

Além disso, os deslocamentos observados para as bandas  $\nu_{OH}$  em  $3439\text{ cm}^{-1}$  e  $1592\text{ cm}^{-1}$  referente à vibração  $\nu_{(COO^-)}$  confirmam a interação química entre a CMD e o HDL MgAl. A adsorção da CMD na estrutura do hidróxido é ilustrada na Figura 3b.

#### 4 CONCLUSÃO

A combinação de hidróxido duplo lamelar tipo hidrotalcita (MgAl) e carboximetil-dextrana (CMD) via co-precipitação *in situ* formam novos biohíbridos onde a biomoléculas intercala e adsorve sobre a superfície da nanopartícula. O mecanismo de adsorção é originado da interação eletrostática entre os grupos carboxilatos da CMD e os sítios positivamente carregados do HDL. Devido ao caráter atóxico, os biohíbridos HDL MgAl-CMD podem ser promissores para o desenvolvimento de nanocompósitos com estrutura esfoliada, utilizando polissacarídeos, tais como amido e quitosana.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao WRRRC/ARS-USDA, CNPq, CAPES, FINEP, e FAPESP (Processos No. 2010/11584-5 e No. 2012/87216) pelo suporte financeiro e bolsas de estudo. Este trabalho também foi suportado pelo Molecular Foundry, Office of Science, Office of Basic Energy Science, U.S. Department of Energy sob contrato n° DE-AC02-05CH11231.

#### REFERÊNCIAS

COSTA, F. R.; SAPHIANNIKOVA, M; WAGENKNECHT, U.; HEINRICH G. Layered Double Hydroxide Based Polymer Nanocomposites, *Advanced Polymer Science*, v. 210, 101–168, 2008.

DEL HOYO, C. Layered double hydroxides and human health: An overview. *Applied Clay Science*, v.36, 103-121, 2007.

EVANS, D. G.; SLADE, R. C. T. Structural Aspects of Layered Double Hydroxides. Em: DUAN, X.; EVANS, D. G., *Layered Double Hydroxides, Structure and Bonding Series*, Springer Berlin Heidelberg New York, 1-88, 2006.

---

## ESTUDO DA ESTABILIDADE DE VITAMINAS NANOENCAPSULADAS EM SUSPENSÃO AQUOSA E EM SUBSTRATOS SÓLIDOS (FUBÁ)

Flávia G. Pinola<sup>1</sup>, \*Douglas de Britto<sup>2</sup>, Lícia M. Lundstedt<sup>3</sup>, Odilio B.G. Assis<sup>1</sup>, Luiz H.C. Mattoso<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio (LNNA), Embrapa Instrumentação.

<sup>2</sup>Embrapa Semiárido.

\*douglas.britto@embrapa.br

**Classificação:** Novos Materiais e Processos em Nanotecnologia e suas Aplicações no Agronegócio.

#### Resumo

A eficiência nutricional da ração para peixes pode ser diminuída devido a processos de degradação e lixiviação. Uma forma de minimizar estas perdas é através da formação de nanopartículas (NPs). Assim, vitaminas C, B9 e B12 foram encapsuladas em NPs de quitosana-tripolifosfato. A estabilidade das vitaminas foi avaliada a partir da suspensão aquosa das NPs+ vitamina (por espectroscopia no UV-Visível) e a partir da extração destas vitaminas em substrato sólido (fubá) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, HPLC. Os resultados indicaram que a NP teve um efeito positivo de preservação das vitaminas, principalmente para a vitamina C. Para a forma encapsulada, a concentração da vitamina C variou de 0,22 mg/mL a 0,07 mg/mL no período de 3 semanas, enquanto que para a forma não-encapsulada a concentração caiu de 0,22 mg/mL a 0,00 mg/mL no mesmo período. Da mesma forma, para o estudo da análise de vitamina a partir da extração em substrato sólido, a concentração da vitamina C praticamente não variou para o sistema NP-VitC, enquanto que para a forma não-encapsulada a concentração variou

de 0,014 mg/mL a 0,005 mg/mL. Estes resultados confirmam que a NP é uma alternativa potencial para preservação de nutrientes da ração de peixe.

