



**SAMANTA COSTA MACHADO SILVA**

**ENCAPSULAMENTO DE TRIPTOFANO EM  
NANOFIBRAS DE ZEÍNA OBTIDAS POR  
ELETROFIAÇÃO**

**LAVRAS-MG**

**2020**

**SAMANTA COSTA MACHADO SILVA**

**ENCAPSULAMENTO DE TRIPTOFANO EM NANOFIBRAS DE ZEÍNA  
OBTIDAS POR ELETROFIAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais, área de concentração Produtos e Nanoprodutos Alimentícios, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Juliano Elvis de Oliveira

Orientador

Prof. Dr. Diego Alvarenga Botrel

Prof. Dr. Júlio Cesar Ugucioni

Coorientadores

**LAVRAS-MG**

**2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Silva, Samanta Costa Machado.

Encapsulamento de triptofano em nanofibras de zeína obtidas  
por eletrofição / Samanta Costa Machado Silva. - 2020.

55 p. : il.

Orientador(a): Juliano Elvis de Oliveira.

Coorientador(a): Júlio César Ugucioni, Diego Alvarenga  
Botrel.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Eletrofição. 2. Nanofibras. 3. Biopolímero. I. de Oliveira,  
Juliano Elvis. II. Ugucioni, Júlio César. III. Botrel, Diego  
Alvarenga. IV. Título.

**SAMANTA COSTA MACHADO SILVA**

**ENCAPSULAMENTO DE TRIPTOFANO EM NANOFIBRAS DE ZEÍNA  
OBTIDAS POR ELETROFIAÇÃO**

**TRYPTOPHAN ENCAPSULATION IN ZEIN NANOFIBERS OBTAINED  
BY ELECTROSPINNING**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais, área de concentração Produtos e Nanoprodutos Alimentícios, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA EM 03 DE MARÇO DE 2020.

Dr. Flávio Augusto de Melo Marques      UFLA

Dr. Guilherme Max Dias Ferreira      UFLA

Dr. Jorge Amim Júnior      UFRJ

Prof. Dr. Juliano Elvis de Oliveira

Orientador

Prof. Dr. Diego Alvarenga Botrel

Prof. Dr. Júlio Cesar Ugucioni

Coorientadores

**LAVRAS-MG**

**2020**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me fortalecer e permitir alcançar meus objetivos, por colocar em meu caminho pessoas de bom coração que muito me ajudaram a superar minhas dificuldades e concluir mais esta etapa de minha vida.

Aos meus pais, por todo o carinho e apoio, por sempre acreditarem em mim.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais, pela oportunidade de adquirir e aprimorar conhecimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão de bolsa.

Ao professor Júlio por todo o apoio, atenção e dedicação, pela paciência e persistência, por acreditar que chegaríamos até aqui com um grande trabalho finalizado.

Ao discente Raphael Henrique Fuzatto, por todo o auxílio e dedicação fornecidos ao longo da execução dos experimentos e finalização do trabalho.

Muito obrigada!

## RESUMO

A nanotecnologia, termo utilizado para designar a manipulação da matéria em nanoescala, vem sendo considerada uma área estratégica, representando, para a indústria, o futuro do desenvolvimento de novos produtos. A elevada área superficial apresentada pelos nanomateriais, se comparada ao volume, é capaz de torná-los atraentes e aplicáveis em setores diversos. Na piscicultura, por exemplo, a nanotecnologia é eficaz para desempenhar um papel fundamental no processo de nutrição animal. O encapsulamento de nutrientes ditos indispensáveis à alimentação de peixes, em nanoestruturas poliméricas, permite solucionar problemas decorrentes da instabilidade de substâncias, quando em contato com a água, impedindo a sua perda, para o meio e garantindo, assim, que maior quantidade do nutriente seja ingerida pelo animal. Uma das técnicas passíveis de serem empregadas tanto na produção de nanoestruturas como no encapsulamento de substâncias é a eletrofiação, uma técnica simples, de fácil manuseio de equipamento e baixo consumo de solução, comumente empregada na produção de nanofibras poliméricas.

**Palavras-chave:** Eletrofiação. Nanofibras. Biopolímero. Triptofano. Encapsulamento. Nutrientes. Piscicultura.

## **ABSTRACT**

Nanotechnology is a term used to describe the manipulation of matter at a nanoscale and has been considered a strategic area, representing the future of product development for the industry. The high surface area of nanomaterials makes them attractive and applicable in different sectors when compared to its volume. In fish farming, for example, nanotechnology can play a fundamental role in animal nutrition. The encapsulation of nutrients essential to fish in polymeric nanostructures can solve issues resulting from substance instability when in contact with water, preventing their loss to the environment and, thus, ensuring that more nutrients are used by the animal. Electrospinning can be used for both the production of nanostructures and substance encapsulation. It is a simple technique, with easy equipment handling and low solution consumption, commonly used to produce polymeric nanofibers.

**Keywords:** Electrospinning. Nanofibers. Biopolymer. Tryptophan. Encapsulation. Nutrients. Pisciculture.

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	8
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	11
<b>2.1 Nanotecnologia</b> .....	11
<b>2.2 Piscicultura..</b> .....	12
<b>2.3 Aminoácidos</b> .....	13
<b>2.4 Processo de Encapsulamento</b> .....	16
<b>2.5 Eletrofiação</b> .....	18
<b>2.6 Polímeros</b> .....	23
<b>2.7 Zeína</b> .....	24
<b>2.8 Sistema de Liberação</b> .....	26
<b>2.9 Modelos matemáticos</b> .....	27
<b>3. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS</b> .....	29
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	29
<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGO</b> .....	37
<b>ARTICLE 1 - ENCAPSULATION OF TRYPTOPHAN IN NANOFIBERS OBTAINED BY ELECTROPHYING AND BIOPOLIMERIC FILMS: A COMPARATIVE EVALUATION BETWEEN DIFFERENT SCALES APPLIED IN THE RELEASE SYSTEM</b> .....	38
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	40
<b>2. MATERIALS AND METHODS</b> .....	41
<b>3. RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	44
<b>4. CONCLUSIONS</b> .....	52
<b>5. ACKNOWLEDGMENTS</b> .....	53
<b>6. REFERENCES</b> .....	53



## **PRIMEIRA PARTE**

## 1. INTRODUÇÃO

O termo nanotecnologia é utilizado para expressar a manipulação da matéria em nanoescala (Sousa Ferreira, Do e Rangel, 2009). Considerada um setor de elevada intensidade tecnológica (Piscopo, Teixeira e Biancolino, 2014), encontra-se, amplamente presente na vida cotidiana, mudando toda a sociedade (He, Deng e Hwang, 2019).

Diferentemente do que ocorre em países, como Estados Unidos, Japão, China e Alemanha, onde a nanotecnologia é considerada destaque, em decorrência da atuação marcante em grandes empresas (Piscopo, Teixeira e Biancolino, 2014), no Brasil, esta área ainda encontra-se em estágio intermediário de desenvolvimento (Sant'anna, Alencar e Ferreira, 2013), destacando-se as pesquisas realizadas em universidades e centros de pesquisa.

O desenvolvimento de produtos à base de nanotecnológica é propício a contribuir para a geração de lucros na economia (Martins e Engelmann, 2016). Nas indústrias farmacêutica e de cosméticos, por exemplo, uma parcela do crescimento de mercado está relacionada à capacidade de produção de nanomateriais com alto valor agregado (Piscopo, Teixeira e Biancolino, 2014). Na produção de cosméticos, o uso da nanotecnologia proporciona um aumento na liberação de substâncias favoráveis a atuar sobre a pele. Já na indústria farmacêutica, vem sendo comumente empregada, em sistemas de liberação de fármacos, com formulações já disponíveis no mercado, como as disponíveis para o tratamento de câncer (Kargozar e Mozafari, 2018).

A elevada área superficial, quando comparada ao volume, representa a principal característica apresentada pelos nanomateriais, capaz de torná-los, consideravelmente atraentes, podendo ser aplicados nas mais variadas áreas, como engenharia, saúde, eletrônica, entre outras. Além disso, nanomateriais podem ser obtidos, baseados em diversas técnicas, incluindo a eletrofição, ou *electrospining*, em que nanofibras são produzidas a partir da aplicação de uma tensão elevada sobre uma solução polimérica.

As nanoestruturas formadas apresentam aplicações variadas nas mais diversas áreas. Na piscicultura, por exemplo, a nanotecnologia contribui para a preservação de espécies cultivadas, além disso, pode ser empregada como fonte no reconhecimento rápido de doenças, em sistemas de liberação de medicamentos e vacinas, bem como contribuir para o aumento da vida de prateleira do produto durante sua comercialização (Dar *et al.*, 2019). Os nanomateriais podem, também, ser empregados no processo de alimentação de peixes, possibilitando maior aquisição

de nutrientes considerados indispensáveis ao animal.

A piscicultura, por sua vez, compreende um setor da aquicultura, em constante expansão no Brasil, destinada à produção de peixes, principalmente os de água doce (Dantas, G. *et al.*, 2017). O setor vem ganhando espaço no mercado brasileiro e sua contribuição apresenta números significativos. De acordo com dados publicados no Anuário Brasileiro de Piscicultura, edição 2019, no ano de 2018, o Brasil exportou 32.417 toneladas de peixes congelados, frescos e refrigerados, alcançando uma receita de US\$ 136 milhões.

Para atender toda a produção de peixes no país, considerando o sistema de cultivo em tanques-rede e viveiros, é importante que os animais recebam uma alimentação que atenda as exigências nutricionais requeridas. Peixes como a tilápia, por exemplo, necessitam de uma dieta rica em aminoácidos essenciais, ácidos graxos, vitaminas e minerais. Uma alimentação balanceada, porém pode representar 40 a 70% dos custos de produção de pescado, estando relacionados à presença de proteínas na composição das rações, ou seja, um nutriente de extrema importância no crescimento dos animais, mas de alto valor agregado (Pezzato, Barros e Furuya, 2009).

Além da composição das rações, outro ponto importante a ser considerado, durante o processo de produção de pescado, remete à estabilidade de rações quando em contato com a água. É de suma importância que os nutrientes, presentes na composição alimentar, não sejam perdidos para o meio, garantindo, assim, que eles sejam ingeridos em quantidades satisfatórias pelos animais.

Neste contexto, o presente trabalho se propôs a desenvolver nanofibras biopoliméricas, utilizando a técnica de eletrofiação, destinadas ao encapsulamento do triptofano, um aminoácido essencial, comumente presente na composição de rações destinadas à alimentação de peixes. O encapsulamento da substância de interesse é uma alternativa que mantém o material em estudo, no interior de uma matriz, impedindo que seja perdido para o meio. Dessa forma, possibilita que maior quantidade da substância que está sendo encapsulada chegue ao local desejado. Além disso, um estudo comparativo foi realizado, utilizando filmes biopoliméricos, também produzidos, a partir de zeína e triptofano, de modo a avaliar o comportamento do aminoácido quando encapsulado em estruturas com escalas diferentes. As estruturas produzidas foram caracterizadas com base em técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), difração de raio X (DRX), análise termogravimétrica (TGA). Um estudo de liberação *in vitro* foi acompanhado por espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Vis). Os resultados obtidos

foram aplicados em modelos matemáticos capazes de descrever a cinética de liberação do material. Sendo assim, foi realizado um estudo de digestibilidade a fim de avaliar a quantidade de aminoácido perdida para o meio.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Nanotecnologia**

A nanotecnologia está baseada no entendimento e na manipulação da matéria em escala nanométrica (Chau, Wu e Yen, 2007). Atualmente, representa um campo da ciência em constante evolução, sendo responsável por considerável avanço tecnológico e científico (Martins e Engelmann, 2016). Sua atuação abrange as mais diferentes áreas, como ciência e engenharia de materiais, eletrônica, medicina (Anisa, Abdallah e Peter, 2003), agroindústria (García, Forbe e Gonzalez, 2010), indústria de alimentos e embalagens (Hamad *et al.*, 2018), tratamento de água (Savage e Diallo, 2005), entre outros.

Os nanomateriais produzidos, a partir dessa tecnologia, podem apresentar diferentes geometrias, incluindo partículas, fios e tubos (Engel *et al.*, 2007). Dessa forma, são eficientes, ao exibir diferentes propriedades, como, por exemplo, a elevada área superficial, quando comparada ao volume, o que permite que eles sejam empregados nos mais variados setores (Costa *et al.*, 2012). As nanofibras, que também compreendem geometrias passíveis de serem assumidas pelos materiais, correspondem às formas de maior interesse em função das inúmeras aplicações associadas (Reneker e Yarin, 2008). Elas podem ser obtidas, a partir da eletrospinação, uma técnica simples que utiliza soluções preparadas, com base em polímeros, sintéticos ou naturais, para a obtenção dos nanomateriais.

#### **2.1.1 Nanotecnologia na Piscicultura**

Na piscicultura, a nanotecnologia é considerada promissora (Ashraf *et al.*, 2011) e apresenta algumas aplicações que vão desde o tratamento de água até a detecção e controle de doenças, como também a entrega eficiente de nutrientes e medicamentos (hormônios e vacinas). A qualidade da água, por exemplo, pode influenciar na produtividade da piscicultura. Para isso, a utilização de nanoadsorventes, nanomembranas e nanofotocatalisadores representam

alternativas passíveis de serem empregadas à remoção de partículas e contaminantes, presentes no meio aquático, garantindo um ambiente propício à criação dos animais (Luis *et al.*, 2019).

