

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel**  
**Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**



**TESE DE DOUTORADO**

**Encapsulação do ácido fólico e avaliação de sua estabilidade  
frente a tratamentos térmicos e irradiação UVA**

Jarine Amaral do Evangelho  
Nutricionista  
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Pelotas, 2018

**Jarine Amaral do Evangelho**

**Encapsulação do ácido fólico e avaliação de sua estabilidade frente  
a tratamentos térmicos e irradiação UVA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de Orientação

Profª Drª Elessandra da Rosa Zavareze (UFPEL - FAEM)

Prof. Dr. Alvaro Renato Guerra Dias (UFPEL - FAEM)

Drª. Martha Zavariz de Miranda (EMBRAPA Trigo)

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

E92e Evangelho, Jarine Amaral do

Encapsulação do ácido fólico e avaliação de sua estabilidade frente a tratamentos térmicos e irradiação UVA / Jarine Amaral do Evangelho ; Elessandra da Rosa Zavareze, orientadora ; Alvaro Renato Guerra Dias, Martha Zavariz de Miranda, coorientadores. — Pelotas, 2018.

69 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Temperatura. 2. Irradiação UVA. 3. Estabilidade. 4. Vitamina. I. Zavareze, Elessandra da Rosa, orient. II. Dias, Alvaro Renato Guerra, coorient. III. Miranda, Martha Zavariz de, coorient. IV. Título.

CDD : 664

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Jarine Amaral do Evangelho

Encapsulação do ácido fólico e avaliação de sua estabilidade frente a tratamentos térmicos e irradiação UVA

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa 31/10/2018

Banca Examinadora:

.....  
Profª Dra. Elessandra da Rosa Zavareze  
Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas.

.....  
Prof. Dr. Álvaro Renato Guerra Dias  
Doutor em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas.

.....  
Profª Dra. Adriana Dilenburg Meinhart  
Doutorada em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas.

.....  
Dra. Shanise Lisie Mello Hallal  
Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas.

.....  
Dra. Luciana Prietto Prietsch  
Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas.

*A minha admirável mãe Tereza Maria*  
*Ao meu pai Jorge*  
*Aos meus irmãos George e Jorge Augusto*  
*Aos demais familiares e amigos*

## Agradecimentos

***À Deus, pois Ele sempre foi minha força e meu refúgio nessa caminhada.***

Nesses anos de Doutorado, não foram poucas as vezes que “minha cruz pesou”, tenho certeza que todas tribulações me fizeram ficar mais próxima do Teu AMOR.

***À virgem Maria***, exemplo de humildade, coragem e obediência. Muito obrigada por me amparar com teu colo e Amor de mãe todos esses anos que passei longe da minha família.

***À minha Mãe Tereza Maria***, que muitas vezes renunciou aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Obrigada por sempre acreditar no meu potencial, mesmo quando eu não acreditava. Quero dizer que essa conquista não é só minha, mas nossa. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que teve por mim. Sempre me ensinou a agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo. E graças à nossa união, os obstáculos foram ultrapassados, vitórias foram conquistadas e alegrias divididas. Agradeço pela paciência e compreensão com minha ausência durante essa longa jornada. Mãe EU TE AMO!! MUITÍSSIMO obrigada!!

**Ao meu irmão George**, agradeço pela amizade, carinho e companheirismo de sempre, por estar sempre torcendo pelas minhas conquistas. Pelo apoio e incentivo incondicional. Te amo meu irmão, muito Obrigada!

**Ao meu Pai Jorge e ao meu irmão Jorge Augusto**, obrigada pelo carinho e apoio. Amo vocês!

**Obrigada a todos familiares e aos amigos** que me incentivaram a concluir essa etapa.

À orientadora, professora Elessandra da Rosa Zavareze que foi fundamental para a conclusão desse trabalho. Obrigada por incentivar-me, apoiar-me sempre que precisei, pelo carinho e amizade.

Agradeço ao meu co-orientador professor Álvaro Renato Guerra Dias pelos conhecimentos repassados nesses anos de trabalho, pela confiança e pela amizade.

Aos professores do programa da Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelos ensinamentos, disposição e amizade.

À minha amiga Vânia Zanella Pinto, que foi um presente de Deus enviado a minha vida. No período do doutorado “nosso cordão umbilical foi cortado”, mas mesmo distante sempre motivou-me para seguir em frente. Tu és sem dúvida um ser humano admirável (eu diria brincando um ser Humano com “H” maiúsculo rrsrs). Parabéns por ser esse exemplo de profissional, pelo entusiasmo e amor pela pesquisa! Gratidão é a palavra que define o que sinto quando penso em ti minha amiga. Te levarei sempre em meu coração.