**Palavras-chave:** Aquicultura; Ração de peixe; Nanoencapsulação; Vitaminas; Quitosana.

## STUDY OF THE STABILITY OF NANOENCAPSULATED VITAMINS IN AQUEOUS SUSPENSION AND IN SOLID SUBSTRATES (CORNMEAL)

### Abstract

The nutritional efficiency of fish feed may be decreased due to degradation and leaching. One way to minimize these losses is by formation of nanoparticles (NPs). Thus, vitamins C, B9 and B12 were encapsulated in NPs of chitosan-tripolyphosphate. The stability of vitamins was evaluated from the aqueous suspension of NPs + vitamin (by UV-Visible spectroscopy) and from the extraction of these vitamins from a solid substrate (cornmeal) by High Efficiency Liquid Chromatography, HPLC. The results indicated that the NP had a positive effect on the preservation of vitamins, especially for vitamin C. For the encapsulated form, the vitamin C concentration ranged from 0.22 mg/mL to 0.07 mg/mL within 3 weeks, whereas for non-encapsulated form, the concentration fell from 0.22 mg/mL to 0.00 mg/mL in the same period. Likewise, for the analysis of vitamin from the extraction of solid substrate, the concentration of vitamin C remained practically unchanged for the system NP-VitC, while for non-encapsulated form the concentration ranged from 0.014 mg/mL to 0.005 mg/mL. These results confirm that NP is a potential alternative for preserving nutrients from fish feed.

**Keywords:** Aquaculture; Fish feed; Nanoencapsulation; Vitamins; Chitosan.

### Publicações relacionadas

BRITTO, D., MOURA, M. R., AOUADA, F. A., MATTOSO, L.H.C., ASSIS, O. B. G. N,N,N-trimethyl chitosan nanoparticles as a vitamin carrier system. *Food Hydrocolloids*, v.27, p.487 - 493, 2012.

## 1 INTRODUÇÃO

Na piscicultura, as rações administradas representam a maior parte do custo de produção, variando de 40 a 70% (Kubitza, 2000; Kubitza, 1999). Além disto, as rações administradas enfrentam barreiras técnicas como manter a qualidade nutricional durante o processo de preparação, diminuir perdas de nutrientes por lixiviação, diminuir impactos ambientais pelo acúmulo de resíduos nos leitos aquosos. Uma maneira para diminuir esse processo de perda é através do encapsulamento. NPs de quitosana com enfoque alimentício têm sido amplamente reportadas na literatura, sendo objeto de revisão em artigo recente (Zhao, et al., 2011).

As vitaminas estão sujeitas a processos de degradação durante a estocagem, produção ou mesmo utilização dos alimentos, tanto para humanos quanto para animais, principalmente por oxidação, ação da luz ou da alta temperatura, e seu encapsulamento pode ser utilizado para diminuir a velocidade deste processo e aumentar o tempo de vida dos produtos que as contêm (Alishahi, 2011). Quitosana e seus derivados são polímeros naturais, biodegradáveis, seguro e não-tóxico e ideal para formação das NPs.

Com isso em vista, a encapsulação das vitaminas C, B12 e B9 foi estudada a partir da síntese de NPs de quitosana e tripolifosfato de sódio (TPP). Parâmetros importantes como estabilidade das vitaminas em suspensão aquosa de NP em diferentes condições e também estabilidade das vitaminas em substrato sólido (fubá) usados em ração de peixe foram avaliados. Este segundo estudo trouxe também informação para se estabelecer uma metodologia de extração e análise das vitaminas por HPLC em ração de peixe.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

Tripolifosfato de sódio, quitosana de média massa molar (80% desacetilada), ácido ascórbico, ácido fólico e cianocobalamina foram adquiridos da Aldrich Chemical Company Inc. (USA). Outros reagentes foram adquiridos da Synth (São Paulo). Fubá mimoso (Zilio) foi adquirido no mercado local.

## 2.2 Preparação das nanopartículas

Para obtenção das NPs, 150 mg de quitosana foram dissolvidos em 50mL de solução de ácido acético 1% (v/v) preparada com água destilada. Foram então preparadas três soluções de TPP com de 67 mg, 35 mg e 69 mg de TPP em 50 mL de água destilada. Em cada uma destas três soluções adicionou-se respectivamente 22,5 mg (15% em relação à massa de quitosana) das vitaminas C, B9 e B12. Em seguida, cada solução contendo TPP e vitamina foi colocada em uma bureta gotejada sobre a solução de quitosana sob agitação para a formação das NPs pelo mecanismo espontâneo de gelificação iônica.

