleo de PS (RIVERA et al, 2015). Este inchaço provavelmente é devido à pressão osmótica dentro da cápsula induzida pelos pequenos íons existentes no interior para compensar a carga da camada de QT mais interna e dos resíduos de PS (YE et al, 2005).



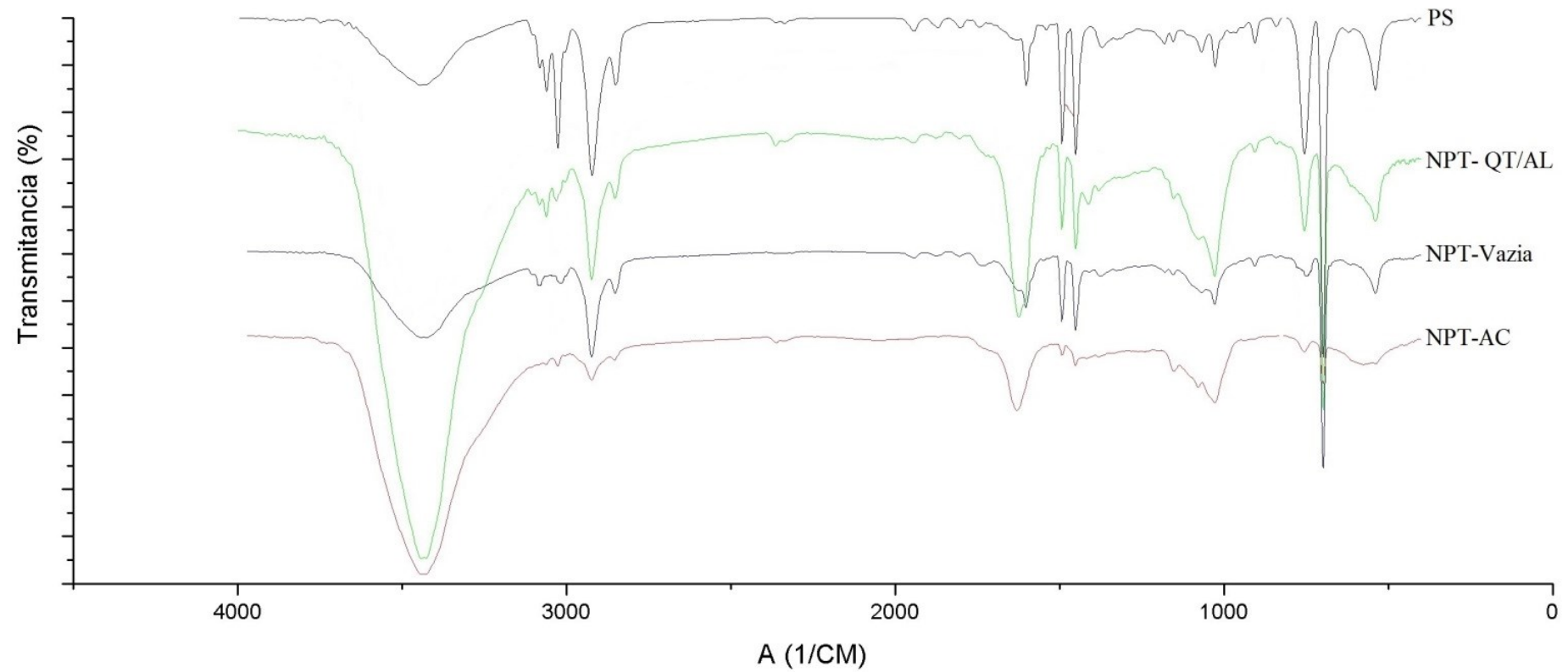
A partir das micrografias não foram observadas muitas partículas quebradas no processo de montagem das camadas (QT/AL), mostrando que a técnica LbL é eficiente, mas são necessários estudos de rompimento destas camadas para a liberação do composto ativo no meio.

#### 4.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A fim de confirmar a remoção do núcleo de poliestireno das nanopartículas de quitosana/alginato (NPT-QT/AL) e nanopartículas carregadas com antocianinas (NPT-A7), e também a confirmação dos picos de PS nos moldes sacrificiais e nas nanopartículas de polieletrólitos (NPT-QT/AL) com molde, foi realizada a espectroscopia FTIR, que estão apresentados na Figura 10.

