

BRITTO, D., FREDERICO, F. R., ASSIS, O. B. G. Optimization of N,N,N-trimethylchitosan synthesis by factorial design. *Polymer International* v. 60, p. 910-915, 2011

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, n. 2, p. 487-493, 2012.

HERRMANN, W.; OBEID, R. Vitamin in the prevention of human diseases, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin/New York, 2011.

JANG, K.; LEE, H.G. Stability of chitosan nanoparticles for l-ascorbic acid during heat treatment in aqueous solution, *Journal of Agricultural Food Chemistry*. v. 56, p. 1936-1941, 2008.

Report of a joint FAO/WHO expert consultation, Vitamin and mineral requirements in human nutrition, 2nd Ed., World Health Organization, Bangkok, 2004.

SOLIMAN, A.K.; JAUNCEY, K.; ROBERTS, R.J. Stability of L-ascorbic acid (vitamin C) and its forms in fish feeds during processing, storage and leaching, *Aquaculture*, v. 60, p. 73, 1987.

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.

## NANOPARTÍCULAS DE TRIMETIL QUITOSANA. II - PERFIL DE LIBERAÇÃO CONTROLADA 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. Por meio de espectroscopia de UV-Visível, o estudo de liberação mostrou perfis diferentes para as vitaminas C, B9 e B12 em solução de PBS neutro, com respectiva liberação de 36%, 52% e 16% após 2, 24 e 4 horas. Em geral, a taxa de liberação foi mais lenta em meio ácido.

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

### CONTROLLED RELEASE OF HYDROSOLUBLE VITAMINS FROM TRIMETHY 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. By means of UV-Visible spectroscopy, release study shows different profiles for vitamins C, B9 and B12 in neutral PBS solution, with a respective release of 36%, 52% and 16% after 2, 24 and 4 hours. In general, the liberation rate is slow in acid media.

**Keywords:** Encapsulation; Controlled release; Nanogel; Fishery diet; Nutrition.

### 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

As vitaminas são fundamentais para o crescimento normal do corpo humano e animal, desempenhando funções específicas e vitais no metabolismo e manutenção da vida. As vitaminas, no entanto, devem ser administradas de forma adequada; sua falta pode levar a doenças específicas (Herrmann e Obeid, 2011), enquanto que o excesso pode ser tóxico, por isso a preocupação das agências reguladoras (OMS/FAO) em recomendar as doses específicas para a sua ingestão (Report of a joint FAO/WHO expert consultation, 2004). Cerca de treze vitaminas são reconhecidas como essenciais para a nutrição humana e estas podem ser classificadas em lipossolúveis, *e.g.*, vitaminas A, D, e, K; e hidrossolúveis, *e.g.*, vitamina C e membros do grupo da vitamina B.

Durante o processamento e armazenamento de alimentos, a maioria das vitaminas pode ser perdida devido a reações químicas, principalmente por oxidação. Isso é um problema, especialmente para a nutrição animal, área em que a conservação e manipulação nem sempre são adequadas. Em rações formuladas para peixes em aquicultura uma preocupação adicional é a perda de nutrientes por lixiviação (Soliman et al, 1987) Uma das formas de evitar ou reduzir essa taxa de degradação é através da micro e nanoencapsulação (Jang, K. e Lee, 2008; Alishahi et al., 2011).

Considerando a sua capacidade quelante e complexante, o polissacarídeo quitosana tem sido extensivamente estudado para a encapsulação, principalmente na área alimentícia (Zhao et al., 2011) e fármacos (Agnihotri et al. 2004). O derivado hidrossolúvel N,N,N-trimetil quitosana, TMQ, também é adequado para preparar NPs para muitas aplicações.

Assim, visando a estabilização ou a manutenção de tais vitaminas quando usadas como aditivos alimentares, o encapsulamento foi realizada por meio da gelificação iônica da quitosana e TMQ com tripolifosfato, TPP. Parâmetros específicos como o perfil de liberação no sistema aquoso em meio neutro e ácido serão discutidos.