## 2.3 Avaliação de vitaminas em suspensão aquosas

Suspensão aquosa de vitamina C foi colocada em estufa (Nova Ética) a 30°C e mantida por 3 semanas no escuro. Duas vezes por semana alíquotas de 1 mL foram retiradas e armazenadas em geladeira e protegidas da luz juntamente com 1mL de solução de ácido metafosfórico 6% (m/v). As amostras contendo as vitaminas B9 e B12 foram armazenadas da mesma maneira, porém com 1 mL de solução 0,1M KOH + 0,1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Soluções aquosas das vitaminas C, B9 e B12 foram submetidas à mesma metodologia para servir como parâmetros de comparação. Adicionalmente, degradação da solução aquosa de vitamina C em ácido acético 1% também foi considerada como parâmetro de comparação.

## 2.4 Preparação das amostras em substrato sólido

Amostras NPs foram centrifugadas (Continent R da Hanil Science Industrial Co., Korea) por 30min a 12000 rpm e 4 °C e após a separação do sobrenadante, as NPs foram adicionadas ao fubá numa razão de 4 mg de vitaminas para 10 g de fubá. No entanto, a massa de fubá foi ajustada, observando as respectivas Eficiência de Encapsulação de 42, 17 e 16% para as vitaminas B9, C e B12. Para as vitaminas puras (não-encapsuladas) não foi necessário este ajuste, aplicando-se diretamente a proporção acima referida. Após esta adição, colocou-se um volume mínimo de água, formando-se uma mistura homogênea com o fubá. A amostra foi então congelada, liofilizada, e depois macerada, obtendo-se um pó fino.

## 2.5 Degradação das amostras em substrato sólido

Cerca de 100 mg de cada uma das amostras descritas acima foram submetidas aos processos degradativos por luz, calor, O<sub>2</sub> e umidade, descritos a seguir nos tempos 0h, 24h e 48h. Após a degradação as amostras foram congeladas em tubos até o dia das análises. a) amostras foram colocadas em placas de Petri e deixadas em um recipiente que continha um spot de luz com uma lâmpada incandescente de 100W (127V) e forrado com papel alumínio (para refletir a luz o máximo possível); b) amostras foram colocadas em placas de Petri e deixadas em estufa (Estufa para esterilização e secagem, ODONTOBRAS), sem iluminação, a 80 °C; c) amostras foram colocadas em um cilindro com base porosa, abaixo da qual um fluxo de O<sub>2</sub> foi conectado, e com saída de ar em cima. O fluxo de gás permaneceu passando através da amostra por todo o período de tempo analisado; d) amostras foram colocadas em placas de Petri e deixadas em estufa com circulação de ar a 30 °C (Nova Ética) dentro da qual foi deixado também um recipiente contendo água para promover a umidificação do ambiente.

## 2.6 Análise das amostras

As amostras em suspensão foram analisadas por espectroscopia UV-Visível (UV-1601PC, Shimadzu Corporation, Japão), nos comprimentos de onda de 244, 283, 362 nm para as vitaminas C, B9 e B12. No caso das NPs, antes da análise as amostras foram centrifugadas (MiniSpin plus, Eppendorf), 10 min a 14500 rpm.

As amostras em substrato sólido foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência -HPLC (Varian, ProStar). As amostras congeladas foram adicionados 1 e 3 mL quando a amostra continha vitamina encapsulada ou não-encapsulada, respectivamente, de solução 0,1 M de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0,1 M de KOH, e elas foram submetidas a agitação em agitador de tubos (AP 56, Phoenix), por cerca de 60 segundos, a fim de extrair as vitaminas do meio, e posteriormente centrifugadas na minicentrífuga para injeção da amostra. As condições cromatográficas foram: pré-coluna e coluna C18 (Microsorb, MV100-5, 250x4,6mm), 20 µL de injeção, fluxo de 0,5 mL/min, gradiente de diluição contendo inicialmente 95% da fase A e 5% da fase B, e chegando a 80% da fase A e 20% da fase B após 10 minutos, sendo A a fase aquosa (0.1 M de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0.1 M de KOH) e B a fase orgânica (isopropanol grau HPLC) e

detector UV-Visível programado para a detecção em 243 nm, 280 e 362 nm para as vitaminas C, B9 e B12 respectivamente.