As bandas características do resíduo de benzeno em PS aparecem em  $3000 - 3103 \text{ cm}^{-1}$ , em  $756 \text{ cm}^{-1}$  e  $703 \text{ cm}^{-1}$  para os moldes, indicando a existência do núcleo PS. Após a remoção do núcleo por dissolução em THF, os picos característicos de poliestireno diminuem ou desaparecem dos espectros das nanopartículas sem núcleo (NPT-Vazia) e nanopartículas carregadas (antocianinas), confirmando que o núcleo de PS foi removido. Estes resultados também foram encontrados por outros pesquisadores (PINHEIRO et al, 2015; YE et al, 2005). Há algum traço de bandas de PS em  $3000 - 3103 \text{ cm}^{-1}$  para as nanopartículas vazias e encapsuladas. Este fato confirma que a maioria das moléculas do molde de PS foi removida por este procedimento e nanocápsulas (nanopartículas ocas) foram obtidas com sucesso.

Figura 10: FTIR do molde de poliestireno e as nanopartículas com multicamadas.



PS: poliestireno. NPT-QT/AL: nanopartícula de quitosana/alginateo com núcleo PS. NPT-Vazia: nanopartícula vazia (sem núcleo). NPT-AC: nanopartícula carregada com antocianina. A: número comprimento de onda. Fonte: Autor

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE

Os parâmetros estudados demonstrados na Tabela 3 revelaram que as nanopartículas são estáveis nas condições estudadas e somente as nanopartículas controle, após dois meses de armazenamento precipitaram, impossibilitando sua análise.

Com este estudo, podemos verificar que com 60 dias as partículas começam a apresentar valores abaixo do ideal, como comentado na seção 3.1, que com o passar do tempo as nanopartículas apresentam certa instabilidade, mas não ao ponto de aglomerarem ou precipitarem (exceto controle). Nanopartículas controle (vazias) e nanopartículas carregadas (antocianinas) não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) no seu tamanho de partícula até o dia 60.

Resultados de IP encontram-se abaixo de 0,300 até o período de 30 dias, tanto para as nanopartículas vazias quanto para as encapsuladas, mostrando que pode ser o limite de estabilidade destas partículas (CHU;WANG;YU, 1991). O aumento do índice de polidispersão pode ser explicado que provavelmente houve formação de agregados ou aglomerados pela ocorrência de lise das partículas e os polieletrólitos em solução formando os aglomerados.

Tabela 3: Estudo da estabilidade das nanopartículas controle (vazia) e carregadas com antocianinas.

<b>Amostra</b>	<b><math>\zeta</math> (mV)</b>	<b>Z-ave (nm)</b>	<b>IP</b>
<b>NPT-Vazia</b>			
Dia 1	$-34,6 \pm 2,1a$	$394,2 \pm 1,4b$	$0,279 \pm 0,010b$
Dia 30	$-32,1 \pm 0,4ab$	$402,2 \pm 1,0c$	$0,291 \pm 0,025a$
Dia 60	**	**	**
<b>NPT-AC</b>			
Dia 1	$-31,3 \pm 0,6ab$	$449,5 \pm 0,8d$	$0,294 \pm 0,023a$
Dia 30	$-30,0 \pm 0,9b$	$457,7 \pm 1,2a$	$0,298 \pm 0,057c$
Dia 60	$-26,3 \pm 1,5c$	$461,0 \pm 2,7a$	$0,329 \pm 0,015d$

NPT-vazia: nanopartícula sem núcleo (controle). NPT-A7: nanopartícula carregada com antocianina pH 7. Z-ave: diâmetro médio de partícula em nanômetros. IP: índice de polidispersão.  $\zeta$ : potencial zeta em mV. \*\*: Instável. Letras minúsculas idênticas sobrescritas na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ( $p > 0,05$ ).