A presença de patógenos no meio aquático, ainda, é capaz de interferir na produção de pescado. A busca pela redução ao uso de antibióticos, capazes de ocasionar quadros de resistência e acúmulo de resíduos no alimento, fez crescer a procura por produtos naturais adequadas a atuarem como agentes biocidas. Óleos essenciais, como os óleos de cravo e menta, vêm sendo amplamente utilizados na aquicultura, em razão de suas características atraentes, como biodisponibilidade imediata, baixo custo e efeito colateral reduzido. Além disso, por apresentarem um amplo espectro de ação incluindo suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, anticarcinogênicas e a atividade biocida, os óleos essenciais são passíveis de serem encapsulados, em nanopartículas poliméricas, garantindo a preservação da saúde animal e, em consequência, reduzindo o surgimento de doenças (Luis *et al.*, 2019).

## 2.2 Piscicultura

A piscicultura compreende uma modalidade de cultivo da aquicultura, destinada à produção de peixes, principalmente os de água doce (Ahmed e Khan, 2004), representando uma das áreas de produção animal que mais vem ganhando espaço no Brasil (Pezzato, Barros e Furuya, 2009). Dados da literatura mostram que, no período de 2004 a 2014, a aquicultura foi o setor de produção de carnes que mais se destacou com crescimento médio de 8% contra 4,1% para frangos, 5,1% para bovinos e 2,9% para suínos (Kubitza, 2015).

De acordo com o relatório publicado pela FAO (*Food and Agriculture Organization*), em 2018, o Brasil esteve entre os principais países produtores de pescado em água interna. Ainda, segundo estimativas, em 2016, a produção no país alcançou valores próximos a 225.000 toneladas (FAO, 2018). O Anuário Brasileiro de Piscicultura, publicado em 2019 pela Sociedade Brasileira de Piscicultura, reporta que, no ano de 2018, o Brasil produziu 722.560 toneladas de peixes, representando um crescimento de 4,5%, se comparado ao ano de 2017, quando a produção de pescado atingiu 691.700 toneladas. Além disso, em virtude da facilidade de adaptação a diferentes regiões, a tilápia foi a espécie destaque em produção, atingindo 400.280 toneladas, em 2018, representando um crescimento de 11,9%, em relação ao ano anterior, quando sua produção atingiu 357.639 toneladas (DELLOVA *et al.*, 2019).

Para atender toda a produção de peixes no país, considerando o sistema de cultivo em tanques-rede e viveiros, é importante que os animais recebam uma alimentação que atenda as

exigências nutricionais requeridas. Peixes necessitam de uma dieta rica em ácidos graxos, vitaminas, minerais e proteínas. As proteínas, por sua vez, são consideradas os principais constituintes orgânicos dos tecidos dos peixes. Quando digeridas, são hidrolisadas em aminoácidos livres que serão, logo depois, distribuídos por meio da corrente sanguínea a órgãos e tecidos, dando origem a novas proteínas destinadas ao crescimento e reprodução. Além disso, contribuem para a formação de anticorpos, hormônios, enzimas, transporte de minerais, bem como atuam como fontes de energia para peixes carnívoros (Lima, Silveira e Tuesta, 2015).

Rações ricas em proteínas, entretanto podem representar 40 a 70% dos custos de produção de pescado (Pezzato, Barros e Furuya, 2009), todavia, para atender a demanda nutricional, é importante que rações produzidas apresentem de 28 a 50% de proteína bruta em sua composição, variando conforme a fase de desenvolvimento, ambiente e espécie (Andrade *et al.*, 2015).

Estudos vêm sendo realizados, a fim de reduzir essa quantidade de proteína na ração, para que não haja interferências no desenvolvimento dos animais. Como as proteínas apresentam aminoácidos em sua composição, uma das alternativas propostas consiste na suplementação dessas rações com aminoácidos industriais, em quantidades adequadas, para não prejudicar o desempenho do animal (Araripe *et al.*, 2011). Furuya e colaboradores (2005) realizaram um experimento para avaliar a redução dos níveis de proteína em dietas de tilápia-do-Nilo. Para isso, aminoácidos sintéticos foram utilizados em quantidades adequadas que permitissem estipular um comparativo entre eles e as proteínas utilizadas na produção de rações. Os resultados apontam que é possível elaborar uma ração completa com teor de proteína reduzido desde que a quantidade de aminoácidos, presentes na formulação, esteja de acordo com o conceito adotado, para a proteína ideal, ou seja, o balanceamento exato de aminoácidos.

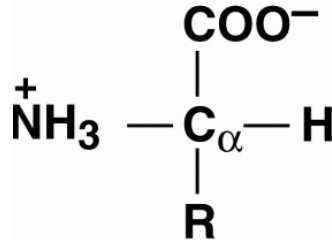
O conhecimento acerca das exigências nutricionais de aminoácidos, para cada espécie de peixe, é fundamental para o desenvolvimento adequado de dietas balanceadas (Lima, Silveira e Tuesta, 2015). Sendo assim, quando o processo de nutrição ocorre de forma satisfatória, espera-se não apenas que os animais atinjam um crescimento considerável, dentro dos padrões de cada espécie, mas também que estejam saudáveis, não suscetíveis a doenças ou à outra adversidade, contribuindo, dessa forma, para os bons resultados da piscicultura.

### **2.3 Aminoácidos**

Os aminoácidos são moléculas formadas por um carbono central ligado a grupamentos

amina (NH<sub>2</sub>) e carboxila (COOH), um hidrogênio e um substituinte característico (R), representando uma cadeia lateral, conforme observado na Figura 1.

Figura 1 - Estrutura geral de um aminoácido.



Fonte: Do autor (2020).

Os aminoácidos constituem blocos responsáveis pela formação de proteínas, classificados em essenciais e não essenciais, variando conforme a dieta de um dado indivíduo ou animal. Os aminoácidos ditos essenciais são indispensáveis ao organismo, porém não são capazes de serem sintetizados pelo organismo, por isso, devem ser obtidos por dieta. Os aminoácidos não essenciais, contudo são passíveis de sofrerem síntese pelo organismo (Li *et al.*, 2009). A Tabela 1 apresenta a relação dos aminoácidos essenciais e não essenciais.

Tabela 1 - Classificação dos aminoácidos em essenciais e não essenciais.

Aminoácidos Essenciais	Aminoácidos Não Essenciais
Arginina (Arg)	Alanina (Ala)
Histidina (His)	Asparagina (Asn)
Isoleucina (Ile)	Aspartato (Asp)
Leucina (Leu)	Glutamato (Glu)
Lisina (Lys)	Glicina (Gly)
Metionina (Met)	Serina (Ser)
Fenilalanina (Phe)	Tirosina (Tyr)
Treonina (Thr)	Cisteína (Cys)
Triptofano (Trp)	Glutamina (Gln)
Valina (Val)	Prolina (Pro)

Fonte: Do autor (2020).

Os aminoácidos desempenham papéis de suma importância no organismo tanto do homem como também dos animais. Na piscicultura, a deficiência dessas substâncias na dieta dos peixes provoca redução na eficiência da utilização de proteínas, retarda o crescimento animal, diminui o ganho de peso, e a eficiência alimentar e pode, ainda, reduzir a resistência a

doenças pelo comprometimento do mecanismo de resposta imunológica (Andrade *et al.*, 2015).

As exigências em aminoácidos essenciais pelos peixes estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Exigência em aminoácidos essenciais para o crescimento da tilápia.

Aminoácido	Exigência (% da proteína)
Arginina	3,66
Histidina	1,50
Isoleucina	2,72
Lisina	4,47
Metionina	2,81
Fenilalanina	4,84
Treonina	3,28
Triptofano	0,88
Valina	2,44

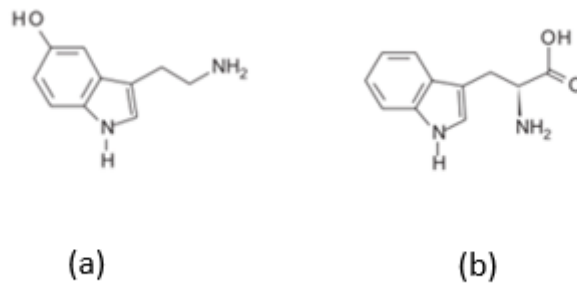
Fonte: Andrade *et al.*, (2015).

Embora a exigência de triptofano pelos peixes apresente um valor inferior, quando comparado a outros aminoácidos essenciais, o aminoácido também apresenta sua contribuição e importância à dieta animal. Sua essencialidade está relacionada à sua contribuição no crescimento normal do peixe, na síntese proteica e, também, na regulação de importantes mecanismos fisiológicos (Rossi e Tirapegui, 2004). Ademais, o triptofano é, ainda, precursor da serotonina (Figura 2a) (Lepage *et al.*, 2003), um importante neurotransmissor presente no sistema nervoso central (SNC), no trato gastrointestinal e em plaquetas (Martins, Silva e Glória, 2010). No cérebro, os níveis de serotonina estão relacionados a alterações no comportamento e humor, na agressividade, depressão, sono, fadiga, supressão do apetite, entre outros (Rossi e Tirapegui, 2004). Para peixes criados em sistema de cativeiro ou tanques-rede, onde é possível a existência de uma condição de estresse, a suplementação com triptofano é capaz de inibir e/ou diminuir os sintomas decorrentes de níveis reduzidos de serotonina.

O triptofano, cuja estrutura química está representada na Figura 2b, é um aminoácido essencial, pertencente ao grupo dos aminoácidos R-aromáticos, com cadeias laterais aromática, apolar e hidrofóbica.



Figura 2 - Estruturas químicas: (a) serotonina e (b) triptofano.



Fonte: Martins, Silva e Glória (2010).

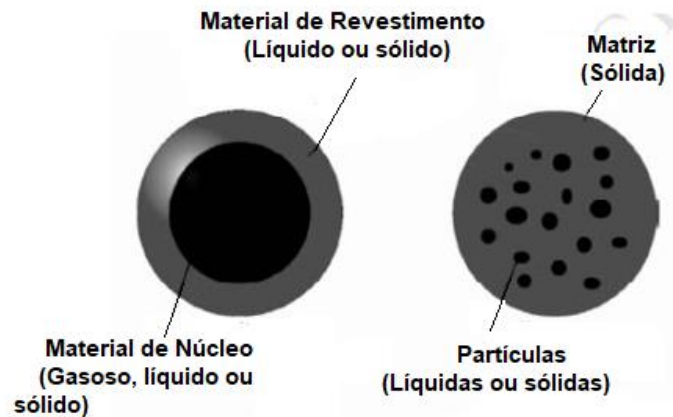
Winberg *et al.*, (2001) avaliaram os efeitos da suplementação dietética de triptofano na atividade serotoninérgica, no cérebro e o comportamento agressivo da truta arco-íris quando mantida em confinamento. Os resultados evidenciaram que a suplementação dietética com o aminoácido triptofano, em longo prazo, pode suprimir o comportamento agressivo do peixe. Um outro estudo realizado por Wilson e Halver (1986) sugere, ainda, que a deficiência de triptofano seja apropriada a gerar deformidades anatômicas, em algumas espécies de salmonídeos, mas não em outros peixes.

## 2.4 Processo de Encapsulamento

Antes de avaliar os benefícios que determinado nutriente pode trazer ao organismo do homem e/ou do animal, é necessário considerar todo o processo que antecede a sua chegada ao organismo. Quando as rações são depositadas na água, por exemplo, propicia que pela instabilidade apresentada por alguns componentes, presentes na formulação das rações, substâncias sejam perdidas para o meio, mediante um processo de lixiviação (Wilson e Halver, 1986).

O processo de encapsulamento, conforme ilustrado na Figura 3, definido como um processo de aprisionamento de uma substância, denominada agente ativo, recheio ou núcleo (Cordeiro, 2005), no interior de um dado material (Devi *et al.*, 2017), denominado agente encapsulante, membrana, invólucro, cápsula, fase externa ou matriz (Cordeiro, 2005), representa um método eficaz, passível de ser empregado em situações nas quais se deseja proteger uma substância de interesse de prováveis interferentes externos, como temperatura, pH, luz e processos oxidativos (Cordeiro, 2005).

Figura 3 - Modelos de estruturas encapsuladas.



Fonte: Do autor (2020).

O processo de encapsulamento é capaz de promover os mais variados benefícios à piscicultura. Microalgas são comumente utilizadas na alimentação de peixes e larvas de mariscos, todavia contribuem para um aumento de 30% em sua produção. (Espinoza, Núñez e Cebrero, 1999). Uma alternativa capaz de reduzir esses custos é pela técnica de encapsulamento das microalgas por gelificação iônica. Para isso, microalgas são encapsuladas em esferas de alginato o que permite que elas fiquem armazenadas, no escuro, por até um ano em temperatura igual a 4°C. Após o armazenamento, podem se multiplicar. Além disso, quando as microalgas são encapsuladas, elas se alimentam de amônia e a removem do meio com a mesma eficácia que as microalgas não encapsuladas (Alvarez, Espinar e Méndez, 2010).

O processo de encapsulamento também pode ser empregado na vacinação de peixes. O desenvolvimento da aquacultura promoveu uma elevação no número de doenças em peixes oriundas de microrganismos diversos. A vacinação dos animais consiste em um método adequado a resolver o problema, todavia, quando administrada por via oral, sua eficácia é reduzida se comparada a outras formas de administração, como injeção, imersão ou pulverização. A eficácia da vacinação via oral é reduzida em consequência da possibilidade de degradação do antígeno no trato gastrointestinal ou por interação do antígeno com o alimento. Por essa razão, é possível o emprego de técnicas de encapsulamento do antígeno, que fica envolto em uma matriz polimérica. O antígeno encapsulado não sofre degradação, ao passar

pelo trato gastrointestinal, o qual, por sua vez, atua no epitélio estimulando uma resposta imune (Alvarez, Espinar e Méndez, 2010).

