



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

NATHALIE ALMEIDA LOPES

**DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS NANOMÉTRICOS
PARA ARMAZENAMENTO E LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS**

PORTO ALEGRE
2018

NATHALIE ALMEIDA LOPES
ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, MSC.

**DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS NANOMÉTRICOS
PARA ARMAZENAMENTO E LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência e Tecnologia de Alimentos como
requisito para a obtenção do grau de Doutora em
Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADOR: PROF. DR. ADRIANO BRANDELLI

PORTO ALEGRE (RS), BRASIL
ABRIL DE 2018

CIP - Catalogação na Publicação

Lopes, Nathalie Almeida

DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS NANOMÉTRICOS PARA
ARMAZENAMENTO E LIBERAÇÃO CONTROLADA DE PEPTÍDEOS
ANTIMICROBIANOS / Nathalie Almeida Lopes. -- 2018.
130 f.

Orientador: Adriano Brandelli.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de
Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Nanoencapsulação. 2. Nisina. 3. Lisozima. 4.
Polissacarídeos. I. Brandelli, Adriano, orient. II.
Título.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Adriano Brandelli pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pelos ensinamentos, paciência e orientação.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) que faz parte do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) e ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS, pela oportunidade e suporte para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao professor Omar Mertins pela disponibilidade e ensinamentos transmitidos.

Agradeço à minha família pelo apoio incondicional e compreensão em todos os momentos. Sem vocês eu não chegaria até aqui. Não tenho palavras que possam expressar minha gratidão.

Aos queridos amigos que o ICTA me deu (É NÓS!), agradeço pela amizade, companhia, conselhos e conversas, essenciais para a conclusão deste trabalho.

Aos colegas do Lab 218 que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”

Simone de Beauvoir

RESUMO

Os compostos antimicrobianos naturais são um tema de grande interesse devido ao aumento da demanda por alimentos seguros e de alta qualidade. A utilização de lipossomas é uma alternativa interessante para proteger antimicrobianos nos alimentos, além de fornecer compostos naturais de liberação controlada. Os lipossomas revestidos com polissacarídeos apresentam melhor estabilidade, representando uma alternativa aos lipossomas convencionais. Inicialmente, os nanolipossomas que encapsulam a nisina foram preparados com fosfatidilcolina de soja (PC) e pectina ou ácido poligalacturônico. Os lipossomas desenvolvidos apresentaram alta eficiência de encapsulação, baixo índice de polidispersão e foram estáveis durante 21 dias a 7 °C e 25 °C. A atividade antimicrobiana foi observada contra cinco cepas diferentes de *Listeria* em placas de ágar de leite, com uma melhor eficiência contra *L. innocua* 6a. Em um segundo momento, as características estruturais dos lipossomas foram estudadas por dispersão de raios-X de pequeno ângulo (SAXS) e as amostras foram submetidas a ciclos de temperatura (20-60 °C). Para isso, os lipossomas foram desenvolvidos contendo pectina ou ácido poligalacturônico pelos métodos de hidratação de filme e evaporação em fase reversa, para encapsular nisina. A análise de SAXS confirmou a presença de estruturas lamelares em todas as amostras. Além disso, parte da estrutura multilamelar tornou-se cúbica, provavelmente devido à presença de nisina nos lipossomas. A adição de polissacarídeos mostrou diferenças entre as fases cúbicas formadas. Em última análise, a mistura de lisozima e nisina foi encapsulada em lipossomas contendo polissacarídeos. O diâmetro médio dos lipossomas foi de 85,6 e variou para 77,3 e 79,9 nm com a incorporação de pectina ou ácido poligalacturônico, respectivamente. O potencial zeta dos lipossomas com polissacarídeos foi de cerca de -30 mV, mostrando alta eficiência de encapsulação. A atividade antimicrobiana foi avaliada a 37 °C, mostrando que a PC-pectina reduziu a população de *L. monocytogenes* em 2 log UFC/mL e 5 log UFC/mL em leite integral e desnatado, respectivamente. Em refrigeração, a PC-pectina reduziu a população de *L. monocytogenes* para quase zero por até 25 dias em leite desnatado. Portanto, pode dizer-se que os lipossomas que contêm polissacarídeos podem ser uma tecnologia promissora para o encapsulamento da lisozima e nisina. Além disso, a existência de estrutura cúbica nos lipossomas pode proporcionar liberação controlada de antimicrobianos.

Palavras chave: nisina, lisozima, lipossomas, pectina, ácido poligalacturônico, SAXS.

ABSTRACT

Natural antimicrobial compounds are a topic of utmost interest due to the increased demand for safe and high-quality foods. The use of liposomes is an interesting alternative to protect antimicrobials in food, also providing controlled release natural compounds. Polysaccharides coated liposomes present better stability, representing an alternative to conventional liposomes. Initially, nanoliposomes encapsulating nisin were prepared with soy phosphatidylcholine (PC) and pectin or polygalacturonic acid. The liposomes developed presented high encapsulation efficiency, low polydispersity index, and were stable for 21 days at 7°C and 25°C. The antimicrobial activity was observed against five different strains of *Listeria* in milk-agar plates, with a better efficiency against *L. innocua* 6a. In a second moment, structural characteristics of liposomes were studied by small angle X-ray scattering (SAXS) and the samples were submitted to temperature cycles (20-60°C). For this, liposomes were developed containing pectin or polygalacturonic acid by the thin-film hydration method and reverse phase evaporation method for nisin encapsulation. The analysis of SAXS confirmed the presence of lamellar structures in all the samples. In addition, part of the multilamellar structure became cubic, probably due to the presence of nisin in the liposomes. The addition of polysaccharides showed differences between the cubic phases formed. Ultimately, the mixture of lysozyme and nisin were encapsulated in liposomes containing polysaccharides. The mean diameter of the liposomes was 85.6 and varied to 77.3 and 79.9 nm with the incorporation of pectin or polygalacturonic acid, respectively. The zeta potential of liposomes with polysaccharides were around -30 mV, showing high encapsulation efficiency. The antimicrobial activity was assessed at 37 °C, showing that PC-pectin reduced the population of *L. monocytogenes* to 2 log CFU/mL and 5 log CFU/mL in whole and skim milk, respectively. At under refrigeration, PC-pectin reduced the population of *L. monocytogenes* to almost zero for up to 25 days in skim milk. Therefore, it can say that the liposomes containing polysaccharides can be a promising technology for the encapsulation of lysozyme and nisin. In addition, the existence of cubic structure in the liposomes can provide controlled release of antimicrobials.

Keywords: nisin; lysozyme; liposomes; pectin; polygalacturonic acid; SAXS.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Diferentes tipos de nanoestruturas.....	15
Figura 2: Estrutura geral de um fosfolipídio	17
Figura 3: Diferentes tipos de lipossomas formados a partir de bicamadas lipídicas. LUV: vesículas unilamelares grandes; MLV: vesículas multilamelares; SUV: vesículas unilamelares pequenas; MVV: vesículas multivesiculares.....	18
Figura 4: Lipossoma formado por fosfolipídios em solução aquosa	19
Figura 5: Esquema do método de hidratação do filme lipídico.....	21
Figura 6: Esquema para o processo de preparação de lipossomas por evaporação em fase reversa. 1: mistura do fosfolipídio em solvente orgânico; 2: adição de solução aquosa contendo o composto bioativo; 3: sonicação; 4: formação de emulsão água-em-óleo. 5: formação de gel; 6: formação dos lipossomas.....	21
Figura 7: Esquema da produção de lipossomas pelo método de injeção de etanol.....	22
Figura 8: Representação esquemática do potencial zeta	25
Figura 9: Representação esquemática das fases lamelar, cúbica e hexagonal.	27
Figura 10: Estrutura química da pectina	32
Figura 11: Estruturas de unidades do ácido galacturônico (a) e ácido galacturônico esterificado (b).	33

ARTIGO 1

Figure 1. Transmission electron microscopy images of nanoliposomes encapsulating nisin. (a) Polygalacturonic acid-coated PC liposomes, (b) pectin-coated PC liposomes and (c) control PC liposomes. Bar $\frac{1}{4}$ 200 nm.....	50
Figure 2. Histograms of size distribution obtained by laser dynamic light scattering of (a) Polygalacturonic acid-coated PC liposomes, (b) pectin-coated PC liposomes and (c) control PC liposomes.....	51
Figure 3. Graphic representation showing the fluctuation in the intensity of scattered light as a function of time. Correlograms of (a) Polygalacturonic acid-coated PC liposomes, (b) pectin-coated PC liposomes and (c) control PC liposomes.....	52
Figure 4. FTIR spectra of pure polygalacturonic acid, pectin, nisin, phosphatidylcholine (PC), and nanoliposomes prepared with pectin and polygalacturonic acid (PGA).....	53

Figure 5. Size and polydispersity index (PDI) of nanoliposomes containing nisin, during storage at 7 °C (a,b) and 25 °C (c,d). (□) Polygalacturonic acid-coated PC liposomes, (Δ) pectin-coated PC liposomes and (○) control PC liposomes. Values are the means ± standard deviations of three independent experiments. 56

Figure 6. Zeta potential (□) of nanoliposomes containing nisin, during storage at 7 °C and 25 °C. (□) Polygalacturonic acid-coated PC liposomes, (Δ) pectin-coated PC liposomes and (○) control PC liposomes. Values are the means ± standard deviations of three independent experiments..... 58

Figure 7. Release rate of nisin encapsulated in (▲) polygalacturonic acid-coated PC liposomes, (●) pectin-coated PC liposomes and (■) control PC liposomes. Values are the mean of three independent experiments. 61

ARTIGO 2

Figure 1: SAXS results of intensity (*I*) as a function of wave vector (*q*) of nisin loaded liposomes (A), nisin-loaded liposomes coated with polygalacturonic acid (B), nisin-loaded liposomes coated with pectin (C), empty liposomes (D), empty liposomes coated with polygalacturonic acid (E) and empty liposomes coated with pectin (F), produced by thin-film hydration method and measured at different temperatures. 73

Figure 2: Cubic phases of the liposomes (arrows) produced by thin-film hydration method at different temperatures. SAXS results of intensity (*I*) as a function of wave vector (*q*) of nisin loaded liposomes (A), nisin-loaded liposomes coated with polygalacturonic acid (B), nisin-loaded liposomes coated with pectin (C)..... 76

Figure 3: SAXS results of intensity (*I*) as a function of wave vector (*q*) of nisin loaded liposomes (A), nisin-loaded liposomes coated with polygalacturonic acid (B), nisin-loaded liposomes coated with pectin (C), empty liposomes (D), empty liposomes coated with polygalacturonic acid (E) and empty liposomes coated with pectin (F), produced by reverse phase evaporation method and measured at different temperatures..... 79

Figure 4: Cubic phases of the liposomes (arrows) produced by reverse phase evaporation method at different temperatures. SAXS results of intensity (*I*) as a function of wave vector (*q*) of nisin loaded liposomes (A), nisin-loaded liposomes coated with polygalacturonic acid (B), nisin-loaded liposomes coated with pectin (C). 82

ARTIGO 3

- Figure 1.** Transmission electron microscopy of (a) PC liposomes, (b) PC-pectin and (c) PC-polygalacturonic acid encapsulating lysozyme. 97
- Figure 2.** Transmission electron microscopy of (a) PC liposomes, (b) PC-pectin and (c) PC-polygalacturonic acid encapsulating lysozyme-nisin. 101
- Figure 3.** FTIR spectra of A) liposomes encapsulating lysozyme, and B) liposomes encapsulating lysozyme-nisin. PC-P= PC-pectin and PC-PA= PC-polygalacturonic acid.... 103
- Figure 4.** Growth of *L. monocytogenes* ATCC 7644 in whole milk (a) and skim milk (b), *S. Enteritidis* ATCC 13076 in whole milk (c) and skim milk (d) at 37 °C containing free or encapsulated lysozyme-nisin. Viable counts were monitored of PC liposomes (●), PC-pectin (◆), PC-polygalacturonic acid (◄), free lysozyme-nisin (►), free lysozyme (▼), free nisin (▲), and control (■). Each point represents the mean ±SEM of three independent experiments. . 104
- Figure 5.** Growth of *L. monocytogenes* ATCC 7644 in whole milk (a) and skim milk (b), mixture of strains of *Listeria* sp in whole milk (c) and skim milk (d) at 7 °C containing free or encapsulated lysozyme-nisin. Viable counts were monitored of PC liposomes (●), PC-pectin (◆), PC-polygalacturonic acid (◄), free lysozyme-nisin (►), free lysozyme (▼), free nisin (▲), and control (■). Each point represents the mean±SEM of three independent experiments... 106

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Comparação de diferentes nanoestruturas.	16
Tabela 2. Classificação dos lipossomas baseada em parâmetros estruturais.....	18
Tabela 3. Vantagens e desvantagens dos métodos convencionais de produção de lipossomas.	23
Tabela 4. Mesofases e índices de picos correspondentes observados utilizando SAXS.....	28

ARTIGO 1

Table 1. Physical characteristics of polygalacturonic acid and pectin-covered nanoliposomes encapsulating nisin.	48
Table 2. Antimicrobial activity of phosphatidylcholine (PC) nanoliposomes encapsulating nisin in milk-agar against different strains of <i>Listeria</i>	60

ARTIGO 2

Table 1: Repeated distances formed by the phospholipid bilayers d (nm) obtained by small angle X-ray scattering, produced by thin-film hydration method at different temperatures....	77
Table 2: Repeated distances formed by the phospholipid bilayers d (nm) obtained by small angle X-ray scattering, produced by reverse phase evaporation method at different temperatures.	80

ARTIGO 3

Table 1. Characterization of PC liposomes containing lysozyme.	95
Table 2. Characterization of PC liposomes containing lysozyme-nisin.	100

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Objetivos	14
1.1.1 Objetivo geral.....	14
1.1.2 Objetivos específicos	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Nanopartículas	15
2.2 Lipossomas: Estrutura e propriedades	17
2.3 Métodos de preparo.....	20
2.4 Métodos de caracterização.....	23
2.4.1 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	24
2.4.2 Potencial Zeta.....	24
2.4.3 Eficiência de encapsulação (EE).....	25
2.4.4 Espalhamento de raios-x a baixo ângulo (SAXS).....	26
2.5 Aplicação dos lipossomas em alimentos	28
2.6 Biopolímeros.....	30
2.6.1 Pectina	31
2.7 Antimicrobianos naturais	34
2.7.1 Nisina	34
2.7.2 Lisozima.....	36
2.8 Doenças transmitidas por alimentos	38
3 ARTIGOS CIENTÍFICOS	40
3.1 Artigo 1	41
3.2 Artigo 2	67
3.3 Artigo 3	87
4 DISCUSSÃO GERAL	113
5 CONCLUSÃO GERAL	117
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
7 OUTRAS PUBLICAÇÕES.....	126

1 INTRODUÇÃO

O constante avanço tecnológico tem inspirado o desenvolvimento de novas tecnologias para a conservação de alimentos e metodologias de processamento, tornando a segurança de alimentos uma questão de grande relevância. A utilização de biomoléculas com atividade antimicrobiana pode controlar a multiplicação de micro-organismos indesejáveis, estendendo a vida útil e mantendo a qualidade e segurança dos alimentos, além de não causar qualquer efeito tóxico ou indesejável para os consumidores (Gyawali e Ibrahim, 2014; Tajkarimi, Ibrahim e Cliver, 2010). O uso de substâncias naturais para a conservação de alimentos atende à crescente demanda por produtos mais saudáveis e seguros, incluindo alimentos minimamente processados e livres de aditivos sintéticos. Muitos agentes antimicrobianos naturais, entre eles, peptídeos antimicrobianos (bacteriocinas, lactoferrina), substâncias derivadas de plantas (polifenóis, isotiocianatos) e enzimas (lisozima, lisostafina) têm sido utilizados para controlar micro-organismos patogênicos através da incorporação na matriz alimentar ou em filmes e revestimentos. No entanto, esses compostos promissores podem ter seu efeito prejudicado devido a interações indesejáveis e inativação na matriz alimentar (Fathi, Martín e McClements, 2014; Meira et al., 2014; Rhim et al., 2013).

Neste contexto, a nanotecnologia pode ser utilizada para melhorar a estabilidade antimicrobiana em alimentos, geralmente mostrando vantagens em comparação com os antimicrobianos em sua forma livre. Nanoestruturas utilizadas como veículos para proteger compostos bioativos, podem ser adequadas no controle de bactérias patogênicas, mantendo sua viabilidade durante exposição à de diferentes estresses ambientais, melhorando assim a estabilidade e a eficácia (Brandelli, 2012). Com isso, novas perspectivas para a aplicação de compostos antimicrobianos fundamentam-se na nanotecnologia, entre elas o desenvolvimento de nanopartículas para encapsulação destes compostos.

Dentre as nanopartículas mais empregadas, as nanovesículas lipossômicas têm recebido atenção especial. É crescente a aplicação de lipossomas na área alimentícia, devido às inúmeras vantagens que essas estruturas podem fornecer ao serem usados como sistemas encapsulantes de substâncias bioativas, podendo ser utilizados para liberação controlada de componentes funcionais, tais como: proteínas, enzimas, vitaminas, entre outros componentes que podem ser utilizados com o intuito de alterar o sabor ou o aroma dos alimentos (Taylor et al., 2005).

Segundo Fathi, Martín e McClements (2014) o material de encapsulação deve possuir qualidade alimentar, ser biodegradável e estável em sistemas alimentares durante processamento, armazenamento e consumo. Sistemas de entrega à base de polissacarídeos são adequados para muitas aplicações na indústria, sendo considerados biocompatíveis e biodegradáveis, possuindo elevado potencial para serem modificados a fim de obter as propriedades requeridas.

Algumas modificações têm sido propostas para estabilizar lipossomas, visando a ação mais eficiente dessas estruturas e aumento da retenção do material encapsulado. O aumento no interesse em produtos naturais alternativos e a descoberta de polissacarídeos na superfície das células estimula o estudo sobre as interações entre lipossomas e diferentes tipos de polissacarídeos (Silva et al., 2014). A pectina é um polissacarídeo linear aniônico que pode formar complexos com outros polímeros (Canteri et al., 2012; Voragen et al., 2009). Devido a características eletrostáticas e de formação de géis, a pectina associada a outros polímeros tem sido avaliada como material de revestimento, com o intuito de conferir uma liberação sustentada e/ou direcionada do composto bioativo. No entanto, essas estratégias ainda não resultaram na obtenção de sistemas totalmente eficazes (Camilo, 2007).

Neste contexto, peptídeos antimicrobianos apresentam grande potencial de uso em substituição aos conservantes químicos comumente utilizados. Aliado a isso, o desenvolvimento de novas tecnologias para liberação controlada destes compostos, com a utilização de polissacarídeos, como a pectina ou o ácido poligalacturônico, se torna um tema promissor de estudo.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver lipossomas contendo pectina ou ácido poligalacturônico como sistemas para encapsulação de peptídeos antimicrobianos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Desenvolver lipossomas contendo pectina ou ácido poligalacturônico para encapsular nisina, pelo método de hidratação de filme.
- Caracterizar os lipossomas com nisina através de seu tamanho e polidispersividade, morfologia, eficiência de encapsulação.
- Avaliar o efeito antimicrobiano de lipossomas contendo nisina contra diferentes cepas de *Listeria* spp mediante ensaios de atividade em ágar leite como sistema modelo.
- Caracterizar a estrutura dos lipossomas de nisina produzidos pelo método de hidratação de filme e evaporação em fase reversa, através da técnica SAXS.
- Desenvolver lipossomas contendo pectina ou ácido poligalacturônico para encapsular a mistura de nisina e lisozima pelo método de hidratação de filme.
- Caracterizar os lipossomas com nisina e lisozima através de seu tamanho e polidispersividade, morfologia, eficiência de encapsulação.
- Avaliar a atividade antimicrobiana de lipossomas contendo a mistura de nisina e lisozima mediante curvas de crescimento microbiano usando leite como sistema modelo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nanopartículas

Nanopartículas (NP) são partículas coloidais, possuindo diâmetros que variam entre 1 e 1000 nm, em que os compostos podem ser encapsulados, adsorvidos ou dispersos. Uma grande variedade de nanopartículas compostas por diferentes materiais, incluindo lipídeos, polímeros naturais e sintéticos, e materiais inorgânicos vem sendo desenvolvidas, resultando em sistemas de liberação que variam nas suas propriedades físico-químicas e permitindo, assim, uma variedade de aplicações (Cushen et al., 2012; Mora-Huertas, Fessi e Elaissari, 2010; Letchford e Burt, 2007; Peters et al., 2011).

De uma forma geral, as nanopartículas podem ser obtidas em diversas morfologias como nanoesferas, nanocápsulas e nanolipossomas, como mostradas na Figura 1 (Gu et al., 2015; Mora-Huertas, Fessi e Elaissari, 2010; Quintanar-Guerrero et al., 1998; Rawat et al., 2006). Utilizando compostos orgânicos para formar dispersões nanométricas, substâncias insolúveis podem ser preparadas para se comportarem como moléculas verdadeiramente dissolvidas, abrindo um enorme potencial para produtos inovadores e competitivos. O desenvolvimento de aditivos alimentares sensíveis, tais como vitaminas e antioxidantes, em uma camada protetora pode prevenir a deterioração durante a produção e armazenamento. Outra aplicação é o mascaramento de propriedades organolépticas indesejadas dos compostos benéficos por meio da nanoencapsulação (Peters et al., 2011).

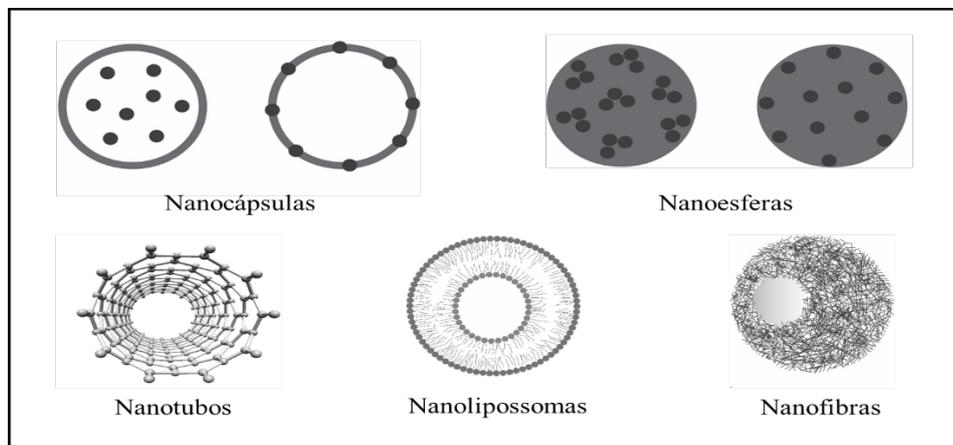


Fig. 1 - Diferentes tipos de nanoestruturas (Lopes e Brandelli, 2017).