À minha amiga Luciana Prietto Prietsch. Lu só eu sei o quanto tu foi essencial nessa etapa da minha vida. Serei eternamente grata por tua disposição incansável (incansável mesmo!!) em me ajudar. Obrigada pelas caronas exclusivas na porta de casa (de gol bolinha e capivara), cafézinhos e histórias compartilhadas. Ficamos um período do meu doutorado longe, por conta do nosso amado Luquinhas, e tu deixou saudade em meus dias. É aquela frase: Cada pessoa que passa por nossa vida é única. Deixa um pouquinho de si... leva um pouco de nós. Amiga te levo em meu coração.

À Fernanda Oliveira, agradeço a Deus por ter cruzado nossos caminhos e ter a oportunidade de conviver com uma pessoa de um coração imenso e generoso. Tens um lugar especial na minha vida!

À Mariana Dias Antunes, pessoa ímpar que tive oportunidade de conhecer. Agradeço por sempre me ajudar no que precisei, e também por saber que posso contar contigo. Espero que a vida nos conceda partilhar ainda muitos cafezinhos "fit" com biscoitinhos amanteigados e pão de queijo. Comadre te levo no meu coração!

À Rozane Crizel, outro anjo enviado por Deus no momento certo. Obrigada por me auxiliar diretamente na realização desse trabalho, compartilhar conhecimento (histórias também rsrrs) foi uma ajuda inestimável sem dúvidas. Levo comigo a tua amizade e o carinho por fazeres parte dessa trajetória.

Agradeço ao Cláudio Cruxen, meu amigo de departamento e de Fé. Obrigada pelo incentivo, amizade e por todos momentos compartilhados que levarei em meu coração.

À Giovana Zandoná, Bárbara Biduski e a Milena Fontes, agradeço pela parceria e momentos compartilhados durante esse período.

À minha querida amiga de Shanise, grande exemplo de perseverança e determinação. Parafraseando O Pequeno príncipe: *Era uma pessoa igual a cem mil outras pessoas. Mas, eu fiz dela um amigo, agora ela é única.* Obrigada pelo apoio e amizade incondicional!

Aos colegas de Pós-graduação e estagiários muito obrigada pelo apoio e a amizade.

À Meri, responsável pela limpeza do laboratório, obrigada por ser uma pessoa generosa com todos.

À Universidade Federal do Rio Grande (FURG) e aos funcionários do CEME-Sul, por estarem sempre dispostos a ajudar, realizando nas análises de microscopia.

À UFPEL e a CAPES por proporcionar o desenvolvimento deste trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Divido com todos vocês mais uma etapa de minha vida.

Deus abençoe a todos!

***“Porque para Deus nada é impossível.”***

*(Lucas 1:37)*



## Resumo

EVANGELHO, Jarine Amaral. **Encapsulação do ácido fólico e avaliação de sua estabilidade frente a tratamentos térmicos e irradiação UVA** 2018, 69 f. Qualificação (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

O ácido fólico é um micronutriente precursor de vários cofatores enzimáticos necessários para a síntese de ácidos nucleicos, interconversão de aminoácidos, metilação do DNA, RNA e proteínas. Uma alimentação deficiente de folatos pode ocasionar vários distúrbios em humanos, tais como defeitos congênitos, doenças cardiovasculares, anemia megaloblástica, doença de Alzheimer e alguns tipos de câncer. Tendo em vista a instabilidade do ácido fólico a diferentes condições, objetivou-se com esse estudo caracterizar as fibras e cápsulas de zeína preparadas pelas técnicas de electrospinning e electrospraying, respectivamente e utilizá-las para encapsular o ácido fólico. Soluções de zeína 30% foram utilizadas para produção de fibras e 9% para o desenvolvimento de cápsulas. Foram adicionados ácido fólico nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5% (p/v) nas soluções poliméricas. As fibras e cápsulas foram avaliadas quanto a morfologia, diâmetro, espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FTIR), propriedades térmicas por análise termogravimétrica (TGA), eficiência de encapsulamento, estabilidade térmica e a luz por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massa (LC/MS). As soluções de zeína pura e adicionadas de ácido fólico foram capazes de formar fibras e cápsulas uniformes. O diâmetro médio das fibras variou de 369 a 702 nm, enquanto das cápsulas foram de 291 a 339 nm. Houve interação entre o ácido fólico e a zeína observada pelos espectros de FTIR, tanto para fibras como para cápsulas. O encapsulamento do ácido fólico na forma de fibras ou cápsulas aumentou sua estabilidade térmica, conforme observado pelas curvas termogravimétricas. As fibras e as cápsulas de zeína com ácido fólico apresentaram alta eficiência de encapsulação (>80%). O ácido fólico puro apresentou 70% de degradação quando exposto a 180°C, enquanto o encapsulado em fibras ou em cápsulas proporcionou a estabilidade do ácido fólico. A fotodegradação do ácido fólico puro foi de aproximadamente 26%, no entanto, quando a vitamina foi incorporada as fibras de zeína, foi observado estabilidade a luz. As fibras e cápsulas de zeína com ácido fólico desenvolvidas nesse trabalho, apresentaram características promissoras para aplicação em alimentos que necessitam de processamentos térmicos e exposição a luz.