Algumas das técnicas empregadas no processo de encapsulamento incluem *spray drying*, *spray chilling* ou *spray cooling*, coacervação (Gibbs *et al.*, 1999), gelificação iônica e eletrofiação. No *spray drying*, as substâncias a serem encapsuladas são homogeneizadas e, em seguida, passam a um processo de secagem por pulverização. No *spray chilling* ou *cooling*, o encapsulamento, ou a solidificação de partículas, ocorre a partir de um processo de resfriamento (Oxley, 2012). A técnica de coacervação envolve um sistema coloidal que se separa, em duas fases líquidas, sendo uma fase contínua de polímeros e uma fase densa, rica em polímeros, também conhecida como coacervado. O coacervado, por sua vez, atua como material de revestimento no processo de encapsulamento (Wang *et al.*, 2018). O encapsulamento por gelificação iônica consiste em um método rápido que apresenta formulação e procedimento simples e de baixo custo. Está baseado na capacidade de polieletrólitos formarem ligações cruzadas na presença de contra-íon, dessa forma, uma solução polimérica carregada negativamente podem formar ligações cruzadas com cátions de baixa massa molar, levando à formação de hidrogéis (Holkem, Codevilla e Menezes, 2015). Na eletrofiação, por fim, as substâncias de interesse a serem encapsuladas são incorporadas à solução polimérica. Após a formação das nanoestruturas, a substância encapsulada pode encontrar-se distribuída, de forma homogênea nas nanofibras, sem agregação, sugerindo uma boa interação entre a substância de interesse e o polímero (Lu *et al.*, 2017) ou pode, ainda ser encontrada, em forma de agregados, podendo dificultar o processo de liberação.

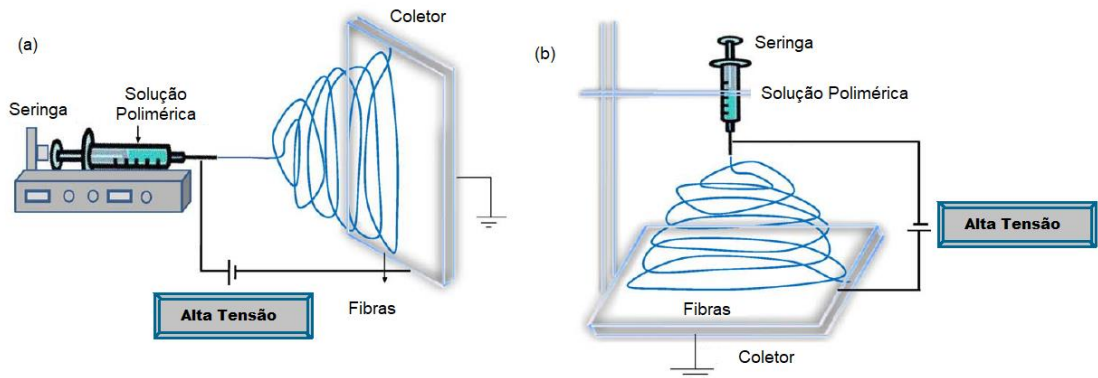
## 2.5 Eletrofiação

A eletrofiação consiste em uma técnica simples, vantajosa, de fácil manuseio de equipamento e baixo consumo de solução utilizada na produção de nanofibras poliméricas (Thenmozhi *et al.*, 2017). Para isso, uma ampla gama de polímeros pode ser empregada, sejam eles sintéticos ou naturais (Wang, Fu e Li, 2009).

O equipamento empregado, ao longo do processo, é composto por três partes principais. A Figura 4 reporta cada uma delas que compõe o aparato de eletrofiação, bem como o posicionamento que podem vir a assumir, horizontal ou vertical. A fonte de alimentação de alta tensão é considerada a parte de maior influência na técnica, uma vez que é responsável por injetar carga na solução polimérica que é, logo depois, estirada ao coletor de carga oposta

(Bhardwaj e Kundu, 2010), dando origem às nanofibras. Além disso, a partir dessa fonte, seguem eletrodos responsáveis pela sua comunicação com os demais componentes do equipamento. Acoplado à bomba injetora tem-se um conjunto formado por uma seringa e uma agulha, conforme ilustrado na Figura 4. Na seringa, é depositada a solução polimérica utilizada para a produção das nanofibras. O coletor, plano ou rotativo, é definido como o local em que as nanofibras produzidas são depositadas.

Figura 4 - Diagrama esquemático da aparelhagem utilizada na técnica de eletrofiação.



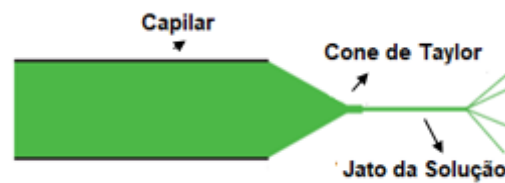
Fonte: Adaptado de Bhardwaj e Kundu, (2010).

As Figuras 4a e 4b esquematizam as duas possíveis configurações em que o aparato de eletrofiação pode ser encontrado. Quando na vertical, conforme Figura 4a, observam-se duas forças atuantes, sendo elas a carga do coletor e a força gravitacional. Quando na horizontal, conforme Figura 4b, observa-se a presença de uma força efetiva, obtida a partir da tensão aplicada, assim como uma força atrativa oposta que atua sobre o coletor puxando as nanofibras formadas (Thenmozhi *et al.*, 2017).

O princípio da técnica baseia-se em interações eletrostáticas. Sendo assim, para que nanofibras sejam produzidas, é necessário que, a partir da fonte de alimentação de alta voltagem, uma tensão seja aplicada sobre a solução polimérica produzida (Thenmozhi *et al.*, 2017), carregando-a para fora do capilar, em direção ao coletor de polaridade oposta (Sill e Recum, Von, 2008). O polímero em solução, depositado no interior da seringa, é então forçado a escoar pela agulha, seja por ação gravitacional ou com o auxílio da bomba de infusão (Júnior, Ávila e Triplett, 2013). Quando a tensão aplicada sobre a solução polimérica é elevada ( $\sim 10\text{--}30\text{ kV}$ ), observa-se, na ponta da agulha, a formação de uma estrutura semelhante a um cone, denominada “cone de Taylor” (Thenmozhi *et al.*, 2017), conforme observado na Figura 5. Neste ponto, o campo elétrico é responsável por alongar o jato de solução, tornando-o cada vez mais

fino, dando origem a fibras de diâmetro micro ou nanométrico (Júnior, Ávila e Triplett, 2013). Antes do jato de fibra que sai da seringa atingir o coletor, ocorre a evaporação do solvente utilizado no processo e, depois, o recolhimento do polímero na forma de fibras (Sill e Recum, Von, 2008).

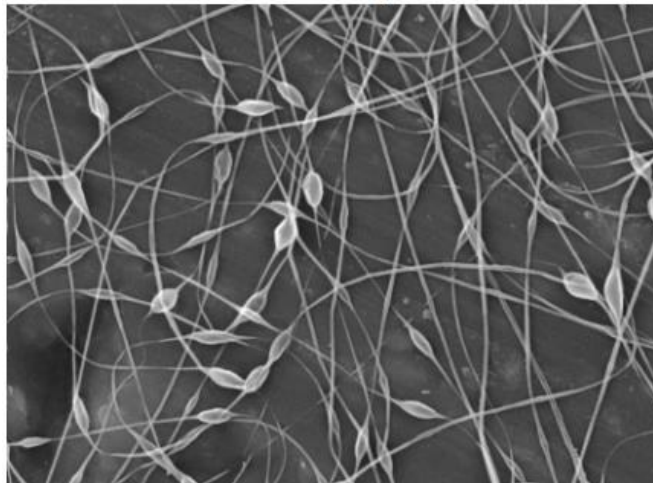
Figura 5 - Cone de Taylor.



Fonte: Adaptada de Costa *et al.*, (2012).

Se as forças de coesão que atuam sobre o líquido não forem fortes o bastante, de modo a permitir o estiramento do material formado, em vez de fibras, serão ejetados defeitos, em forma de gotículas, denominados de *beads*, conforme observado na Figura 6.

Figura 6 - *Beads* formados em nanofibras poliméricas.



Fonte: Fong, Chung e Reneker (1999).

### 2.5.1 Parâmetros que influenciam a eletrofição

Apesar da facilidade no uso da técnica, existem alguns parâmetros que são capazes de afetar o processo de eletrofição, interferindo na morfologia das fibras obtidas: os parâmetros de solução, de processo e ambientais. Os parâmetros de solução estão relacionados com a

concentração do polímero, viscosidade da solução, condutividade e tensão superficial. Os parâmetros de processo envolvem a tensão aplicada, distância entre a ponta da agulha e o coletor e a taxa de alimentação da bomba, também denominada vazão. Já os parâmetros ambientais estão relacionados à temperatura e umidade do local em que as nanofibras estão sendo produzidas. Sendo assim, para obter melhor compreensão, quanto à técnica de eletrospinação, é importante entender a influência de cada um desses fatores (Haider, Haider e Kang, 2018).

#### a) **Parâmetros de solução**

A massa molar de um polímero determina as propriedades de uma solução. Dessa forma, é possível que ocorram interferências tanto na viscosidade da solução preparada como no número de emaranhados de cadeias poliméricas formadas (Bhardwaj e Kundu, 2010). Quando ocorre um aumento da massa molar de polímeros, observa-se a diminuição de sua solubilidade, todavia observa-se um aumento em propriedades como viscosidade, flexibilidade e grau de emaranhamento (Ghorani e Tucker, 2015). Park e Um (2018) relatam que o aumento na massa molar polimérica permite a formação de nanofibras com maior diâmetro.

A condutividade de uma dada solução polimérica desempenha um papel importante à produção de nanofibras, sendo determinada pelo tipo de polímero utilizado, no decorrer do processo, solvente empregado e disponibilidade de sais ionizáveis (Bhardwaj e Kundu, 2010). A adição de sais como NaCl, KCl e KBr propicia o aumento da condutividade, o qual, por sua vez, promove uma diminuição do diâmetro das nanofibras, levando, assim, à produção de nanoestruturas mais finas (Thenmozhi *et al.*, 2017). Além disso, o aumento da condutividade favorece a formação de estruturas sem defeitos, ou *beads* (Lasprilla-Botero, Álvarez-Láinez e Lagaron, 2018). Quando a condutividade é aumentada, excedendo o valor crítico, a formação do cone de Taylor é novamente interrompida (Haider, Haider e Kang, 2018).

A redução da tensão superficial induz à formação de fibras sem defeitos (Thenmozhi *et al.*, 2017). Se a tensão superficial aplicada for aumentada, as forças de Coulomb superam as forças viscoelásticas, ocorrendo uma irregularidade no jato formado entre a ponta da agulha e o coletor metálico, promovendo a formação de estruturas defeituosas (Lasprilla-Botero, Álvarez-Láinez e Lagaron, 2018).

A viscosidade da solução polimérica é um parâmetro que relaciona a concentração do polímero e o tipo de solvente utilizado (Liu *et al.*, 2017). O aumento da viscosidade promove menor estiramento das fibras, ao longo do processo, resultando na formação de estruturas com

maior diâmetro (Park e Um, 2018). Esse aumento também interfere na formação de defeitos, ao longo das estruturas, logo, à medida que a viscosidade da solução é aumentada, observa-se a formação de *beads* nas nanofibras produzidas (Fong, Chung e Reneker, 1999). Entretanto, quando a viscosidade de uma solução polimérica diminui, advém uma redução no emaranhamento das cadeias poliméricas presentes, bem como no diâmetro das nanofibras formadas (Park e Um, 2018).

O aumento na concentração da solução polimérica é responsável pelo aumento da viscosidade, o que acarreta em aumento de emaranhados entre as cadeias poliméricas (Haider, Haider e Kang, 2018). Além do mais, esse aumento promove a formação de nanofibras com menor quantidade de defeitos (Zhang e Yu, 2016). Quando a concentração da solução é diminuída, o grau de emaranhamento das cadeias poliméricas é pequeno, proporcionando uma instabilidade capilar na extremidade do jato. Essa instabilidade pode ocasionar um espalhamento eletrostático (*electrospraying*), em vez de eletrofiação (Costa *et al.*, 2012). Com isso, observa-se a formação de fibras com defeitos (Ghorani e Tucker, 2015) e de diâmetro mais reduzido (Zhang e Yu, 2016).

#### **b) Parâmetros de processo**

A taxa de fluxo determina a quantidade de solução disponível na ponta da agulha durante o processo de eletrofiação (Ghorani e Tucker, 2015). Quando a taxa de fluxo é aumentada, verifica-se a formação de nanoestruturas com maior diâmetro (Zhang e Yu, 2016) e com defeitos ao longo de sua extensão (Haider, Haider e Kang, 2018). Quando a vazão é baixa, entretanto haverá mais tempo, para que o solvente possa evaporar, promovendo, dessa forma, a formação de fibras sem defeitos (Ghorani e Tucker, 2015).

O aumento da distância de trabalho, ou seja, a distância entre a ponta da agulha e o coletor, permite que o solvente, empregado no processo de eletrofiação, sofra evaporação, formando fibras sem defeitos e com diâmetro médio reduzido. Todavia, quando a distância é diminuída, não há tempo suficiente, para que o solvente seja evaporado, antes que as fibras sejam depositadas no coletor. Portanto ocorre a formação de fibras mais densas com defeitos presentes ao longo das estruturas (Ghorani e Tucker, 2015).