O uso de nanocarreadores pode modular a liberação de agentes antimicrobianos, protegendo-os contra condições adversas, melhorando sua estabilidade, diminuindo assim a quantidade necessária para obter o efeito antimicrobiano. Os sistemas de nanoencapsulação têm excelentes propriedades de liberação controlada. Além disso, a encapsulação de compostos antimicrobianos reduz o custo, porque uma menor quantidade do ingrediente ativo é necessária (Blanco-Padilla et al., 2014).

O tipo de sistema nanoestruturado está frequentemente associado com as características da substância antimicrobiana a ser encapsulada e do material utilizado, além da natureza do alimento ao qual será destinado. Um resumo das principais propriedades de algumas nanoestruturas disponíveis para encapsulação de antimicrobianos estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Comparação de diferentes nanoestruturas.

Nanoestruturas	Características	Vantagens
Nanolipossomas	Vesículas contendo uma ou mais bicamadas de fosfolipídios, com núcleo aquoso	Produzido utilizando ingredientes naturais em escala industrial, podendo encapsular compostos com diferentes solubilidades
Nanopartículas metálicas	Composto de metais como cobre, prata, zinco, paládio, ou titânio, podendo ser utilizadas para produzir nanoestruturas com tamanho forma e porosidade variável	Pode ser facilmente incorporado em diversos materiais, entre eles produtos têxteis e plásticos
Nanofibras	Nanoestruturas com diâmetros pequenos e grandes áreas de superfície, que promove a melhoria de propriedades físicas, químicas e biológicas	Produzido a partir de diferentes materiais orgânicos e inorgânicos
Nanotubos	Os nanotubos são divididos em tubos de carbono de parede única ou duplos	Podem ser de composição orgânica ou inorgânica
Nanopartículas poliméricas	Dependendo do método de preparação, nanoesferas ou nanocápsulas podem ser obtidas, onde os compostos são dissolvidos, aprisionados, encapsulados ou ligados à matriz das nanopartículas	Preparo relativamente fácil, podendo formar complexos com polissacarídeos, lipídeos e outros polímeros

Fonte: Lopes e Brandelli, 2017.

2.2 Lipossomas: Estrutura e propriedades

Nanopartículas a base de lipídeos (composta por fosfolipídios, triacilglicerídeos, ácidos graxos, entre outros) são as mais utilizadas, uma vez que podem ser produzidas a partir de ingredientes naturais, podendo encapsular compostos com diferentes solubilidades e ser aplicados em nível industrial (Peters et al., 2011).

Lipossomas são vesículas de bicamada concêntricas, onde o volume aquoso está inteiramente fechado através de uma bicamada lipídica composta principalmente de fosfolipídios, sendo este o nome dado a lipídeos que possuem um resíduo de ácido fosfórico em sua estrutura. Tal molécula possui duas caudas hidrofóbicas ou apolares, compostas de hidrocarbonetos, e um grupo hidrofílico chamado de cabeça polar (Rawat et al., 2006). A Figura 2 mostra uma molécula de fosfatidilcolina, um tipo de fosfolipídio cujo grupo polar é a colina.

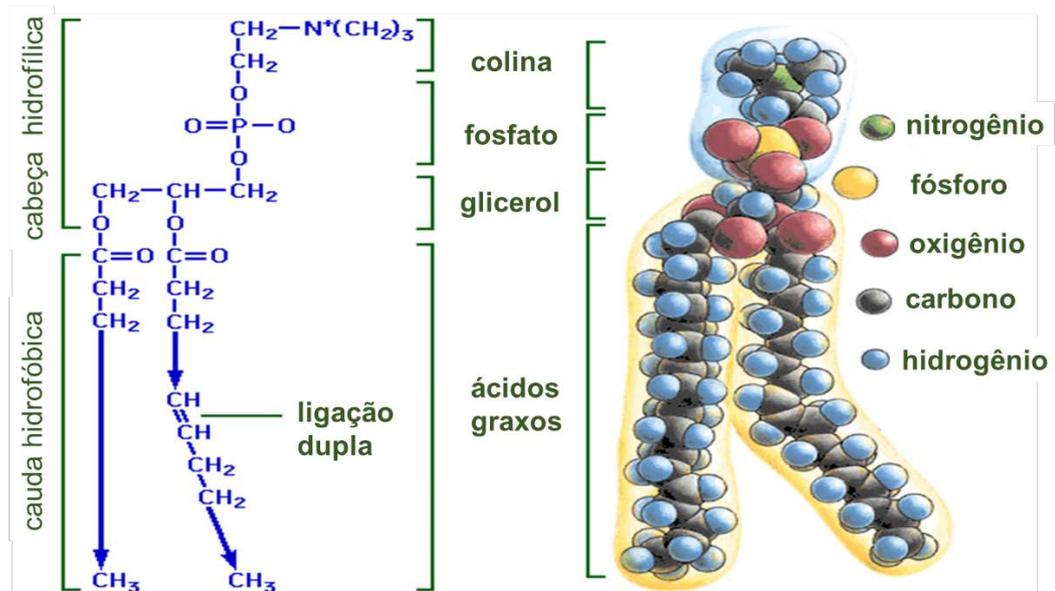


Fig. 2: Estrutura geral de um fosfolipídio (<http://www.madsci.org/posts/archives/2006-12/1164999854.Bc.r.html>).

As moléculas de fosfolipídios são insolúveis em água, porém, quando em ambientes aquosos, dependendo da concentração e da temperatura, formam dispersões e se ordenam em agregados, onde a parte hidrofílica fica em contato com a água, enquanto a parte hidrofóbica se localiza no interior da estrutura, formando as bicamadas lipídicas. Em solução aquosa, acima de uma determinada concentração, dependendo da temperatura, tais bicamadas lipídicas curvam-se sobre si mesmas dando origem aos lipossomas, onde os fosfolipídios encapsulam

parte do meio aquoso onde estão inseridos. A caracterização dos lipossomas é realizada pelo tamanho, carga da superfície e número de bicamadas (Rawat et al., 2006), podendo ser classificado nas categorias estruturais mostradas na Tabela 2 e representadas na Figura 3.

Tabela 2. Classificação dos lipossomas baseada em parâmetros estruturais.

Tipo de lipossoma	Diâmetro médio
Vesículas multilamelares (MLV)	Maior que 0,5 μm
Vesículas oligolamelares (OLV)	0,1-1,0 μm
Vesículas unilamelares (UV)	Não especificado
Vesículas unilamelares pequenas (SUV)	20-100 nm
Vesículas unilamelares grandes (LUV)	Maior que 100 nm
Vesículas unilamelares gigantes (GUV)	Maior que 1,0 μm
Vesículas multivesiculares (MVV)	Maior que 1,0 μm

Fonte: adaptado de Toniazzo, 2013.

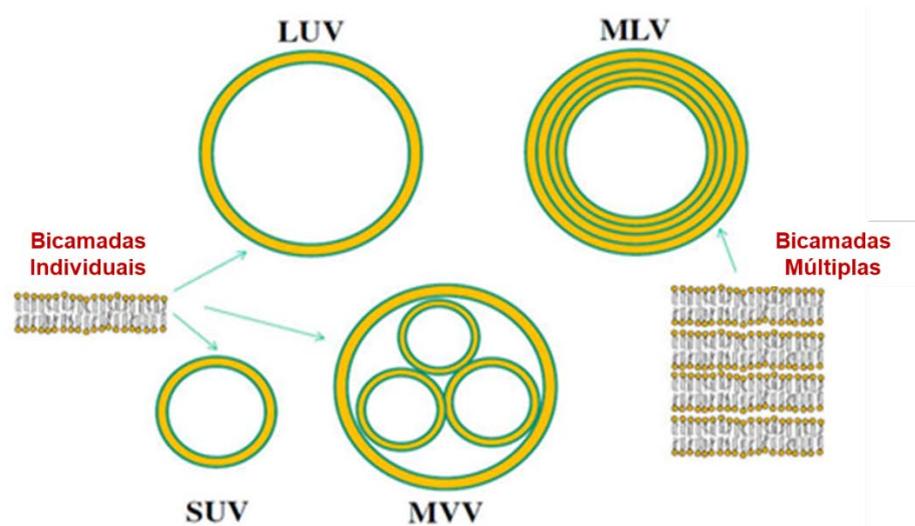


Fig. 3: Diferentes tipos de lipossomas formados a partir de bicamadas lipídicas. LUV: vesículas unilamelares grandes; MLV: vesículas multilamelares; SUV: vesículas unilamelares pequenas; MVV: vesículas multivesiculares. Fonte: (McClements, 2015).

Nanolipossomas são definidos como vesículas de bicamada lipídica (vesículas <30 ou 30-100 nm), que possuem e mantêm o tamanho nanométrico durante a aplicação e armazenamento. A característica comum de moléculas formadoras de bicamadas está na sua anfifilicidade, isto é, possuem regiões polares e não polares definidas, que podem reter, entregar e controlar a liberação de materiais solúveis em água e lipídeos, como apresentado na Figura 4 (Bouwmeester et al., 2009; Mozafari et al., 2006).

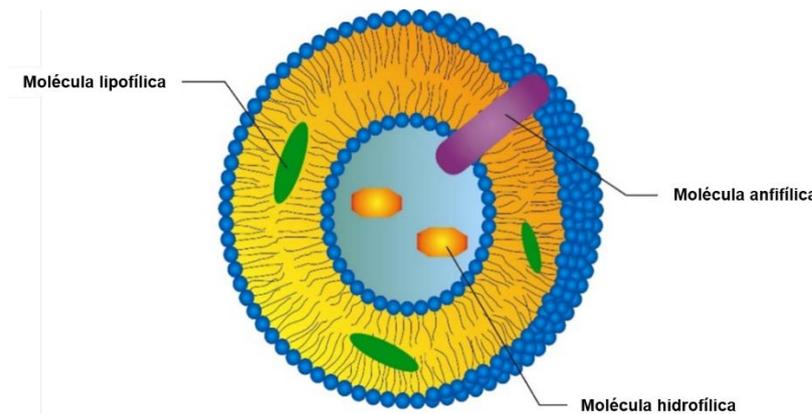


Fig. 4: Lipossoma formado por fosfolipídios em solução aquosa. Fonte: Brandelli, Lopes e Boelter, 2017.

A aparência das suspensões de lipossomas depende da sua estrutura, determinando o seu comportamento de dispersão de luz. Suspensões que possuem lipossomas pequenos se apresentam opticamente transparentes, devido ao fato de não dispersarem a luz fortemente, enquanto que as suspensões que contêm lipossomas maiores podem apresentar turbidez (Khlebtsov, 2001). As características elétricas dos lipossomas dependem do tipo e da concentração de fosfolipídios dentro da formulação, apresentando para a fosfatidilcolina grupos catiônicos e aniônicos ligados na sua cabeça hidrofílica. O grau de ionização dos grupos de cabeça varia de acordo com o pH, onde a carga da fosfatidilcolina pode ser negativa em valores altos de pH e positiva em pH baixo (McClements, 2015; Singh et al., 2012).

Alterações de pH podem reduzir as interações eletrostáticas e promover a agregação dos lipossomas, afetando a sua estabilidade. Para isso, alternativas tem sido utilizadas, como o revestimento da superfície das vesículas com certos polímeros, tais como polietileno glicol (PEG) e quitosana, ou através da utilização de ingredientes catiônicos/aniônicos na estrutura dos lipossomas. Assim, se torna desejável maximizar as forças de repulsão entre as vesículas para evitar a agregação e sedimentação das mesmas durante o armazenamento, aumentando sua

estabilidade. Em geral, as partículas com valores de potencial zeta maiores que +30 mV ou menores que -30 mV possuem maior estabilidade eletrostática (Mozafari et al., 2008).

2.3 Métodos de preparo

A formação de lipossomas e nanolipossomas não é um processo espontâneo. As vesículas lipídicas são formadas quando os fosfolípidios são colocados em água e, conseqüentemente, forma uma camada dupla ou uma série de bicamadas, cada uma separada por moléculas de água, uma vez que a energia adequada é fornecida (por exemplo, sob a forma de sonicação, homogeneização, aquecimento, etc.) (Mozafari et al., 2008). A escolha correta do método de preparação depende dos seguintes parâmetros (Gomez-Hens e Fernandez-Romero, 2006; Mozafari et al., 2008):

- Características físico-químicas do lipossoma e do material a ser encapsulado;
- Natureza do meio em que as vesículas estão dispersas;
- Concentração da substância encapsulada e sua potencial toxicidade;
- Processos adicionais envolvidos durante a aplicação das vesículas;
- Tamanho ótimo, polidispersividade e durabilidade das vesículas para a aplicação que se destina;
- Reprodutibilidade do lote, possibilidade de produção em larga escala de produtos seguros e eficientes.

Existem diversos tipos de métodos de preparo de lipossomas relatados na literatura, incluindo o método de hidratação do filme lipídico, evaporação em fase reversa, técnica de injeção de solvente e método de remoção de detergente. Além disso, algumas técnicas têm sido utilizadas para reduzir o tamanho dos lipossomas, como por exemplo, sonicação, extrusão de alta pressão e microfluidização. Alguns dos métodos mais importantes estão descritos a seguir (Huang et al., 2014; Patil e Jadhav, 2014):

Método de hidratação do filme lipídico: esse método baseia-se na solubilização de lipídeos em um solvente orgânico, seguida da etapa de evaporação desse solvente, resultando na formação de um filme lipídico seco no fundo de um balão de vidro. Esse filme é posteriormente hidratado, através da adição de um meio aquoso, sendo submetido ao processo de agitação, com a formação dos lipossomas (Figura 5).

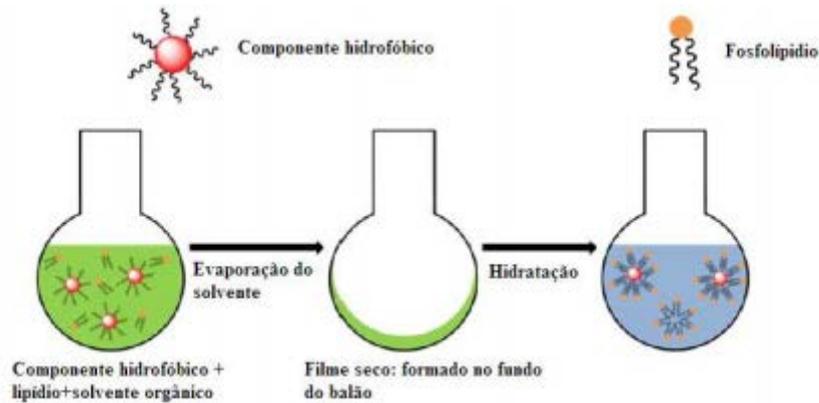


Fig. 5: Esquema do método de hidratação do filme lipídico (Toniazzi, 2013).

Evaporação em fase reversa: nesse método ocorre a mistura do fosfolípido em um solvente orgânico, sendo posteriormente adicionado uma solução aquosa contendo o composto bioativo. A mistura é homogeneizada através de sonicação, formando uma emulsão água-em-óleo. Em seguida, o solvente orgânico é evaporado, resultando na formação de um gel, que é submetido à agitação para a formação da dispersão dos lipossomas (Figura 6).

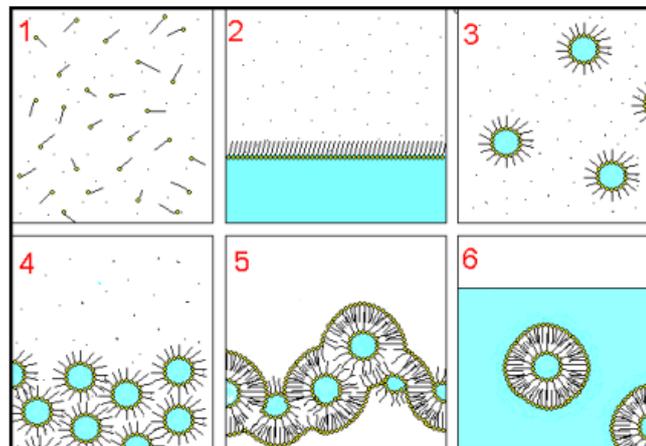


Fig. 6: Esquema para o processo de preparação de lipossomas por evaporação em fase reversa. 1: mistura do fosfolípido em solvente orgânico; 2: adição de solução aquosa contendo o composto bioativo; 3: sonicação; 4: formação de emulsão água-em-óleo. 5: formação de gel; 6: formação dos lipossomas (Mertins, 2004).

Pró-lipossomas: esse método se baseia no preparo de uma mistura de lipídios secos, com posterior hidratação desta mistura para a formação dos lipossomas do tipo MLV. Tais partículas secas podem ser produzidas por atomização, resultando em estruturas amorfas, muito mais

fácies de hidratar quando comparado com outros métodos convencionais de formação de lipossomas.

Método da injeção de etanol: nesse método uma solução de etanol contendo fosfolipídios é injetada em água pura, ou em uma solução aquosa. Durante esse processo, as fases aquosa e orgânica entram em contato, levando a diluição imediata do etanol na fase aquosa. Assim, se obtém a precipitação das moléculas, formando fragmentos de bicamadas lipídicas. Durante o processo ocorre agitação do sistema, onde as bicamadas lipídicas se organizam, levando a formação dos lipossomas (Figura 7).

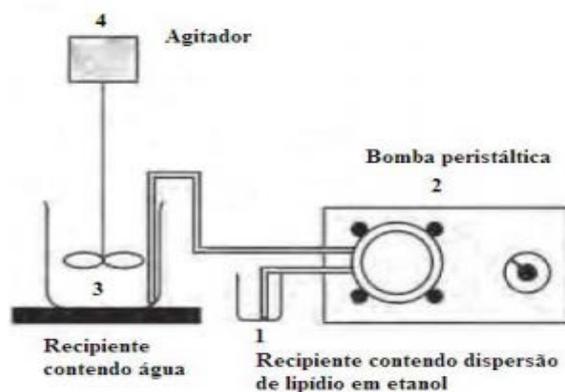


Fig. 7: Esquema da produção de lipossomas pelo método de injeção de etanol (Toniazzo, 2013).

Método de remoção de detergente: o método se baseia na solubilização de lipídios em detergente, formando micelas mistas de detergente/lipídio. A formação dos lipossomas ocorre quando o detergente é removido da solução, utilizando para isso técnicas como diálise. Esse método pode ser utilizado para formar uma grande variedade de tipos de lipossomas, possuindo a capacidade de produção de lipossomas com distribuição de tamanho homogênea.

De maneira complementar, a Tabela 3 apresenta as vantagens e desvantagens dos métodos de produção de lipossomas descritos no texto.

Tabela 3. Vantagens e desvantagens dos métodos convencionais de produção de lipossomas.

Método de preparo	Vantagens	Desvantagens
Pró-lipossomas	Componente bioativo previamente incorporado nas partículas de pró-lipossomas; alta eficiência de encapsulação; técnica simples e prática; facilidade para produção em grande escala	Formação de lipossomas com distribuição de diâmetros heterogêneos; somente formação de MLV
Hidratação do filme lipídico seco	Processo simples	Longo período na etapa de remoção do solvente; produção em pequena escala; baixa eficiência de encapsulação
Injeção de etanol	Processo relativamente simples	Resíduo do solvente orgânico
Remoção de Detergente	Projeto simples; controle do tamanho das partículas, dispersão homogênea	Resíduo de detergente; longo tempo de processo; baixo rendimento
Evaporação em fase reversa	Alta eficiência de encapsulação	Resíduo de solvente orgânico

Fonte: adaptado de Maherani et al. (2011).

2.4 Métodos de caracterização

O comportamento de lipossomas, tanto em relação à estabilidade de armazenamento, como em meios biológicos, é determinado por fatores como tamanho de partícula, carga de superfície, concentração de amostra e pelas propriedades da solução. Desta forma, é fundamental a determinação e controle de tais parâmetros para assegurar a eficiência e a estabilidade das formulações dos lipossomas (Lopes, 2014). Alguns métodos relevantes utilizados para caracterização de lipossomas são descritos abaixo.

2.4.1 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (Dynamic Light Scattering, DLS) é amplamente utilizada para medir o tamanho e a distribuição do tamanho de partículas em suspensão. O espalhamento da luz está relacionado ao movimento Browniano das partículas, de modo que a intensidade da luz espalhada por estas, forma um padrão de movimento. Este movimento em suspensão faz com que a luz laser incidida nas partículas seja espalhada em diferentes intensidades (Lopes, 2014).

O princípio deste método consiste em relacionar a velocidade de difusão das partículas provocada pelos seus movimentos Brownianos com o tamanho das mesmas. A intensidade de dispersão da luz detectada está diretamente relacionada com a velocidade de difusão das partículas e conseqüentemente, com o tamanho destas. Partículas menores se movimentam mais rapidamente e causam rápidas modificações no espalhamento da luz. Por outro lado, partículas de maior diâmetro, as quais possuem menores coeficientes de difusão, resultam em menores flutuações na intensidade do espalhamento da luz (Delgado, 2013; Lopes, 2014).

Outro parâmetro calculado através dessa técnica é o índice de polidispersão (PDI), que consiste em uma análise da função de autocorrelação da intensidade de dispersão de luz. Para isso, um único tamanho de partícula é assumido e um ajuste exponencial simples é aplicado à função de autocorrelação. Assim, os valores de PDI são utilizados para descrever a largura da distribuição de tamanho das partículas (Delgado, 2013).

2.4.2 Potencial Zeta

A maioria das partículas dispersas em meio aquoso, tende a adquirir uma carga elétrica superficial, devido à natureza química dos constituintes da partícula e do próprio meio de dispersão. A presença dessas cargas afeta a distribuição de íons que estão em uma região muito próxima da partícula (interface entre a superfície da partícula e o meio de suspensão), promovendo o acúmulo de íons de carga oposta à carga da superfície, na região que cerca a partícula. Esses íons acabam formando uma “camada elétrica” que reveste a partícula e a mesma é dividida em duas partes (Figura 8): uma camada interna, onde os íons estão fortemente ligados à partícula, e uma camada externa, onde os íons difundem e estão fracamente ligados (Mertins, 2008).