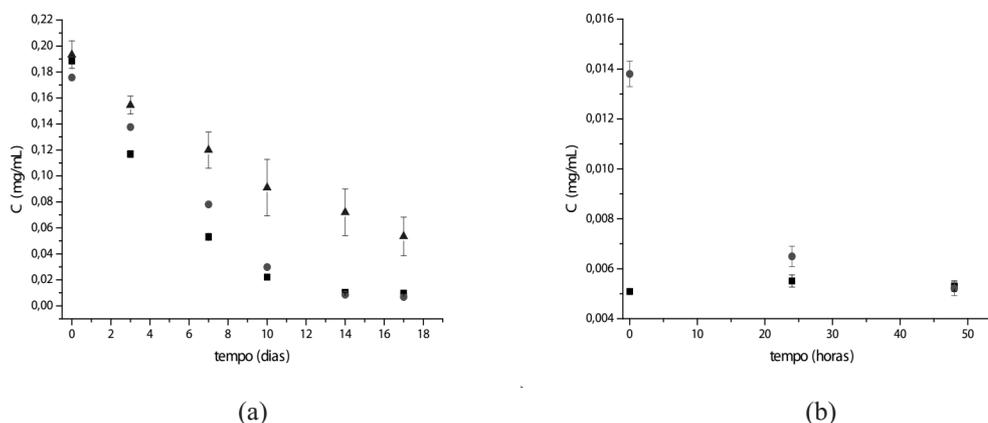
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises da quantidade de vitaminas B9 e B12 das amostras em suspensão mostram claramente que estas duas vitaminas não sofrem muita influência em função do tempo de estocagem. De fato, foi observado que a concentração das vitaminas B9 e B12 não apresentou variação significativa tanto para a forma de suspensão de NPs como para a solução pura (controle comparativo) dentro do período de tempo analisado.

Já em relação à degradação da vitamina C foi observado um comportamento bem diferente (Figura 1a). A vitamina C sofre oxidação nas condições ambientes e se degrada com o tempo. Por outro lado, a degradação desta vitamina quando encapsulada é bem menor. Isto mostra que o encapsulamento tem um efeito positivo na conservação desta vitamina. Outro fato interessante é que o meio ácido acético 1% também é favorável à degradação da vitamina C (Figura 1a). Este fato coloca o uso de derivados hidrossolúveis de quitosana como alternativa potencial no encapsulamento de vitaminas, pois o solvente para estes derivados é somente água, não empregando o ácido acético 1% que, como visto, é mais agressivo à degradação da vitamina.

O estudo da degradação das vitaminas a partir de substratos sólidos mostrou que a temperatura é um fator significativo que provoca a degradação da vitamina C (Figura 1b). Nota-se claramente o efeito positivo de preservação da vitamina C na forma encapsulada, em que a curva de degradação praticamente não variou para forma encapsulada durante as 48 horas de análise, enquanto que para a forma não-encapsulada houve um decréscimo significativo na concentração de vitamina C. De fato, tanto no experimento em suspensão aquosa como neste de extração do substrato sólido, as NPs de quitosana-TPP apresentaram excelente capacidade de preservação, principalmente da vitamina C.

Este estudo da degradação e extração em substrato sólido (fubá) também forneceu informação dos parâmetros de HPLC a ser utilizados na extração da ração de peixe em que haverá um nível de complexidade maior devido à presença de vários ingredientes. Os outros parâmetros (umidade, luz e oxigênio) apresentaram alguma influência, mas os dados ainda são inconclusivos. Experimentos estão sendo repetidos para a confirmação dos resultados.



**Figura 1.** (a) Variação da concentração de vitamina C em água (●); solução aquosa de ácido acético 1% (■) e suspensão aquosa de NPs (meio reacional) (▲) durante 3 semanas de estocagem. (b). Variação da concentração de vitamina C encapsulada (■) e não-encapsulada (●) extraída do fubá durante 48 horas de degradação a 80°C em estufa.