A tensão aplicada sobre a solução polimérica oportuniza gerar fibras com defeitos. Esse fato ocorre, em virtude da diminuição do cone de Taylor e do aumento da velocidade do jato. Quando a tensão aplicada é aumentada, é possível observar um aumento no diâmetro das

nanofibras produzidas (Haider, Haider e Kang, 2018) e maior tendência à formação de defeitos ao longo da estrutura. Além disso, em tensões mais elevadas, observa-se que as nanofibras produzidas apresentam um arranjo irregular o que pode ser explicado em função da instabilidade do jato no campo elétrico de alta tensão (Ghorani e Tucker, 2015).

### c) **Parâmetros ambientais**

A temperatura é capaz de aumentar a taxa de evaporação do solvente, durante o processo de eletrofiação, diminuindo a viscosidade da solução polimérica e, em consequência, reduz o diâmetro das nanofibras formadas (Haider, Haider e Kang, 2018).

A umidade pode reduzir o diâmetro das nanoestruturas. Dessa forma, pode contribuir à formação de estruturas porosas ao longo das fibras formadas. Esse fenômeno está associado à utilização de um sistema de solventes binários. O solvente de maior volatilidade evapora mais rapidamente que aquele menos volátil, causando um efeito de resfriamento que resulta na condensação do vapor de água em gotículas de água. A evaporação dos solventes, juntamente com a formação das gotículas, favorece a formação das estruturas porosas (Haider, Haider e Kang, 2018).

## **2.5.2 Aplicação das nanofibras**

As nanofibras obtidas, a partir da técnica de eletrofiação, podem ser caracterizadas em função da elevada área superficial, quando comparada ao volume, e esse fato faz com que as estruturas fibrosas nanométricas obtidas apresentem vantagens em relação às estruturas fibrosas convencionais (Lasprilla-Botero, Álvarez-Láinez e Lagaron, 2018). As nanofibras, por sua vez, podem ser empregadas, nas mais variadas áreas, incluindo o desenvolvimento de *scaffolds*, utilizados na engenharia de tecidos, a fabricação de sensores, filtros, membranas, baterias, roupas de proteção, curativo, catalisadores, piscicultura, entre outros (Thenmozhi *et al.*, 2017).

## **2.6 Polímeros**

Para que nanofibras sejam produzidas, a partir da técnica de eletrofiação, é necessário que soluções poliméricas sejam preparadas. Os polímeros empregados na técnica podem ser naturais, sintéticos ou uma mistura de ambos.

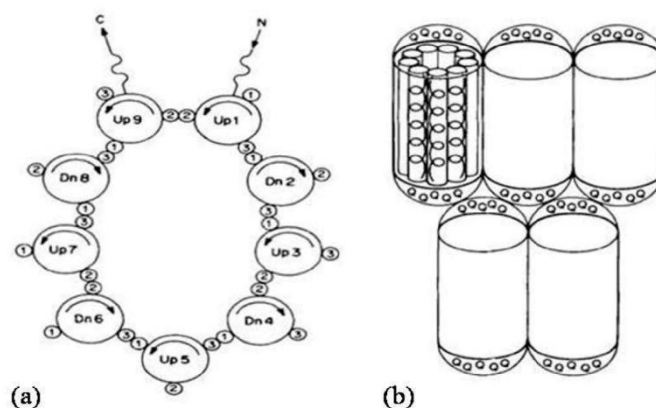


Os polímeros sintéticos apresentam flexibilidade, durante a síntese, entretanto não possuem afinidade celular pela baixa hidrofiliabilidade. Além do mais, não apresentam, em sua estrutura, locais específicos para o reconhecimento celular, o que impossibilita a sua utilização na produção de nanofibras destinadas à aplicação na área médica, por exemplo. Diferente dos sintéticos, os polímeros naturais exibem boa biocompatibilidade e funcionalidade clínica, além de baixa imunogenicidade. Alguns apresentam, também, propriedades antibacterianas. Todas essas características tornam os polímeros naturais materiais promissores, considerados de grande interesse ao desenvolvimento de sistemas de liberação de substâncias ativas. Ainda, são passíveis de serem empregados ao desenvolvimento de nanofibras destinadas à aplicação nas áreas alimentícia e de saúde. Polissacarídeos, como a celulose, quitina, quitosana, dextrose e proteínas, como colágeno, gelatina e seda, são alguns dos exemplos mais comuns de polímeros obtidos de fontes naturais (Hu *et al.*, 2014).

## **2.7 Zeína**

A zeína, cuja estrutura química está representada na Figura 7, é um polímero de origem natural, caracterizada como uma prolamina, ou seja, uma proteína solúvel em álcool, de coloração amarela, extraída do endosperma do grão de milho. É constituída, em sua maioria, por aminoácidos de caráter hidrofóbico, como o ácido glutâmico (21-26%), leucina (20%), prolina (10%) e alanina (10%). Apresenta boa solubilidade em 50-90% de etanol, em cetonas (metiletilcetona e acetona), acetamida, ésteres e glicóis, mas não em soluções de álcool anidro (exceto metanol). Em 40% de etanol, o processo de solubilização somente ocorre quando em presença de altas temperaturas (Shukla, R e Cheryan, 2001).

Figura 7 - Modelo de estrutura secundária da proteína zeína,



Fonte: ARGOS *et al.*, (1982).

O biopolímero é separado da farinha de glúten de milho por um processo de extração utilizando o isopropanol como solvente. O extrato obtido é clarificado, mediante centrifugação e, posteriormente, arrefecido, levando à precipitação da zeína que, após secagem, adquire o formato de pó com coloração amarela (Torres-Giner, Gimenez e Lagaron, 2008).

A zeína apresenta reduzido valor biológico, em função do desequilíbrio provocado pelo alto teor de leucina e deficiência, em aminoácidos essenciais, como a lisina e o triptofano, o que faz com que ela seja pobre em qualidade nutricional e necessite de suplementação ao ser utilizada, por exemplo, em rações destinadas à alimentação de animais. Na alimentação humana, entretanto existe uma limitação, quanto ao uso do biopolímero, em função da sua insolubilidade em água (Shukla e Cheryan, 2001).

O peso molecular, grau de polimerização e estrutura química conferem à zeína boa propriedade de formação de filmes flexíveis, mediante um processo de automontagem. Esses filmes, por sua vez, são caracterizados por uma rede tridimensional estabilizada por interações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e ligações dissulfeto formadas entre as cadeias da proteína. A automontagem permite a formação de micro e nanopartículas mediante a dispersão líquido-líquido ou evaporação de solventes (Luo e Wang, 2014). No método de evaporação de solvente ou *casting*, o polímero de escolha é dissolvido em uma solução de álcool alifático e, em seguida, disperso em uma superfície plana, permitindo a evaporação do solvente e a formação do filme. Além de flexíveis, os filmes produzidos são resistentes e apresentam caráter hidrofóbico. Apresentam, ainda, resistência ao ataque de microrganismos, facilitando, dessa forma, a formação de sistemas de liberação de fármacos e nutrientes (Corradini *et al.*, 2014).

Decorrente de sua boa biocompatibilidade, biodegradabilidade e natureza não tóxica, a zeína é considerada um material promissor a ser utilizado no desenvolvimento de produtos destinados à saúde (Lu *et al.*, 2017). Na indústria farmacêutica, por exemplo, vem sendo empregada com a finalidade de mascarar sabores e odores indesejáveis, bem como no revestimento de cápsulas, aumentando a proteção do produto formado (Shukla, R e Cheryan, 2001).

Na eletrofiação, o biopolímero pode ser empregado na produção de nanofibras. Um estudo desenvolvido por Brahathesseswaran e colaboradores (2012) registra o emprego de nanofibras de zeína encapsuladas com curcumina, um composto polifenólico com ação anti-inflamatória, antioxidante e anticarcinogênica, com aplicação no processo de cicatrização de feridas, promovendo, assim, a reconstrução do epitélio, formação de novos vasos sanguíneos e a migração aumentada de células como fibroblastos e macrófagos para o local da ferida (Sidhu *et al.*, 1999).

Estudos realizados por Luis (2017) reportam a utilização de nanopartículas de zeína encapsuladas com eugenol e óleo essencial de alho destinadas ao controle de doenças na piscicultura. A escolha da zeína, como agente encapsulante, está associada às características de solubilidade e biocompatibilidade, o que a torna adequada ao desenvolvimento de sistemas carreadores. Quanto ao eugenol e óleo de alho, além de apresentarem propriedades antimicrobiana e antifúngica, representam alternativa ao controle de doenças em peixes em substituição à utilização de substâncias químicas capazes de ocasionar problemas de contaminação ambiental e riscos à saúde humana.

## **2.8 Sistema de Liberação**

O processo de entrega de um nutriente ou fármaco, em seu local de ação, é tão importante quanto a sua atividade à determinação do efeito desejado. Para isso, sistemas de liberação são empregados, modulando de forma eficiente a cinética, o tempo e o local de liberação, permitindo a obtenção de uma resposta mais específica.

O valor nutricional de um alimento para o peixe está relacionado à quantidade de nutrientes e energia que o animal pode absorver. Portanto a liberação da substância de interesse, após sua administração no organismo, no local e tempo certos, além de essencial à piscicultura, permite avaliar a digestibilidade das substâncias de interesse. A digestibilidade, por sua vez, é

responsável por descrever a fração do nutriente ingerido que não é excretada pelas fezes. Sendo assim, quanto maior a digestibilidade, maior é a absorção do nutriente.

Em sistemas de liberação, nanofibras obtidas, a partir da técnica de eletrospinning, podem atuar como agentes carreadores de substâncias, como os aminoácidos, por exemplo. Esses, por outro lado, são incorporados a matrizes poliméricas durante o processo de produção de nanofibras. Espera-se, assim, que o processo de liberação do nutriente encapsulado para o meio ocorra de forma lenta, quanto maior for a hidrofobicidade do polímero. Neste caso, o emprego das nanofibras é capaz de controlar o estado de distribuição do aminoácido incorporado à nanoestrutura, melhorando sua cinética de liberação (Hu *et al.*, 2014).

A aplicação de modelos matemáticos, em estudos de liberação de substâncias, permite, além da previsão da cinética de liberação, a compreensão dos fenômenos capazes de afetar a liberação da substância de interesse (Dash *et al.*, 2010).

## 2.9 Modelos matemáticos

Paralelo aos vários estudos desenvolvidos com enfoque em sistemas de liberação, principalmente de fármacos, muitos modelos matemáticos foram criados, com o intuito de elucidar o comportamento dos sistemas, fornecendo mecanismos de previsão da cinética de liberação da substância de interesse, minimizando, dessa forma, a realização de estudos *in vitro* (Lao *et al.*, 2011).

Os processos que ocorrem na maioria dos sistemas poliméricos de liberação, bem como em grande parte dos modelos matemáticos teóricos, estão baseados no fenômeno de difusão. A difusão é definida como o movimento espontâneo de moléculas de uma área de maior potencial químico, para uma de menor potencial químico, considerando um dado volume de fluido. Fick foi o responsável por introduzir uma das primeiras análises referentes ao fenômeno de transporte de massa, o que deu origem a duas equações fundamentais, denominadas Leis de Fick da difusão. A primeira Lei de Fick (Eq.1) descreve o processo de difusão, em estado estacionário, ou seja, quando a concentração dentro do volume de difusão não é alterada em função do tempo (Lao *et al.*, 2011).

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad \text{Eq. (1)}$$

Em que  $J$  representa o fluxo de difusão, ou seja, a quantidade de partículas que atravessa uma determinada área, em função do tempo;  $C$  é a concentração da espécie, dependente da posição;  $D$  é o coeficiente de difusão da substância de interesse e  $x$  representa o plano normal ao plano central da membrana (Lao et al., 2011).

Já a segunda Lei de Fick (Eq. 2) descreve um processo de difusão não estacionário em que a concentração dentro de um dado volume sofre alteração em função do tempo.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad \text{Eq. (2)}$$

Os perfis de liberação podem ser descritos a partir de modelos como Korsmeyer- Peppas e Peppas-Sahlin. O modelo de Korsmeyer Peppas é comumente utilizado, para explicar o processo de liberação, quando ele não se encontra bem esclarecido ou quando possa estar envolvido em mais de um tipo de liberação (Costa, 2002). Além disso, descreve o perfil de liberação a partir de sistemas poliméricos (Lao et al., 2011). Esse modelo pode ser representado pela seguinte Eq. 3.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad \text{Eq. (3)}$$

Em que  $M_t/M_\infty$  representa a fração da substância de interesse liberada, ao longo do tempo  $t$ ,  $k$  representa a constante da taxa de liberação da substância e  $n$  representa o expoente de difusão (Wu et al., 2019).

O modelo de Kormeyer-Peppas é, em geral utilizado, para avaliar a liberação de substâncias, quando o mecanismo de liberação não é bem conhecido ou quando possa estar envolvido mais de um tipo de liberação (Costa, 2002).