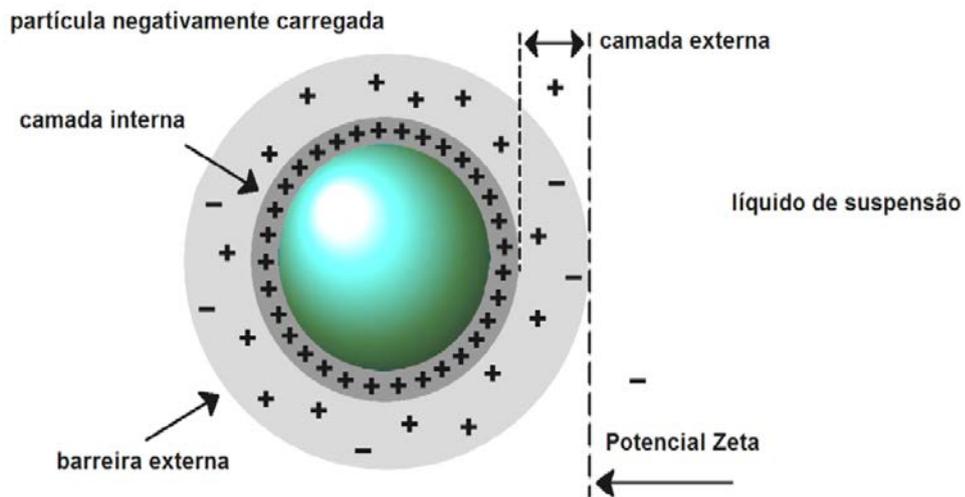


Fig. 8: Representação esquemática do potencial zeta (Mertins, 2008).

As medições do potencial zeta são comumente utilizadas para avaliar as interações repulsivas entre as partículas e prever a estabilidade dos sistemas coloidais. Valores de potencial zeta elevados (negativa ou positivamente) indicam que haverá repulsão entre as partículas, reduzindo assim a tendência de agregação das mesmas. Dispersões coloidais com valores de potencial zeta em torno de ± 30 mV são geralmente consideradas estáveis (Laouini et al., 2012).

O método utilizado para determinar o potencial zeta dos lipossomas consiste na incidência de um feixe de luz e aplicação de um campo elétrico de força conhecida através da amostra. Com isso, as partículas carregadas se deslocam com velocidades distintas induzindo deslocamentos da frequência do feixe de luz incidente, gerando um espectro de frequências, que são então utilizadas para os cálculos das velocidades, as quais são convertidas para valores de mobilidades eletroforéticas (Lopes, 2014).

2.4.3 Eficiência de encapsulação (EE)

A caracterização dos lipossomas através da determinação da eficiência de encapsulação é de extrema importância, uma vez que a eficácia de lipossomas *in vivo*, bem como suas propriedades físico-químicas depende do total de composto ativo incorporado às nanoestruturas (Lopes, 2014).

A obtenção de valores elevados de EE é importante, podendo ser alcançada pela escolha correta do método de encapsulação. Diferentes métodos são utilizados na quantificação dos teores de material encapsulado, entre eles: espectrofotometria, espectroscopia de fluorescência, métodos enzimáticos, técnicas eletroquímicas e cromatografia líquida de alta eficiência

(Edwards e Baeumner, 2006; Pinilla e Brandelli, 2016). Segundo Laouini et al. (2012), essas técnicas podem ser empregadas também para monitorar a estabilidade de armazenamento de lipossomas em relação à retenção/liberação do material encapsulado ao longo do tempo.

2.4.4 Espalhamento de raios-x a baixo ângulo (SAXS)

Os fosfolipídios, componentes das bicamadas dos lipossomas, são moléculas anfifílicas que, quando dispersos em água, podem formar diferentes fases. Dependendo da temperatura, geometria molecular dos lipídeos e as condições da mistura lipídeo/água, essas moléculas podem se organizar de diferentes formas, podendo ser classificados principalmente em fase lamelar, fase cúbica e fase hexagonal, de acordo com suas diferentes estruturas internas (Koynova e Tenchov, 2013).

As fases lamelares são classificadas em lamelar cristalina (L_c), lamelar gel (L_β) e lamelar fluida (L_α). Em determinadas temperaturas ocorrem transições de fases dos lipídeos, sendo que a principal transição ocorre quando a membrana lipídica passa de uma fase lamelar ordenada rígida (L_β) para uma fase lamelar fluida (L_α), momento no qual há um elevado grau de liberdade das moléculas. Com o aumento da temperatura, outras transições de fase podem ocorrer a partir da fase lamelar fluida. Essas transições são relativas à transição de uma fase lamelar para fases não lamelares. A sequência das fases não lamelares geralmente se inicia com a fase cúbica invertida (Q_{II}), onde três fases distintas podem ser identificadas: $Pn3m$, $Ia3d$ e $Im3m$, passando para a fase hexagonal invertida (H_{II}), como ilustrado na Figura 9. Entre essas fases, a cúbica e a hexagonal receberam atenção considerável devido às suas estruturas internas altamente ordenadas, capazes de sustentar a liberação lenta de compostos bioativos com diferentes tamanhos e polaridades (Chen, Ma e Gui, 2014; Guo et al., 2010; Koynova e Tenchov, 2013).

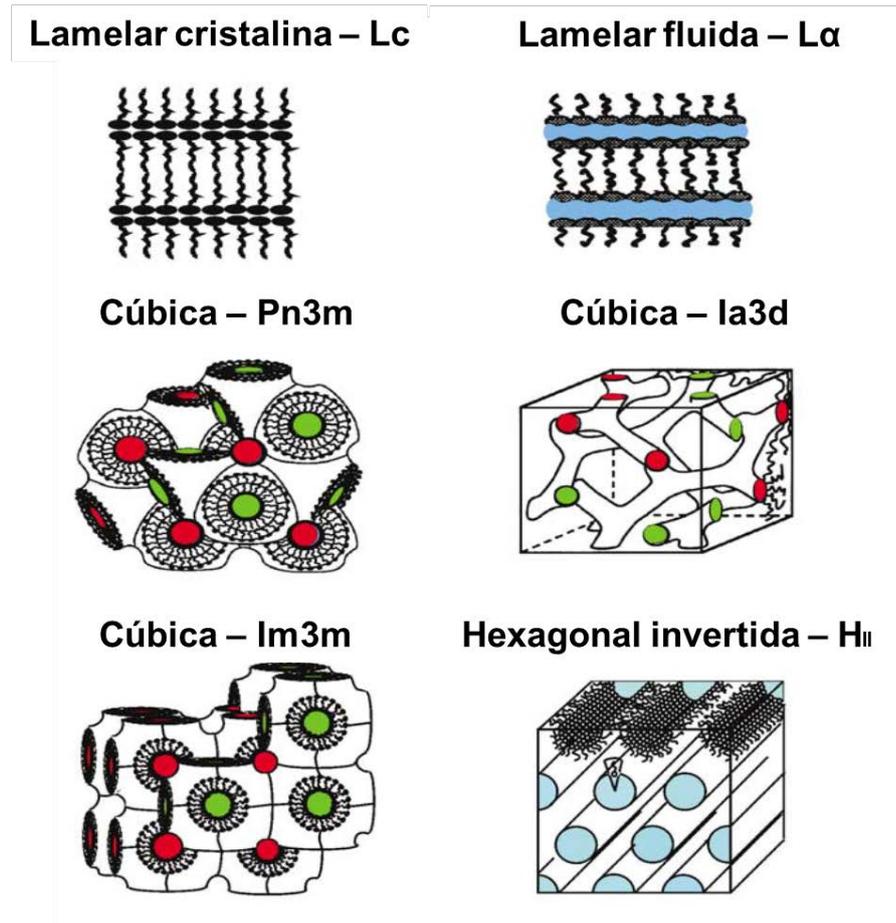


Fig. 9: Representação esquemática das fases lamelar, cúbica e hexagonal (Caffrey, 2003).

A determinação das transições de fase da membrana lipídica é importante, uma vez que esses parâmetros influenciam a estabilidade dos lipossomas nos sistemas biológicos. Diferentes métodos físicos são empregados na investigação das transições de fase dos fosfolipídios, entre eles, o emprego da técnica de espalhamento de raios-x, que visa compreender os mecanismos de associação do composto encapsulado aos lipossomas, bem como para o entendimento da estabilidade desses nanossistemas (Lopes, 2014).

Os raios-x, utilizados nos estudos de análise estrutural, podem ser obtidos a partir de fontes de luz síncroton. Essa fonte de luz emite a radiação por elétrons ou pósitrons em velocidade próxima à velocidade da luz, através de um anel circular. Quando acelerados radialmente, os elétrons emitem a radiação síncroton, durante a passagem por campos magnéticos colocados em alguns pontos da trajetória do anel de armazenamento. A obtenção de padrões de difração com elevado grau de informação é permitida pela radiação síncroton, que possui fluxo de algumas ordens de grandeza maior (aproximadamente 10^{12} fótons/s) que as demais fontes (Dong e Boyd, 2011).

O espalhamento de raios-x a baixo ângulo (SAXS) consiste em uma técnica fundamental para o estudo da organização de sistemas vesiculares em nível molecular. A interação da radiação com a estrutura eletrônica e o seu subsequente espalhamento oferece informações detalhadas de aspectos estruturais que dificilmente poderiam ser obtidas por outras técnicas (Mertins, 2008). A análise do SAXS permite a obtenção de informações referentes às mudanças estruturais dos lipossomas, desencadeadas após um estímulo específico (pH, temperatura, luz, etc.), o qual pode estar relacionado à desestruturação dos lipossomas com consequente liberação do material encapsulado (Dong e Boyd, 2011).

As análises de SAXS são utilizadas para medir a intensidade de raios-X dispersos em ângulos, que pode ser expresso pelo comprimento do vector de espalhamento q :

$$q = \left(\frac{4\pi}{\lambda}\right) \sin \frac{\theta}{2}$$

onde θ é o ângulo de incidência e λ é o comprimento de onda do feixe de raios-X incidente (Lindblom e Rilfors, 1989). O ordenamento das bicamadas fornece razões de reflexão de Bragg, mostrando valores típicos para o espaçamento das reflexões dos raios-X característicos das mesofases (Tabela 4), permitindo a identificação das fases formadas nos lipossomas.

Tabela 4. Mesofases e índices de picos correspondentes observados utilizando SAXS.

Mesofases	Razões características para os diferentes espaçamentos
Lamelar	1:2:3:4:5:6:7...
Hexagonal	1: $\sqrt{3}$:2: $\sqrt{7}$:3: $\sqrt{12}$: $\sqrt{13}$...
Cúbica (Im3m)	1: $\sqrt{2}$:2: $\sqrt{6}$: $\sqrt{8}$: $\sqrt{10}$...
Cúbica (Pn3m)	1: $\sqrt{2}$: $\sqrt{3}$:2: $\sqrt{6}$: $\sqrt{8}$:3...
Cúbica (Ia3d)	1: $\sqrt{3}$:2: $\sqrt{10}$: $\sqrt{11}$...

Fonte: Lindblom e Rilfors, 1989.

2.5 Aplicação dos lipossomas em alimentos

A crescente aplicação de lipossomas na área alimentícia é devida às vantagens que os lipossomas podem fornecer ao serem usados como sistemas para encapsulação de substâncias bioativas, como a proteção de tais substâncias contra alterações químicas e enzimáticas, bem como variação da temperatura e da força iônica (Mozafari et al., 2008). A maioria das técnicas de encapsulação aplicadas na indústria de alimentos são baseadas em matrizes de biopolímeros

como amidos, gomas, proteínas, dextrinas e alginatos. A utilização de lipossomas para a liberação controlada de componentes funcionais, tais como peptídeos, enzimas e vitaminas têm motivado diferentes pesquisas (Taylor et al., 2005; Malheiros, Daroit e Brandelli, 2010).

Um dos primeiros relatos da aplicação de lipossomas em alimentos foi na fabricação de queijos (Law e King, 1985), com o objetivo de diminuir o tempo e custo de maturação. Para isso, foram adicionadas proteinases encapsuladas em lipossomas na mistura do queijo, demonstrando que a atividade e a estabilidade das enzimas foram melhores com a encapsulação, além de melhorar o sabor do queijo e diminuir os custos de produção.

Lee et al. (2000) encapsularam a enzima bromelina, utilizada no amaciamento de carnes, avaliando que a estabilidade e a biodisponibilidade da enzima aumentaram significativamente com a encapsulação em lipossomas. Rao et al. (1995) utilizaram a encapsulação de β -galactosidase em lipossomas, com o objetivo de auxiliar a digestão de alimentos lácteos, demonstrando que os lipossomas podem estabilizar a enzima durante o armazenamento.

Toniazzo et al. (2014) estudaram a encapsulação de β -caroteno em lipossomas para a aplicação em iogurte. Os lipossomas foram capazes de proteger o β -caroteno da degradação por um período de até 95 dias e, quando aplicados nos iogurtes, mostraram que a textura não foi afetada, sugerindo que parte dos corantes artificiais poderia ser substituída pelos lipossomas encapsulando β -caroteno.

Lipossomas foram estudados como transportadores de vitamina C e E, com o objetivo de serem incorporados em suco de laranja. A combinação de formulações de lipossomas e vitaminas não alterou as características organolépticas do suco de laranja, além disso, mostrou estabilidade microbiológica após a pasteurização e armazenamento a 4°C, por 37 dias (Marsanasco et al., 2011).

Peptídeos antimicrobianos têm sido extensivamente estudados como potenciais bioconservantes, porém, sua atividade antimicrobiana pode ter seu efeito diminuído devido à degradação proteolítica e a interação do peptídeo antimicrobiano com os componentes alimentares. A encapsulação de bacteriocinas em lipossomas pode ser uma alternativa para sobrepor esse problema (Maherani et al., 2011).

Malheiros, Daroit e Brandelli (2012) investigaram a eficácia da nisina livre e encapsulada em nanolipossomas para o controle de *Listeria monocytogenes* em queijo minas frescal. Para isso a nisina comercial foi encapsulada em lipossomas de lecitina de soja parcialmente purificada. Os resultados mostraram efeito bactericida com 0,25 mg/mL de nisina livre; efeito bacteriostático para nisina encapsulada em lipossomas e com 0,1 mg/mL de nisina livre.

O peptídeo antimicrobiano P34 foi encapsulado em lipossomas, preparados com fosfatidilcolina de soja parcialmente purificada. Os resultados apresentaram alta eficiência de encapsulação e estabilidade durante o armazenamento, além de apresentar ação contra a bactéria patogênica *L. monocytogenes*. O estudo sugere que a encapsulação deste peptídeo pode ter potencial para uso como conservante alimentar (Malheiros et al., 2011).

A encapsulação de pediocina em nanolipossomas foi avaliada por Mello et al. (2013). Os lipossomas obtidos apresentaram elevada eficiência de encapsulação e boa estabilidade, demonstrando potencial para aplicação em alimentos. A aplicação de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a para a conservação de alimentos foi estudada por Malheiros, Cuccovia e Franco (2016). A encapsulação em lipossomas foi eficaz e retardou o crescimento de *L. monocytogenes* por 5 dias em leite de cabra UHT armazenado a 7 °C.

2.6 Biopolímeros

A utilização de biopolímeros em sistemas de liberação controlada têm recebido muita atenção, devido a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, possuindo a vantagem de serem incorporados numa vasta gama de produtos comerciais (Hu et al., 2015; Khaksar et al., 2014).

A quitosana é um biopolímero muito empregado no revestimento de nanopartículas. A caracterização de nanovesículas contendo fosfatidilcolina de soja e o polissacarídeo quitosana foi realizada por Mertins et al. (2006), onde as nanovesículas foram preparadas através do método de evaporação em fase reversa. O raio hidrodinâmico das nanovesículas variou entre 106 e 287 nm, dependendo do conteúdo de quitosana e o tamanho de filtro utilizado. A obtenção de vesículas esféricas em escala manométrica foi alcançada com o uso de filtros 0,45 µm.

Lipossomas revestidos com quitosana representam uma alternativa aos lipossomas convencionais, pois apresentam melhor estabilidade e bioadesividade. Gonçalves et al. (2012) desenvolveram e avaliaram estabilidade físico-química de melatonina encapsulada em lipossomas com quitosana. Os resultados demonstraram que a encapsulação em lipossomas é viável e com boa eficiência. A quitosana melhorou a estabilidade dos lipossomas encapsulando melatonina, além de fornecer nanoestruturas melhor organizadas, devido a redução da espessura da bicamada.

Hasan et al. (2016) encapsularam curcumina em nanolipossomas contendo quitosana, mostrando que a adição de quitosana aumentou significativamente a estabilidade dos lipossomas. Silva et al. (2014) desenvolveram nanolipossomas revestidos com o biopolímero

quitosana ou sulfato de condroitina, demonstrando que a formulação com quitosana foi mais estável e eficiente na inibição de *L. monocytogenes* quando comparado com a formulação que utilizava o sulfato de condroitina.

Muitos relatos da literatura apontam para os benefícios que a adição do biopolímero quitosana pode fornecer ao ser adicionado como revestimento de nanopartículas, estimulando a busca por outros polímeros que possam estabilizar lipossomas.

2.6.1 Pectina

Propriedades únicas da pectina, como a flexibilidade, não toxicidade e baixo custo, torna esse polímero um candidato ideal para muitas práticas em diferentes áreas da ciência (Khazaei, Khazaei e Rahmati 2015). A pectina é um biopolímero aniônico extraído de diferentes fontes, principalmente de frutos cítricos ou maçã. A estrutura da pectina é heterogênea e possui uma ampla gama de massa molecular (50.000 a 150.000). A pectina é um polissacarídeo linear que consiste de unidades de ácido galacturônico com pequenas quantidades de açúcares neutros, onde os monômeros estão unidos por ligações α 1,4. Além disso, sugere-se que as moléculas de pectina possuem regiões galacturônicas longas e regulares (*smooth*), e regiões ricas em ramnose (*hairy*) que transportam açúcares como cadeias laterais (Figura 10), formadas por moléculas de arabinose, galactose e xilose, ligados covalentemente aos carbonos 2 e 3 dos resíduos de ácido galacturônico ou ao carbono 4 dos resíduos de ramnose. Os grupos carboxílicos dos ácidos galacturônicos podem ser parcialmente esterificados com grupamentos metil e parcialmente ou completamente neutralizados por íons sódio, potássio ou amônio (Kjønksen, Hiorth e Nyström 2005; Monsoor, Kalapathy e Proctor 2001).

Pectinas são geralmente classificadas de acordo com seu grau de metoxilação (DM), definido como a porcentagem de resíduos de ácido galacturônico que são metilesterificados, sendo esse um parâmetro chave na determinação da funcionalidade da pectina. Pectinas com DM superior a 50% são classificadas como pectinas de alto teor de éster metílico (HM), enquanto que pectinas com DM inferior a 50% são classificadas como pectinas de baixo teor de éster metílico (LM) (Ventura e Bianco-Peled, 2015).

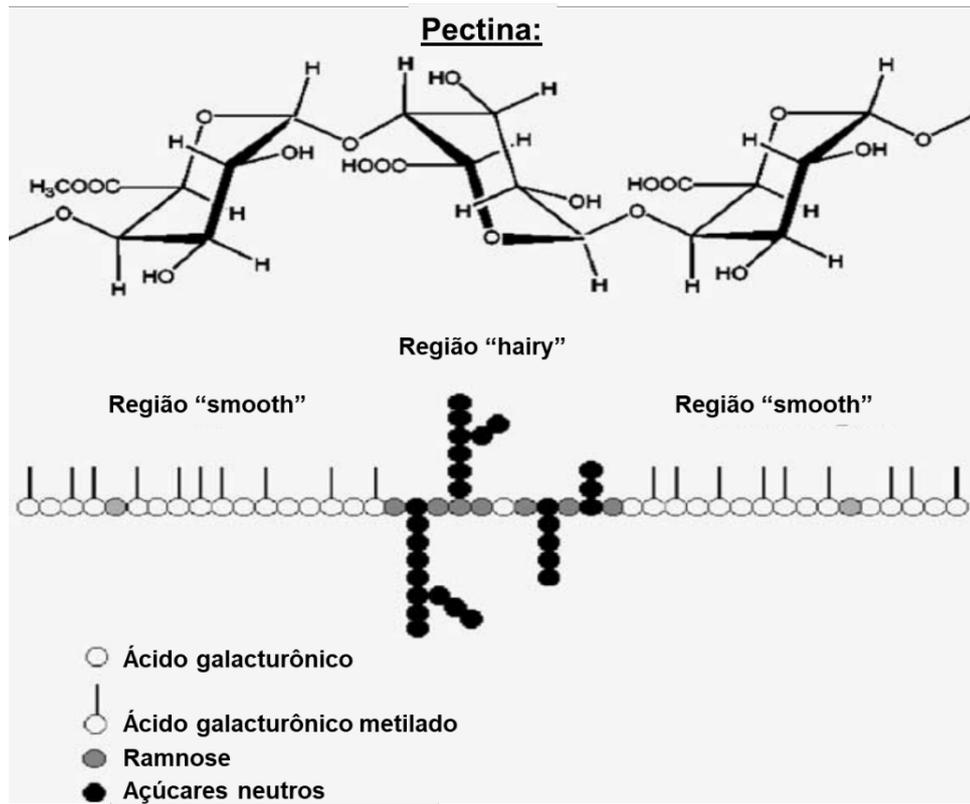


Fig. 10: Estrutura química da pectina (Kjønicksen, Hiorth and Nyström 2005).

O conteúdo de metoxila pode variar com a origem da pectina, sendo que a variação que ocorre em frutas está condicionada ao seu desenvolvimento e amadurecimento. As pectinas fazem parte de um grupo de substâncias, denominadas de substâncias pécnicas, onde estão incluídos o ácido pécnico, ácido pectínico e protopectina, apresentando-se como um polissacarídeo complexo de alto peso molecular (Kashyap et al., 2001).

O ácido pécnico é considerado o componente mais simples das substâncias pécnicas, sendo composto de unidades de ácido galacturônico combinados por ligações α - glicosídicas (Figura 11a). Ácidos pectínicos possuem estruturas similares aos ácidos pécnicos, diferenciando-se por apresentar algumas unidades de ácidos galacturônicos esterificados (Figura 11b). A combinação da pectina com a celulose e hemicelulose, as quais também se apresentam como componentes do material estrutural da parede celular dos vegetais através de ligações covalentes, origina a protopectina. A protopectina, por sua vez, pode ser facilmente atacada por ácidos diluídos, liberando a pectina (Kashyap et al., 2001).

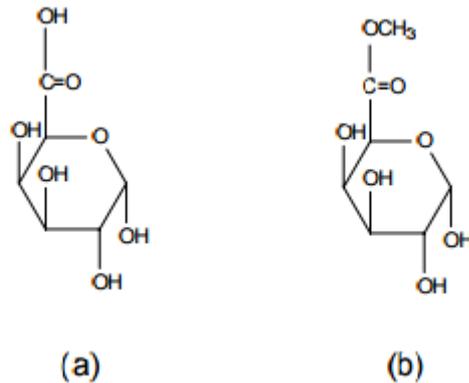


Fig. 11: Estruturas de unidades do ácido galacturônico (a) e ácido galacturônico esterificado (b) (Bobbio, 1989).