### 4 CONCLUSÃO

Os resultados indicaram que tanto no experimento da estabilidade da vitamina em suspensão aquosa como no experimento de extração da vitamina a partir de substrato sólido (fubá), as NPs de quitosana e TPP apresentaram excelente capacidade de preservação das vitaminas, principalmente da vitamina C. NP é uma alternativa potencial e viável para preservação de nutrientes da ração de peixe.

## AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos aos órgãos FINEP/MCT, Embrapa (Rede AgroNano), FAPESP, CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

KUBITZA, F. Manejo nutricional e alimentar de tilápias. Revista Panorama da Aquicultura, Jundiaí, SP, v. 10, n. 60, p. 31-36, 2000.

KUBITZA, F. Nutrição e alimentação de tilápias. Parte 1. Revista Panorama da Aquicultura, Jundiaí, SP, v. 9, n. 52, p. 42-50, 1999.

ZHAO, L.-M.; SHI, L.-E.; ZHANG, Z.-L.; CHEN, J.-M.; SHI, D.-D.; YANG, J.; TANG, Z.-X. Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 28, n. 3, p. 353-362, 2011.

ALISHAHI, A.; MIRVAGHEFI, A.; TEHRANI, M.R.; FARAHMAND, H.; SHOJAOSADATI, S.A.; DORKOOSH, F.A.; ELSABEE, M.Z. Shelf life and delivery enhancement of vitamin C using chitosan nanoparticles. Food Chemistry, v. 126, p. 935-940, 2011.

## NANOPARTÍCULAS DE TRIMETIL QUITOSANA. I - CARACTERIZAÇÃO E EFICÁCIA DE ENCAPSULAMENTO DE VITAMINAS HIDROSSOLÚVEIS

**\*Douglas de Britto<sup>1</sup>, Marcia R. de Moura<sup>2</sup>, Fauze A. Aouada<sup>2</sup>, Flávia G. Pinola<sup>3</sup>, Lícia M. Lundstedt<sup>4</sup>, Odilio B. G. Assis<sup>3</sup>, Luiz H. C. Mattoso<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Embrapa Semiárido. <sup>2</sup>UNESP Ilha Solteira. <sup>3</sup>Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio (LNNA), Embrapa Instrumentação. <sup>4</sup>Embrapa Aquicultura.

\*douglas.britto@embrapa.br

**Classificação:** Novos Materiais e Processos em Nanotecnologia e suas Aplicações no Agronegócio.

### Resumo

Nanoencapsulação é um processo adequado para reduzir a degradação de componentes instáveis. Neste estudo, nanopartículas (NPs) de quitosana e trimetilquitosana com tripolifosfato foram utilizadas para encapsular vitaminas C, B9 e B12. As análises de tamanho de partícula mostraram que, para uma razão fixa de polímero:tripolifosfato, o sistema experimentou uma enorme variação de tamanho quando as vitaminas foram adicionada; para a vitamina B9 o tamanho variou de 150±5 nm a 809±150 nm. O potencial zeta confirmou que, em geral, a trimetilquitosana tem menor carga residual positiva (20 mV) em comparação com a quitosana (40 mV). A eficiência de encapsulação mostrou uma dependência entre a estrutura da NPs e da solubilidade vitamina; o sistema mais eficientemente encapsulado foi da vitamina B9 (~40%).

**Palavras-chave:** Encapsulamento; Liberação controlada; Nanogel; Ração de peixe; Nutrição.

### CONTROLLED RELEASE OF HYDROSOLUBLE VITAMINS FROM TRIMETHYL CHITOSAN NANOPARTICLES

#### Abstract

Nanoencapsulation is a very suitable process to reduce degradation of instable components. In this study, chitosan and trimethyl chitosan with tripolyphosphate are used to nanoencapsulate vitamins C, B9 and B12. Particle size analysis shows that for a fix proportion polymer : tripolyphosphate, the system experiences a huge size variation by vitamins addition; for vitamin B9 the size varies from 150±5 nm to 809±150 nm. The zeta potential confirms that, generally, trimethyl chitosan has lower net positive charge (20 mV) than chitosan nanoparticles (40 mV). The encapsulation efficiency shows dependency on the nanoparticle structure and vitamin solubility; the most efficiently encapsulated is the vitamin B9 (~40%).