A equação, proposta no modelo de Kormeyer-Peppas, é passível de sofrer modificação, de modo a incluir o tempo de latência, no início da liberação da substância de interesse, dessa forma, é utilizada a sua versão logarítmica, conforme Eq. 4:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k(t - t_{lag})^n \quad \text{Eq. (4)}$$

O modelo de Peppas-Sahlin, representado pela Eq. 5, é aplicado em sistemas que possuem mecanismo anômalo com a finalidade de determinar qual o mecanismo, difusão ou

relaxamento é predominante no processo de liberação da substância de interesse (Peppas e Sahlin, 1989).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^m + k_2 t^{2m} \text{ Eq. (5)}$$

Na Eq. 5, o termo  $M_t/M_\infty$  representa a contribuição da difusão de Fick. Já  $k_1$  e  $k_2$  representam as constantes de difusão e relaxamento, respectivamente (Peppas e Sahlin, 1989). Assim como no modelo de Korsmeyer-Peppas, o tempo de latência, no início da liberação da substância de interesse, também, foi incluído no modelo de Peppas-Sahlin, sendo o processo descrito pela Eq. 6.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1(t - t_{lag})^m + k_2(t - t_{lag})^{2m} \text{ Eq. (6)}$$

### 3. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

O processo de encapsulamento representa uma técnica simples, passível de ser empregada em uma gama variada de setores. Na piscicultura, compreende uma alternativa capaz de melhorar a aquisição de nutrientes essenciais, como os aminoácidos, por exemplo, pelos animais, impedindo que essas substâncias sejam perdidas para o meio, caso apresentem alguma instabilidade se em contato com água. No presente trabalho, o encapsulamento ocorreu, mediante o emprego da eletrofiação, uma técnica simples, de fácil manuseio de equipamento e baixo consumo de solução.

### 4. REFERÊNCIAS

AHMED, I.; KHAN, M. A. Dietary lysine requirement of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). **Journal of Aquaculture**, v. 235, p. 499–511, 2004.

ALAVAREZ, A. L.; ESPINAR, F. J. O.; MÉNDEZ, B. Microencapsulation of diets and vaccines for cultured fishes, crustaceans and bivalve mollusks. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 20, n. 4, p. 277–288, 2010.

ANDRADE, C. L.; RODRIGUES, F. S.; CARVALHO, D. P.; PIRES, S. F.; PIRES, M. F.

Nutrição e alimentação de Tilápias do Nilo. **Nutri Time**, v. 12, n. 6, p. 4464–4469, 2015.

ANISA, M.; ABDALLAH, S. D.; PETER, A. S. “Mind the gap”: science and ethics in nanotechnology. **Nanotechnology**, v. 14, n. 3, p. R9, 2003.

ARARIPE, M. N. B. A.; ARARIPE, H. G. A.; LOPES, J. B.; CASTRO, P. L.; BRAGA, T. E. A.; FERREIRA, A. H. C.; ABREU, M. L. T. Redução da proteína bruta com suplementação de aminoácidos em rações para alevinos de tambatinga. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 9, p. 1845–1850, 2011.

ASHRAF, M.; SHARMA, R.; AHMAD, S.; KHAN, M. Nanotechnology as a Novel Tool in Fisheries and Aquaculture Development: A Review. **Iranica Jouenal of Energy & Environment**, v. 2, n. 3, p. 258–261, 2011.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 325–347, 2010.

CHAU, C. F.; WU, S. H.; YEN, G. C. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 5, p. 269–280, 2007.

CORDEIRO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. p. 89–97, 2005.

CORRADINI, E.; MATTOSO, L. H. C.; GUEDES, C. G. F.; ROSA, D. S. Mechanical , thermal and morphological properties of poly (  $\epsilon$ -caprolactone )/ zein blends. **Polymers for advanced technologes**, v. 15, p. 340–345, 2004.

COSTA, P. J. C. Avaliação in vitro da lioequivalência de formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, 2002.

COSTA, R. G. F.; OLIVEIRA, J. E. DE; PAULA, G. F. DE; DE, P. H.; PICCIANI, S.; RIBEIRO, C.; MATTOSO, L. H. C. Eletrofiação de Polímeros em Solução. Parte I: Fundamentação Teórica Electrospinning of Polymers in Solution. Part I: Theoretical Foundation. **Polimeros**, v. 22, n. 2, p. 170–177, 2012.

DANTAS, G.; KARINA, M.; CABRAL, D. V.; GARDNER, I. A. Characterization of tilapia farming in net cages at a tropical reservoir in Brazil. **Aquaculture Reports**, v. 6, p. 43–48, 2017.

DAR, A. H.; RASHID, N.; MAJID, I.; HUSSAIN, S.; DAR, M. A. Nanotechnology interventions in aquaculture and seafood preservation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1–10, 2019.

DASH, S.; MURTHY, P. N.; NATH, L.; CHOWDHURY, P. KINETIC MODELING ON DRUG RELEASE FROM CONTROLLED DRUG DELIVERY SYSTEMS. **Acta Poloniae Pharmaceutica- Drug Research**, v. 67, n. 3, p. 217–223, 2010.

DELLOVA, D.; FRANÇA, D.; DONATI, G.; CEZÁRIO, G.; MARINI, H.; REAL, J. V.; LINO, J.; PRIEBSCHE, K.; ALBUQUERQUE, L.; OLIVEIRA, M.; VIEIRA, R. Anuário PeixeBR da Piscicultura 2019. **Sociedade Brasileira de Piscicultura**, 2019.

DEVI, N.; SARMAH, M.; KHATUN, B.; MAJI, T. K. Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 239, p. 136–145, 2017.

ENGEL, E.; MICHIARDI, A.; NAVARRO, M.; LACROIX, D.; PLANELL, J. A. Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side. **Trends in Biotechnology**, n. November, p. 39–47, 2007.

ESPINOZA, E. V.; NÚÑEZ, R. M.; CEBRERO, F. N. Biomass production and nutrient uptake by *Isochrysis aff. galbana* (Clone T-ISO) cultured with a low cost alternative to the f / 2 medium. **Aquacultural Engineering**, v. 20, p. 135–147, 1999.

FAO. **The State of world fisheries and aquaculture. Meeting the sustainable development goals**. Rome, 2018.

FONG, H.; CHUNG, I.; RENEKER, D. Beaded nanofibers formed during electrospinning.



**Polymer**, v. 40, n. 16, p. 4585–4592, 1999.

GARCÍA, M.; FORBE, T.; GONZALEZ, E. Potential applications of nanotechnology in the agro-food sector. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 573–581, 2010.

GHORANI, B.; TUCKER, N. Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. **Food hydrocolloids**, v. 51, p. 227–240, 2015.

GIBBS, B. F.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C. N. Encapsulation in the food industry - a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, p. 213–224, 1999.

HAIDER, A.; HAIDER, S.; KANG, I. K. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 11, n. 8, p. 1165–1188, 2018.

HAMAD, A. F.; HAN, J. .; KIM, B. .; RATHER, I. . The intertwine of nanotechnology with the food industry. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, p. 27–30, 2018.

HE, X.; DENG, H.; HWANG, H. M. The current application of nanotechnology in food and agriculture. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 27, n. 1, p. 1–21, 2019.

HOLKEM, A.; CODEVILLA, C. F.; MENEZES, C. R. Emulsificação/gelificação iônica interna: Alternativa para microencapsulação de compostos bioativos Emulsificação / gelificação iônica interna: Alternativa para microencapsulação de compostos bioativos Emulsification / internal ionic gelation : Alternat. **Ciência e Natura**, v. 37, n. July 2016, p. 116–124, 2015.

HU, X.; LIU, S.; ZHOU, G.; HUANG, Y.; XIE, Z.; JING, X. Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. **Journal of Controlled Release**, v. 185, p. 12–21, 2014.

JÚNIOR, J. DE Á.; ÁVILA, A. F.; TRIPLETT, M. H. Caracterização Morfológica de

Nanomembranas de Poliamida-66 Dopadas com Grafeno Obtidas por Electrospinning. **Polimeros**, v. 23, n. 1, p. 74–81, 2013.

KARGOZAR, S.; MOZAFARI, M. Nanotechnology and Nanomedicine: star small, think bigs. **Materials Today: Proceedings**, v. 5, 2018.

KUBITZA, F. Aquicultura no Brasil: Principais espécies, áreas de cultivo, rações, fatores limitantes e desafios. **Panorama da Aquicultura**, v. 25, n. 150, 2015.

LAO, L. L.; PEPPAS, N. A.; BOEY, F. Y. C.; VENKATRAMAN, S. S. Modeling of drug release from bulk-degrading polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 418, n. 1, p. 28–41, 2011.

LASPRILLA-BOTERO, J.; ÁLVAREZ-LÁINEZ, M.; LAGARON, J. M. The influence of electrospinning parameters and solvent selection on the morphology and diameter of polyimide nanofibers. **Materials Today Communications**, n. 14, p. 1–9, 2018.

LEPAGE, O.; VÍLCHEZ, I. M.; POTTINGER, T. G.; WINBERG, S.; SAWREY, F. Time-course of the effect of dietary L -tryptophan on plasma cortisol levels in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 206, p. 3589–3599, 2003.

LI, P.; MAI, K.; TRUSHENSKI, J.; WU, G. New developments in fish amino acid nutrition: Towards functional and environmentally oriented aquafeeds. **Amino Acids**, v. 37, n. 1, p. 43–53, 2009.

LIMA, C. S.; SILVEIRA, M. M.; TUESTA, G. M. R. Nutrição proteica para peixes. **Ciência Animal**, v. 25, n. 4, p. 27–34, 2015.

LIU, G.; GU, Z.; HONG, Y.; CHENG, L.; LI, C. Electrospun starch nano fibers : Recent advances , challenges , and strategies for potential pharmaceutical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 95–107, 2017.

LU, H.; WANG, Q.; LI, G.; QIU, Y.; WEI, Q. Electrospun water-stable zein/ ethyl cellulose

composite nano fiber and its drug release properties. **Materials Science & Engineering C**, v. 74, p. 86–93, 2017.

LUIS, A. I. S.; CAMPOS, E. V. R.; OLIVEIRA, J. L.; FRACETO, L. F. Trends in aquaculture sciences : from now to use of nanotechnology for disease control. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, p. 119–132, 2019.

MARTINS, A. C. C. L.; SILVA, T. M.; GLÓRIA, M. B. . Determinação simultânea de precursores de serotonina - triptofano e 5-hidroxitriptofano- em café. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 316–320, 2010.

MARTINS, P. S.; ENGELMANN, W. Nanotecnologias : “A ciência encontra , a indústria aplica , o homem se adapta”. **Revista de Estudos Constitucionais, Hermenêutica e Teoria do Direito**, v. 8, n. 2, p. 210–222, 2016.

OXLEY, J. D. **Spray cooling and spray chilling for food ingredient and nutraceutical encapsulation**. [s.l.] Elsevier Masson SAS., 2012.

PARK, B. K.; UM, I. C. Effect of molecular weight on electro-spinning performance of regenerated silk. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 1166–1172, 2018.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 57, n. 2, p. 169-172, 1989.

PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; FURUYA, W. M. Valor nutritivo dos alimentos utilizados na formulação de rações para peixes tropicais Nutritive value of common feeds used in tropical fish diets. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 3598, p. 43–51, 2009.

PISCOPO, M. R.; TEIXEIRA, C. E.; BIANCOLINO, C. A. O setor brasileiro de nanotecnologia: Oportunidades e desafios. **Revista de Negócios**, v. 19, n. 4, p. 43–63, 2014.

RENEKER, D. H.; YARIN, A. L. Electrospinning jets and polymer nanofibers. **Polymer**, v.

49, n. 10, p. 2387–2425, 2008.

ROSSI, L.; TIRAPEGUI, J. Implicações do Sistema Serotoninérgico no Exercício Físico. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 48, n. 1, p. 227–233, 2004.

SANT'ANNA, L. S.; ALENCAR, M. S. M.; FERREIRA, A. P. Patenteamento em nanotecnologia no Brasil: Desenvolvimento, potencialidades e reflexões para o meio ambiente e saúde. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 348–353, 2013.

SAVAGE, N.; DIALLO, M. S. Nanomaterials and water purification: Opportunities and challenges. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 7, p. 331–342, 2005.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial crops and products**, v. 13, p. 171–192, 2001.

SIDHU, G.; MANI, H.; GADDIPATI, J.; SINGH, A. K.; SETH, P.; BANAUDHA, K. K.; PATNAIK, G. K.; MAHESHWARI, R. K. Curcumin enhances wound healing in streptozotocin induced diabetic rats and genetically diabetic mice. **Wound repair and regeneration**, v. 7, n. 5, p. 362–374, 1999.

SILL, T. J.; RECUM, H. A. VON. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. **Biomaterials**, v. 29, p. 1989–2006, 2008.

SOUSA FERREIRA, H.; DO, M.; RANGEL, C. Nanotecnologia: Aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1860–1870, 2009.

THENMOZHI, S.; DHARMARAJ, N.; KADIRVELU, K.; KIM, H. Y. Electrospun nanofibers: New generation materials for advanced applications. **Materials Science and Engineering: B**, n. 217, p. 36–48, 2017.

TORRES-GINER, S.; GIMENEZ, E.; LAGARON, J. . Characterization of the morphology and thermal properties of zein prolamine nanostructures obtained by electrospinning. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 601–614, 2008.

WANG, B.; AKANBI, T. O.; AGYEI, D.; HOLLAND, B. J.; BARROW, C. J. **Coacervation Technique as an Encapsulation and Delivery Tool for Hydrophobic Biofunctional Compounds**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

WANG, H. S.; FU, G. D.; LI, X. . Functional Polymeric Nanofibers from Electrospinning. **Recent Patensts on Nanotechnology**, v. 3, p. 21–31, 2009.

WILSON, R. P.; HALVER, J. E. PROTEIN AND AMINO ACID REQUIREMENTS OF FISHES. **Annual Review of Nutrition**, v. 6, p. 225–244, 1986.

WU, H.T., CHEN, H.C.; LEE, H.K. Controlled release of theophyllinechitosan composite particles prepared using supercritical assisted atomization. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 02, p. 895 - 904, 2019.

ZHANG, C. L.; YU, S. H. Spraying functional fibres by electrospinning. **Materials Horizons**, v. 3, p. 266–269, 2016.