**Palavras-chave:** temperatura, irradiação UVA, estabilidade, vitamina.

## Abstract

EVANGELHO, Jarine Amaral. **Folic acid encapsulation and evaluation of its stability against thermal treatments and UVA irradiation**. 2018, 69 f. Thesis (Doctoral Degree in Food Science and Technology) - Graduate Program in Food Science and Technology, Agronomy School Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2018.

Folic acid is a precursor micronutrient of several enzymatic cofactors required for nucleic acid synthesis, amino acid interconversion, DNA methylation, RNA and proteins. Poor folate feeding can lead to various disorders in humans, such as birth defects, heart disease, megaloblastic anemia, Alzheimer's disease, and some types of cancers. In view of the instability of folic acid under different conditions, the purpose of this study was to characterize the fibers and zein capsules prepared by the electrospinning and electrospraying techniques, respectively, and to use them to encapsulate folic acid. Solutions of zein 30% were used for fiber production and 9% for the development of capsules. Folic acid at concentrations of 0.5, 1.0 and 1.5% (w / v) in the polymer solutions was added. The fibers and capsules were evaluated for morphology, diameter, infrared spectroscopy with Fourier transform (FTIR), thermal properties by thermogravimetric analysis (TGA), encapsulation efficiency, thermal stability and light by liquid chromatography high efficiency coupled to mass spectrometry / MS). Solutions of pure zein and folic acid added were able to form uniform fibers and capsules. The mean diameter of the fibers varied from 369 to 702 nm, whereas the capsules were 291 to 339 nm. There was interaction between folic acid and zein observed by FTIR spectra, for both fibers and capsules. The encapsulation of folic acid in the form of fibers or capsules increased its thermal stability, as observed by thermogravimetric curves. Folic acid zein fibers and capsules showed high encapsulation efficiency (> 80%). Pure folic acid showed 70% degradation when exposed to 180 ° C, while fiber or capsule encapsulation provided the stability of folic acid. The photodegradation of pure folic acid was approximately 26%, however, when the vitamin was incorporated into the zein fibers, light stability was observed. The fibers and zein capsules with folic acid developed in this work, presented promising characteristics for application in foods that require thermal processing and exposure to light.

**Key words:** Temperature, UVA irradiation, vitamin, stability.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura química do ácido fólico.....	19
<b>Figura 2.</b> Defeito no tubo neural de recém-nascido (espinha bífida).....	23
<b>Figura 3.</b> Modelo de uma estação de <i>electrospinning/electrospraying</i> para a formação de fibras e cápsulas .....	26
<b>Figura 4.</b> Esquema de um processo básico de <i>electrospinning</i> e <i>electrospraying</i> ....	27
<b>Figura 5.</b> Diferenças morfológicas do processo de <i>electrospray/electrospinning</i> com variações da concentração das soluções poliméricas.....	28
<b>Figura 6.</b> Imagens digitais (a-c) apresentam a deformação de três estágios da gota sob a influência do aumento do campo elétrico. (d-f) Desenho ilustrativo do mecanismo do efeito das cargas nas gotículas poliméricas.....	33
<b>Figura 7.</b> Microscopia Eletrônica de Varredura demonstrando o efeito da distância na formação de cápsulas por <i>electrospraying</i> .....	35
<b>Figura 8.</b> Fotografia da estação de <i>electrospinning/electrospraying</i> utilizada neste estudo.....	40
<b>Figura 9.</b> Espectros de FTIR-ATR para fibras ultrafinas de zeína pura (A), zeína com 0,5% de ácido fólico (B), zeína com 1,0% de ácido fólico (C) e zeína com 1,5% de ácido fólico (D) .....	47
<b>Figura 10.</b> Espectros de FTIR-ATR para cápsulas de zeína pura (A), zeína com 0,5% de ácido fólico (B), zeína com 1,0% de ácido fólico (C) e zeína com 1,5% de ácido fólico (D) .....	47
<b>Figura 11.</b> Morfologia das fibras ultrafinas e respectiva distribuição de tamanho: zeína pura (A), zeína com 0,5% de ácido fólico (B), zeína com 1,0% de ácido fólico (C) e zeína com 1,5% de ácido fólico (D).....	49
<b>Figura 12.</b> Morfologia das cápsulas e respectiva distribuição de tamanho: zeína pura (A), zeína com 0,5% de ácido fólico (B), zeína com 1,0% de ácido fólico (C) e zeína com 1,5% de ácido fólico (D).....	50
<b>Figura 13.</b> Termogramas: (a) ácido fólico puro e fibras de zeína com ácido fólico 0,5, 1,0 e 1,5%, (b) ácido fólico puro e cápsulas de zeína com ácido fólico 0,5, 1,0 e 1,5%.....	52
<b>Figura 14.</b> Produtos de degradação do ácido .....	58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Diferentes polímeros e seus respectivos solventes utilizados no processo de <i>electrospinning</i> .....	31
<b>Tabela 2.</b> Delineamento experimento da obtenção e caracterização de fibras e cápsulas de zeína incorporadas com ácido fólico.....	38
<b>Tabela 3.</b> Viscosidade aparente e condutividade elétrica das soluções de zeína 30% e 9% (m/v) com diferentes concentrações de ácido fólico.....	44
<b>Tabela 4.</b> Eficiência de encapsulamento do ácido fólico encapsulado em fibras ultrafinas e cápsulas de zeína.....	53
<b>Tabela 5.</b> Eficiência de encapsulamento e estabilidade térmica do ácido fólico puro, em fibras ultrafinas e cápsulas de zeína.....	54
<b>Tabela 6.</b> Eficiência de encapsulamento e estabilidade a irradiação do ácido fólico puro, em fibras ultrafinas e cápsulas de zeína.....	56

