

## 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%).

**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 nano-encapsulação (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 ou TMQ com tripolifosfato, TPP. Parâmetros específicos como capacidade de encapsulação após a centrifugação (Eficiência de Encapsulação) 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

A TMQ foi obtida por metilação da quitosana com dimetilsulfato (Britto et al., 2011).

As NPs foram preparadas pela adição contínua (~ 1,0 mL/min) de 50,0 mL de uma solução de TPP a 0,7; 1,34 e 1,38 mg/mL, respectivamente, para as vitaminas B9, B12, C em 50,0 mL de solução de quitosana a 3,0 mg/mL (Britto et al., 2012). A quitosana foi dissolvida em ácido acético 1%. Da mesma forma, para a TMQ 50,0 mL de uma solução de TPP a 0,6; 0,7 e 0,44 mg/mL, respectivamente para as vitaminas B9, B12, C foi adicionada a 50,0 mL de solução de TMQ a 2,0 mg/mL em água desionizada. O sistema foi agitado magneticamente à temperatura ambiente durante a adição de solução de TPP e estendida por 15 minutos após a adição total. A quantidade de vitaminas foi de 15,0% (m/m) com base na massa de quitosana ou de TMQ. Outros testes com base em 5,0% e 10,0% (m/m) de vitaminas também foram feitos. As vitaminas foram previamente dissolvidas na solução de TPP.

O rendimento das NPs, expresso em percentagem, foi baseado na razão entre a massa seca liofilizada de NPs e a soma das massas de quitosana (ou TMQ) e TPP.

Um equipamento Zetasizer Nano ZS Zen 3600 da Malvern Instruments Ltd., Inglaterra, com base na técnica de dispersão dinâmica da luz, foi usado para medir a distribuição do tamanho médio hidrodinâmico e o potencial zeta das NPs. Todas as análises foram realizadas em triplicata, a 25°C.

## 2.3 Determinação da eficácia de encapsulação

A eficiência de encapsulação das NPs foi determinada após a centrifugação da suspensão a 12000 rpm, a 4°C (centrífuga Continente R da Hanil Science Industrial Co., Coreia). O precipitado foi separado e a quantidade de vitamina no sobrenadante determinada por espectroscopia de UV-Visível (Espectrofotômetro UV-1601PC da Shimadzu Co., Japão). Assim, 1,0 mL do sobrenadante foi extraído com o mesmo volume de solução aquosa de ácido metafosfórico a 3,0% (m/v) para a vitamina C e com uma solução aquosa constituída de 0,1 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 0,1 M de KOH para as vitaminas do complexo B. Quando necessário, a solução foi centrifugada a 10.000 rpm para eliminar os sólidos em suspensão. A detecção foi em 244, 283, 362 nm, respectivamente, para as vitaminas C, B9 e B12. Em seguida, a eficiência de encapsulação (EE) foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$EE = (\text{vitamina no sobrenadante} - \text{vitamina total}) / (\text{vitamina total}) \times 100$$

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Propriedades físico-químicas da nanopartículas

O tamanho e o potencial zeta das NPs mostraram ser dependentes do tipo da vitamina adicionada (Tabela 1). Deste modo, para atingir o tamanho desejado, torna-se necessário fixar a concentração do polímero e a ajustar a concentração de TPP. A partir da Tabela 1, é claro que a adição de vitamina B9 (mantendo-se fixa a proporção utilizada para o sistema puro Qui-TPP), resultou num aumento considerável no tamanho das NPs. De fato, a vitamina B9 é praticamente insolúvel em meio ácido e em tais condições é quimicamente favorável para ela ficar na fase sólida (precipitado de NPs) do que na fase líquida (solvente da quitosana). Isto aumenta o tamanho e também influenciará o EE, bem como o perfil de libertação. O mesmo argumento pode ser usado para explicar o tamanho dos sistemas Chi-VitC e Qui-VitB12. Nestes casos, dobrando-se a quantidade de TPP não resultou num aumento significativo no tamanho das NPs. Como estas vitaminas são muito solúveis em meio ácido é favorável para elas estar na fase líquida, de modo que o aumento do tamanho das NPs não foi proeminente.