Na literatura é possível encontrar trabalhos com a utilização de diferentes biopolímeros, entre eles a pectina, para o desenvolvimento de nanopartículas. Essas nanopartículas são desenvolvidas com o objetivo de encapsular compostos antimicrobianos e substâncias ativas. O uso de três tipos de pectina (ácido péctico, pectina de alto e baixo grau de esterificação) foi testado por Krivorotova et al. (2016) para a formação de nanopartículas carregadas com nisina. O estudo mostrou que o grau de metoxilação da pectina influenciou a eficiência de carregamento da nisina e o tamanho das nanopartículas formadas. As nanopartículas contendo nisina apresentaram atividade antimicrobiana dependente do biopolímero utilizado, sendo considerado o ácido péctico a formulação mais adequada para aplicação na indústria como sistema antimicrobiano.

A mistura de alginato com pectina de alta metoxilação para a produção de micropartículas foi realizada por Khaksar et al. (2014), visando a liberação controlada de nisina. Os resultados mostraram que o teor de nisina teve influência significativa na eficiência de encapsulação e no tamanho das micropartículas, apresentando valores de 47-54% e 57-131 μm , respectivamente. Além disso, os estudos de liberação *in vitro* indicaram que o teor de nisina nas micropartículas influenciou sua taxa de liberação, apresentando-se mais elevada quando utilizadas concentrações mais baixas de nisina nas micropartículas.

Nanopartículas preparadas com pectina e zeína (Hu et al., 2015) foram utilizadas para a encapsulação de curcumina, apresentando elevada eficiência de encapsulação (>86%), além do tamanho de partícula relativamente pequeno (250 nm) e índice de polidispersividade de 0,24. Através da análise de infravermelho foi possível concluir que a curcumina encapsulada interagiu com a zeína através de interações hidrofóbicas. O estudo sugere que essas

nanopartículas podem ser aplicadas em alimentos e bebidas funcionais, bem como suplementos dietéticos e produtos farmacêuticos.

Burapapadh, Takeuchi e Sriamornsak (2015) desenvolveram um método simples de produção de nanopartículas com pectina para a encapsulação de itraconazol, um antifúngico utilizado na indústria farmacêutica. Através do método de homogeneização mecânica foi possível produzir nanopartículas com pectina que apresentaram elevada porcentagem de fármaco dissolvido (60-80%) e mantiveram boas propriedades de dissolução, mesmo após o armazenamento por 1 ano. Os resultados sugerem que as nanopartículas de pectina preparadas a partir de nanoemulsões poderiam ser utilizadas como transportador eficaz no melhoramento da dissolução de itraconazol.

2.7 Antimicrobianos naturais

2.7.1 Nisina

O antimicrobiano nisina é uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis*, pertencente à família de lantibióticos, na qual contém grupos de lantionina e metil lantionina. A nisina é um peptídeo antimicrobiano catiônico e anfifílico, que possui ponto isoelétrico acima de 8,5 e tem sido utilizado como conservante em alimentos, por ser eficiente em baixo pH e a altas temperaturas (Meira et al., 2015; Salmieri et al., 2014).

A nisina é um polipeptídeo pequeno, com 34 aminoácidos, que apresenta as variantes A, Z, M, Q, que são derivados de *Lactococcus lactis*, enquanto os tipos U e U2 são obtidos a partir de *Streptococcus uberis*, e nisina P é produzida por *Streptococcus suis* e *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* (Qi et al., 2012; Wu et al., 2014). As variantes A e Z diferem por um único aminoácido na posição 27, sendo histidina em nisina A, e asparagina em nisina Z. Dentre esses tipos, a nisina A é considerado o mais ativo contra patógenos (Prombutara et al., 2012).

Diferentes tipos de concentrados de nisina são comercialmente produzidos e adicionados a alimentos para controlar as bactérias patogênicas em produtos como leite, queijos pasteurizados, molhos e molhos para salada, apresentando características ideais para um aditivo alimentício, na medida em que não apresenta efeitos sobre a microbiota normal do intestino, é atóxica, não afeta a cor ou sabor dos alimentos e apresenta estabilidade térmica (Gálvez et al., 2007). O Nisaplin™ é um produto comercial, estabelecido no mercado, composto por 2,5%

nisina A, 77,5% NaCl e leite desidratado isento de gordura (12% de proteína e 6% de carboidratos) e é normalmente utilizado como conservante na indústria de alimentos (Guiga et al., 2010).

A nisina tem recebido atenção particular devido a sua grande atividade antimicrobiana contra uma ampla variedade de bactérias Gram-positivas, entre elas patógenos de origem alimentar, como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, bem como a inibição eficaz de esporos de *Bacillus* e *Clostridium*. Esse peptídeo é considerado um aditivo alimentar (E234) seguro para o uso em alimentos, sendo aprovado pela Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO). Também faz parte da lista do FDA e é um aditivo geralmente reconhecido como seguro (GRAS) (Ibarguren et al., 2014; Salmieri et al., 2014).

A ingestão diária permitida pela FAO/WHO é de até 33.000 unidades de nisina por 70 kg de peso corporal, sendo que esse valor pode variar dependendo de cada país. Austrália, Grã-Bretanha e França não estipulam limite máximo de ingestão para a nisina, enquanto que nos EUA, o limite máximo é de 10.000 UI/g; na Rússia 8000 UI/g, e para a Argentina, Itália e México, o limite é de 500 UI/g, para os queijos e alimentos processados (Chen e Hoover, 2003). No Brasil, a nisina tem o seu uso permitido pela Legislação Brasileira (DETEN/MS nº 29, de 22 de janeiro de 1996) com a função de conservador para queijos pasteurizados no limite máximo de 12,5 mg/kg (500 UI/g).

A introdução direta de agentes antimicrobianos em produtos alimentares, entre eles a utilização de nisina em sua forma livre (não encapsulada), está associada com a perda de atividade devido à degradação e possível interação entre os diferentes componentes dos alimentos. Atualmente, alguns novos métodos de encapsulamento foram desenvolvidos com o objetivo de superar essas limitações, podendo melhorar a atividade antimicrobiana e a estabilidade desses conservantes em sistemas complexos (Ibarguren et al., 2014; Imran et al., 2015). Prombutara et al. (2012) encapsularam nisina em nanopartículas lipídicas sólidas, produzidas por homogeneização a alta pressão, com o objetivo de proteger e prolongar a atividade biológica da nisina. As nanopartículas apresentaram liberação controlada da nisina, inibindo a multiplicação de *Listeria monocytogenes* DMST 2871 e *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 durante 15-20 dias, enquanto que a nisina livre mostrou inibição por apenas três dias com as mesmas bactérias.

Malheiros, Daroit e Brandelli (2012) investigaram a eficácia da nisina livre e encapsulada no controle de *Listeria monocytogenes* em queijo minas frescal. Nisina comercial foi encapsulada em lipossomas de lecitina de soja parcialmente purificada, apresentando efeito bactericida com 0,25 mg/mL de nisina livre e efeito bacteriostático com nisina encapsulada em

lipossomas e com 0,1 mg/mL de nisina livre. Silva et al., (2014) avaliaram a atividade antimicrobiana da nisina encapsulada em nanovesículas contendo polissacarídeos. A nisina foi encapsulada em lipossomas de fosfatidilcolina adicionados de quitosana ou de sulfato de condroitina, através do método de hidratação de filme e testados quanto a atividade antimicrobiana contra *Listeria* spp. A nisina encapsulada apresentou eficácia semelhante a nisina livre na inibição de *Listeria* spp. isolada de carcaça bovina, e maior eficiência na inibição de *Listeria monocytogenes*. A formulação contendo quitosana mostrou-se mais estável e eficiente na inibição de *L. monocytogenes*, quando comparada com outras nanovesículas testadas.

Nanocápsulas de quitosana e carragenina foram preparadas por Chopra et al. (2014) utilizando o método de complexação iônica, para a liberação controlada e sustentada da nisina. Dentre as formulações testadas, a que apresentou os melhores parâmetros foi a que continha 10,0 mg/mL de quitosana, 0,75 mg/mL de carragenina e 1,0 mg/mL de surfactante. As nanocápsulas apresentaram atividade antimicrobiana contra diferentes micro-organismos, entre eles *Micrococcus luteus* MTCC 1809, *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 424, *Salmonella enterica* MTCC 1253 e *Enterobacter aerogenes* MTCC2823, e quando incorporadas em suco de tomate fresco demonstrou ação por até seis meses.

Filmes nanocompósitos de poli (ácido lático) contendo nanocristais de celulose (PLA-CNC) foram preparados pelo método de revestimento por adsorção, usando a nisina como agente antimicrobiano. Esses filmes foram introduzidos em embalagens que continham presunto cozido e estocados por 14 dias a 4 °C, mostrando-se estável neste período e apresentando inibição eficiente contra *L. monocytogenes* (Salmieri et al. 2014).

2.7.2 Lisozima

Lisozima é um antimicrobiano natural que pode ser derivado de ovos, plantas, bactérias e secreções animais (Were et al., 2003). Segundo Bugatti, Sorrentino e Gorrasi (2017), a União Européia classifica a lisozima como uma molécula com atividade bacteriostática, bacteriolítica e bactericida, e a Food and Drug Administration considera essa proteína uma substância GRAS.

A lisozima é uma molécula alcalina, com ponto isoelétrico de 11.35, e sua estrutura química é caracterizada por uma única cadeia polipeptídica com massa molecular de 14,6 kDa. A atividade antimicrobiana desta enzima está relacionada com a capacidade de hidrolisar as ligações β 1,4- glicosídicas entre o ácido *N*-acetilmurâmico e a *N*-acetilglicosamina. Tais ligações estão presentes nos peptidoglicanos, que compreendem 90% da parede celular das

bactérias Gram-positivas, tornando-as muito suscetíveis à atividade antimicrobiana da lisozima (Bugatti, Sorrentino e Gorrasi, 2017; Liu et al., 2013). As bactérias Gram-negativas são menos propensas a ação da lisozima, pois são protegidas pela membrana externa, se tornando relativamente resistente às atividades antimicrobianas da lisozima (Bermudez e Forciniti, 2004). No entanto, a lisozima de ovo de galinha quando desnaturada, por meio de aquecimento e mudanças de pH, podem tornar-se efetivas contra bactérias Gram-negativas, sugerindo uma ação antimicrobiana independente da função catalítica, podendo ser atribuída à ligação da membrana e subsequente perturbação das funções da membrana (Ibrahim et al., 1996).

Devido à sua atividade antibacteriana, a lisozima tem recebido atenção considerável na indústria de alimentos (Venkataramani, Truntzer e Coleman, 2013). Comercialmente, a lisozima tem sido utilizada para inibir o crescimento de *Clostridium tyrobutyricum* em queijo (Chung e Hancock, 2000; Were et al., 2003) com o objetivo de reduzir a deformação do alimento devido à formação de gases fermentativos, resultantes do crescimento microbiano. Sua utilização também foi estudada na produção de vinho, com o objetivo de prevenir a fermentação heterolática durante o envelhecimento do produto, visto que a lisozima é capaz de controlar o crescimento de bactérias ácido lácticas, responsáveis por essa fermentação (Lasanta et al., 2010).

Além disso, estudos estão sendo realizados visando aumentar a capacidade lítica da lisozima, promovendo a ação contra bactérias Gram-negativas. O efeito sinérgico da lisozima com outros conservantes, tem resultado em uma significativa melhora no seu espectro de ação. Em muitos casos, a combinação de lisozima com alguns conservantes naturais tem tido um desempenho melhor em relação à enzima sozinha. Combinações de lisozima e nisina foram testadas em sistemas alimentares, reduzindo e controlando bactérias Gram-positivas, além de inibir *S. Typhimurium* e *E. coli* O157: H7 (Gill e Holley, 2000; Gill e Holley, 2000b).

Usualmente é realizada a introdução direta de antimicrobianos nos produtos alimentares, contudo, a interação dos compostos antimicrobianos com os componentes alimentares pode reduzir a eficácia contra patógenos, sendo muitas vezes necessárias grandes concentrações antimicrobianas (Were et al., 2004). Desta forma, a ação da lisozima pode ser reforçada através de revestimentos protetores para a liberação controlada (Liu et al., 2013), podendo aumentar a atividade antimicrobiana e a estabilidade em sistemas alimentares complexos.

Nanopartículas encapsulando lisozima foram revestidas com ácido poli- γ -glutâmico e quitosana, através do método de ionização, promovendo a liberação da lisozima *in vitro* de forma lenta. Além disso, as nanopartículas revestidas apresentaram boa atividade antimicrobiana contra *B. subtilis* e *E. coli* (Liu et al., 2013). A avaliação das propriedades da

lisozima encapsulada através da secagem por pulverização, bem como o efeito da complexação, com diferentes concentrações de pectina, foi avaliada por Amara et al. (2016). Os resultados revelaram que a secagem por pulverização apresentou um efeito significativo sobre a estrutura, a atividade e a mobilidade da lisozima, principalmente em concentrações mais elevadas de pectina (acima de 0,5 g/L).

2.8 Doenças transmitidas por alimentos

Doenças graves podem ser transmitidas pela ingestão de alimentos contaminados. Segundo a CDC (Center for Diseases Control and Prevention), em 2015 foram notificados 20.107 casos de doenças transmitidas por alimentos, ocorrendo 4.531 hospitalizações e 77 mortes confirmadas por essa causa, incluindo infecções bacterianas e por parasitas. O agente de maior incidência foi a *Salmonella* sp, apresentando 7.728 casos, seguido do *Campylobacter* que apresentou 6.309 casos. *Listeria* é o agente patogênico com maior porcentagem de hospitalizações (96%), sendo que 12,9% dos casos levaram a óbito, demonstrando elevado percentual de mortes por hospitalização, quando comparado com *Salmonella* (0,4%) e *Campylobacter* (0,2%).

O gênero *Listeria* consiste em um grupo de bactérias Gram-positivas, anaeróbios facultativos, que não formam esporos e são móveis a temperatura de 20 a 25 °C. *Listeria* spp são isolados a partir de uma diversidade de fonte ambientais, incluindo solo, água, efluentes, fezes de humanos e animais, bem como uma grande variedade de alimentos. O gênero *Listeria* inclui atualmente dezessete espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, *L. weihenstephanensis*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensis*, *L. booriae*, e *L. newyorkensis*. A doença infecciosa causada por essas bactérias é conhecida como listeriose, sendo que a *L. monocytogenes* pode causar sérias infecções localizadas e generalizadas em humanos, como meningite, encefalite e septicemia (Jarvis et al., 2016; Vázquez-Boland et al., 2001; Weller et al., 2015).

Entre estas, a espécie *Listeria monocytogenes* pode multiplicar-se em temperaturas que variam de -0,4 °C a 45 °C, com intervalo de pH 4,0 a pH 9,6 (pH ótimo de 6,0-8,0), sob condições aeróbicas e anaeróbicas. Além disso, *L. monocytogenes* é capaz de aderir em superfícies de contato com alimentos, como aço inoxidável e poliestireno, podendo persistir em instalações de processamento de alimentos durante meses ou anos como biofilmes. Quando

protegido em biofilmes, pode tolerar altas concentrações de muitos agentes, como desinfetantes, sanitizantes e antimicrobianos, o que pode resultar na contaminação de alimentos (Valimaa, Tilsala-Timisjarvi e Virtanen 2015).

Esse micro-organismo foi reconhecido pela primeira vez como patógeno de origem alimentar em 1981, em um surto ligado a repolho contaminado no Canadá (Schlech et al., 1983). Estima-se que mais de 99% dos casos de listeriose devido ao consumo de alimentos contaminados, particularmente alimentos prontos para consumo, tal como carnes, laticínios e produtos de pesca (Allen et al., 2016). Alimentos prontos para consumo podem ter uma vida útil longa, sendo armazenados a baixas temperaturas e sob embalagens a vácuo ou em atmosfera modificada. Esta capacidade de crescer em condições adversas, faz com que esse micro-organismo seja uma grande preocupação para a indústria de alimentos e necessita de controle ao longo da cadeia alimentar (Valimaa, Tilsala-Timisjarvi e Virtanen 2015). Além disso, a presença de *L. monocytogenes* em alimentos tem consequências econômicas importantes, tais como a retirada de produtos do mercado consumidor e diminuição nas vendas de produtos (Auvolat e Besse 2016). Desta forma, a investigação de novas tecnologias que aumentem e/ou promovam a liberação controlada de antimicrobianos naturais, como a nisina e a lisozima, tem recebido grande ênfase, pois possuem potencial de uso pela indústria de alimentos, podendo assim combater a *L. monocytogenes* em diferentes categorias de alimentos.

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados obtidos no decorrer deste trabalho de pesquisa estão apresentados em forma de artigos científicos, seguindo as normas do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA-UFRGS). Cada artigo traz os materiais e métodos utilizados em seu desenvolvimento, juntamente com os resultados, as discussões e conclusões pertinentes a cada etapa do mesmo.

Artigo 1: Pectin and polygalacturonic acid-coated liposomes as novel delivery system for nisin: Preparation, characterization and release behavior.

Publicado na revista: Food Hydrocolloids, v. 70, p. 1-7, 2017.

doi: 10.1016/j.foodhyd.2017.03.016

Artigo 2: Structural characterization of nisin loaded liposomes containing pectin and the polygalacturonic acid.

Formatado para submissão na revista: Materials Science and Engineering C

Artigo 3: Antimicrobial activity of Lysozyme-Nisin co-encapsulated in long circulatory liposomes coated with polysaccharides.

Formatado para submissão na revista: Food Hydrocolloids

3.1 Artigo 1

Pectin and polygalacturonic acid-coated liposomes as novel delivery system for nisin: preparation, characterization and release behavior

Nathalie Almeida Lopes, Cristian Mauricio Barreto Pinilla, Adriano Brandelli*

Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970 Porto Alegre, Brazil

* Corresponding author: Dr. A. Brandelli, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre, Brazil; fax: +5551 3308 7048; e-mail: abrand@ufrgs.br

Abstract

Liposome systems can increase the stability of encapsulated compounds, such as the bacteriocin nisin, improving its benefits as antibacterial agent. In this study, nanoliposomes encapsulating nisin were prepared with soy phosphatidylcholine (PC) and pectin or polygalacturonic acid. The efficiency of encapsulation was 87.9% to PC-pectin and 84.0% to PC-polygalacturonic acid nanoliposomes. The liposomes presented a well-defined spherical shape, with sizes ranging from 94 to 160 nm, showing minimal differences during storage at 7°C or 25°C for 28 days. The values for polydispersity index were around 0.2-0.3, and the zeta potential of polysaccharide-coated liposomes was in the range from -17 mV to -32 mV during the time of storage, indicating high physical stability. The antimicrobial activity was observed against five different strains of *Listeria* in milk-agar plates, with a better efficiency against *L. innocua* 6a. The in vitro release studies showed that the nisin release rate of PC-pectin and PC-polygalacturonic acid liposomes was lower when compared with PC liposomes, evidencing sustained-releasing potential for food applications.

Keywords: nisin; liposomes; pectin; polygalacturonic acid.

1. Introduction

Nisin is a natural antimicrobial substance that has received particular attention because of its broad antibacterial activity against Gram-positive bacteria. It is a heat-stable peptide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and has Generally Recognized As Safe (GRAS) approval by the US Food and Drug Administration (Chopra, Kaur, Bernela, & Thakur, 2014; Salmieri et al., 2014). However, its antimicrobial efficacy in food matrices may be reduced by the susceptibility to proteolytic degradation and interactions with food components (Aasen, Markussen, Moretro, Katla, Axelsson, & Naterstad, 2003; Sant'Anna, Malheiros, & Brandelli, 2011).

Novel delivery systems may overcome this problem by encapsulation of nisin in nanoformulations, improving controlled and sustained release (Xiao & Zhong, 2011; Brandelli, 2012). Liposomes are spherical vesicles, having an aqueous core enclosed by one or more phospholipid bilayers. Due to the presence of both lipid and aqueous phases in the structure, they can be utilized in the entrapment and delivery of either amphiphilic, water-soluble, or lipid-soluble materials (Mozafari, Johnson, Hatziantoniou, & Demetzos, 2008; Imran, Revol-Junelles, Paris, Guedon, Linder, & Desobory, 2015), representing an interesting technology for the encapsulation and delivery of bioactive agents.

Nanoliposomes composed of phospholipids and polysaccharides can be alternative for the controlled release of bacteriocins, such as nisin. This bacteriocin was encapsulated into liposomes coated with chitosan or chondroitin sulfate by the thin-film hydration method, demonstrating similar efficiency as free nisin in inhibiting *Listeria* spp. isolated from food, and greater efficiency in inhibiting *L. monocytogenes* ATCC 7644 (Silva, Boelter, Silveira, & Brandelli, 2014). However, the use of polysaccharides other than chitosan in liposome formulations has been poorly described, stimulating the investigation on liposomes with different types of polysaccharides.

Biopolymers, such as polysaccharides, are regularly used in the pharmaceutical, cosmetic and food industries. Pectin is an example of natural polymer that has received considerable attention in different research areas. Pectin is an anionic polysaccharide, comprising of a linear backbone composed by galacturonic acid units linked by α -1 \rightarrow 4 bonds. The carboxylic groups of the polygalacturonic acid may be partially esterified by methyl groups, presenting a pKa of approximately 2.9, close to the pKa value of the monomeric galacturonic acid (Souza, Gebara, Ribeiro, Chaves, Gigante, & Grosso, 2012; Ventura & Bianco-Peled, 2015). The advantage of using pectin in the development of nanoparticles is due to its biocompatibility, absence of toxicity and biodegradability, thus allowing incorporation into a wide range of commercial products (Da Silva et al., 2014; Hu, Huang, Gao, Huang, Xiao, & McClements, 2015). Thus, the aim of the present research was to develop nanoliposomes containing pectin or polygalacturonic acid by the thin-film hydration method for nisin encapsulation, and to determine the physicochemical characteristics of the nanostructures, their stability and antimicrobial activity.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The pectin and polygalacturonic acid used in this study were from Sigma (St. Louis, MO, USA): pectin from apple (degree of esterification 70-75%) and polygalacturonic acid (\geq 90%, enzymatic). Polygalacturonic acid was dissolved in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 and pectin was dissolved in ultrapure water, in concentrations of 0.5, 1.0 and 1.5 mg/mL. Nisaplin® (25 mg of nisin/g of Nisaplin®) was provided by Danisco (Vargem Grande, Brazil). Before each experiment, nisin was prepared as described by Pinilla & Brandelli (2016). The stock solution was diluted in 10 mM phosphate buffer pH 7.0, filter-sterilized through 0.22 μ m membranes (Millipore; Billerica, MA, USA), stored into a sterile tube at 4 °C. The lipid used

in the experiments was Phospholipon 90G®, a purified soybean phosphatidylcholine (PC, ≥ 94%), provided by Lipoid (Ludwigshafen, Germany).