## 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).

### 2.2 Preparação e caracterização das nanopartículas

As NPs foram preparadas e caracterizadas conforme descrito na parte 1 (Britto et al., 2014).

### 2.3 Determinação do perfil de liberação.

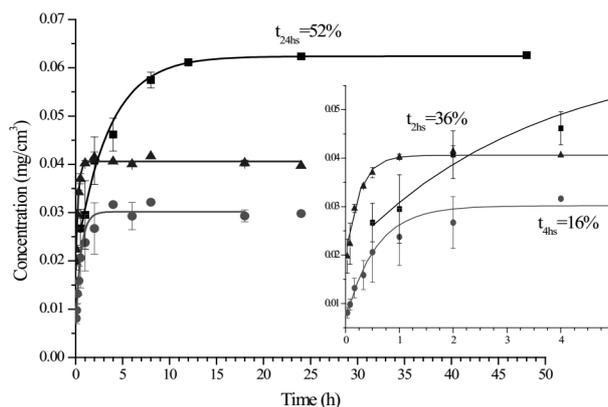
Após a separação do sobrenadante, o precipitado de NPs foi ressuspensão em 40,0 mL (para a vitamina B9) ou 20,0 mL (para as vitaminas C e B12) de solução tampão de fosfato salina preparada recentemente, PBS, (NaCl, 137,0 M + KCl, 2,7 M + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10,0 M + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,0 M, pH = 7,4), procedendo-se a liberação a 25°C sob agitação orbital (120 rpm). Em intervalos de tempo pré-determinados, alíquotas foram centrifugadas, o sobrenadante separado e a vitamina livre determinada como mencionado acima. Todas as experiências foram realizadas em triplicata. Para os ensaios, em meio ácido em pH = 3,0, a solução de PBS foi ajustada com HCl 1,0 M.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

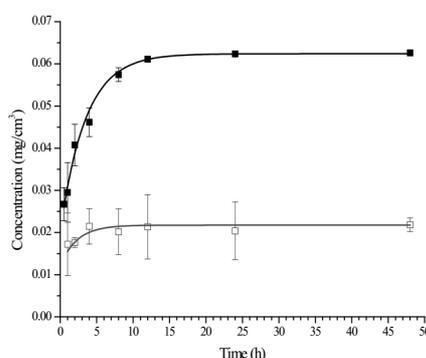
### 3.1 Perfil de liberação

O perfil de liberação é muito importante para definir a durabilidade teórica da substância encapsulada. Cada vitamina encapsulada apresentou diferentes perfis de liberação em solução neutra de PBS (Figura 1). Os sistemas de Qui-Vit C e Qui-Vit B12 apresentaram um efeito *burst* (liberação inicial rápida). Para a vitamina B12 este efeito foi menos pronunciado. Por outro lado, o sistema Qui-VitB9 apresentou um comportamento muito diferente, com uma taxa de liberação mais lenta, atingindo um

patamar em 24 horas. É evidente que a propriedade particular de cada vitamina influencia o perfil de liberação. A vitamina C é uma molécula pequena e bem solúvel em água, portanto, em um estado intumescido ela é rapidamente liberada do nanogel. A vitamina B12, embora muito solúvel em água ela tem um tamanho relativamente grande e portanto, sua liberação é mais lenta (Brazel e Peppas, 1999). Por outro lado, o perfil de liberação da vitamina B9 pode ser compreendido em função de sua solubilidade dependente do pH. Em solução neutra de PBS (Figura 1) a vitamina B9 é pouco solúvel e, portanto, sua liberação é mais lenta. O perfil de liberação para a vitamina B9 em meio PBS ácido (pH = 3,0), confirma claramente a dependência da solubilidade em função do pH (Figura 2). Em tais condições, a quantidade liberada e a velocidade de liberação foram muito baixas em comparação com a liberação medida em condição neutra. Neste caso, a vitamina B9 tem uma afinidade muito baixa para com o solvente e a sua liberação ocorre de maneira muito lenta.