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	14
<b>2. OBJETIVOS</b>	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	18
3.1. Vitaminas	18
3.2. Folatos e ácido fólico	18
3.3. Fontes de folatos	19
3.4. Estabilidade do ácido fólico	19
3.5. Deficiência do ácido fólico na dieta	22
3.6. Fortificação dos alimentos com ácido fólico	23
3.7. Encapsulação do ácido fólico	24
3.8. Encapsulação por <i>electrospinning</i> e <i>electrospraying</i>	26
3.8.1. Parâmetros da solução polimérica	28
3.8.1.1. Concentração do polímero e viscosidade da solução	28
3.8.1.2. Condutividade	29
3.8.1.3. Solvente	29
3.8.2. Parâmetros do processo	32
3.8.2.1. Tensão superficial	32
3.8.2.2. Tensão elétrica	32
3.8.2.3. Taxa de alimentação	33
3.8.2.4. Distância da agulha ao coletor	34
3.8.3. Parâmetros ambientais	36
3.9. Zeína	36
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	38
4.1. Material	38
4.2. Delineamento experimental	38
4.3. Preparo das soluções poliméricas	38
4.4. Caracterização das soluções poliméricas	39
4.5. Produção de fibras ultrafinas/cápsulas por <i>electrospinning/electrospraying</i>	39
4.6. Caracterização das fibras ultrafinas e cápsulas	40

4.6.1. Morfologia e diâmetro.....	40
4.6.2. Grupos funcionais .....	40
4.6.3. Propriedades térmicas por análise termogravimétrica (TGA).....	41
4.6.4. Eficiência de encapsulamento .....	41
4.6.5. Estabilidade térmica e a irradiação UVA.....	42
4.7. Análise estatística .....	43
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
5.1. Caracterização das soluções poliméricas.....	44
5.1.2. Viscosidade aparente e condutividade elétrica das soluções poliméricas.....	44
5.2. Caracterização das fibras ultrafinas e cápsulas.....	45
5.2.1. Grupos funcionais .....	45
5.2.2. Morfologia e distribuição do diâmetro .....	48
5.2.3 Propriedades termogravimétricas .....	51
5.2.4 Eficiência de encapsulamento e estabilidade térmica e a irradiação UVA .....	53
5.2.5. Produtos de degradação do ácido fólico.....	57
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>59</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>60</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O ácido fólico, também conhecido como vitamina B9, é um componente essencial de uma dieta saudável. Este micronutriente é o precursor de vários cofatores enzimáticos necessários para a síntese de ácidos nucleicos, interconversão de aminoácidos e reações de metilação do DNA e RNA (SCOTT; EBEILL; FLETCHER, 2000). Uma alimentação deficiente de folatos pode ocasionar vários distúrbios como defeitos congênitos, doença cardiovascular, anemia megaloblástica, doença de Alzheimer e alguns tipos de câncer (AGRAWAL et al., 2007; NUKOLOVA et al., 2011; GAZZALI et al., 2016).

Quimicamente o ácido fólico é constituído por um anel pteridina ligado a um grupamento p-aminobenzóico, que por sua vez está associado a um ou mais ácidos glutâmicos. Quando há quebra dessa estrutura química os produtos formados são biologicamente inativos (DELCHIER et al., 2016). A reatividade química do ácido fólico torna esta vitamina uma das mais susceptíveis a perdas durante o armazenamento e processamento de alimentos. Fatores como temperatura, luz, pH, presença de catalisadores e agentes oxidantes contribuem para a degradação do ácido fólico (NGUYEN et al., 2003, JASTREBOVA et al., 2013)