2.2. Nanoliposome production by film hydration

Nisin was encapsulated into PC nanoliposomes by the thin-film hydration method adapted from Silva et al. (2014). The lipid was dissolved in chloroform in a round-bottom flask, and the organic solvent was removed by rotary evaporation until formation of a thin lipid film. The flask was stored overnight in a desiccator for elimination of all traces of chloroform. The film was dispersed by adding 5 mL solution of nisin (0.5 mg/mL) in 10 mM phosphate buffer pH 7.0 and vortexed at 60 °C for 1 min. To assist the formation of the liposomes, the solution was heated and stirred for 5 cycles of heating to 60 °C for 2 min, followed by 1 min under vigorous agitation. After this process 5 mL of the polysaccharide solution (0.5, 1.0 or 1.5 mg/mL) was added and the final concentration of nisin in solution was 0.25 mg/mL. The mixture was subjected to ultrasound for size reduction using a probe-type sonicator (Unique OF S500, frequency 20 kHz, power 250 W), for 5 cycles of 1 min with intervals of the same time under ice bath, and then sterilized by filtration through 0.22 µm membranes (Millipore, Billerica, MA, USA). The resulting nanoliposomes were immediately submitted to characterization tests.

2.3. Nanoliposome characterization

The mean diameter and polydispersity index (PDI) of nanoliposomes were determined by dynamic light scattering (DLS) performed in a Brookhaven Instruments standard setup (BI-200 M goniometer, BI-9000AT digital correlator) with a He-Ne laser of 35 mV at λ of 632.8 nm as the light source (Pecora & Berne, 2000). The zeta potential of liposomes containing pectin or polygalacturonic acid were carried out after dilution of the formulations in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 using a Brookhaven Zeta PALS equipment (Silva et al., 2014). For

determination of zeta potential and DLS, measurements were performed immediately after of the nanoliposomes preparation and were monitored for 28 days for filtered liposomes stored at 7 °C and at room temperature (25 °C).

The encapsulation efficiency (EE) was determined by HPLC (Pinilla & Brandelli, 2016). Encapsulated nisin was separated from unencapsulated nisin by ultrafiltration (Ultracel YM-10 Membrane, Millipore) at 10,000 g for 20 min. The amount of free nisin was determined in the filtrate by HPLC as described below. The EE was calculated using the following equation:

$$\%EE = \frac{\text{Nisin (used in preparation - in filtrate)}}{\text{Nisin used in preparation}} \times 100$$

For HPLC analysis, samples were filtered through 0.22 µm nylon membrane and loaded 100 µL onto the XBridge® C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm) column (Waters, Milford, MA, USA). The column was eluted using mobile phases A (0.1% v/v TFA in water) and B (0.1% v/v TFA acid in acetonitrile) following this sequence: 100% A for 5 min, a linear gradient 0-50% B over 45 min, a linear gradient to 100% B over 5 min and 100% B for 7 min, at 1 mL/min flow rate. Mobile phases were filtered through 0.22 µm nylon filters and degassed by sonication prior to use. The UV detector was used at 215 nm and the column temperature was at 35 °C. The concentration of nisin was determined by means of a calibration curve standard. HPLC analysis and data acquisition were operated on the Empower® 2 software (Waters, Milford, MA, USA).

2.4. Transmission electron microscopy

The morphology of liposomes was evaluated by transmission electron microscopy. The sample was deposited on a Formvar-coated 300 mesh copper grids and left for 1 min, and stained with 2.5% (v/w) uranyl acetate solution for 30 seconds. All samples were observed by JEM-1200 Transmission Electron Microscope (JEOL, Tokyo, Japan) operated at 100 kV.

2.5. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

FTIR spectra of pectin, polygalacturonic acid, nisin, phosphatidylcholine and nanoliposomes, were obtained using a Shimadzu 8300 FTIR spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). The liposomal samples were freeze-dried prior analysis. The analysis was carried out using the KBr disk method. The scanning range used was 4000 to 400 cm^{-1} with 64 scans and resolution was set at 4 cm^{-1} .

2.6. Antimicrobial activity assay

Antimicrobial activity was determined by agar diffusion assay as described by Motta & Brandelli (2002). Serial dilutions of encapsulated nisin were made, and aliquots of 10 μL were applied onto BHI agar plates previously inoculated with a swab submerged in a suspension of *L. monocytogenes* ATCC 7644 (107 CFU/mL), incubated at 37 °C for 24 h. Antimicrobial activity was defined as the reciprocal of the last dilution giving an inhibition zone, and expressed as activity units (AU) per mL (Kimura, Sashihara, Matsusaki, Sonomoto, & Ishizaki, 1998).

An aliquot was withdrawn for test immediately after preparation of liposomes to analyze the stability over time. Samples of each treatment were stored at 7 and 25 °C, and the antimicrobial activity of each sample was evaluated at days 1, 7 and 14.

2.7. Antimicrobial activity in milk-agar plates

Milk-agar plates were used for simulate a model system, through the efficacy test of the liposomes against different strains of *Listeria* (*L. monocytogenes* ATCC 7644, *Listeria* sp. str1, *L. innocua* 6a, *L. monocytogenes* 4b isolated from bovine carcass, and *Listeria* sp. str2 isolated from cheese). The antimicrobial activity was detected by agar diffusion assay. Aliquots of the liposomes were applied onto milk-agar plates previously inoculated with a swab submerged in

a suspension of each indicator microorganism. Plates were incubated at 37 °C for 24 h, and the activity was determined by the diameter of the inhibition zone formed in the plate (Silva et al., 2014).

2.8. In vitro release assay

The in vitro nisin release from PC nanoliposomes containing pectin or polygalacturonic acid was measured in phosphate buffered saline pH 7.4 (Wang, Li, & Kong, 2013). Nanoliposomes were placed into dialysis bags (cutoff 12,000 Da), immediately after preparation. The experiments were performed in a shaker at 100 rpm and 37 °C with 25 mL dissolution solution. After a fixed time interval, 2.0 mL of the solution was removed and the absorbance at 220 nm was measured, and 2.0 mL of buffer solution was added to the release medium to maintain a constant solution volume. The nisin that was released could be calculated using the follow equation:

$$\%CR = (C_n/C_t) \times 100$$

where C_n is the concentration of the solution of the n th sample and C_t is the total amount of nisin in the suspension.

2.9. Statistical analysis

The experiments were performed in triplicate and means were compared using Tukey's test at a level of 95% of significance ($P < 0.05$) by Statistica 7.0 software (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical characteristics of nanoliposomes

Nanoliposomes were successfully prepared in this study using biodegradable and biocompatible materials approved by the US Food and Drug Administration (FDA).

Phosphatidylcholine was used to produce nanoliposomes coated with pectin or polygalacturonic acid for encapsulation of nisin. For development of liposomes, three different concentrations of pectin or polygalacturonic acid were initially tested (0.5, 1.0 and 1.5 mg/mL). The results of particle size, polydispersity index (PDI) and zeta potential are summarized in Table 1. The control liposomes encapsulating nisin had a mean diameter of 105.8 ± 1.0 nm, the PDI was 0.271 ± 0.01 , and zeta potential was -18.0 ± 4.9 mV.

Table 1. Physical characteristics of polygalacturonic acid and pectin-covered nanoliposomes encapsulating nisin.

Polysaccharide (mg/mL)	PC-polygalacturonic acid			PC-pectin		
	Size (nm)	PDI	ζ (mV)	Size (nm)	PDI	ζ (mV)
0.5	116.2 \pm 11.3 ^b	0.428 \pm 0.037 ^a	-7.0 \pm 3.2 ^b	122.6 \pm 5.7 ^a	0.529 \pm 0.014 ^a	-17.3 \pm 9.0 ^a
1.0	160.9 \pm 11.1 ^a	0.139 \pm 0.025 ^b	-17.1 \pm 5.0 ^a	108.1 \pm 1.3 ^a	0.274 \pm 0.010 ^c	-25.4 \pm 5.5 ^a
1.5	94.5 \pm 3.4 ^b	0.461 \pm 0.024 ^a	-24.2 \pm 11.6 ^a	121.3 \pm 11.5 ^a	0.454 \pm 0.048 ^b	-24.1 \pm 12.2 ^a

*Values are the means \pm standard deviations of three independent experiments. Different superscript letters within the same column indicate significant differences at $P < 0.05$.

The liposomes prepared with pectin showed similar results for the mean diameter and zeta potential for the three different concentrations tested. However, the PDI of the samples with concentrations of 0.5 and 1.5 mg/mL were above of 0.4, indicating an elevated polydispersity of liposomes. The sample with concentration of 1.0 mg/mL pectin showed polydispersity around 0.2, being this value appropriate for systems prepared from biological materials (Malheiros, Sant'Anna, Micheletto, Silveira, & Brandelli, 2011). The PDI values of liposomes prepared with polygalacturonic acid presented similar behavior, with the concentration of 1.0 mg/mL showing the PDI values under 0.2, indicating a narrow size distribution. Some significant differences ($P > 0.05$) in the size and zeta potential were observed

among samples, but the PDI was determinant in the choice of polysaccharide concentration to continue the study. Thus, the concentration of 1.0 mg/mL of polysaccharide was selected as the best condition for the development of nisin nanoliposomes coated with pectin or polygalacturonic acid.

Despite specific studies with pectic polysaccharides have not been developed, the polysaccharide chitosan has been considered as a good candidate for stabilization of PC liposomes. In previous studies, the mean diameter of PC-chitosan nanovesicles varied from 174 to 285 when the chitosan concentration was increased from 0.1 to 1 mg/mL (Mertins, Sebben, Pohlmann, & Silveira, 2005). Nisin was encapsulated into PC liposomes containing the cationic polysaccharide chitosan and chondroitin sulfate, showing that mean particle size of PC liposomes was 145 nm and varied to 210 and 134 nm with the incorporation of chitosan and chondroitin sulfate, respectively. Besides, the polydispersity index was under 0.2 for all formulations tested (Silva et al., 2014).

The encapsulation efficiency of nisin into PC nanoliposomes without incorporation of polysaccharides was 86.9%, similar to that reported in previous studies (Taylor, Gaysinsky, Davidson, Bruce, & Weiss, 2008; Malheiros, Micheletto, Silveira, & Brandelli, 2010). The values for PC nanoliposomes with incorporation of pectin and polygalacturonic acid were 87.9% and 84.0%, respectively, showing a high encapsulation efficiency. Pectin-based nanoparticles had a loading efficiency for hydrophobic azole drugs, reaching values of 80-88%, HMP-based nanoparticles gave the highest loading efficiency compared with to LMP-based (Burapapadh, Takeuchi, & Sriamornsak, 2015). According to Krivorotova et al. (2016) the loading efficiency depends on the degree of pectin esterification, showing higher values for high methoxyl pectin and pectic acid at pH 7.0, the same as that used in the present study, suggesting that not only electrostatic interactions, but also hydrophobic interactions contribute to the complex formation at neutral pH values.

The nanoliposomes incorporating nisin were analyzed by transmission electron microscopy and their morphological characteristics can be observed in Fig. 1. All samples showed predominantly spherical structures, as often observed for nanoliposomes (Malheiros et al., 2010) and similar to that observed by Khaksar et al. (2014) and Krivorotova et al. (2016), which prepared nisin-loaded pectin particles. Fig. 1a and 1b show a dense coating suggesting that liposomes were covered with polygalacturonic acid and pectin, respectively. In addition, the histograms of size distribution (Fig. 2) showed that the preparations had a monomodal size distribution profile and 90% (D0.9) of the nanoliposomes presented diameters smaller than 200 nm.

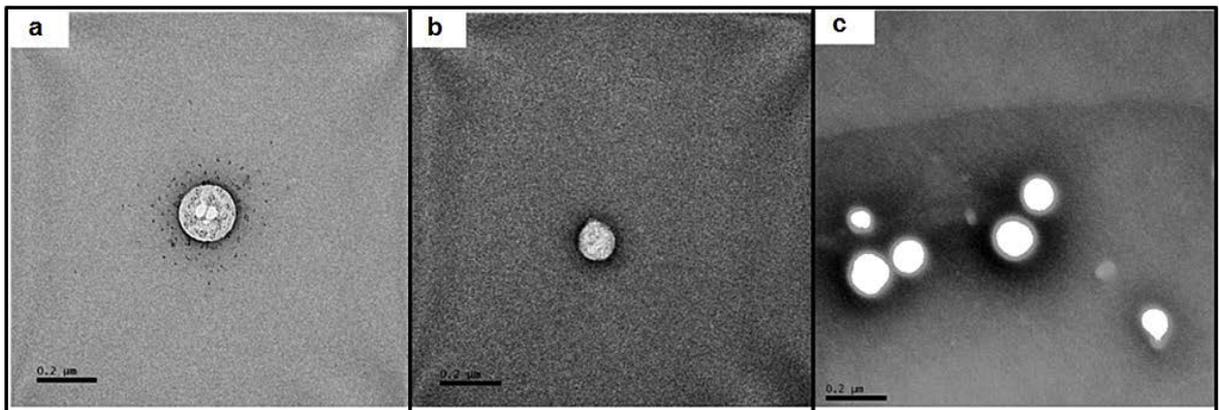


Fig. 1. Transmission electron microscopy images of nanoliposomes encapsulating nisin. (a) Polygalacturonic acid-coated PC liposomes, (b) pectin-coated PC liposomes and (c) control PC liposomes. Bar $\frac{1}{4}$ 200 nm.

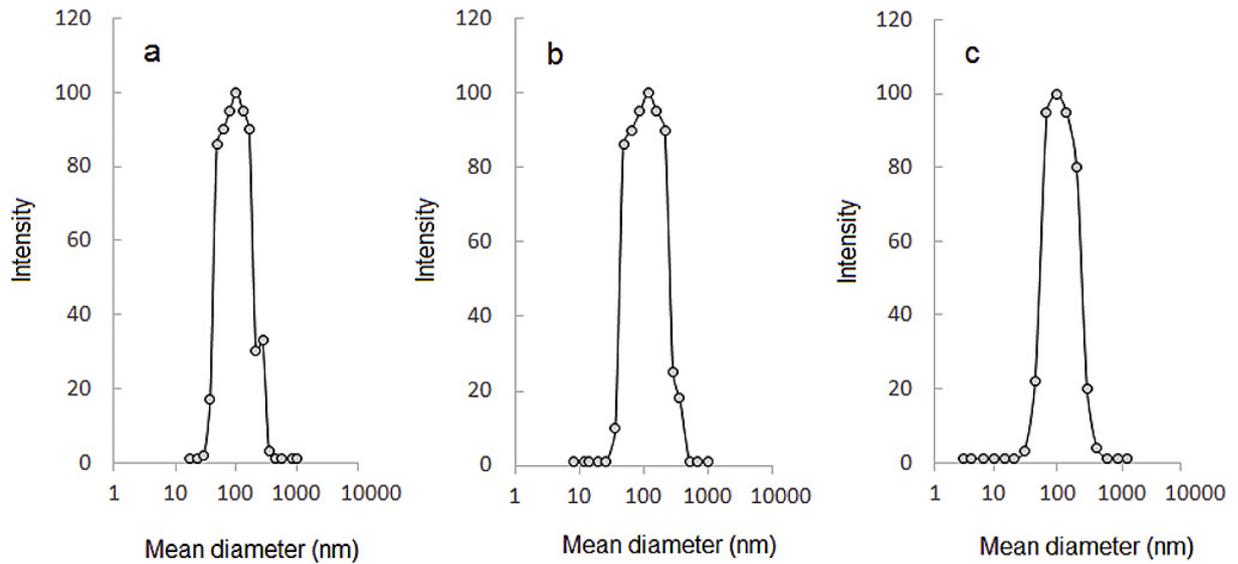


Fig. 2. Histograms of size distribution obtained by laser dynamic light scattering of (a) Polygalacturonic acid-coated PC liposomes, (b) pectin-coated PC liposomes and (c) control PC liposomes.

The correlogram also provides useful information to analyze different aspects of nanostructures such as the size and PDI. For the smaller and hence faster diffusing particles, the measured correlation curve decays to baseline within shorter times, while the larger and slower diffusing particles require more time before correlation in the signal is entirely lost. The more prolonged the decay becomes, the greater the sample polydispersity (Schätzel, 1987). The monomodal distribution of the nanoliposomes was confirmed by the correlogram analysis (Fig. 3). The liposomes showed a typical correlogram from samples containing large nanoparticles (>100 nm) in which the correlation of the signal takes time to decay (Agut, Taton, Brület, Sandre, & Lecommandoux, 2011). The correlogram of control PC-liposomes indicated more disperse particles because the correlation of the signal decays more gradually. This could be explained because the moving particles are constantly forming new patterns and the rate at which these intensity fluctuations occur will depend on the size of the particles (Pecora & Berne, 2000).

In addition, the intercepts of the correlation functions in Fig. 3 revealed a higher value for PC-polygalacturonic acid liposomes. The intercept of the correlation function is affected if the particle absorbs at the laser wavelength, thereby reducing the number of scattered photons compared to non-absorbing particles. The size of this loss correlates with the number of absorbed photons and therefore, with the absorption cross section of the particles and their number concentration (Geißler, Gollwitzer, Sikora, Minelli, Krumrey & Resch-Genger, 2015).

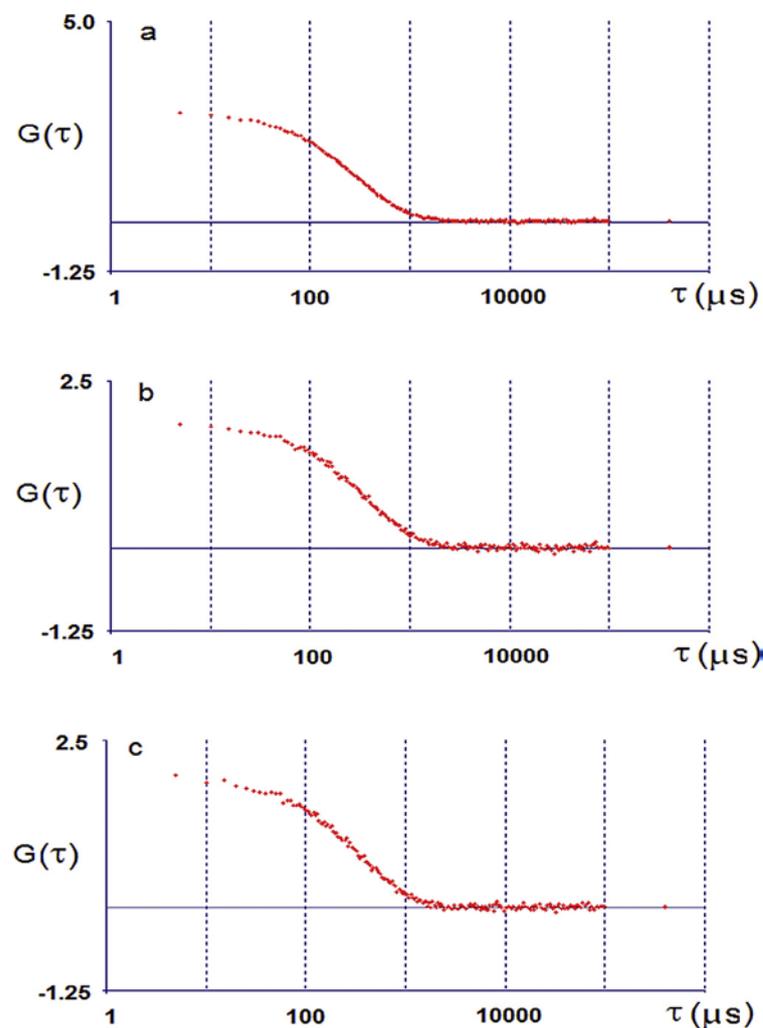


Fig. 3. Graphic representation showing the fluctuation in the intensity of scattered light as a function of time. Correlograms of (a) Polygalacturonic acid-coated PC liposomes, (b) pectin-coated PC liposomes and (c) control PC liposomes.

3.2. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

Fourier transform infrared measurements were employed to give information about the interactions of nanoliposomes with pectin and polygalacturonic acid. The FTIR peak assignments for the different spectra are presented in Fig. 4 for nisin, polygalacturonic acid and pectin, each of them separately and with different types of formulation.

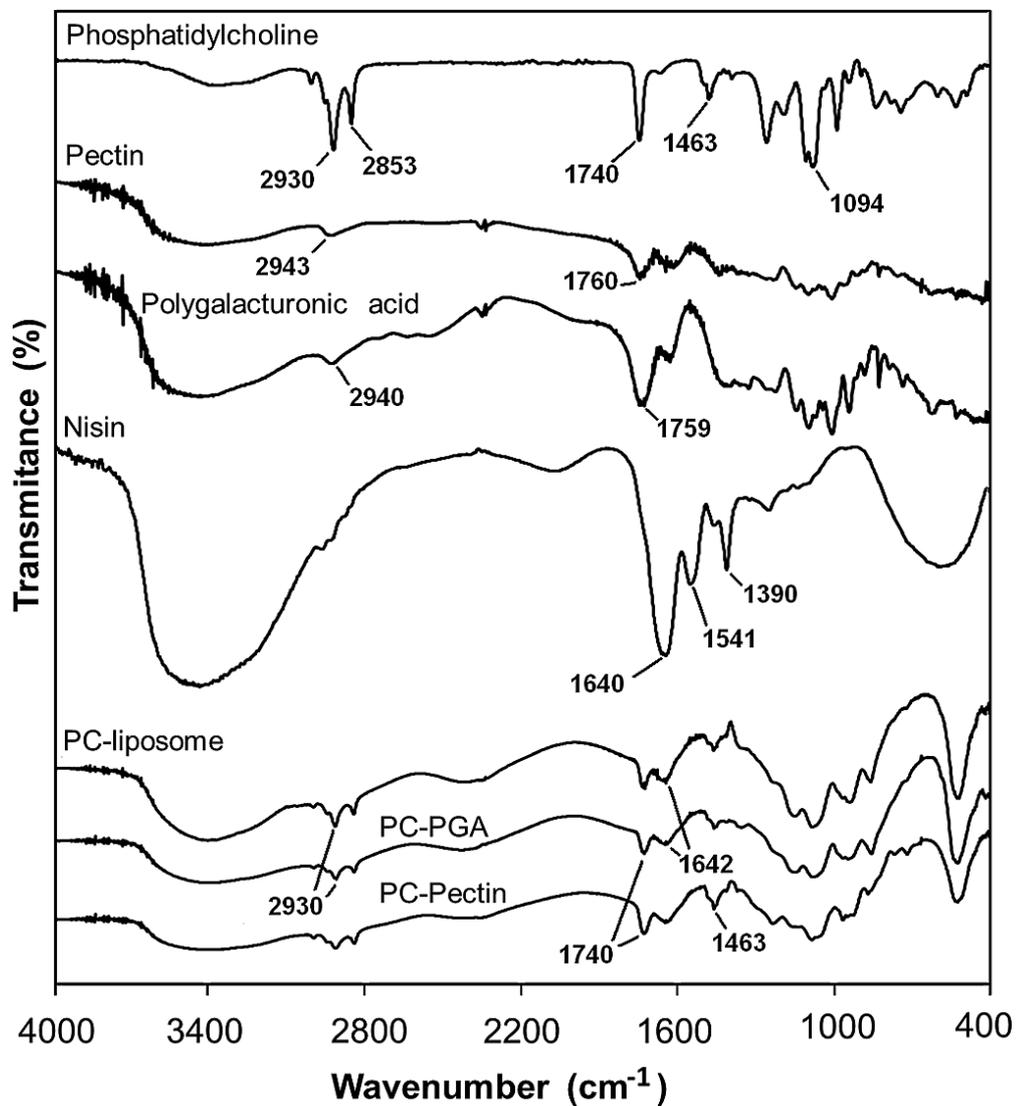


Fig. 4. FTIR spectra of pure polygalacturonic acid, pectin, nisin, phosphatidylcholine (PC), and nanoliposomes prepared with pectin and polygalacturonic acid (PGA).