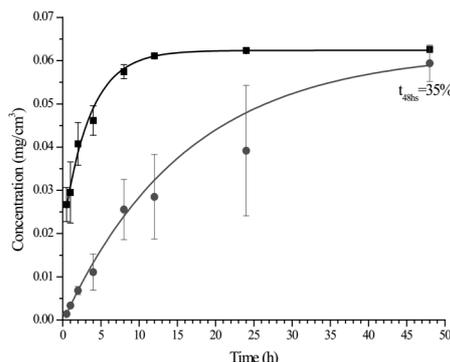


**Figura 1.** Perfil de liberação para os sistemas Qui-Vit C (▲), Qui-Vit B9 (■) e Qui-Vit B12 (●) em solução neutra de PBS (pH = 7.4). Detalhe: expansão das curvas para a faixa de 0 – 5 horas.



**Figura 2.** Comparação dos diferentes perfis de liberação entre Qui-Vit B9 em solução neutra de PBS (■) e em meio ácido, pH = 3.0 (□).

Um comportamento bem diferente e muito interessante foi encontrado para o perfil de liberação dos sistemas de TMQ, principalmente a da TMQ-Vit B9 (Figura 3). Este perfil mostrou um efeito *burst* menos pronunciado quando comparado com a Qui-VitB9. O sistema apresentou uma taxa de liberação baixa com um aumento gradual com o tempo, atingindo 35% em 48 horas. Este é um cenário positivo, uma vez que em contrapartida a quitosana atingiu 52% em 24 horas. Evidentemente a natureza hidrofílica da cadeia TMQ foi contrabalançada pela baixa solubilidade da vitamina B9, resultando numa liberação gradual de vitamina e também da solubilização das NPs.



**Figura 3.** Comparação dos diferentes perfis de liberação entre Qui-Vit B9 (■) e TMQ-Vit B9 (●) ambos em solução neutra de PBS.

#### 4 CONCLUSÃO

O efeito *burst* pode ser explorado em algumas aplicações onde é desejável uma liberação inicial grande de vitamina, seguida por uma taxa de liberação mais lenta e constante. Uma das vantagens do TMQ sobre quitosana foi um efeito *burst* menos pronunciado, principalmente a da vitamina B9. Além disso, a ocorrência da solubilização progressiva das NPs de TMQ pode ser explorada em algumas aplicações, tais como formulação de rações para peixes. De facto, os resultados mostram a potencialidade das NPs de quitosana e TMQ-TPP como veículo encapsulador e pode ser usado como um agente de estabilização de vitaminas em produtos alimentícios para humanos e animais.

#### AGRADECIMENTOS

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

#### REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, S.A.; MALLIKARJUNA, N.M.; AMINABHAVI, T.M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery, *Journal of Controlled Release*, v 100, n. 1, p. 5–28, 2004.
- 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.
- BRAZEL, C.S.; PEPPAS, N.A. Mechanisms of solute and drug transport in relaxing, swellable, hydrophilic glassy polymers, *Polymer* v. 40, p. 3383–3398, 1999.
- BRITTO, D.; MOURA, M.R.; AOUADA, F.A.; PINOLA, F.G.; LUNDSTEDT, L.M.; MATTOSO, L.H.C.; ASSIS, O.B.G. Nanopartículas de trimetil quitosana. I Caracterização e eficácia de encapsulamento de vitaminas hidrossolúveis. In: WORKSHOP DE NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO, VIII, 2014, Juiz de Fora, Anais... submetido.
- HERRMANN, W.; OBEID, R. Vitamin in the prevention of human diseases, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin/New York, 2011.
- JANG, K.; LEE, H.G. Stability of chitosan nanoparticles for l-ascorbic acid during heat treatment in aqueous solution, *Journal of Agricultural Food Chemistry*. v. 56, p. 1936-1941, 2008.
- Report of a joint FAO/WHO expert consultation, Vitamin and mineral requirements in human nutrition, 2nd Ed., World Health Organization, Bangkok, 2004.

SOLIMAN, A.K.; JAUNCEY, K.; ROBERTS, R.J. Stability of L-ascorbic acid (vitamin C) and its forms in fish feeds during processing, storage and leaching, *Aquaculture*, v. 60, p. 73, 1987.

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.