**Tabela 1.** Características principais de NPs de Qui-TPP e TMQ-TPP encapsuladas com vitaminas C, B9 e B12 a 15% (m/m)

System	TPP <sup>a</sup> (mg cm <sup>-3</sup> )	Nanoparticle size (nm)	Zeta potential (mV)	Yielding (%)
Qui	0,70	150±5	40,3±4,0	16
Qui-Vit B9	0,70	809±150	64,9±4,6	22
Qui-Vit C	1,34	325±24	30,7±3,7	54
Qui-Vit B12	1,38	326±41	29,4±3,1	55
TMQ	0,40	404±60	26,9±5,6	4
TMQ-Vit B9	0,60	606±10	18,4±3,0	54
TMQ-Vit C	0,70	338±74	10,3±6,4	37
TMQ-Vit B12	0,44	335±21	20,7±7,1	10

<sup>a</sup> Concentração inicial.

Para a TMQ, outras considerações devem ser feitas, tendo em mente que o solvente agora é água (pH ≈ 7,0). Por exemplo, comparando os sistemas TMQ e TMQ-VitB9 (quinta e sexta linhas na Tabela 1), um aumento na quantidade de TPP não resultou num aumento considerável no tamanho das NPs. Neste caso, a fase líquida não é tão desfavorável para esta vitamina como aquele da quitosana e vitamina B9 pode estar tanto nas fases sólida e líquida. Mais uma vez, este efeito influencia a formação de NPs, bem como as suas propriedades de encapsulamento.

O potencial zeta também foi influenciado pela quantidade de TPP e vitamina. Em geral, tanto para quitosana e TMQ, seu valor aumenta para a vitamina B9, mas diminui para as outras vitaminas,

quando comparado com as NPs não-encapsuladas. Tal como discutido na literatura (Alishahi et al., 2011; Britto et al., 2012), NPs de quitosana e TMQ têm uma carga superficial positiva, devido ao caráter catiônico destes polieletrólitos e, dependendo da estrutura do complexo polímero-vitamina-TPP, o seu valor pode aumentar ou diminuir. Além disso, o potencial zeta, também mostrou uma clara diferença residual de carga global entre a quitosana e a TMQ e depois do entrecruzamento com o TPP. A quitosana tem muito mais da carga positiva, uma vez que cada grupo amina é protonado em meio ácido, já para a TMQ esta densidade de carga é menor visto que somente 40% de grupos quaternários são responsáveis pela geração de carga positiva (Britto et al., 2011).

### 3.2 Eficiência de encapsulamento

De acordo com a Tabela 2, o sistema mais eficiente foi o da vitamina B9, tanto para quitosana como para a TMQ. O fator preponderante aqui é, evidentemente, a solubilidade da vitamina. Vitaminas muito solúveis em meio aquoso (C e B12) apresentaram baixa EE. O sistema de quitosana-TPP pode ser classificado como um nanogel que combina características de nanomateriais e hidrogel. Como as NPs neste estudo foram sintetizadas e encapsuladas num estado intumescido, propriedades químicas das vitaminas, principalmente sua solubilidade influenciam o EE, bem como o perfil de liberação.

**Tabela 2.** Eficiência de encapsulação, EE, (%) de vitaminas em NPs de Qui-TPP e TMQ-TPP em três diferentes concentrações de vitaminas

System	EE a 15% de vitamina	EE a 10% de vitamina	EE a 5% de vitamina
Qui-Vit B9	42,4	31,0	5,7
Qui-Vit C	17,1	28,0	15,0
Qui-Vit B12	16,1	~1,0	~1,0
TMQ-Vit B9	44,8	-	-
TMQ-Vit C	6,3	-	-
TMQ-Vit B12	4,4	-	-

## 4 CONCLUSÃO

A adição de vitamina ao sistema polissacarídeo-TPP afetou muito a estrutura das NPs, como o tamanho e o potencial zeta. As propriedades particulares de cada vitamina, por exemplo, massa molar e solubilidade, desempenham um papel importante na eficácia de encapsulação e no perfil de liberação. 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.

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 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. 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.