Polysaccharides display a broad area of absorption above 3200 cm^{-1} due to stretching vibrations of O-H groups along the polysaccharide backbone (Burapapadh et al., 2015). The peak of absorption at 2943 cm^{-1} was due to C-H stretching vibration from pectin samples. In the case of polysaccharides, the $1000\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ interval is not very useful to differentiate carbohydrates and their derivatives. Thus, the bands in the $1000\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ region may be used to identify galacturonic acid, because are independent of pectin source (Monsoor, Kalapathy, & Proctor, 2001). The strong carbonyl absorption bands at 1675 and 1740 cm^{-1} were from free (COO^-) and esterified (COO-R) carbonyl groups, respectively. For nisin, the peak at 1637 cm^{-1} is attributed to bending of primary amines and the peak at 1390 cm^{-1} is due to C-N stretching of amide group (Maquelin et al., 2002).

In FTIR spectra of nanoliposomes (Fig. 4), it was observed that most of the peaks appear at almost the same wavenumbers. However, some differences in $1000\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ and $1600\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$ regions may indicate the presence of pectin and polygalacturonic acid on the surface of nanoliposomes prepared with polysaccharides. In addition, the peaks around $1520\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ attributed to amide groups of nisin most likely caused a shifting in the wavenumbers in liposomes with pectin and polygalacturonic acid. These subtle alterations may suggests that intermolecular interactions between amino groups of the peptide and the polysaccharides exist.

3.3. Stability of nanoliposomes during storage

The physicochemical characteristics of liposomes containing pectin or polygalacturonic acid stored for 28 days under refrigeration and at room temperature are depicted in Fig. 5 and 6. These parameters are mainly dependent on the chemical properties of nisin and liposome constituents, as well as the possible interactions among them. The different formulations evaluated showed different particle sizes, but an average diameter within the nanometrical scale, ranging from 90 to 160 nm (Fig. 5a and 5c). The PC-polygalacturonic liposomes

decreased mean diameter with the first 7 days, remaining stable over the 28 days. In general, the values for the PDI were around 0.2 and 0.3 indicating that the liposomes were physically stable during storage (Fig. 5). The PDI values of PC-pectin liposomes increased during storage and were higher than 0.4 after 20 days (Fig. 5b and 5d), indicating degradation and instability over time for this liposome formulation. Despite no significant alteration of size and PDI was observed for PC liposomes until 21 days, the system collapsed after this time at 25 °C and no further measurements were possible (Fig. 5 c,d). This result indicates that negatively charged polysaccharides may be interesting coatings for nisin-loaded liposomes, increasing their stability during storage at room temperature probably by providing increased electrostatic repulsion between the nanoparticles.

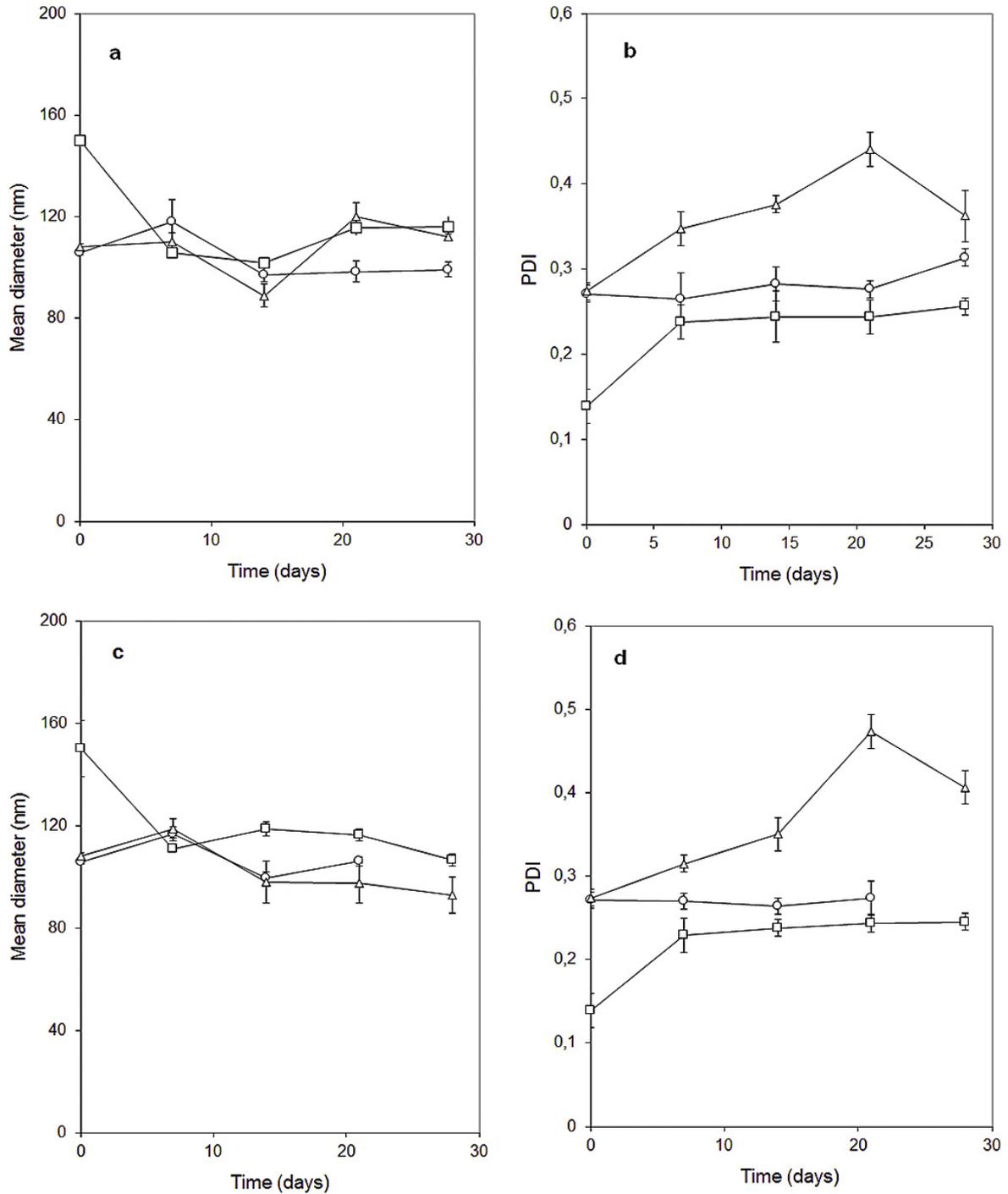


Fig. 5. Size and polydispersity index (PDI) of nanoliposomes containing nisin, during storage at 7 °C (a,b) and 25 °C (c,d). (□) Polygalacturonic acid-coated PC liposomes, (△) pectin-coated PC liposomes and (○) control PC liposomes. Values are the means \pm standard deviations of three independent experiments.

Although pectin-coated liposomes were not previously studied, the physical stability of liposome-encapsulated nisin has been demonstrated. Soy lecithin liposomes kept at 4 °C were still intact after 6 weeks according to physical stability study by zeta-sizer. Nisin entrapped in soy lecithin liposomes, showed that average size of liposomes ranged from 151 to 181 nm, without or with nisin respectively (Imran et al., 2015). In addition, the stability of chitosan-coated liposomes encapsulating melatonin was investigated (Gonçalves, Mertins, Pohlmann, Silveira, & Guterres, 2012). The mean particle diameter, ranging from 220 to 250 nm, was stable over 90 days at 22 °C, whereas PDI values remained around 0.4 within the same period, reinforcing the hypothesis that the polysaccharide could be acting as a liposome stabilizer in the suspensions.

The zeta potential analysis measures the surface charge of particles and could be useful to estimate the influence of the polysaccharide incorporation on the stability of liposomes (Silva et al., 2014). In this study, zeta potential was negative to PC-polygalacturonic acid and PC-pectin liposomes, and remained constant over the period, indicating the physical stability of nanoliposomes at both 7 °C and 25 °C (Fig. 6). The incorporation of polysaccharide molecules seem to have formed an outer coating, and the net charge on the nanoliposomes showed to be negative. Otherwise, the charge of PC nanoliposomes significantly changed after 14 days at 7 °C and after 7 days at 25 °C (Fig. 6). Thus, a rearrangement during storage may have occurred, leading to the change of negative charge to positive charge from the possible exposition of nisin on the surface of liposomes without a polysaccharide coating. According to Imran et al. (2015), the introduction of nisin, as a cationic peptide, in liposomes significantly changes net surface charge of liposomes, neutralizing and reducing the electrostatic repulsion between liposomes.

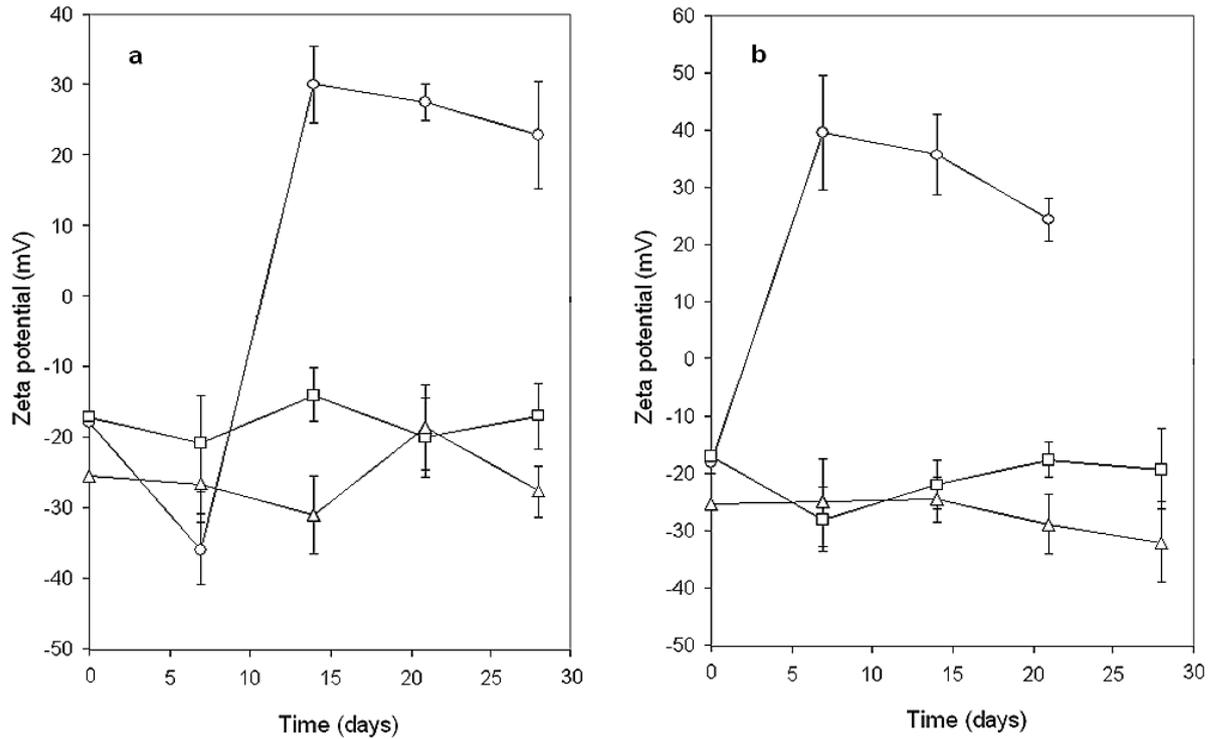


Fig. 6. Zeta potential (λ) of nanoliposomes containing nisin, during storage at 7 °C and 25 °C. (□) Polygalacturonic acid-coated PC liposomes, (△) pectin-coated PC liposomes and (O) control PC liposomes. Values are the means \pm standard deviations of three independent experiments.

In a recent study, Krivorotova et al. (2016) demonstrated that zeta potential measurements exhibited the interaction between negatively charged pectin and cationic peptide. Nisin binding caused the reduction of the negative surface charge and led to the formation of nisin-loaded pectin particles. The pectin is an anionic polysaccharide composed of α -(1 \rightarrow 4)-linked D-galacturonic acid units, some of which are naturally methyl-esterified (Ventura & Bianco-Peled, 2015). On the other hand, nisin is a cationic peptide that contains three lysine and one histidine positively charged residues. Besides, the N-terminal end of the peptide chain has hydrophobic residues that can contribute to nisin-pectin interaction by hydrophobic forces (Krivorotova et al., 2016), leading to formation nisin-loaded pectin nanoparticles.

3.4. Antimicrobial activity

The antimicrobial activities of nanoliposomes prepared with pectin or polygalacturonic acid were evaluated during storage at 7 °C and 25 °C. The activity against *L. monocytogenes* ATCC 7644 was monitored to understand the behavior of the liposomes containing biopolymers, considering the potential application of nanoformulated nisin in foods.

Samples of PC-pectin and PC-polygalacturonic acid liposomes showed initial activity of 800 AU/mL, whereas samples of PC liposomes had an initial activity of 400 AU/mL. It was observed that the liposomes were losing their antimicrobial activity after 14 days, but this decrease was lower for those stored at 7 °C. After 7 days, PC nanoliposomes maintained its initial activity, while the liposomes containing PC-polygalacturonic acid and PC-pectin showed 400 AU/mL and 200 AU/mL residual activity, respectively, for both temperatures. However, at the end of 14 days, the antimicrobial activity of PC and PC-polygalacturonic acid nanoliposomes was 200 AU/mL, while PC-pectin showed no antimicrobial activity. Thus, PC-polygalacturonic acid nanoliposomes maintained a higher antimicrobial activity after 14 days when compared with PC-pectin. The loss of antimicrobial activity could be associated with the establishment of strong interactions between cationic nisin and negatively charged polysaccharides during storage (Krivorotova et al., 2016). In this case, an increased nisin concentration could be encapsulated to warrant extended antimicrobial activity.

To simulate a food system, the antimicrobial activity of the nanoliposomes was tested against five different strains of *Listeria* in milk-agar plates, and then the diameter of the inhibition zones was measured (Table 2). All formulations showed a similar behavior, showing larger inhibition zones against *L. innocua* 6a. In a similar approach, Silva et al. (2014) observed the inhibition of PC liposomes containing chitosan and chondroitin sulfate against different strains of *Listeria*, showing more effective inhibition against *L. monocytogenes* ATCC 7644. Nisin can be used to control *Listeria* ssp. in food, but food-related environmental stresses may

have significant influence on its effectiveness. Cell wall modifications and alterations in membrane fluidity of *L. monocytogenes* may occur under salt stress or acid stress at low temperature, leading to increased resistance to bacteriocins, which can be variable depending on the strain (Bergholz, et al. 2013). Thus, alternative strategies for nisin delivery can be helpful to allow an effective antimicrobial action on target bacteria.

Table 2. Antimicrobial activity of phosphatidylcholine (PC) nanoliposomes encapsulating nisin in milk-agar against different strains of *Listeria*.

Indicator strain	Inhibition zone (mm)			
	Free nisin	PC	PC-PGA	PC-Pectin
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	10.9±0.2 ^{aC}	11.0±0.7 ^{aC}	0±0 ^{bC}	11.3±0.2 ^{Ad}
<i>L. monocytogenes</i> 4b	17.5±1.0 ^{bA}	19.6±1.2 ^{bB}	27.4±1.3 ^{aA}	26.7±0.4 ^{aA,B}
<i>Listeria</i> sp. str1	14.2±1.4 ^{cB}	19.9±2.3 ^{bB}	20.9±1.6 ^{bB}	26.2±1.0 ^{Ab}
<i>L. innocua</i> 6a	14.5±1.0 ^{cB}	24.0±0.5 ^{bA}	26.2±1.1 ^{bA}	29.1±1.1 ^{aA}
<i>Listeria</i> sp. str2	14.1±0.6 ^{bB}	21.7±0.4 ^{aA,B}	23.2±0.6 ^{aB}	23.5±1.4 ^{aC}

Values are the means ± standard deviations (n=3). Different letters (a-d and A-B) represent significant differences among the rows and columns, respectively (P<0.05). PGA = polygalacturonic acid.

Nisin has been used as natural preservative in the food industry, but the antimicrobial activity can be reduced when it is directly applied in food, due to its interaction with food components. Encapsulation of nisin may reduce the interaction with food matrix components and overcome the problems related to the direct application in foods (Sant'Anna et al., 2011; Khaksar et al., 2014). A diversity of nanostructures have been proposed to delivery nisin, used to control spoilage and pathogenic microorganisms by incorporation into the food matrix or in

films and coatings (Prombutara, Kulwatthanasal, Supaka, Sramala, & Chareonpornwattana, 2012; Salmieri et al., 2014; Boelter & Brandelli, 2016). Thus, polysaccharide-coated nanoliposomes encapsulating nisin may be an interesting strategy to combat *Listeria* in food.

3.5. *In vitro* release assay

The *in vitro* release studies from PC, PC-pectin and PC-polygalacturonic acid nanoliposomes were performed using a dialysis membrane system. The release kinetics of nisin from the nanoliposomes is shown in Fig 7.

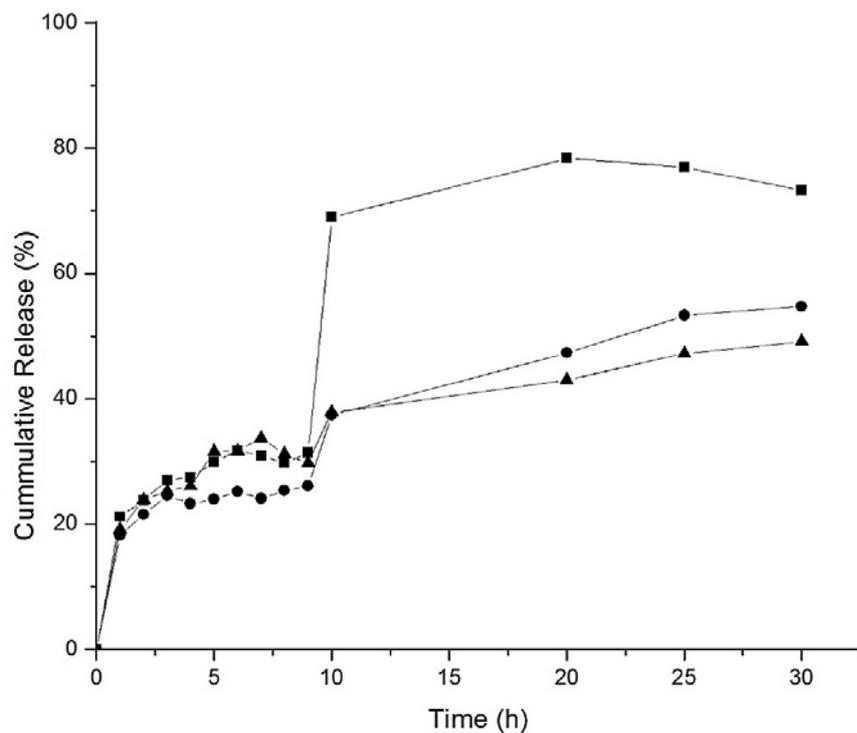


Fig. 7. Release rate of nisin encapsulated in (▲) polygalacturonic acid-coated PC liposomes, (●) pectin-coated PC liposomes and (■) control PC liposomes. Values are the mean of three independent experiments.

The initial nisin release rate from PC-pectin and PC-polygalacturonic acid nanoliposomes was lower and followed a more sustained release over 30 h as compared with PC nanoliposomes. The initial higher release rate from nanoliposomes can be attributed to nisin

located at the outer edge of the phospholipid bilayers (Silva et al. 2014), followed by a slower release phase that may be due to the diffusion of nisin from the inner core of nanoliposomes. The in vitro release profile of nisin from alginate-pectin particles can be described as an initial rapid release phase, followed by a slower release phase until the nisin content is constant, reaching about 65-75% cumulative release (Khaksar et al. 2014). A sharp increase of nisin release was observed at 10 h for PC nanoliposomes, reaching 70% cumulative release, whereas for PC-pectin and PC-polygalacturonic acid this value was 37% (Fig. 7). These results reveal an important difference in nisin release pattern for the formulations containing polysaccharide moieties, since interaction of nisin with the negatively charged polysaccharides probably warrants a slower release rate from the nanoliposomes.

The nanoliposomes containing pectin or polygalacturonic developed in this study presented high encapsulation efficiency, low polydispersity index, and were stable for 21 days at 7 °C and 25 °C, evidencing their technological applicability. In this sense, nanoliposomes composed with polysaccharides can be an alternative for the controlled release of antimicrobial peptides such as nisin.

Acknowledgments

This work received financial support from CNPq and CAPES (Brasilia, Brazil).

References

- Aasen, I.M., Markussen, S., Moretro, T., Katla, T., Axelsson, L., & Naterstad, K. (2003). Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 35-43.