**SEGUNDA PARTE - ARTIGO**

**ARTICLE 1 - ENCAPSULATION OF TRYPTOPHAN IN NANOFIBERS OBTAINED BY ELECTROSPINNING AND BIOPOLIMERIC FILMS: A COMPARATIVE EVALUATION BETWEEN DIFFERENT SCALES APPLIED IN THE RELEASE SYSTEM**

**ENCAPSULAMENTO DE TRIPTOFANO EM NANOFIBRAS OBTIDAS POR ELETROFIAÇÃO E EM FILMES BIOPOLIMÉRICOS: UMA AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE DIFERENTES ESCALAS EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO**

**ABSTRACT**

The acquisition of essential nutrients in satisfactory quantities is associated with the most varied health benefits of fish, contributing to animal growth, protein synthesis, reproduction. The instability presented by some substances present in the composition of feed allows them to be lost to the environment. In the present work, zein nanofibers encapsulated with tryptophan were produced by electrospinning. Zein films with tryptophan were also produced by the casting method in order to compare the behavior of the encapsulated substance when at different scales and how the substance release process occurs when nanofibers and film are deposited in water and in gastric and intestinal simulation fluids. The materials produced were characterized by scanning electron microscopy (SEM), thermogravimetric analysis (TGA) and infrared spectroscopy by Fourier transform (FTIR). The in vitro release of tryptophan, both in water and in gastrointestinal simulation fluids, was evaluated using a UV-Vis spectrophotometer. Mathematical models were applied in order to evaluate the release kinetics of tryptophan, allowing the identification of factors capable of interfering with its release. The in vitro digestibility of tryptophan was also evaluated, so it was possible to identify the amount of the amino acid lost to the medium, not absorbed by the animal

**Keywords:** Eletrospinnig, Tryptophan, release system, in vitro digestibility

## RESUMO

A aquisição de nutrientes essenciais em quantidades satisfatórias está associada aos mais variados benefícios à saúde de peixes, contribuindo para crescimento do animal, síntese proteica, reprodução. A instabilidade apresentada por algumas substâncias presentes na composição de rações permite com que estas sejam perdidas para o meio. No presente trabalho nanofibras de zeína encapsuladas com triptofano foram produzidas por eletrofiação. Filmes de zeína com triptofano também foram produzidos pelo método *casting* de modo a comparar o comportamento da substância encapsulada quando em diferentes escalas e como ocorre o processo de liberação da substância quando nanofibras e filme são depositados em água e em fluidos de simulação gástrico e intestinal. Os materiais produzidos foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise termogravimétrica (TGA) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). A liberação *in vitro* do triptofano, tanto em água como em fluidos de simulação gastrointestinal, foi avaliada utilizando um espectrofotômetro UV-Vis. Modelos matemáticos foram aplicados de modo a avaliar a cinética de liberação do triptofano, permitindo a identificação de fatores capazes de interferir na liberação do mesmo. A digestibilidade *in vitro* do triptofano também foi avaliada, logo, foi possível identificar a quantidade do aminoácido perdida para o meio, não absorvida pelo animal.

**Palavras-chave:** Eletrofiação, triptofano, sistema de liberação, digestibilidade *in vitro*.



## 1. INTRODUCTION

Fish farming comprises a constantly expanding aquaculture sector in the country (Dantas *et al.*, 2017) . Aquaculture was the most prominent meat production sector between 2004 and 2014, with an average growth of 8.0%, against 4.1% for chickens, 5.1% for cattle and 2.9% for pigs. Tilapia, the main aquaculture species grown in the country, presented an average production increase of 14.2% per year in the same period (Kubitza, 2015).

To meet the production of fish in the country, considering the system of cultivation in tanks and ponds, it is important that animals receive a diet capable of meeting the necessary nutritional requirements. The essential amino acid tryptophan is present in the composition of diets (Pezzato *et al.*, 2009). Its essentiality is related to its contribution in the normal growth of the fish, in the protein synthesis and also in the regulation of important physiological mechanisms (Rossi and Tirapegui, 2004). In addition, tryptophan is also a precursor to serotonin (Lepage *et al.*, 2003), an important neurotransmitter present in the central nervous system, in the gastrointestinal tract and in platelets (Martins, Silva and Glória, 2010). In the brain, serotonin levels are related to changes in behavior and mood, aggression, depression, sleep, fatigue, appetite suppression, among others (Rossi and Tirapegui, 2004). For fish raised in a captive system or net-tanks, where a stress condition is possible, tryptophan supplementation is able to inhibit and / or decrease symptoms resulting from reduced levels of serotonin.

Knowledge about the stability of feed components is important. When in contact with water, some substances may be lost to the environment (Célia *et al.*, 2010), making it impossible to ingest. The development of encapsulated systems is capable of allowing the loss of substances to the environment, ensuring that more nutrients are ingested by the animals. The encapsulation of nutrients in polymeric nanofibers obtained by electrospinning is an effective alternative.

Electrospinning consists of a simple, advantageous technique, with easy handling of equipment and low consumption of solution used in the production of polymeric nanofibers (Thenmozhi *et al.*, 2017). For this, a wide range of polymers can be used, whether they are synthetic or natural (Wang, Fu and Li, 2009). In this work, zein nanofibers were obtained by electrospinning.

Zein is a polymer of natural origin, characterized as a prolamine, that is, an alcohol-soluble protein, yellow in color, extracted from the endosperm of the corn grain. It consists mostly of hydrophobic amino acids such as glutamic acid (21-26%), leucine (20%), proline (10%) and alanine (10%) (Shukla, R and Cheryan, 2001). The molecular weight, degree of

polymerization and chemical structure give zein a good film-forming property. Zein is also resistant to attack by microorganisms, facilitating the formation of drug and nutrient delivery systems (Corradini et al., 2014). Due to its good biocompatibility, biodegradability and non-toxic nature, it is considered a promising material to be used in the development of health products (Lu et al., 2017).

In this context, the present work proposes to develop and characterize hydrophobic nanofibers obtained and zein films encapsulated with the amino acid tryptophan, considered indispensable in the fish nutrition process. Zein films with tryptophan were also produced in order to assess the behavior of the amino acid when encapsulated at different scales. In addition to the characterization techniques to be employed, nanostructures and films were evaluated for the *in vitro* release profile of the amino acid, analyzing the efficiency of the encapsulation process, which determined the viability of the materials production, considering the incorporation as a future perspective of these in diets intended for feeding fish, thus contributing to the animal nutrition process.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Materials**

Zein was obtained from Sigma-Aldrich (USA), and the Tryptophan from Synth (Brazil). Ethanol were purchased from Synth (Brazil) and water was used as solvent.

### **2.2 Experimental**

#### **2.2.1 Preparation of Polymer Solutions**

The 30% (w/v) zein solution was prepared by dissolving it in ethanol: water at 80: 20% (v/v) under stirring for 2 hours at room temperature, until the complete dissolution of the zein.

#### **2.2.2 Preparation of tryptophan-zein solution**

After preparing the zein solution, as described above, 30% (w / w) tryptophan was added to this solution. The new solution was kept under stirring for another hour.

### **2.2.3 Fiber spinning**

For the production of nanofibers from the electrospinning technique, a voltage of 27 kV was applied from a high voltage source (INSTRUM, model HIPOT 60.00 kV, 5.00 mA). The system used to propel the polymeric solution out of the capillary was assisted by a flow pump (NEW ERA BUMP SYSTEMS, model Syringe Pump AL1000) with an applied flow equal to 0.08  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . The polymeric solution was deposited in a plastic syringe with a volume of 5.0 mL and a diameter of 0.70 mm. The syringe was attached to the pump. The working distance was 7.50 cm. The nanofibers produced were collected on a metal plate, wrapped with aluminum foil, forming fibrous blankets. The contact of the high voltage source with the tip of the needle and of the source with the collector was made through electrodes. In addition, the system formed by the pump and collector was isolated in a wooden box with a glass front opening, in order to control the temperature and humidity of the environment. The temperature recorded during the production process of the nanofibers varied from 26-28 ° C and the humidity, from 60-68%.

### **2.2.3 Biopolymeric film**

For the formation of pure zein and zein films with tryptophan, the same solutions, mentioned above, were used. The solutions were deposited on plates with a non-stick surface and kept at room temperature for 24 hours for drying.

### **2.2.4 Film and fiber characterization**

The morphology of the nanofibers and films was analyzed using scanning electron microscopy (LEO EVO 40 XVP – Carl Zeiss). Samples were prepared by cutting samples of the mats with a blade and fixed on aluminum stubs using double-sided adhesive tape and coated with gold using a sputtering (Balzers, SCD 050). The diameter of the fiber was measured with the aid of an image analysis software (Image J, National Institutes of Health, USA). The average

nanofiber diameter and diameter distribution were determined from approximately 100 random measurements using representative micrographs.

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) data were recorded on a Nicolet 470 Nexus FTIR spectrometer. The FTIR spectrometer was purged continuously with nitrogen. A total of 64 scans were considered with a resolution of  $2\text{ cm}^{-1}$ . The infrared spectra were recorded in transmission mode on thick blow spinning samples deposited on a silicon wafer.

X-ray diffraction (XRD) patterns were generated from non-woven fibrous mats using a Shimadzu XRD-6000 Diffractometer with a Ni filtered  $\text{CuK}\alpha$  radiation ( $1.54\text{ \AA}$ ) at 50 kV and 20 mA. Scans were carried out from  $5$  to  $30^\circ$  ( $2\theta$ ) at a scan rate of  $2^\circ/\text{min}$ .

Thermogravimetric analysis (TGA) are performed under a nitrogen atmosphere at a flow rate of  $50\text{ mL/min}$ , with a heating rate of  $10^\circ\text{C/min}$  and thermal variation of  $50$  to  $600^\circ\text{C}$ .

### 2.2.5 Assessment of tryptophan in vitro release

Approximately  $25\text{ mg}$  of zein / tryptophan were deposited in a falcon tube with  $50\text{ ml}$  of the release medium (aqueous  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$  solution,  $40\text{ mg/L}$ ). Three test conditions have been proposed in order to make the study as close to real conditions: a)  $25^\circ\text{C}$  and  $\text{pH} = 5.5$ , b)  $25^\circ\text{C}$  and  $\text{pH} = 8.5$  and c)  $35^\circ\text{C}$  and  $\text{pH} = 5.5$ . In all of these conditions, the solutions were kept under stirring at  $120\text{ rpm}$ .

The amount of tryptophan released was assessed by sampling intermittent aliquots (about  $180\text{ }\mu\text{L}$ ) collected from the medium, using a UV-visible spectrophotometer (Shimadzu, model UV-2601) at  $280\text{ nm}$ .

To analyze the kinetics of in vitro release data, a Korsmeyer-Peppas model (Eq. 1) and Korsmeyer-Peppas with  $T_{lag}$  (Eq. 2) was used.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad \text{Eq. (1)}$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k(t - t_{lag})^n \quad \text{Eq. (2)}$$

Where  $M_t / M_\infty$  is a fraction of tryptophan released at time  $t$ ,  $k$  is the release rate constant and  $n$  is the release exponent. The  $n$  value is used to characterize different release for cylindrical shaped matrices.

Another model used was Peppas-Sahlin (Eq. 3) and Peppas-Sahlin with  $T_{lag}$  (Eq. 4)

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^m + k_2 t^{2m} \quad \text{Eq. (3)}$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 (t - t_{lag})^m + k_2 (t - t_{lag})^{2m} \quad \text{Eq. (4)}$$

Where  $M_t$  is the concentration of released tryptophan and  $M_\infty$  is the concentration of released tryptophan at equilibrium,  $k_1$  and  $k_2$  are constant and  $m$  is the purely fickian diffusion exponent for a system of any geometric shape.

### 2.2.6 In vitro Digestibility

The in vitro digestibility test was carried out based on the methodology WANG et al., 2010. In the first stage, 20 mg of zein encapsulated with tryptophan were deposited in 40 ml of gastric simulation fluid produced from 5% w / v of pepsin in 0.15 M NaCl. The solutions were acidified until reaching pH values of 1.8, 2.5 and 3.5. The test was kept under stirring at 100 rpm for 1 hour in the dark and at room temperature.

In the second stage, another 20 mg of zein encapsulated with tryptophan were deposited in 40 ml of intestinal simulation fluid, produced from 1.5% w / v pancreatin, 0.5% w / v amylase, 0.3 % w / v amylase, 0.3% w / v bile salts and 0.15M NaCl. The solutions were acidified until reaching pH values of 4.5, 5.5 and 6.5. The test was kept under stirring at 30 rpm, for 5 hours in the dark and at room temperature.

The containers used to prepare the solution were covered with aluminum foil to prevent the passage of light. The released tryptophan was quantified using a UV-Vis spectrophotometer.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows SEM images obtained for the surface and cryogenic fracture of the films of pure zein and zein-tryptophan.