Devido à baixa estabilidade do ácido fólico, é necessário adicionar altas concentrações dessa vitamina na fortificação de alimentos para garantir seu efeito de promoção da saúde (ACEVEDO-FANI et al., 2018). A ingestão acima dos níveis recomendados pode levar ao aparecimento de ácido fólico não metabolizado na circulação fetal e materna. Sugere-se que o ácido fólico não metabolizado no sangue materno e fetal pode atuar como um doador de metila, o que irá influenciar na regulação da expressão gênica, tendo como conseqüências a má formação fetal (SILVA, KEATING, & PINTO, 2017). Considerando a importância do ácido fólico para a saúde humana, sua vulnerabilidade a agentes externos e os riscos potenciais associados ao seu excesso na alimentação, o encapsulamento do ácido fólico pode fornecer uma alternativa à sua degradação em produtos alimentícios e um aumento em sua bioacessibilidade. O processo de encapsulamento pode aumentar a bioacessibilidade do ácido fólico, tornando-o disponível para absorção no intestino delgado. Assim, sugere-se que o encapsulamento também promova maior biodisponibilidade, por ser uma das formas mais disponíveis para metabolização e distribuição (PEÑALVA et al. 2015).

As técnicas de *electrospinning* e *electrospraying* são métodos versáteis para encapsular compostos, com uma série de vantagens quando comparadas com as técnicas de encapsulamento tradicionais, tais como o *spraydrying*, coacervação ou gelificação iônica. Entre suas vantagens estão a não utilização de altas temperaturas, alta área superficial, o pequeno diâmetro das fibras e cápsulas resultantes, além da alta eficiência de encapsulação (BHUSHANI & ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014; ZUSSMAN, 2011; ACEITUNO-MEDINA et al., 2015). A diferença entre as técnicas de *electrospinning* e *electrospraying* baseia-se na concentração da solução do polímero. Quando a concentração da solução polimérica é alta (*electrospinning*), o jato que sai do capilar está na forma de uma fibra e executa um movimento de chicote até atingir a placa coletor. O solvente é evaporado durante o processo, resultando na deposição de uma nanofibra sólida sob o anteparo aterrado (JAWOREK & SOBCZYK, 2008). Quando a concentração da solução de polímero é baixa (*electrospraying*), formam-se gotículas. Estas gotículas altamente carregadas são auto-dispersantes e a evaporação do solvente leva à solidificação, resultando em nanopartículas e nano-aglomerados no coletor.

O uso de proteínas para o micro e nano-encapsulamento de compostos bioativos tem a vantagem da não-toxicidade para aplicação em alimentos e fármacos (ARIYARATHNA & KARUNARATNE, 2015). A zeína, principal proteína de armazenamento de milho, é considerada um ingrediente alimentar seguro pela Food and Drug Administration (FDA); no entanto, devido ao seu caráter hidrofóbico e sua deficiência em aminoácidos (como a lisina e o triptofano), o uso de proteína do milho em produtos alimentícios é limitado. Contudo, a zeína é utilizada na fabricação de uma ampla variedade de produtos, incluindo fibras têxteis (SELLING et al., 2007), filmes biodegradáveis e embalagens (PADGETT et al., 1998) e para o encapsulamento de produtos alimentícios e farmacêuticos (GUO, HEINAMAKI & YLIRUUSI, 2008).

Pesquisas utilizando fibras de zeína produzidas pela técnica de *electrospinning* reportaram o aumento da estabilidade e a biodisponibilidade de compostos como ácido gálico (NEO et al., 2013),  $\beta$ -caroteno (FERNANDEZ; TORRES-GINER; LAGARON, 2009), curcumina (BRAHATHEESWARAN et al., 2012),  $\alpha$ -tocoferol (WONGSASULAK; PATHUMBAN; YOOVIDHYA, 2014), ácido ferúlico (YANG et al., 2013) e taninos (OLIVEIRA et al., 2014).

Torres-Giner et al. (2010) produziram cápsulas de zeína pelo processo de *electrospinning* com ácido docosaheptaenóico (DHA, ômega-3) e relataram o atraso



das reações de oxidação e um aumento na estabilidade química do DHA. Peñalva et al. (2015), em um estudo utilizando zeína para encapsular o ácido fólico *por spray-drying* para aplicações farmacêuticas, relataram a capacidade das nanopartículas de zeína em melhorar a biodisponibilidade do ácido fólico. No entanto, não há estudos sobre a avaliação da resistência térmica do ácido fólico encapsulado com zeína por *electrospinning* e *electrospraying* a temperaturas simulando o processamento e alimentação de alimentos para aplicação na indústria de alimentos. Além disso, são necessárias pesquisas para avaliar a exposição do ácido fólico encapsulado em diferentes níveis de irradiação ultravioleta.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a estabilidade do ácido fólico encapsulado em fibras ultrafinas ou cápsulas ultrafinas de zeína produzidas pela técnica de *electrospinnig* e *electrospraying* frente a tratamentos térmicos e de irradiação UVA.