- Agut, W., Taton, D., Brület, A., Sandre, O., & Lecommandoux, S. (2011). Depletion induced vesicle-to-micelle transition from self-assembled rod-coil diblock copolymers with spherical magnetic nanoparticles. *Soft Matter*, 7, 9744-9750.
- Bergholz, T.M., Tang, S., Wiedmann, M., & Boor, K.J. (2013). Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* is increased by exposure to salt stress and is mediated via LiaR. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 5682-5688.
- Boelter, J.F., & Brandelli, A. (2016). Innovative bionanocomposite films of edible proteins containing liposome-encapsulated nisin and halloysite nanoclay. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 145, 740-747.
- Brandelli, A. (2012). Nanostructures as promising tools for delivery of antimicrobial peptides. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 12, 731-741.
- Burapapadh, K., Takeuchi, H., & Sriamornsak, P. (2015). Development of pectin nanoparticles through mechanical homogenization for dissolution enhancement of itraconazole. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11, 365-375.
- Chopra, M., Kaur, P., Bernela, M., & Thakur, R. (2014). Surfactant assisted nisin loaded chitosan-carageenan nanocapsule synthesis for controlling food pathogens. *Food Control*, 37, 158-164.
- Da Silva, E.P., Sitta, D.L.A., Fragala, V.H., Cellet, T.S.P., Mauricio, M.R., Garcia, M.F., Nakamura, C.V., Guilherme, M.R., Rubira, A.F., & Kunita, M.H. (2014). Covalent TiO₂/pectin microspheres with Fe₃O₄ nanoparticles for magnetic field-modulated drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 67, 43-52.
- Geißler, D., Gollwitzer, C., Sikora, A., Minelli C., Krumrey, M., & Resch-Genger, U. (2015). Effect of fluorescent staining on size measurements of polymeric nanoparticles using DLS and SAXS. *Analytical Methods*, 7, 9785-9790.

- Gonçalves, M.C.F., Mertins, O., Pohlmann, A., Silveira, N.P., & Guterres, S.S. (2012). Chitosan coated liposomes as an innovative nanocarrier for drugs. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 8, 240-250.
- Hu, K., Huang, X., Gao, Y., Huang, X., Xiao, H., & McClements, D.J. (2015). Core-shell biopolymer nanoparticle delivery systems: Synthesis and characterization of curcumin fortified zein-pectin nanoparticles. *Food Chemistry*, 182, 275-281.
- Imhan, M., Revol-Junelles, A., Paris, C., Guedon, E., Linder, M., & Desobory, S. (2015). Liposomal nanodelivery systems using soy and marine lecithin to encapsulate food biopreservative nisin. *LWT Food Science and Technology*, 62, 341-349.
- Khaksar, R., Hosseini, S.M., Hosseini, H., Shojaee-Aliabadi, S., Mohammadifar, M.A., Mortazavian, A.M., Khosravi-Darani, K., Javadi, N.H.S., & Komeily, R. (2014). Nisin-loaded alginate-high methoxy pectin microparticles: preparation and physicochemical characterization. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 2076-2082.
- Kimura, H., Sashihara, T., Matsusaki, H., Sonomoto, K., & Ishizaki (1998). Novel bacteriocin of *Pediococcus* sp. ISK-1 isolated from well-aged bed of fermented rice bran. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 864, 345-348.
- Krivorotova, T., Cirkovas, A., Maciulyte, S., Staneviciene, R., Budriene, S., Serviene, E., & Sereikaite, J. (2016). Nisin-loaded pectin nanoparticles for food preservation. *Food Hydrocolloids*, 54, 49-56.
- Malheiros, P.S., Micheletto, Y.M.S., Silveira, N.P., & Brandelli, A. (2010). Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. *Food Research International*, 43, 1198-1203.
- Malheiros, P.S., Sant'Anna, V., Micheletto, Y.M.S., Silveira, N.P., & Brandelli, A. (2011). Nanovesicle encapsulation of antimicrobial peptide P34: physicochemical characterization

- and mode of action on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Nanoparticle Research*, 13, 3545-3552.
- Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L.P., van den Braak, N., Endz, H.P., Naumann, D., & Puppels, G.J. (2002). Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods*, 51, 255-271.
- Mertins, O., Sebben, M., Pohlmann, A., & Silveira N.P. (2005). Production of soybean phosphatidylcholine-chitosan nanovesicles by reverse phase evaporation: a step by step study. *Chemistry and Physics of Lipids*, 138, 29-37.
- Monsoor, M.A., Kalaphaty, U., & Proctor, A. (2001). Determination of polygalacturonic acid content in pectin extracts by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 74, 233-238.
- Motta A.S., & Brandelli, A. (2002). Characterization of an antimicrobial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 63-70.
- Mozafari, M.R., Johnson, C., Hatziantoniou, S., & Demetzos, C. (2008). Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of Liposome Research*, 18, 309-327.
- Pecora, R., & Berne, B.J. (2000). *Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics*. Dover Publications, New York.
- Pinilla, C.M.B., & Brandelli, A. (2016). Antimicrobial activity of nanoliposomes co-encapsulating nisin and garlic extract against Gram-positive and Gram-negative bacteria in milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 36, 287-293.
- Prombutara, P., Kulwatthanasal, Y., Supaka, N., Sramala, I., & Chareonpornwattana, S. (2012). Production of nisin-loaded solid lipid nanoparticles for sustained antimicrobial activity. *Food Control*, 24, 184-190.
- Salmieri, S., Islam, F., Khan, R.A., Hossain, F.M., Ibrahim, H.M.M., Miao, C., Hamad, W.Y., & Lacroix, M. (2014). Antimicrobial nanocomposite films made of poly(lactic acid)-

- cellulose nanocrystals (PLA-CNC) in food applications: part A - effect of nisin release on the inactivation of *Listeria monocytogenes* in ham. *Cellulose*, 21, 1837-1850.
- Silva, I.M., Boelter, J.F., Silveira, N.P., & Brandelli, A. (2014). Phosphatidylcholine nanovesicles coated with chitosan or chondroitin sulfate as novel devices for bacteriocin delivery. *Journal of Nanoparticle Research*, 6, 2479.
- Sant'Anna, V. Malheiros, P.S., & Brandelli, A. (2011). Liposome encapsulation protects bacteriocin-like substance P34 against inhibition by Maillard reaction products. *Food Research International*, 44, 326-330.
- Schätzel, K. (1987). Correlation techniques in dynamic light scattering. *Applied Physics B: Photophysics and Laser Chemistry*, 42, 1923-213.
- Souza, F.N., Gebara, C., Ribeiro, M.C.E., Chaves, K.S., Gigante, M.L., & Grosso, C.R.F. (2012). Production and characterization of microparticles containing pectin and whey proteins. *Food Research International*, 49, 560-566.
- Taylor, T.M., Gaysinsky, S., Davidson, P.M., Bruce, B.D., & Weiss, J. (2007). Characterization of antimicrobial-bearing liposomes by ζ -potential, vesicle size, and encapsulation efficiency. *Food Biophysics*, 2, 1-9.
- Ventura, I., & Bianco-Peled, H. (2015). Small-angle X-ray scattering study on pectin–chitosan mixed solutions and thermoreversible gels. *Carbohydrate Polymers*, 123, 122-129.
- Wang, Y., Li, P., & Kong, L. (2013). Chitosan-modified PLGA nanoparticles with versatile surface for improved drug delivery. *AAPS Pharmaceutical Science and Technology*, 14, 585-592.
- Xiao, D., & Zhong, Q. (2011). In vitro release kinetics of nisin as affected by Tween 20 and glycerol co-encapsulated in spray-dried zein capsules. *Journal of Food Engineering*, 106, 65-73.

4 DISCUSSÃO GERAL

Lipossomas revestidos com pectina ou ácido poligalacturônico foram preparados para a encapsulação de nisina. Para o desenvolvimento dos lipossomas, três concentrações diferentes dos polissacarídeos foram inicialmente testadas (0,5, 1,0 e 1,5 mg/mL). Os lipossomas preparados apresentaram resultados semelhantes com relação ao diâmetro médio e potencial zeta nas três concentrações testadas. No entanto, o PDI das amostras nas concentrações de 0,5 e 1,5 mg/mL foi acima de 0,4, indicando alto índice de polidispersão nessas amostras. Na concentração de 1,0 mg/mL os lipossomas revestidos com polissacarídeos mostraram valores de PDI em torno de 0,2. Segundo Malheiros et al. (2011) em sistemas preparados a partir de materiais biológicos, como os lipossomas, os valores de PDI em torno de 0,2 são considerados adequados, indicando estreita distribuição de tamanho das partículas. Assim, a concentração de 1,0 mg/mL de polissacarídeo foi selecionada como a melhor condição para o desenvolvimento de lipossomas com nisina revestidos com pectina ou ácido poligalacturônico.

Os lipossomas preparados tiveram alta eficiência de encapsulação em todas as formulações testadas, mostrando valores acima de 80%. Nos lipossomas revestidos, a eficiência de encapsulação depende do grau de esterificação da pectina, mostrando-se maior para pectina de alta metoxilação e ácido pécico a pH 7,0, sugerindo que não só as interações eletrostáticas, mas também interações hidrofóbicas contribuem para a formação do complexo em valores de pH neutro (Krivorotova et al., 2016).

As características físico-químicas dos lipossomas contendo pectina ou ácido poligalacturônico foram avaliadas por 28 dias, onde os lipossomas foram mantidos em refrigeração ou temperatura ambiente. Ao longo do tempo, as formulações avaliadas apresentaram diferentes tamanhos de partículas, mas um diâmetro médio dentro da escala nanométrica, variando de 90 a 160 nm. Os lipossomas PC-ácido poligalacturônico diminuíram o diâmetro médio nos primeiros 7 dias, permanecendo estável ao longo de 28 dias. Em geral, os valores para o PDI foram em torno de 0,2 e 0,3 indicando que os lipossomas foram fisicamente estáveis durante o armazenamento. A incorporação de polissacarídeos parece ter formado um revestimento externo nos lipossomas, mostrando carga líquida negativa, mantendo-se ao longo do tempo, tanto em 7 °C quanto 25 °C. Esses resultados indicam que os polissacarídeos de carga negativa podem ser revestimentos interessantes para lipossomas encapsulados com nisina, aumentando sua estabilidade durante o armazenamento à temperatura ambiente, provavelmente devido a maior repulsão eletrostática entre as nanopartículas.

Além disso, foi realizada a avaliação da atividade antimicrobiana nos lipossomas armazenados a 7 e 25 °C por até 14 dias. Foi observado que os lipossomas perderam a atividade antimicrobiana após 14 dias, porém, essa redução foi menor para aqueles armazenados a 7 °C. Os lipossomas revestidos com ácido poligalacturônico mantiveram maior atividade antimicrobiana quando comparados com os lipossomas revestidos com pectina. A perda de atividade antimicrobiana pode ser associada ao estabelecimento de fortes interações entre a nisina (catiônica) e os polissacarídeos carregados negativamente, durante o armazenamento (Krivorotova et al., 2016). Assim, maiores concentrações de nisina poderiam ser encapsuladas para garantir que a atividade antimicrobiana seja prolongada.

O ensaio com membranas de diálise mostrou que os lipossomas revestidos com polissacarídeos apresentaram menor taxa de liberação da nisina, mantendo a liberação controlada por até 30 h, em comparação com os lipossomas sem revestimento. A maior taxa de liberação da nisina nos lipossomas sem revestimento pode ser atribuído à nisina localizada na borda externa das bicamadas de fosfolípidios (Silva et al. 2014). Esses resultados revelam uma diferença importante no padrão de liberação de nisina para as formulações contendo polissacarídeos, uma vez que a interação da nisina com os polissacarídeos com carga negativa provavelmente garante uma taxa de liberação mais lenta.

Na sequência, a caracterização estrutural dos lipossomas foi realizada, mostrando que a relação (1:2) entre os picos de Bragg no SAXS confirmou a presença de estruturas lamelares em todas as amostras de lipossomas analisados. Além disso, a presença de fases cúbicas também foi observada nos lipossomas contendo nisina, produzidos pelos métodos de filme lipídico e evaporação em fase reversa. Diferentes fatores podem ter contribuído para a formação das fases cúbicas (Koynova e Tenchov, 2013), entre eles, a utilização de água em excesso durante a produção dos lipossomas, combinada com o uso de fosfolípidios negativamente carregados com polissacarídeos, através do aumento da repulsão eletrostática entre as bicamadas lipídicas e redução da energia necessária para dissipação da fase lamelar antes da sua conversão em fase cúbica. Embora a fosfatidilcolina não influencie a formação de fases cúbicas invertidas (Koynova e Tenchov, 2013), a nisina parece induzir a formação (Jastimi e Lafeur, 1999; Rzesutek e Willumeit, 2010), através da perturbação da estrutura das membranas formadas por fosfatidilcolina, enquanto que as amostras sem adição de nisina não apresentaram a formação de fases cúbicas.

Desta forma, provavelmente entre os empilhados de bicamadas a presença de nisina pode ter levado a estruturas contendo fases cúbicas dentro delas, ou seja, parte da estrutura multilamelar tornou-se cúbica. A formação de fase cúbica tem atraído muita atenção, devido

suas estruturas internas e propriedades físico químicas altamente ordenadas, que podem garantir a liberação lenta de compostos bioativos (Chen, Ma e Gui, 2014; Guo et al., 2010). Assim, a descoberta de estruturas cúbicas corrobora os resultados obtidos na primeira parte do trabalho, onde os lipossomas produzidos promoveram a liberação controlada de nisina.

Na última parte do trabalho, lisozima e nisina foram encapsuladas em lipossomas contendo polissacarídeos. Inicialmente, a lisozima livre foi avaliada, apresentando atividade contra *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*. Com isso, foram preparados lipossomas encapsulados com lisozima e revestidos com pectina ou ácido poligalacturônico, visando proteger o composto e prolongar a atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os lipossomas produzidos apresentaram boas características físico químicas, porém, não mostrou atividade contra bactérias Gram negativas, ou seja, a lisozima quando encapsulada perdeu sua atividade contra a *S. Enteritidis*.

Combinações de nisina e lisozima têm sido experimentadas, reduzindo e controlando bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Gill & Holley, 2000; Gill & Holley, 2000b). A lisozima pode facilitar o acesso da nisina à membrana celular, diminuindo o número de células viáveis, mas o mecanismo real de sinergia entre esses compostos não é claramente entendido. Assim, visando ampliar o espectro de ação, a mistura de nisina e lisozima foi testada, e os lipossomas produzidos com essa mistura foram avaliados quanto a caracterização físico química e microbiológica.

Os lipossomas contendo a mistura de nisina-lisozima, revestidos com polissacarídeos, apresentaram menor tamanho de partícula quando comparados ao lipossoma sem revestimento. Esse parâmetro depende da natureza dos polímeros e das características da nisina e da lisozima, bem como das prováveis interações entre eles. O índice de polidispersividade indicou uma distribuição de tamanho estreito para todas as amostras. Os valores de potencial zeta (em torno de -30 mV) se mostraram elevados, indicando aumento das interações repulsivas e redução da frequência de colisões nos lipossomas. Com relação a atividade antimicrobiana, os resultados demonstraram os benefícios de utilizar misturas de nisina e lisozima contra bactérias indesejáveis, quando comparado com o uso dos agentes individuais. A mistura encapsulada mostrou atividade contra *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*, além disso, a incorporação da pectina melhorou a estabilidade dos lipossomas, uma vez que mantiveram uma maior atividade contra *S. Enteritidis*, quando comparada com as demais formulações testadas. O mecanismo de sinergismo entre nisina e lisozima não está totalmente esclarecido, no entanto, os lipossomas produzidos com a combinação de nisina-lisozima aumentaram a lise celular nas bactérias Gram-negativas, podendo prevenir a contaminação nos alimentos.

Quando avaliados em um sistema complexo, como o leite integral e desnatado, armazenado a 7 °C e 37 °C, a formulação contendo pectina como revestimento foi mais eficiente na inibição de *Listeria* spp. No leite desnatado o efeito antimicrobiano foi maior, quando comparado ao leite integral. O efeito negativo da gordura sobre a atividade antimicrobiana da nisina é amplamente relatado (Chollet et al., 2008; Sobrino-López e Martín-Belloso, 2008; Pinilla & Brandelli, 2016). Assim, a ação mais eficiente da nisina no leite desnatado era de certa forma esperada, devido à adsorção de nisina nos glóbulos de gordura. Os resultados mostraram que a presença de gordura e a temperatura podem modificar a dinâmica de liberação de cada componente, afetando o efeito sinérgico contra *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis* no leite integral. No entanto, a encapsulação da mistura não restringiu a atividade antilisterial e a adição de pectina aumentou a retenção da lisozima-nisina no leite integral e desnatado, armazenado em temperatura de refrigeração e a 37 ° C, evidenciando seu potencial para aplicação em alimentos.

De uma forma geral, os lipossomas produzidos nesse estudo apresentaram boas características físico químicas e, quando adicionados de pectina ou ácido poligalacturônico, promoveram a liberação controlada de agentes antimicrobianos, mostrando-se estáveis quando armazenado em diferentes temperaturas. Desta forma, a adição de polímeros em lipossomas pode ser uma alternativa promissora, com potencial aplicação em alimentos.

5 CONCLUSÃO GERAL

Com a realização deste trabalho, foi possível concluir que lipossomas revestidos com pectina ou ácido poligalacturônico podem ser uma alternativa interessante para a liberação controlada de agentes antimicrobianos, tais como nisina e lisozima.

Os lipossomas contendo nisina apresentaram alta eficiência de encapsulação, baixo índice de polidispersão e foram estáveis durante 21 dias, na temperatura de 7 e 25 °C, evidenciando sua aplicabilidade tecnológica.

A caracterização aprofundada das estruturas lipídicas dos lipossomas mostrou que, de uma forma geral, a estrutura lamelar se encontra em maior quantidade, porém, também é encontrada a presença de estrutura cúbica nos lipossomas produzidos. É provável que entre os empilhados de bicamadas lipídicas, a presença de nisina tenha levado a formação de estruturas cúbicas, com isso, parte da estrutura lamelar tornou-se cúbica. Esses resultados corroboram com os anteriores, pois a fase cúbica apresenta estruturas internas definidas, que favorecem a liberação controlada de compostos bioativos.

A mistura de nisina e lisozima demonstrou benefícios, quando comparado com o uso dos agentes individuais. Os lipossomas desenvolvidos apresentaram baixo índice de polidispersão e alta eficiência de encapsulação. O sinergismo entre lisozima e nisina garantiu a inibição mais eficiente de *Listeria* spp, e a adição de pectina nos lipossomas aumentou a retenção da mistura, quando adicionados em leite armazenado em diferentes temperaturas. Assim, os resultados demonstram que os lipossomas contendo polissacarídeos podem ser uma tecnologia promissora para a liberação controlada de lisozima e nisina em alimentos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, K. J.; EWAWAŁECKA-ZACHARSKA, E.; CHEN, J. C.; KATARZYNA, K.; DEVLIEGHIERE, F.; MEERVENNE, E. V.; OSEK, J.; WIECZOREK, K.; BANIA, J. *Listeria monocytogenes* – An examination of food chain factors potentially contributing to antimicrobial resistance. **Food Microbiology**. 54, 178–189, 2016.

AMARA, C. B.; EGHBAL, N.; DEGRAEVE, P.; GHARSALLAOUI, A. Using complex coacervation for lysozyme encapsulation by spray-drying. **Journal of Food Engineering**. v. 183, p. 50-57, 2016.

AUVOLAT, A.; BESSE, N. G. The challenge of enumerating *Listeria monocytogenes* in food. **Food Microbiology**. 53, 135–149, 2016.

BERMUDEZ, O.; FORCINITI, D. Decontamination of surfaces by lysozyme encapsulated in reverse micelles. **Journal of Chromatography B**. v. 807, p. 95-103, 2004.

BLANCO-PADILLA, A.; SOTO, K. M.; ITURRIAGA, M.H.; MENDOZA, S. Food antimicrobials nanocarriers. **The Scientific World Journal**. 2014. DOI: 10.1155/2014/837215

BRANDELLI, A. Nanostructures as promising tools for delivery of antimicrobial peptides. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. 12, 731–741, 2012.

BRANDELLI, A.; LOPES, N.A.; BOELTER, J.F. Food applications of nanostructured antimicrobials. **In: Nanotechnology in the Agri-Food Industry**, Vol. 6, Food Preservation, A.M. Grumezescu (Ed.). Elsevier: Londres, 35–74, 2017.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução a Química de Alimentos**. 2^a ed. São Paulo: Livraria Varela. 231p, 1989.

BOUWMEESTER, H.; DEKKERS, S.; NOORDAM, M. Y.; HAGENS, W. I.; BULDER, A. S.; HEER, C.; VOORDE, S. E. C. G.; WIJNHOFEN, S. W. P.; MARVIN, H. J. P.; SIPS, A. J. A. M. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. 53, 52–62, 2009.

BUGATTI, V.; SORRENTINO, A.; GORRASI, G. Encapsulation of lysozyme into halloysite nanotubes and dispersion in PLA: Structural and physical properties and controlled release analysis. **European Polymer Journal**. v. 93, p. 495-506, 2017.

BURAPAPADH, K.; TAKEUCHI, H.; SRIAMORNSAK, P. Development of pectin nanoparticles through mechanical homogenization for dissolution enhancement of itraconazole. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 11 (3), 365–375, 2016.

CAFFREY, M. Membrane protein crystallization. **Journal of Structural Biology**. v. 142, p. 108-132, 2003.

CAMILO, K. F. B. Complexo pectina/caseína: aspectos básicos e aplicados. 2007. 166 f. Tese. (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Faculdade De Ciências Farmacêuticas De Ribeirão Preto, São Paulo, 2007.

CANTERI, M. H. G.; MORENO, L.; WOSIACKI, G.; SCHEER, A. P. Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros**. 22 (2), 149–157, 2012.

CDC, Preliminary Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006–2014. Weekly. Sept 02, 2016 / 64(18);495-499

CHEN, H.; HOOVER, D. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. 2 (3), 82–100, 2003.

CHEN, Y.; MA, P.; GUI, S. Cubic and hexagonal liquid crystals as drug delivery systems. **BioMed Research International**. no. 2014, p. 815981, 2014.

CHOPRA, M.; KAUR, P.; BERNELA, M.; THAKUR, R. Surfactant assisted nisin loaded chitosan-carageenan nanocapsule synthesis for controlling food pathogens. **Food Control**. 37, 158–164, 2014.

CHUNG, W.; HANCOCK, R. E. W. Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. v. 60, p. 25-32, 2000.

CUSHEN, M.; KERRY, J.; MORRIS, M.; CRUZ-ROMERO, M.; CUMMINS, E. Nanotechnologies in the food industry – Recent developments, risks and regulation. **Trends in Food Science & Technology**. 24, 30–46, 2012.

DELGADO, J. M. F. **Preparação e caracterização de nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados) sem substância ativa**. 2013. 117f. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Tecnologia e Gestão Instituto Politécnico de Bragança. Instituto Politécnico de Bragança.

DONG, Y-D.; BOYD, B.J. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 417, p. 101-111, 2011.

EDWARDS K. A.; BAEUMNER A. J. Analysis of liposomes. **Talanta**. v. 68(5), p. 1432-1441, 2006.

FATHI, M.; MARTÍN, A.; MCCLEMENTS, D. J. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**. 39, 18–39, 2014.

GÁLVEZ, A.; ABRIQUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; OMAR, N. B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**. 120, 51–70, 2007.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Surface application of lysozyme, nisin, and EDTA to inhibit spoilage and pathogenic bacteria on ham and bologna. **Journal of Food Protection**. v. 63(10), p. 1338-1346, 2000.