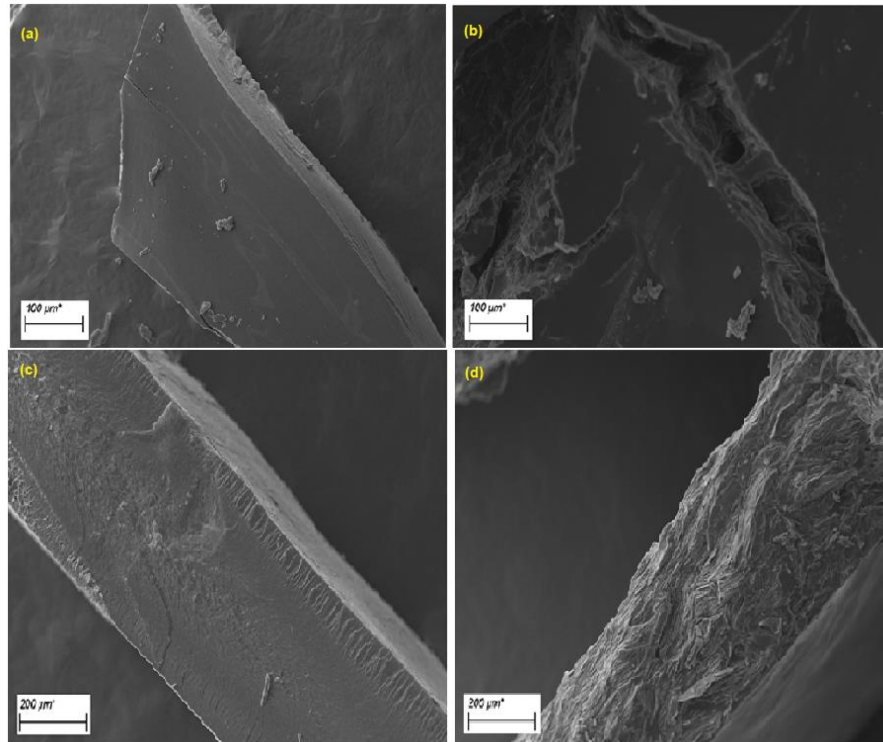


Figure 1 - Scanning electron microscopy (SEM) images: surface of the films (a) pure zein (b) zein-tryptophan; cryogenic fracture of the films (c) pure zein (d) zein-tryptophan.

The films of zein (Fig.1a) and zein-tryptophan (Fig.1b) presented a smooth and homogeneous surface. The heterogeneous morphology of the cryogenic fracture surface observed in the zein-tryptophan film is indicative of the formation of crystals. According to Yang et al., (2015), tryptophan has the ability to crystallize and can remain concentrated in specific regions of the produced film.

Figure 2 shows SEM images obtained for the pure zein (Fig. 2a) and zein-tryptophan nanofibers (Fig. 2b).

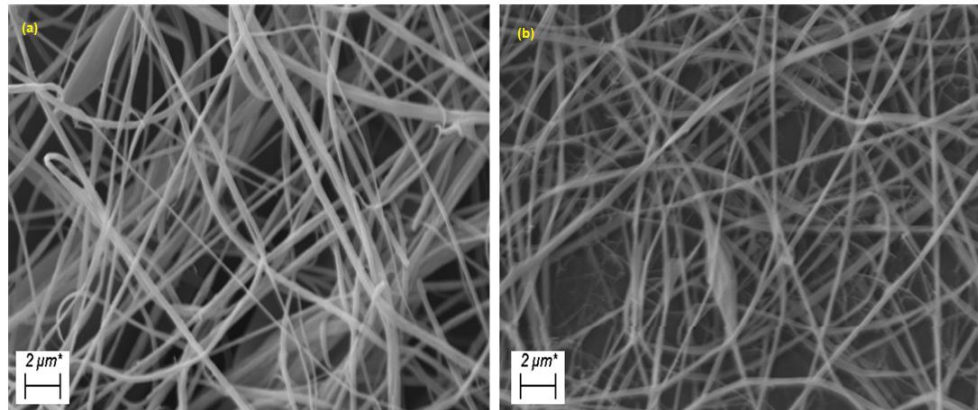


Figure 2: Scanning electron microscopy (SEM) images of nanofibers: (a) pure zein, (b) zein-tryptophan.

The nanofibers showed uniform and homogeneous morphology. The homogeneity maintained after encapsulation of the amino acid is an indication that there was an interaction between the biopolymer and the amino acid.

Figure 3 shows the distribution of the nanofiber diameters. The increase in the average fiber diameter due to tryptophan addition is similar to results found in the literature, and can be interpreted as a success in the incorporation of essential amino acid in the zein matrix. This increase in diameter is associated with an increase in the viscosity of the polymeric solution, after the incorporation of the amino acid. According to the literature, the increase in viscosity is able to promote a lower stretching of the produced nanofibers, leading to the formation of structures with a larger diameter.

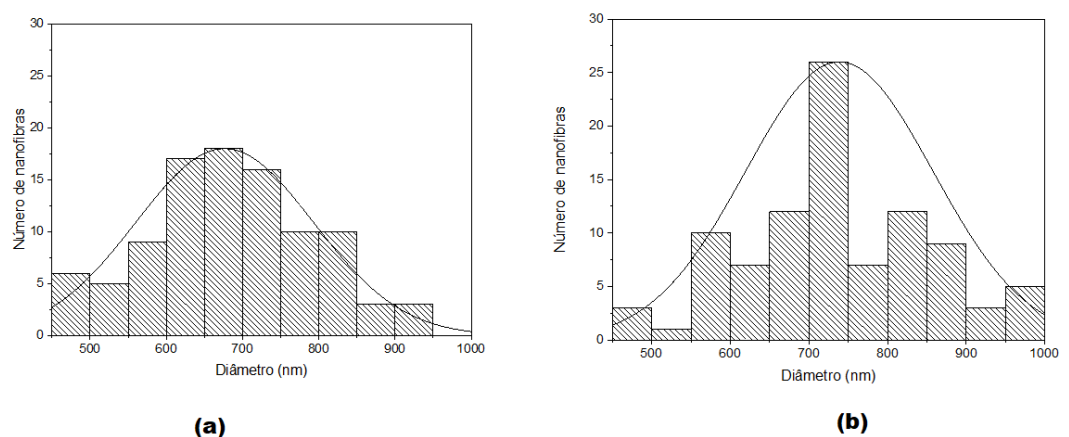


Figure 3 - Nanofiber diameter distribution: (a) pure zein, (b) zein-tryptophan.

The recorded FTIR transmittance spectra of zein electrospun fibers and zein/tryptophan are shown in Fig. 4 in the 500 – 4,000  $\text{cm}^{-1}$  region. The assigned peaks for zein spectra are in agreement to the bands previously reported in literature for zein. The characteristic peaks at 3307, 1650, 1538 and 1361  $\text{cm}^{-1}$ , for neat zein, correspond to the NH stretching, to amide I (C=O), amide II (N–H bending) and amide III (C–N), respectively (Ansari et al., 2019). For the tryptophan spectrum, the characteristic peaks are 3402, 3037, 1589, 1411, 1357 and 1059  $\text{cm}^{-1}$ , which correspond to the characteristic band of aromatic amine, to the C-O bond in aromatics, amine I, carbonyl and C-N bond in aromatics, respectively (Ayodhya et al., 2015).

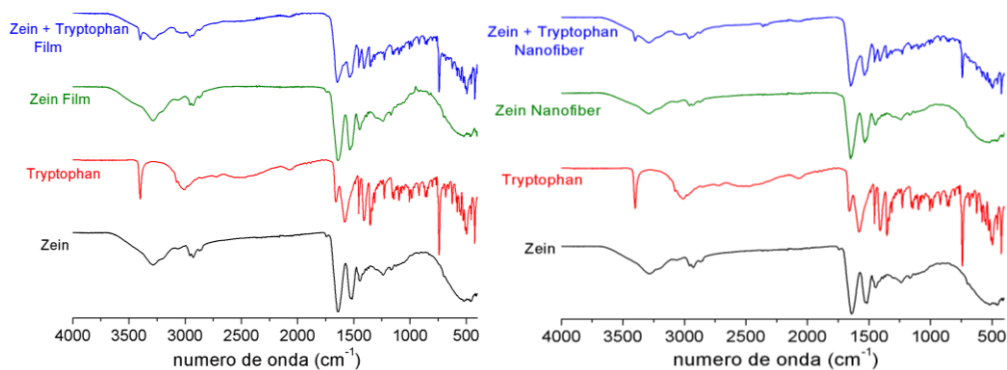


Figure 4 - Infrared spectra of zein, tryptophan and zein/tryptophan samples in the region 4000-500  $\text{cm}^{-1}$ .

When comparing the two spectra, it can be concluded that the presence of tryptophan did not significantly affect the chemical structure of zein.

Both in the spectrum referring to zein powder and in the spectrum referring to tryptophan dust, the bands of greater intensity are related to the presence of functional groups that are able to bond to each other through peptide bonds.

The low intensity bands, observed between 3397 and 3293  $\text{cm}^{-1}$  can be attributed to the interaction between zein and tryptophan. This interaction occurs through the connection between polar groups, amine and hydroxyl, present in the structure of the amino acid, with apolar group, amide, present in the structure the biopolymer. A change in the bands related to amide I and amide II (1650 and 1538  $\text{cm}^{-1}$ ) is observed, where further investigation reveals a zein / tryptophan interaction, other studies report that changes in amides I and II were associated with the occurrence of electrostatic interactions between proteins and other groups (Yang et al., 2019).



Figure 5 shows the X-ray diffraction patterns of the evaluated samples. As previously reported in the literature, both pure zein nanofibers and pure zein film have an amorphous peak around  $2\theta = 9^\circ$  and another broad peak around  $2\theta = 20^\circ$ . The first peak, that is, the shortest peak, represents the mean intra-helix distance of the skeleton ( $\alpha$ -helix structure of pure zein), while the largest peak is related to the intra-helix packing between the neighboring chains (Kayaci & Uyar, 2012; Ping *et al.*, 2013; Ullah *et al.*, 2019). The pure zein powder exhibits the same tendency in structure, this is evidence that nanofibers and zein film did not show changes in their structure.

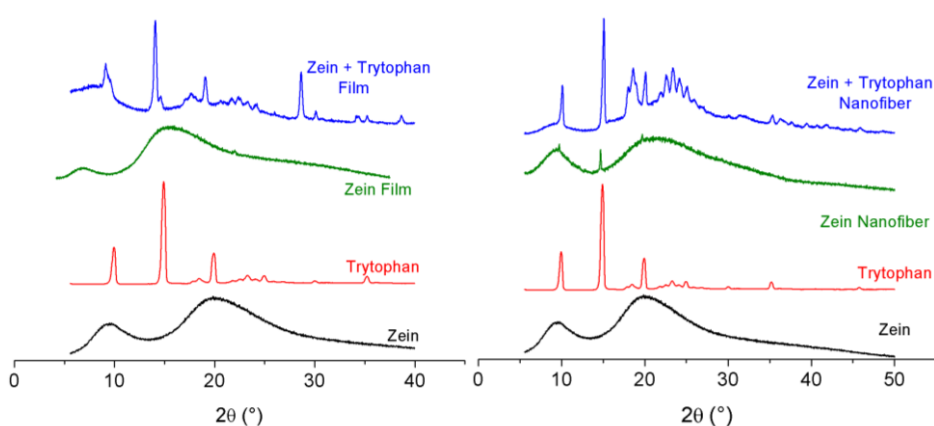


Figure 5 - X ray Diffraction patterns of zein, tryptophan and zein/tryptophan samples.

Diffraction patterns for pure tryptophan, nanofibers and films encapsulated with tryptophan were also obtained. For tryptophan powder, crystalline peaks around  $2\theta = 9.8^\circ$ ,  $14.7^\circ$ ,  $19.8^\circ$ ,  $23.0^\circ$ ,  $24.7^\circ$ ,  $35.0^\circ$  were observed (You *et al.*, 2014). When tryptophan was encapsulated in zein nanofibers, it was possible to observe an increase in the size of the crystallites. This result indicates that during the crystallization of zein-tryptophan nanofibers, the stages of nucleation and growth are controlled by the interaction of the biopolymer with the amino acid.

In addition, the formation of new crystalline structures in zein-tryptophan nanofibers, not present in the other spectra, is possibly related to the rapid evaporation of the solvent.

Thermogravimetric analysis (TGA) was used to determine onset degradation temperature ( $T_{\text{onset}}$ ) for neat zein nanofibers and films and zein/tryptophan nanofibers as shown in Figure 6.

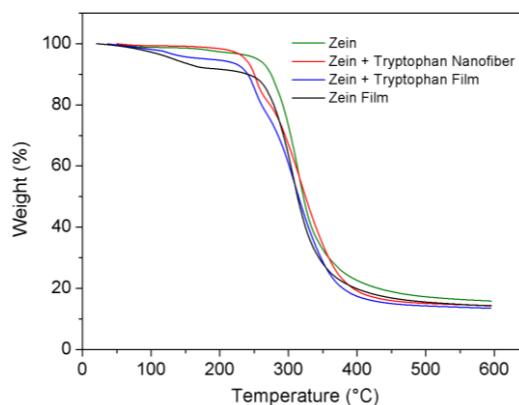


Figure 6 - Thermogravimetric curves for zein and zein/tryptophan samples.

Figure 6 illustrates the release behaviors of tryptophan from the nanostructured zein membranes. It is observed that the difference between the zein/tryptophan systems releasing is basically related to the thermal degradation of zein occurs in 2 stages. The first stage, at a temperature of 30 – 105°C, indicates loss of water and low molecular mass (plasticizers and volatile compound). The second stage, at a temperature of 250 – 450°C is related to protein degradation. The changes in the protein structure, provoked by the rupture of low energy intermolecular bonds, can promote a reduction in the thermal stability of the protein (Brahathesseswaran *et al.*, 2012; Corradini *et al.*, 2004).

Figure 7 shows the values obtained in the controlled release test in water. It was observed that the zein-tryptophan film (Fig.7b) did not release tryptophan in the first 15 minutes of the experiment. The zein / tryptophan nanofibers showed a high percentage of tryptophan released at the beginning of the experiment, but showed a lower percentage at the end of the experiment. Regarding the evaluated parameters, the increase in the temperature of the experiment also increased the amount of tryptophan released, but it is not statistically relevant. The same behavior was observed with the increase in pH in zein / tryptophan films. Regarding nanofibers, the same behavior was observed in relation to temperature, however, the increase in pH led to a slightly lower amount of released tryptophan, but there was still no relevant statistical difference.