## 5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostraram que as nanopartículas ocas e carregadas com antocianinas foram preparadas com sucesso através da técnica de camada por camada (LbL). Esta técnica é viável e promissora na utilização de partículas sacrificiais na construção de nanocápsulas como reservatórios para compostos químicos com atividade biológica. Os polissacarídeos naturais, quitosana e alginato, foram utilizados com êxito na montagem de nanocápsulas layer-by-layer (LbL) através de um molde sacrificial de nanopartículas de poliestireno, e as nanocápsulas obtidas possuem potencial para aplicações em ciência e tecnologia de alimentos.

A confirmação de que ocorreu uma montagem bem sucedida veio com as inversões de carga conforme as camadas foram sendo acrescentadas. A retirada do molde foi confirmada por espectroscopia FTIR, que mostrou a remoção do núcleo de poliestireno pela imersão em THF, seguida por processos de lavagem. Além disso, a estrutura capsular pôde ser confirmado por microscopia eletrônica de transmissão.

A atividade antioxidante das nanopartículas carregadas com antocianinas mostra habilidade de sequestrar o radical DPPH e ABTS, podendo ser atribuída a alguns fatores: baixa concentração de antocianina empregada, avaliação da liberação em um intervalo de tempo que não foi o suficiente para liberação total desde o núcleo da cápsula ou que a antocianina pode ter ficado aderida à parede por interações eletrostáticas, mas sabemos que o fato de ter uma concentração mais baixa, causou mesmo assim uma inibição dos radicais.

Do ponto de vista físico-químico, estes resultados indicam que as nanopartículas de quitosana/alginato carregadas com antocianinas são estáveis até o tempo de ensaio empregado (60 dias), mas há necessidade da continuidade deste estudo avaliando a liberação deste composto ativo das matrizes poliméricas para avaliar aplicações em matrizes alimentícias, ou o emprego de outros compostos bioativos nessa mesma matriz.

## REFERÊNCIAS

AMAROWICZ, R.; CARLE, R., DONGOWSKI, G. et al. Influence of postharvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods. **Molecular nutrition & food research**, v. 53, p. 151-183, 2009.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, p. 89-97, 2005.

AZEVEDO, V. V.C., CHAVES, S. A., BEZERRA, D. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais, **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, 27-34, 2007.

BAZANA, M. T.; CODEVILLA, C. F.; MENEZES, C. R. Nanoencapsulation of bioactive compounds: challenges and perspectives. **Current Opinion in Food Science**, v. 26, p. 47-56, 2019.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, n. 1, p. 337–351, 2016.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSER, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant. **LWT- Food Science and Technology**, v. 28, p. 25–30, 1995.

CARVALHO, S. M.; NORONHA, C. M.; FLORIANI, C. L. et al. Optimization of  $\alpha$ -tocopherol loaded solid lipid nanoparticles by central composite design. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 278–285, 2013.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ M. L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ M. E. et al. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 113, p. 859-871, 2009.

CASANOVA, Monise C. R. Síntese, Caracterização e Estudo da Estabilidade de Nanopartículas Metálicas Estabilizadas com Polieletrólitos e Tióis. 2010. Dissertação

(Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

CAVALCANTI, R. N., SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems - An overview. **Food Research International**, v. 44, p. 499-509, 2011.

CELLI, G. B.; TAN, C.; SELIG, M. J. Anthocyanidins and Anthocyanins. **Encyclopedia of Food Chemistry**, p. 218-223, 2019.

CHU, B., WANG, Z., YU, J. Dynamic light scattering study of internal motions of polymer coils in dilute solution. **Macromolecules**, v. 24, p. 6832–6838, 1991.

CRUCHO, C. I. C.; BARROS, M. T. Polymeric nanoparticles: a study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering C**, v. 80, n. 6, p. 771–784, 2017.

DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L.; FENNEMA, Owen R. Química de alimentos de Fennema. Artmed, 2010.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, p. 173–289, 2010.

DECHER, G.; SCHMITT, J. The fine-tuning of ultra-thin multilayer film thickness composed of successively alternating layers of anionic and cationic polyelectrolytes.. **Progress in Colloid and Polymer Science**, v. 89, p. 160-164, 1992.