GILL, A. O., HOLLEY, R. A. Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme, nisin and EDTA. **Food Research International**. v. 33, p. 83-90, 2000b.

GOMEZ-HENS, A.; FERNANDEZ-ROMERO, J.M. Analytical methods for the control of liposomal delivery systems. **Trends Anal Chem**. 25, 167–178, 2006.

GONÇALVES, M. C. F.; MERTINS, O.; POHLMANN, A. R.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S. Chitosan coated liposomes as na innovative nanocarrier for drugs. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. 8, 240–250, 2012.

GU, F.; LI, B.; XIA, H.; ADHIKARI, B.; GAO, Q. Preparation of starch nanospheres through hydrophobic modification followed by initial water dialysis. **Carbohydrate Polymers**. 115, 605–612, 2015.

GUIGA, W.; SWESI, Y., GALLAND, S.; PEYROL, E.; DEGRAEVE, P.; SEBTI, I. Innovative multilayer antimicrobial films made with Nisaplin® or nisin and cellulosic ethers: Physico-chemical characterization, bioactivity and nisin desorption kinetics. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. 11 (2), 352–360, 2010.

GUO, C.; WANG, J.; CAO, F.; LEE, R. J.; ZHAI, G. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. **Drug Discovery Today**. v. 15(23-24), p. 1032-1040, 2010.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**. 46, 412–429, 2014.

HASAN, M.; MESSAOUD, G. B.; MICHAUX, F.; TAMAYOL, A.; KAHN, C. J. F.; BELHAJ, N.; LINDER, M.; ARAB-TEHRANY, E. Chitosan-coated liposomes encapsulating curcumin: study of lipid–polysaccharide interactions and nanovesicle behavior. **RSC Advances**. 6, 45290, 2016.

HU, K.; HUANG, X.; GAO, Y.; HUANG, X.; XIAO, H.; MCCLEMENTS, D.J. Core–shell biopolymer nanoparticle delivery systems: Synthesis and characterization of curcumin fortified zein–pectin nanoparticles. **Food Chemistry**. 182, 275–281, 2015.

HUANG, Z.; LI, X.; ZHANG, T.; SONG, Y.; SHE, Z.; LI, JING.; DENG, Y. Progress involving new techniques for liposome preparation. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 9 (4), 176–182, 2014.

IBARGUREN, C.; NARANJO, P. M.; STÖTZEL, C.; AUDISIO, M. C.; SHAM, E. L.; TORRES, E. M. F.; MÜLLER, F. A. Adsorption of nisin on raw montmorillonite. **Applied Clay Science**. 90, 88–95, 2014.

IBRAHIM, H. R.; HIGASHIGUCHI, S.; JUNEJA, L. R.; KIM, M.; YAMAMOTO, T. A structural phase of heat-denatured lysozyme with novel antimicrobial action. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 44, p. 1416-1423, 1996.

IMRAN, M.; REVOL-JUNELLES, A. M.; PARIS, C.; GUEDON, E.; LINDER, M.; DESOBRY, S. Liposomal nanodelivery systems using soy and marine lecithin to encapsulate food biopreservative nisin. **LWT Food Science and Technology**. v. 62(1), p. 341-349, 2015.

JARVIS, N. A.; O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C.; JOHNSON, M. G.; CRANDALL, P. G. A review of minimal and defined media for growth of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**. 66, 256–269, 2016.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**. 77 (3), 215–227, 2001.

KHAKSAR, R.; HOSSEINI, S. M.; HOSSEINI, H.; SHOJAEI-ALIABADI, S.; MOHAMMADIFAR, M. A.; MORTAZAVIAN, A. M.; KHOSRAVI-DARANI, K.; JAVADI, H. S.; KOMEILY, R. Nisin-loaded alginate-high methoxy pectin microparticles: preparation and physicochemical characterization. **International Journal of Food Science and Technology**, 49 (9), 2014. DOI: 10.1111/ijfs.12516

KHAZAEI, A.; KHAZAEI, M.; RAHMATI, S. A green method for the synthesis of gelatin/pectin stabilized palladium nano-particles as efficient heterogeneous catalyst for solvent-free Mizoroki–Heck reaction. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**. 398, 241–247, 2015.

KHLEBTSOV, N.; KOVLER, L.; ZAGIROVA, S.; KHLEBTSOV, B.; BOGATYREV, V. Spectroturbidimetry of liposome suspensions. **Colloid J**. 63, 491–498, 2001.

KJØNIKSEN, A.; HIORTH, M.; NYSTRÖM, B. Association under shear flow in aqueous solutions of pectin. **European Polymer Journal**. 41, 761–770, 2005.

KOYNOVA, R.; TENCHOV, B. Transitions between lamellar and non-lamellar phases in membrane lipids and their physiological roles. **OA Biochemistry**. v. 1(1), p. 1-9, 2013.

KRIVOROTOVA, T.; CIRKOVAS, A.; MACIULYTE, S.; STANEVICIENE, R.; BUDRIENE, S.; SERVIENE, E.; SEREIKAITI, J. Nisin-loaded pectin nanoparticles for food preservation. **Food Hydrocolloids**. 54, 49–56, 2016.

LAOUINI, A.; JAAFAR-MAALEJ, C.; LIMAYEM-BLOUZA, I.; SFAR, S.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. **Journal of Colloid Science and Biotechnology**. v.1, p. 147-168, 2012.

LASANTA, C.; ROLDÁN, A.; CARO, I.; PÉREZ, L.; PALACIOS, V. Use of lysozyme for the prevention and treatment of heterolactic fermentation in the biological aging of sherry wines. **Food Control**. v. 21(11), p. 1442-1447, 2010.

LAW, B. A.; KING, J. S. Use of liposomes for proteinase addition to Cheddar cheese. **Journal of Dairy Research**. 52 (01), 183–188, 1985.

LEE, D.; JIN B.; HWANG, Y.; SEUNG-CHEOL-LEE, S. Encapsulation of bromelain in liposome. **J. Food Sci. Nutr**. 5, 81–85, 2000.

LETCHFORD, K.; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. 65, 259–269, 2007.

LINDBLOM, G.; RILFORS, LEIF. Cubic phases and isotropic structures formed by membrane lipids – possible biological relevance. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 288, p. 221-256, 1989.

LIU, Y.; SUN, Y.; XU, Y. X.; FENG, H.; FU, S. D.; TANG, J. W.; LIU, W.; SUN, D. C.; JIANG, H.; XU, S. S. Preparation and evaluation of lysozyme-loaded nanoparticles coated with poly- γ -glutamic acid and chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 59, p. 201-207, 2013.

LOPES, S. C. A. **Lipossomas contendo ácido ursólico: desenvolvimento, caracterização química e físico-química e avaliação da citotoxicidade**. Belo Horizonte, 2014. 150f. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Minas Gerais.

MAHERANI, B.; ARAB-TEHRANY, E.; MOZAFARI, M.R.; GAIANI, C.; LINDER, M. Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies. **Current Nanoscience**. 7, 436–452, 2011.

MALHEIROS, P. S.; CUCCOVIA, I. M.; FRANCO, B. D. G. M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in vitro and in goat milk by liposomal nanovesicles containing bacteriocins produced by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2^a. **Food Control**. 63, 158–164, 2016.

MALHEIROS, P. S.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in minas frescal cheese by free and nanovesicle-encapsulated nisin. **Brazilian Journal of Microbiology**. 1414–1418, 2012.

MALHEIROS, P. S.; SANT'ANNA, V.; MICHELETTO, Y. M. S.; SILVEIRA, N. P.; BRANDELLI, A. Nanovesicle encapsulation of antimicrobial peptide P34: physicochemical characterization and mode of action on *Listeria monocytogenes*. **J Nanoparticle Res**. 13, 3545–3552, 2011.

MARSANASCO, M.; MÁRQUEZ, A. L.; WAGNER, J. R.; ALONSO, S. D. V.; CHIARAMONI, N. S. Liposomes as vehicles for Vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer Vitamin C protection after heat treatment. **Food Res. Int**. 44, 3039–3046, 2011.

MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. **Advances in Colloid and Interface Science**. 219, 27–53, 2015.

MEIRA, S. M. M.; JARDIM, A. I.; BRANDELLI, A. Adsorption of nisin and pediocin on nanoclays. **Food Chem**. 188, 161–169, 2015.

MEIRA, S. M. M.; ZEHETMEYER, G.; JARDIM, A. I.; SCHEIBEL, J. M., OLIVEIRA, R. V. B.; BRANDELLI, A. Polypropylene/montmorillonite nanocomposites containing nisin as antimicrobial food packaging. **Food Bioprocess Technol**. v. 7, p. 3349-3357, 2014.

MELLO, M. B.; MALHEIROS, P. S.; BRANDELLI, A.; SILVEIRA, N. P.; JANTZEN M. M.; MOTTA, A. S. Characterization and antilisterial effect of phosphatidylcholine nanovesicles

containing the antimicrobial peptide pediocin. **Probiotics Antimicrob Proteins**. 5, 43–50, 2013.

MERTINS, O. Desenvolvimento e caracterização de nanovesículas lipossômicas compósitas de fosfatidilcolina da lecitina de soja e quitosana. Porto Alegre, 2004. 78f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MERTINS, O. **Estudos físico-químicos e estruturais de lipossomas compósitos de fosfatidilcolina e quitosana**. Porto Alegre, 2008. 206f. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MERTINS, O.; CARDOSO, M. B.; POHLMANN, A. R.; SILVEIRA, N. P. Structural evaluation of phospholipidic nanovesicles containing small amounts of chitosan. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. 6, 2425–2431, 2006.

MONSOOR, M. A.; KALAPATHY, U.; PROCTOR, A. Determination of polygalacturonic acid content in pectin extracts by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**. 74, 233–238, 2001.

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

MOZAFARI, M. R.; FLANAGAN, J.; MATIA-MERINO, L.; AWATI, A.; OMRI, A.; SUNTRES, Z. E.; SINGH, H. Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 86 (13), 2038–2045, 2006.

MOZAFARI, M. R.; JOHNSON, C.; HATZIANTONIOU, S.; DEMETZOS, C. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. **Journal of Liposome Research**. 18, 309–327, 2008.

PATIL, Y. P.; JADHAV, S. Novel methods for liposome preparation. **Chemistry and Physics of Lipids**. 177, 8–18, 2014.

PETERS, R.; DAM, G.; BOUWMEESTER, H.; HELSPER, H.; ALLMAIER, G.; KAMMER, F.; RAMSCH, R.; SOLANS, C.; TOMANIOVÁ, M.; HAJŠLOVA, J.; WEIGEL, S. Identification and characterization of organic nanoparticles in food. **Trends in Analytical Chemistry**. 30 (1), 2011.

PINILLA, C. M. B.; BRANDELLI, A. Antimicrobial activity of nanoliposomes co-encapsulating nisin and garlic extract against Gram-positive and Gram-negative bacteria in milk. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. v. 36, p. 287-293, 2016.

PROMBUTARA, P.; KULWATTHANASAL, Y.; SUPAKA, N.; SRAMALA, I.; CHAREONPORNWATTANA, S. Production of nisin-loaded solid lipid nanoparticles for sustained antimicrobial activity. **Food Control**. 24, 184–190, 2012.

QI, Z.; YU, Y.; VÉLASQUEZ, J. E.; VAN DER DONK, W. A. Evolution of lanthipeptide synthetases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 109 (45), 18361–18366, 2012.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. **Pharmaceutical Research**. 15 (7), 1998.

RAO, D. R.; CHAWAN, C. B.; VEERAMACHANENI, R. Liposomal encapsulation of beta-galactosidase: Comparison of two methods of encapsulation and in vitro lactose digestibility. **J. Food Biochem**. 18(4), 239–251, 1995.

RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S.; SARAF, S. Nanocarriers: Promising vehicle for bioactive drugs. **Biol. Pharm. Bull**. 29, 1790–1798, 2006.

RHIM, J. W.; PARK, H. M.; HA, C. S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. **Progr. Polym. Sci**. v. 38, p. 1629-1652, 2013.

SALMIERI, S.; ISLAM, F.; KHAN, R. A.; HOSSAIN, F. M.; IBRAHIM, H. M. M.; MIAO, C.; HAMA, W. Y.; LACROIX, M. Antimicrobial nanocomposite films made of poly(lactic acid)-cellulose nanocrystals (PLA-CNC) in food applications: part A - effect of nisin release on the inactivation of *Listeria monocytogenes* in ham. **Cellulose**. 21, 1837–1850, 2014.

SCHLECH, W. F.; LAVIGNE, P. M.; BORTOLUSSI, R. A.; ALLEN, A. C.; HALDANE, E. V.; WORT, A. J.; HIGHTOWER, A. W.; JOHNSON, S. E.; KING, S. H.; NICHOLLS, E. S.; BROOME, C. V. 1983. Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. **N. Engl. J. Med**. 308, 203–206, 1983.

SINGH, H.; THOMPSON, A.; CORREDIG, M. Liposomes as food ingredients and nutraceutical delivery systems. In: **Garti N, McClements DJ, editors. Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals**. Oxford, U.K. Woodhead Publishing. 287–318, 2012.

SILVA, I. M.; BOELTER, J. F.; SILVEIRA, N. P.; BRANDELLI, A. Phosphatidylcholine nanovesicles coated with chitosan or chondroitin sulfate as novel devices for bacteriocin delivery. **J Nanopart Res**. 6, 2479, 2014.

TAJKARIMI, M.; IBRAHIM, S.; CLIVER, D. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**. 2 (9), 1199–1218, 2010.

TAYLOR, T. M., WEISS, J., DAVIDSON, P. M., BRUCE, B. D. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. **Food Science and Nutrition**. 45, 587–605, 2005.

TONIAZZO, T. Dispersões de lipossomas encapsulando β -caroteno: caracterização, estabilidade físico-química e incorporação em iogurte. Pirassununga, 2013. 120f. Dissertação de mestrado. Faculdade do Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo.

TONIAZZO, T.; BERBEL, I. F.; CHO, S.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; MORAES, I. C. F.; PINHO, S. C. β -carotene-loaded liposome dispersions stabilized with xanthan and guar gums:

physicochemical stability and feasibility of application in yogurt. **LWT - Food Science and Technology**. 59, 1265–1273, 2014.

VALIMAA, A.; TILSALA-TIMISJARVI, A.; VIRTANEN, E. Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain – A review. **Food Control**. 55, 103–114, 2015.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clin Microbiol Rev**. 14 (3), 584–640, 2001.

VENKATARAMANI, S.; TRUNTZER, J.; COLEMAN, D. R. Thermal stability of high concentration lysozyme across varying pH: A Fourier Transform Infrared study. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**. v. 5(2), p. 148-153, 2013.

VENTURA, I.; BIANCO-PELED, H. Small-angle X-ray scattering study on pectin–chitosan mixed solutions and thermoreversible gels. **Carbohydrate Polymers**. 123, 122–129, 2015.

VORAGEN, A. G. J.; COENEN, G. J.; VERHOEF, R. P.; SCHOLS, H. A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Struct. Chem**. 20, 263–275, 2009.

WELLER, D.; ANDRUS, A.; WIEDMANN, M.; DEN BAKKER, H. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 65, 286–292, 2015.

WERE, L. M.; BRUCE, B., DAVIDSON, M.; WEISS, J. Size, stability, and entrapment efficiency of phospholipid nanocapsules containing polypeptide antimicrobials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51(27), p. 8073-8079, 2003.

WERE, L. M.; BRUCE, B., DAVIDSON, M.; WEISS, J. Encapsulation of nisin and lysozyme in liposomes enhances efficacy against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**. v. 67(5), p. 922-927, 2004.

WU, Z.; WANG, W.; TANG, M.; SHAO, J.; DAI, C.; ZHANG, W.; CHEN, D. Comparative genomic analysis shows that *Streptococcus suis* meningitis isolate SC070731 contains a unique 105K genomic island. **Gene**. 535 (2), 156–164, 2014.

7 OUTRAS PUBLICAÇÕES

- **Artigo de revisão publicado:**

LOPES, N. A.; BRANDELLI, A. Nanostructures for delivery of natural antimicrobials in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 10, 1–11, 2017. doi: 10.1080/10408398.2017.1308915. 2017

Abstract

Natural antimicrobial compounds are a topic of utmost interest in food science due to the increased demand for safe and high-quality foods with minimal processing. The use of nanostructures is an interesting alternative to protect and delivery antimicrobials in food, also providing controlled release of natural compounds such as bacteriocins and antimicrobial proteins, and also for delivery of plant derived antimicrobials. A diversity of nanostructures are capable of trapping natural antimicrobials maintaining the stability of substances that are frequently sensitive to food processing and storage conditions. This article provides an overview on natural antimicrobials incorporated in nanostructures, showing an effective antimicrobial activity on a diversity of food spoilage and pathogenic microorganisms.

Keywords: Bacteriocin; nanobiotechnology; nanoparticles; nisin; phytochemicals

- **Capítulos de livros publicados:**

BRANDELLI, A.; LOPES, N.A.; BOELTER, J.F. Food applications of nanostructured antimicrobials. **In: Nanotechnology in the Agri-Food Industry**, Vol. 6, Food Preservation, A.M. Grumezescu (Ed.). Elsevier: Londres, 35–74, 2017.

Abstract

The demand by consumers for more natural foods with an extended shelf life and without the addition of chemical preservatives is increasing, challenging industry and research institutions to develop new conservation technologies. To meet this demand, bioconservation emerges as an interesting alternative, in which natural antimicrobial compounds are used in food in order to control the growth of pathogenic and spoilage microorganisms. The application of these

antimicrobial compounds in food can be improved using nanotechnology, which becomes increasingly important for the food industry. Nanostructured antimicrobials can have diverse applications in food formulations and packaging, and promising results are found with the use of the nanostructures that are addressed and discussed throughout the chapter. Nanovesicles, nanospheres, metallic nanoparticles, nanofibers, and nanotubes are capable of trapping bioactive substances, increasing and maintaining the stability of compounds that are often sensitive under typical food processing and storage conditions. The effective utilization of nanostructured antimicrobials in real food systems and toxicological studies are topics that still need additional investigation. Strategies for studies on the potential toxicity of antimicrobial nanostructures are discussed.

Keywords: antimicrobial; controlled release; drug delivery; liposome; nanoparticle; nanotoxicology

BRANDELLI, A.; Pinilla, C. M. B.; LOPES, N. A. Nanoliposomes as a platform for delivery of antimicrobials. **In: Mahendra Rai**; Carolina Alves dos Santos. (Org.). *Nanotechnologies Applied to Pharmaceutical Technology*. 1ed. Cham: Springer International Publishing, 2017, v., p. 55-90.

Abstract

The recent expansion of pharmaceutical nanotechnology (nanomedicines) and targeting strategies for antimicrobial delivery are highlighted and utilized in the applied fields of biomedicine, cosmetology, pharmaceutical, and food technologies. Nanoliposomes are artificially prepared membranous vesicles often composed of natural phospholipids and cholesterol. Their structure is similar to the cell membrane, and they can trap and release compounds with different properties, including both hydrophobic and hydrophilic drugs. Nanoliposomes can be used to achieve a slow release of drugs; the reduced particle size enhances the surface area, improving bioavailability and solubility, and thereby reducing its toxicity. As pharmaceutical nanocarriers, liposomes have been extensively studied for topical/dermal use against fungal diseases and as alternative therapy for diseases such as tuberculosis, due to the increase of antimicrobial efficacy, improving the interactions between pathogen and encapsulated drugs. Conventional liposomes have some limitations, such as low stability for long periods of storage and rapid uptake. Actually, a new generation of liposomes is developed with modifications in their surface, optimized size, high loading efficiency, ease

of interaction with the cell membrane, and increased target specificity, gaining novel applications and increasing attention in the medicine area.

Keywords: liposome; antibiotic; drug delivery; controlled release

- **Capítulo de livro submetido para publicação:**

BRANDELLI, A.; Pinilla, C. M. B.; LOPES, N. A. Nanotechnology in food preservation. **In: Advances in Processing Technologies for Bio-Based Nanosystems in Food.** CRC Press, 2018.

- **Participação em trabalho de conclusão de curso com artigo submetido para publicação:**

BERTOLINI, D.; CORRÊA, A. P. F.; VERAS, F. F.; LOPES, N. A.; GREGORY, G.; BRANDELLI, A. **Characterization of nanovesicles containing bioactive peptides obtained from sheep whey.** Trabalho de conclusão do curso de Biomedicina - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Abstract

Whey is a by-product formed in the milk casein production. It corresponds to the remaining aqueous fraction of milk, containing about half of its soluble components. Despite having excellent nutritional qualities, its production may have a big environmental impact. The production of bioactive peptides from proteins is a viable alternative to solve this problem, turning the residue into an applicable food bioconservative. This application, however, is only possible with microencapsulation methods which protect the peptides from degradation. In this work, bioactive peptides from sheep whey were encapsulated in liposomes, which had their stability characterized and their ability to maintain the biological activities evaluated. Though slightly unstable, liposomes have shown constant parameters over a month, in addition to preventing accentuated loss of biological activities of the peptides.

Keywords: bioactive peptides; microencapsulation; liposomes; whey

- **Trabalhos apresentados em congressos:**

LOPES, N. A.; PINILLA, C. M. B.; BRANDELLI, A. **Encapsulação de lisozima em nanolipossomas contendo polímeros: caracterização e avaliação antimicrobiana.** In: II CINA – II Congresso Internacional de Nanotecnologia e V Simpósio de Nanobiotecnologia e suas Aplicações, 2017.

ISAIA, H. A.; PINILLA, C. M. B.; LOPES, N. A.; BRANDELLI, A. **Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas contendo o peptídeo antimicrobiano P34.** In: II CINA – II Congresso Internacional de Nanotecnologia e V Simpósio de Nanobiotecnologia e suas Aplicações, 2017.

BERTOLINI, D.; CORRÊA, A. P. F.; VERAS, F. F.; LOPES, N. A.; GREGORY, G.; BRANDELLI, A. **Caracterização de nanovesículas contendo peptídeos bioativos obtidos do soro de leite ovino.** In: II CINA – II Congresso Internacional de Nanotecnologia e V Simpósio de Nanobiotecnologia e suas Aplicações, 2017.

BARRETO, C.; LOPES, N.; BRANDELLI, A. **Melhoramento da estabilidade térmica de nanolipossomas contendo a mistura de nisina e extrato de alho.** In: IX Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada e V Escola de Termodinâmica, 2017.

LOPES, N. A.; PINILLA, C. M. B.; BRANDELLI, A. **Caracterización de nanoliposomas con incorporación de ácido galacturónico para liberación controlada de péptidos antimicrobianos.** In: XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología, 2016, Rosario. Libro de Resúmenes del XXIII CLAM, 2016. v. 1.