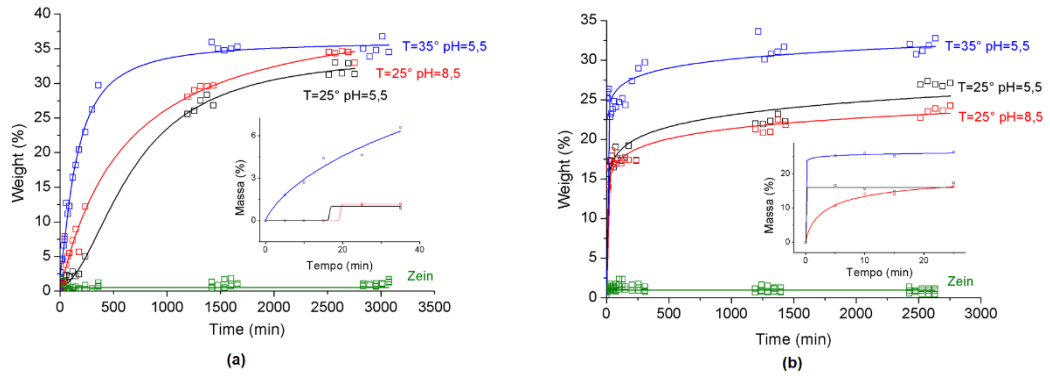


Figure 7 - In vitro release profile of tryptophan from zein samples: (a) zein-tryptophan nanofibers, (b) zein-tryptophan film.

Evaluating the proposed mathematical models and observing the constants present in Table 1 it is possible to observe, according to the value of  $R^2$ , that there is a change in the behavior of zein / tryptophan of the film to nanofiber, suggesting a change in the release mechanism. Note that the film fits well with both the Korsmeyer-Peppas and Peppas-Sahlin models. The nanofibers fit well with the Korsmeyer-Peppas model and showed a poor fit to the Peppas-Sahlin model. In Korsmeyer-Peppas model, the value of  $n$  characterizes the release mechanism of substance of interest as described in Table 1. When  $0.45 \leq n$ , we have a Fickian diffusion mechanism,  $0.45 < n < 0,89$  for non-Fickian transport,  $n = 0.89$  for the transport of case II (relaxational) and  $n > 0.89$  for the transport of super case II (Dash et al., 2010, Pandey et al., 2011).

<i>Model</i>	<i>Constants</i>	<i>T=25°C pH=5,5</i>		<i>T=25°C pH=8,5</i>		<i>T=25°C pH=5,5</i>	
		<b>Film</b>	<b>Nanofiber</b>	<b>Film</b>	<b>Nanofiber</b>	<b>Film</b>	<b>Nanofiber</b>
<i>Korsmeyer-Peppas</i>	n	0,84	0,09	0,59	0,09	0,37	0,05
	R <sup>2</sup>	0,92	0,93	0,95	0,96	0,87	0,93
<i>Korsmeyer-Peppas with T<sub>lag</sub></i>	n	0,83	0,09	0,62	0,09	0,41	0,05
	T <sub>lag</sub>	2,00	2,00	3,00	3,00	2,00	2,00
	R <sup>2</sup>	0,93	0,93	0,94	0,97	0,79	0,93
<i>Peppas-Sahlin</i>	k <sub>1</sub>	0,53	3,51	1,02	2,28	2,21	3,32
	k <sub>2</sub>	0,01	-0,03	0,00	-0,05	-0,03	-0,07
	m	0,45	0,28	0,45	0,45	0,45	0,45
	R <sup>2</sup>	0,95	0,11	0,96	0,14	0,97	-0,53
<i>Peppas-Sahlin with T<sub>lag</sub></i>	k <sub>1</sub>	0,54	2,30	1,03	2,29	2,24	3,32
	k <sub>2</sub>	0,01	-0,05	0,00	-0,05	-0,03	-0,07
	m	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
	T <sub>lag</sub>	3,00	2,00	3,00	2,00	3,00	2,00
	R <sup>2</sup>	0,95	-0,02	0,97	0,08	0,98	-0,64

Table 1 - Parameters of the Korsmeyer–Peppas, Korsmeyer-Peppas with T<sub>lag</sub>, The Peppas-Sahlin and Peppas-Sahlin with T<sub>lag</sub> .

Fitting the release data to the Korsmeyer–Peppas and Korsmeyer-Peppas with T<sub>lag</sub> equation proposed that release of the tryptophan from the zein nanofibers is through Fickian diffusion at different conditions. These results suggest that the tryptophan release from the zein nanofibers is through diffusion. Furthermore, it occurs due to the diffusion of the dissolution medium into the zein nanofibers, dissolution medium solubilized the tryptophan and releases it slowly. The Peppas-Sahlin and Peppas-Sahlin with T<sub>lag</sub> model can analyze the contribution of chain relaxation and the diffusional contribution to the controlled release process. Although zein / tryptophan nanofibers did not fit well into the model, the negative values obtained for k<sub>2</sub> should be interpreted in terms of an insignificant diffusion process compared to the relaxation mechanism. The Peppas-Sahlin (k<sub>1</sub> >> k<sub>2</sub>) model suggests that the release of tryptophan is controlled by the relaxation of polymer chains.

Fitting the release data to the release of the tryptophan from the Zein film, the Korsmeyer–Peppas and Korsmeyer-Peppas with T<sub>lag</sub> equation proposed that release is through non-Fickian (anomalous) transport at different conditions. The Peppas-Sahlin and Peppas-Sahlin with T<sub>lag</sub> model also presented very small or negative K<sub>2</sub> values which suggests that suggests that the release of tryptophan from the zein film is controlled by the relaxation of polymer chains. mechanism. A good fit to the KorsmeyerPeppas (n > 0.85) and Peppas-Sahlin

( $k_1 \gg k_2$ ) equations suggests that the release from the tryptophan from the zein film is controlled by the polymer relaxation.

The Table 2 and Table 3 shows the values of the in vitro digestibility test for the simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid. It can be seen that zeina / tryptophan nanofibers had a slight increase in tryptophan digestion in both gastric and intestinal fluid digests in most cases, comparing the same pH conditions. This can be explained by the increased surface area in the nanofibers, which speeds up the release process. It was not possible to observe a relationship between the pH change and the amount of tryptophan released through the static tests. In most cases there was no statistical difference with the pH variation, which suggests that pH variation does not interfere with the amount of tryptophan digested.

<i>pH</i>	<i>Zein + Tryptophan Film</i>			<i>Zein + Tryptophan Nanofiber</i>		
	<i>Average Weight</i>	<i>Standard Deviation</i>	<i>Statistical Test</i>	<i>Average Weight</i>	<i>Standard Deviation</i>	<i>Statistical Test</i>
<b>1,8</b>	49,73	3,658	a	61,51	2,590	b
<b>2,5</b>	47,53	3,734	a	55,98	1,751	a
<b>3,5</b>	53,30	0,734	a	59,87	0,751	ab

Table 2 - *In Vitro* Digestibility test for the simulated gastric fluid.

<i>pH</i>	<i>Zein + Tryptophan Film</i>			<i>Zein + Tryptophan Nanofiber</i>		
	<i>Average Weight</i>	<i>Standard Deviation</i>	<i>Statistical Test</i>	<i>Average Weight</i>	<i>Standard Deviation</i>	<i>Statistical Test</i>
<b>5,5</b>	53,94	1,084	a	54,94	2,501	a
<b>6,5</b>	50,21	3,725	a	62,11	0,617	b
<b>7,5</b>	57,54	4,250	a	56,26	2,826	a

Table 3 - *In Vitro* Digestibility test for the simulated intestinal fluid.

#### 4. CONCLUSIONS

The eletrospinnig technology can be appropriated used to encapsulate the tryptophan in a zein matrix, providing a release with Korsmeyer–Peppas kinect rates. The zein/tryptophan film demonstrated good performance in amino acid encapsulation and showed good fit to the Korsmeyer–Peppas and Peppas-Sahlin model. This study clearly indicated that zein films and zein nanofibers can potentially be used in the controlled tryptophan distribution system. The zein-tryptophan films have potential for application in fish farming, since there was no release in the first 15 minutes of testing, being an important factor in fish farming.

## 5. ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful for the financial support from FINEP/MCT, CAPES, CNPq, Embrapa/LNNA/Rede AgroNano, and FAPESP (Process N° 2010/19860-1) funding agencies.

## 6. REFERENCES

AYODHYA, D.; VENKATESHAM, M.; SANTOSHI, A.; REDDY, G. B.; VEERABHADRAM, G. One-pot sonochemical synthesis of CdS nanoparticles : photocatalytic and electrical properties One-pot sonochemical synthesis of CdS nanoparticles : photocatalytic and electrical properties. **International Journal of Industrial Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 261–271, 2015.

BRAHATHEESWARAN, D.; MATHEW, A.; ASWATHY, R. G.; NAGAOKA, Y.; VENUGOPAL, K. Hybrid fluorescent curcumin loaded zein electrospun nanofibrous scaffold for biomedical applications. v. 045001, 2012.

CÉLIA, A.; BARBOSA, A.; SOUSA, R. V. DE. Efeitos da Lixiviação em Alimentos para Camarões Penaeídeos em Fase de Reprodução Effects of leaching in Food for Penaeid Shrimps in Reproduction Phase. p. 58–65, 2010.

CORRADINI, E.; MATTOSO, L. H. C.; GUEDES, C. G. F.; ROSA, D. S. Mechanical , thermal and morphological properties of poly ( e -caprolactone )/ zein blends. **Polymers for advanced technologes**, v. 15, p. 340–345, 2004.

DANTAS, G.; KARINA, M.; CABRAL, D. V.; GARDNER, I. A. Characterization of tilapia farming in net cages at a tropical reservoir in Brazil. **Aquaculture Reports**, v. 6, p. 43–48, 2017.

DASH, S.; MURTHY, P. N.; NATH, L.; CHOWDHURY, P. KINETIC MODELING ON DRUG RELEASE FROM CONTROLLED DRUG DELIVERY SYSTEMS. **Acta Poloniae Pharmaceutica- Drug Research**, v. 67, n. 3, p. 217–223, 2010.

KAYACI, F.; UYAR, T. Electrospun zein nanofibers incorporating cyclodextrins. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 558–568, 2012.

KUBITZA, F. Aquicultura no Brasil: Principais espécies, áreas de cultivo, rações, fatores limitantes e desafios. **Panorama da Aquicultura**, v. 25, n. 150, 2015.

LEPAGE, O.; VÍLCHEZ, I. M.; POTTINGER, T. G.; WINBERG, S.; SAWREY, F. Time-course of the effect of dietary L -tryptophan on plasma cortisol levels in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 206, p. 3589–3599, 2003.

LU, H.; WANG, Q.; LI, G.; QIU, Y.; WEI, Q. Electrospun water-stable zein/ ethyl cellulose composite nano fi ber and its drug release properties. **Materials Science & Engineering C**, v. 74, p. 86–93, 2017.

MARTINS, A. C. C. L.; SILVA, T. M.; GLÓRIA, M. B. . Determinação simultânea de precursores de serotonina - triptofano e 5-hidroxitriptofano- em café. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 316–320, 2010.

PANDEY, H.; PARASHAR, V.; PARASHAR, R.; PRAKASH, R.; RAMTEKE, W. Nanoscale Controlled drug release characteristics and enhanced antibacterial effect of graphene nanosheets containing gentamicin sulfate †. **Nanoscale**, v. 11, n. 3, p. 4104–4108, 2011.

PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; FURUYA, W. M. Valor nutritivo dos alimentos utilizados na formulação de rações para peixes tropicais Nutritive value of common feeds used in tropical fish diets. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 3598, p. 43–51, 2009.

PING, Y.; RAY, S.; JIN, J.; GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, M.; NIEUWOUTD, M. K.; LIU, D.; YOUNG, S. Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique : A physicochemical study based on zein – gallic acid system. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 1013–1021, 2013.

ROSSI, L.; TIRAPEGUI, J. Implicações do Sistema Serotoninérgico no Exercício Físico.

**Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 48, n. 1, p. 227–233, 2004.

THENMOZHI, S.; DHARMARAJ, N.; KADIRVELU, K.; KIM, H. Y. Electrospun nanofibers: New generation materials for advanced applications. **Materials Science and Engineering: B**, n. 217, p. 36–48, 2017.

ULLAH, S.; HASHMI, M.; KHAN, M. Q.; KHARAGHANI, D. Silver sulfadiazine loaded zein nanofiber mats as a novel wound dressing. p. 268–277, 2019.

WANG, H.-S.; MAN, Y.-B.; WU, F.-Y.; ZHAO, Y.-G.; WONG, C. K. C.; WONG, M.-H. Oral Bioaccessibility of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons ( PAHs ) through Fish Consumption , Based on an in Vitro Digestion Model. **journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 21, p. 11517–11524, 2010.

YANG, J.; WANG, Y.; HAO, H.; XIE, C.; BAO, Y.; YIN, Q.; GONG, J.; JIANG, C.; HOU, B.; WANG, Z. Spherulitic Crystallization of L - Tryptophan : Characterization , Growth Kinetics , and Mechanism. **Crystal Growth e Design**, v. 15, p. 5124–5132, 2015.

YANG, S.; DAI, L.; MAO, L.; LIU, J.; YUAN, F.; LI, Z.; GAO, Y. International Journal of Biological Macromolecules Effect of sodium tripolyphosphate incorporation on physical, structural , morphological and stability characteristics of zein and gliadin nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 653–660, 2019.