### 2.2 Objetivos específicos

- Elaborar soluções poliméricas de zeína e caracterizá-las quanto a viscosidade aparente e condutividade elétrica;
- Produzir fibras ultrafinas de zeína pela técnica de *electrospinning* e avaliá-las quanto a morfologia e distribuição de diâmetro;
- Produzir cápsulas de zeína pela técnica de *electrospraying* e avaliá-las quanto a morfologia e distribuição de diâmetro;
- Produzir fibras ultrafinas de zeína incorporadas com ácido fólico pela técnica de *electrospinning* e avaliá-las quanto a morfologia e distribuição de diâmetro, grupos funcionais, propriedades térmicas, eficiência de encapsulamento, estabilidade térmica e a luz UVA;
- Produzir cápsulas de zeína incorporadas com ácido fólico pela técnica de *electrospraying* e avaliá-las quanto a morfologia e distribuição de diâmetro, grupos funcionais, propriedades térmicas, eficiência de encapsulamento, estabilidade térmica e a luz UVA.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

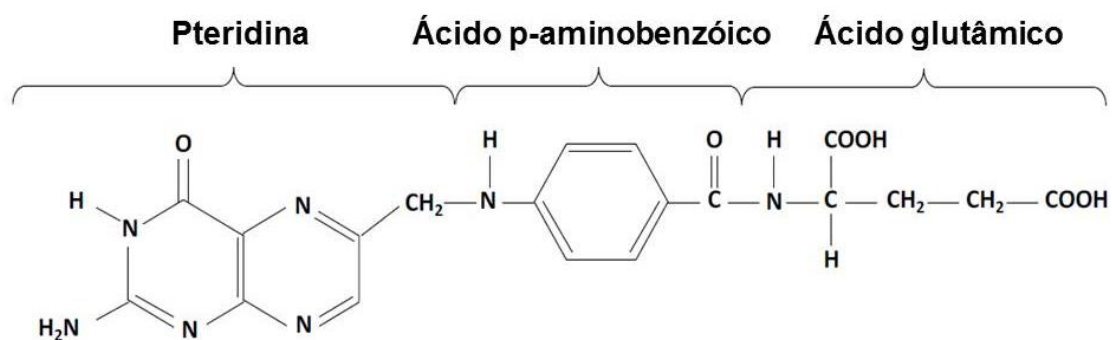
#### **3.1. Vitaminas**

As vitaminas são compostos orgânicos essenciais para manutenção dos processos metabólicos do organismo humano. As vitaminas A, D, E e K são lipossolúveis, enquanto que as vitaminas C, B (B1-tiamina, B2-riboflavina, B3-niacina, B5-pantotênico, B6 e B12), biotina (vitamina H) e folato são hidrossolúveis (LESKOVA et al., 2006, BENDER, 2003). Esses micronutrientes, exceto as vitaminas D e K, não são sintetizados pelo corpo humano e devem ser fornecidos através da dieta. No entanto, as vitaminas presentes nos alimentos são altamente instáveis e suscetíveis a degradação, cuja taxa e extensão depende de: (1) estrutura química do micronutriente, (2) propriedades das matrizes alimentares, (3) condições de processamento e (4) armazenamento/ambiente de distribuição (BALL, 1998; LESKOVA et al., 2006; LOPERA et al., 2009).

Nessa revisão são abordados especificamente o folato/ácido fólico, suas fontes, estabilidade, deficiência e métodos de fortificação em alimentos.

#### **3.2. Folatos e ácido fólico**

Os folatos estão naturalmente presentes nos alimentos em sua forma reduzida como derivados de poliglutamatos, apresentando de 2 a 7 resíduos de L-glutamato unidos ao grupo p-aminobenzoico por ligações peptídicas (FACCO et al., 2007). O ácido fólico, também conhecido como ácido pteroilglutâmico ou vitamina B9, é a forma sintética dos folatos. O ácido fólico, com massa molecular de 441,4 g/mol, é formado por três componentes estruturais, um anel hetero bicíclico de pteridina, um ácido p-aminobenzóico e um resíduo de ácido glutâmico (Figura 1). O ácido fólico forma cristais amarelos e tem uma baixa solubilidade em água e a 25°C é praticamente insolúvel (0,01 mg/mL). A sua solubilidade aumenta em meio alcalino ou ácido, embora tenha sido descrito que é mais estável em meio alcalino (ARAUJO et al., 2011).



**Figura 1.** Estrutura química do ácido fólico. Fonte: Solmaz Alborzi, (2012).

### 3.3. Fontes de folatos

As principais fontes de folatos são os vegetais verdes folhosos, embora eles também possam ser encontrados em cereais e frutas. Os teores de folato nesses alimentos variam entre 20 a 160 µg/100g. Os alimentos de origem animal, em geral, apresentam baixos teores dessa vitamina, exceto o fígado bovino que apresenta altas concentrações, valores entre 700 a 1400 µg/100g (MARTINEZ et al., 2005, LIMA et al., 2004; CATHARINO et al, 2006). A recomendação dietética diária de folato para homens adultos é de 200 µg, mulheres adultas de 180 µg, gestantes de 400 µg e nutrizes de 280 µg (MELO, 2004).