DINGLER, A.; BLUM, R. P.; NIHEUS, H.; MULLER, R. H.; GOHLAS. Solid lipid nanoparticles (SLN tm/Lipopearls TM)- a pharmaceutical and cosmetic Carrier for the application of vitamin E in dermal products. **Journal Microencapsulation**, v. 16, n. 6, p. 751-767, 1999.

DRAGET, K. I.; TAYLOR, C. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 251–256, 2011.

EL ASBAHANI, A.; MILADI, K.; BADRI, W. et al. Essential oils: from extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, p. 220–243, 2015.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, p. 217-225, 2003.

GOY, R. C., DE BRITO, D., ASSIS, O. B. G., A Review of the antimicrobial activity of chitosan, **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 19, nº 3, p. 241-247, 2009.

GROSBURG, A. Y.; NGUYEN, T. T.; SHKLOVSKII, B. I. Colloquium: the physics of charge inversion in chemical and biological systems. **Reviews Of Modern Physics**, v. 74, p. 329-345, 2002.

GUTERRES, S.S; FESSI, H.; BARRAT, G. et al. Poly (D,L-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, p. 57-63, 1995.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

GUZMÁN, E.; CAVALLO, J. A.; CHULIÁ-JORDÁN, R. et al. pH-induced changes in the fabrication of multilayers of poly(acrylic acid) and chitosan: fabrication, properties, and tests as a drug storage and delivery system. **Langmuir**, v. 27, p. 6836-6845, 2011.

GUZMÁN, E.; MATEOS-MAROTO, A.; RUANO, M. et al. Layer-by-Layer polyelectrolyte assemblies for encapsulation and release of active compounds. **Advances in Colloid and Interface Science**, 2017.

HATANAKA, J.; CHIKAMORI, H.; SATO, H. et al. Physicochemical and pharmacological characterization of  $\alpha$ -tocopherol-loaded nano-emulsion system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 396, p. 188-193, 2010.



HOOGEVEEN, N. G.; STUART, C. M. A.; FLEER, G. J. et al Formation and stability of multilayers of polyelectrolytes **Langmuir**, v. 12, p. 3675-3681, 1996.

HWANG, San-pin et al. In vitro and in vivo antibacterial activity of shrimp chitosan against some intestinal bacteria. **Fisheries science**, v. 70, n. 4, p. 675-681, 2004.

ILER, R. K.; Multilayer of colloidal particles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 21, p. 569-594, 1966.

ILLUM, L.; JABBAL-GILL, I.; HINCHCLIFFE, M. et al. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 51, p.81–96, 2001.

ITOH, Y.; MATSUSAKI, M.; KIDA, T. et al. Preparation of Biodegradable Hollow Nanocapsules by Silica Template Method. **Chemistry Letters**. v.33, p. 1-2, 2004.

JOHNSTON, A. P. R.; SUCH, G. K., DODDS, S. J. et al. Engineered Layer-by-Layer Assembled Capsules for Biomedical Applications. **Multilayer Thin Films**, p. 801–829, 2012.

JOHNSTON, A. P. R.; CORTEZ, C; ANGELATOS, A. S. et al. Layer-by-layer engineered capsules and their applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. v. 11 p. 203–209, 2006.

KIM, G. H.; KIM, J. E.; RHIE, S. J. et al. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Experimental neurobiology**, v. 24, p. 325-340, 2015.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37 p. 106– 126, 2012.

LEVI, M. A. B.; SCARMINIO, I. S.; POPPI, R. J. et al. Three-way chemometric method study and UV-Vis absorbance for the study of simultaneous degradation of anthocyanins in flowers of the Hibiscus rosa-sinensis species. **Talanta**, v. 62, p. 299–305, 2004.

LIMA, V.L.A.G.; PINHEIRO, I.O.; NASCIMENTO, M.S.; GOMES, P.B.; GUERRA, N.B. Identificação de antocianidinas em acerolas do banco ativo de germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.4, p.927-935, 2006.

LIU, Y.; YANG J.; ZHAO, Z. et al. Formation and characterization of natural polysaccharide hollow nanocapsules via template layer-by-layer self-assembly. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 379, p. 130-140, 2012.