### 3.4. Estabilidade do ácido fólico

A ingestão ideal de folato é influenciada por sua estabilidade durante o processamento dos alimentos. Dessa maneira, o ácido fólico, uma forma sintética da vitamina, é comumente utilizado para a suplementação de folato e fortificação de alimentos, devido a sua maior estabilidade relatada em relação ao folato (MARCHETTI et al., 2014).

Kam, Arcot e Ward (2012) fortificaram arroz parboilizado com ácido fólico e após a cocção de 20 min em temperatura de ebulição, observaram uma retenção de 90% da vitamina. Uma perda semelhante de 10% da vitamina foi observada durante processamento (homogeneização, esterilização e fervura) de leite enriquecido (LIMA-PALLONE; CATHARINO; GODOY, 2006). Achanka, Boeneke e Aryana (2007) observaram que o processo de pasteurização (85°C por 30 min) não proporcionou uma diferença significativa no teor de ácido fólico em iogurtes. Day e Gregory (1983)

relataram que o ácido fólico tem uma retenção de 75-92% após 2 h a 100°C, o que demonstra que o ácido fólico é relativamente estável a tais temperaturas.

Para determinar a temperatura necessária para a degradação do ácido fólico e o seu padrão de degradação, Vora et al. (2002) estudaram a estabilidade térmica do ácido fólico utilizando Calorimetria Diferencial de Varredura, com o auxílio da análise de difração de raios X, espectroscopia de infravermelho e análise por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas para identificar os produtos da degradação. O ácido fólico foi aquecido até 800°C e as alterações na sua composição foram observadas. Os autores relataram que a cerca de 180°C, houve a quebra das ligações do ácido glutâmico e isto foi seguido pela degradação de pteridina e do ácido p-aminobenzóico. A 195°C, as funções amida e ácidos foram totalmente degradadas e a 200 °C a degradação do ácido fólico foi muito expressiva. Jankovi (2009) relatou um padrão semelhante de degradação para o Folnak®, um produto comercialmente disponível contendo ácido fólico.

Segundo Keagy (1985), o ácido fólico apresenta maior estabilidade em condições alcalinas do que em condições ácidas. Arcot e Shrestha (2005) relataram que em solução aquosa, o ácido fólico é estável a 100°C por 10 min em uma faixa de pH de 5-12 e protegido da luz, no entanto, apresenta uma instabilidade crescente em pH inferior a 5. Liang et al. (2013) estudaram a estabilidade do ácido fólico em diferentes condições de pH. Os resultados demonstram que o ácido fólico apresentou uma boa estabilidade no tampão com pH 8,05 ~ 10,40, e a sua retenção atingiu 93,1% em 72 h, enquanto que em pH 1,95 ~ 6,40 houve redução de 23%. Além disso, os autores relataram uma boa estabilidade do ácido fólico em pH 5,39 ~ 10,40, após banho de água a 100°C durante 2 h.

A luz ultravioleta (UV) também pode degradar o ácido fólico. Baugh e Krumdieck (1969) relataram que os folatos são instáveis à luz ocorrendo a clivagem na posição C<sub>9</sub>-N<sub>10</sub> do composto. Liang et al. (2013) investigaram os efeitos de dois tipos de iluminação (luz solar e incubadora de iluminação modelo GZX-250- UVA 1,5 KW) na estabilidade do ácido fólico, a pH 3, 6 e 9 após 0,5 h, 1 h ou 2 h. A iluminação solar causou degradação do ácido fólico que foi reduzido gradualmente ao longo do tempo. Após 2 h, cerca de 63% de ácido fólico foi degradado a pH 3 enquanto cerca de 85% foi degradado a pH 6 e 9. Esses autores reportaram que não houve diferença significativa na estabilidade de ácido fólico após utilização da iluminação artificial durante 2 h.

Off et al. (2005) avaliaram a estabilidade do ácido fólico utilizando uma lâmpada emitindo luz com comprimento de onda na faixa do UVA (1 Mw/cm<sup>2</sup>) por 60 min e observaram a redução de 80% da vitamina. Thomas et al. (2000) relataram a redução de 60% do ácido fólico utilizando uma lâmpada Rayonet RPR (3500 Å) com o tempo de exposição de 22 min. Um estudo realizado por Yakubu e Muazu (2010), foi demonstrado uma redução de 40% do ácido fólico quando exposto a lâmpada UVA por um período de 5 h.