LUO, Y.; WANG, Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 353–367, 2014

MANHITA, A. C., TEIXEIRA, D. M., COSTA, C. T. Application of sample disruption methods in the extraction of anthocyanins from solid or semi-solid vegetables samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1129, p. 14-20, 2006.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S; LEITÃO, G. G. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother Res**, v.15, p. 27-30, 2001.

MORA-HUERTAS, C.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-142, 2010.

MOURA, C., MUSZINSKI, P., SCHIMIDT, C. et al. Quitina e Quitosana produzidos a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto, **Vetor, Rio Grande**, 16(1/2): 37-45, 2006.

MOZAFARI, M. R.; FLANAGAN, J.; MATIA-MERINO, L. et al. Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, 2006.

NARAYAN, M. S.; AKHILENDER N. K.; RAVISHANKAR, G. A. et al. Antioxidant effect of anthocyanin on enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 60, p. 1-4, 1999.

NEHA, K.; HAIDER, M. R.; PATHAK, A. et al. Medicinal prospects of antioxidants: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 178, p. 687-704, 2019.

PINA, F.; MELO, M. J.; LAIA, C.A.; et al. Chemistry and applications of flavylum compounds: a handful of colours. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 869-908, 2012.

PINHEIRO. A. C.; BOURBON, A. I.; CERQUEIRA, M. A. et al. Chitosan/fucoidan multilayer nanocapsules as a vehicle for controlled release of bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**. v. 115, p.1–9, 2015.

RIVERA, M. C.; PINHEIRO, A. C.; BOURBON, A. I. et al. Hollow chitosan/alginate nanocapsules for bioactive compound delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 79, p. 95–102, 2015.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p.1231-1237, 1999.

REIS, C.P.; NEUFELD, R.J.; VILELA, S. et al. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. **Journal of Microencapsulation**. v. 23, p. 245-257, 2006.

REMMINGHORST, U., REHM, B.H.A. Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. **Biotechnol Lett**. v. 28, p. 1701-1712, 2006.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**. v. 31, p. 603-632, 2006.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Update on natural food pigments - A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. **Food Research International**, 2018.

SANTOS-BUELGA, C.; GONZÁLEZ-PARAMÁS A. M. Anthocyanins. **Encyclopedia of Food Chemistry**, p. 10-21, 2019.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SCHLENOFF, J. B.; DUBAS, S. T. Mechanism of polyelectrolyte multilayer growth: charge overcompensation and distribution. **Macromolecules**, v. 34, p. 592-598, 2001.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, p. 930, 2010.

SINOPOLI, A.; CALOGER, G.; BARTOLOTTA, A. Computational aspects of Anthocyanidins and Anthocyanins: a review. **Food Chemistry**, v. 297, p. 124898, 2019.

SUI X.; ZHANG Y.; JIANG L. et al. Anthocyanins in Food. **Encyclopedia of Food Chemistry**, p. 10-17, 2019.

SUKHORUKOV, G.B.; DONATH, E.; LICHTENFELD, H. et al. Layer-by-layer self-assembly of polyelectrolytes on colloidal particles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 137, p. 253-266, 1998.

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. C. Comparação de métodos para a quantificação de antocianinas. **Revista Ceres**, v. 55, n. 4, p. 297-304, 2008.

WANG, Y.; ANGELATOS, A. S.; CARUSO, F. template synthesis of nanostructured materials via Layer-by-Layer assembly. **Chem. Mater.** v. 20, p. 848-858, 2008.

XUAN, M.; ZHAO, J.; SHAO, J. et al. Recent progresses in layer-by-layer assembled biogenic capsules and their applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 487, p. 107–117, 2017.

YANG, Y.; HE, Q.; DUAN, L.; et al. Assembled alginate/chitosan nanotubes for biological application. *Biomaterials*, v. 28, p. 3083-3090, 2007.

YANG, J.; XIE, Y.; HE, W. Research progress on chemical modification of alginate: A review. **Carbohydrate Polymers**. v. 84, p. 33–39, 2011.

YE, S.; WANG, C.; LIU, X. et al. Multilayer nanocapsules of polysaccharide chitosan and alginate through layer-by-layer assembly directly on PS nanoparticles for Release. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 16, p. 909–923, 2005.

ZHENG, L.; ZHU, J. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 4, p. 527-530, 2003.