Além da degradação in vitro, a irradiação UV (A e B) pode causar degradação do folato no sangue humano através da penetração na pele. Dos dois tipos de radiação UV recebidos pelos seres humanos, UVA (315-400 nm) que é capaz de penetrar a pele na camada dérmica e, portanto, tem a capacidade de afetar o nível de folato no sangue através de uma via de degradação indireta, enquanto UVB (280-315 nm) não tem a capacidade de penetrar na pele, mas pode diretamente degradar folato (BORRADALE e KIMLIN, 2012). A foto-degradação parece ser mais lenta quando o íon folato está ligado à albumina sérica. Assim, acredita-se que seja necessário uma grande exposição a irradiação UV para induzir a degradação in vivo do ácido fólico (OFF et al., 2005). O fato de que a luz UV ser emitida pelo sol se torna importante para o homem o uso de proteção contra os raios UV (Gazzali et al., 2016).

A presença de oxigênio também pode influenciar na estabilidade do ácido fólico. Uma pesquisa realizada com leites submetidos à esterilização e posteriormente a estocagem apresentou uma taxa de retenção de folatos variável, de 0 a 80%, dependendo da raça e tipo de alimentação do animal, condições do processo, presença de vitamina C e concentração de oxigênio dissolvido durante e após o processamento (DONG e OACE1975). Burton et al. (1970) observaram perdas diferenciadas quanto à forma do processo de esterilização do leite, sendo no processo direto a perda de folatos de 4% e 10% para processo indireto, devido principalmente, segundo os autores, aos níveis de oxigênio. De acordo com Chen e Cooper (1979), o oxigênio tem um efeito sinérgico com tratamentos térmicos na degradação do ácido fólico. Esses autores relataram que o nível de oxigênio tem efeito no grau de degradação do ácido fólico. Thomas et al. (2000) observaram que na presença de oxigênio, o ácido fólico é clivado fotoquimicamente (a 350 nm em temperatura ambiente) produzindo 6-formilpterina e ácido p-aminobenzoilglutâmico. À medida que a fotólise prossegue, a 6-formilpterina forma a 6-carboxipterina.

### 3.5. Deficiência do ácido fólico na dieta

Os folatos participam de reações de metilação do DNA, logo a sua deficiência está relacionada a hipometilação ocasionando danos na estrutura do DNA e nos processos de sua reparação. A diminuição na síntese de DNA, causada pela carência de folatos, leva a anemia megaloblástica. O termo megaloblástico refere-se a uma anormalidade morfológica das hemácias que apresentam tamanho anormal, imaturidade do núcleo e membranas frágeis (HINES, 2002; ROURE, 2010). Essas células mal formadas são capazes de transportar o oxigênio, porém, possuem apenas a metade ou um terço do tempo de sobrevivência comparando a uma célula normal (BAILEY e GREGORY, 1999). Além disso, a deficiência de folato prejudica a síntese de DNA e isso pode ser associado a um risco aumentado de vários tipos de câncer, como câncer colorretal, gastrointestinal e de mama (CROTT et al., 2001, WALS et al., 2007)

O consumo inadequado de folatos durante a gestação está relacionado a desordens na formação do tubo neural (DTN), que são más-formações do sistema nervoso central do embrião. Em geral, essa má formação ocorre entre 21° e 28° dias de gestação, período no qual a maior parte das mulheres não sabem que estão grávidas, por isso a importância do consumo adequado de folatos em mulheres na idade fértil (WANAT et al., 2005; SANTOS e PEREIRA, 2007).

Anormalidades como a anencefalia e espinha bífida ocorrem quando o tubo neural do embrião não se fecha adequadamente. Quando não há o fechamento adequado do tubo neural no extremo superior, o resultado é anencefalia (falha no desenvolvimento do cérebro) que leva à morte. E se estiver incorretamente fechado no extremo inferior resulta em espinha bífida (espinha aberta), com paralisia da parte inferior do corpo e perda do controle das funções intestinais e da bexiga, e pode ocasionar sequelas neurológicas, urológicas e ortopédicas irreversíveis ao recém-nascido (PACHECO et al., 2009). A Organização Mundial da Saúde (OMS) no ano de 2003 publicou o *Atlas Mundial de Defeitos Congênitos*. Entre os 41 países com dados analisados de 1993 a 1998, o Brasil apareceu em quarto lugar entre aqueles com maior prevalência de anencefalia e espinha bífida (Figura 2), apenas atrás do México, Chile e Paraguai.



**Figura 2.** Defeito no tubo neural de recém-nascido (espinha bífida).

Alguns estudos demonstraram que a elevada concentração de homocisteína no plasma pode aumentar o risco de doença cardiovascular e que a manutenção de baixos níveis de homocisteína pode ser importante na prevenção de acidente vascular cerebral em idosos (HAYNES, 2002; LAMBERT, 1999). O ácido fólico é responsável por quebrar homocisteína e convertê-lo em metionina, a deficiência deste micronutriente pode aumentar o nível de homocisteína no plasma e reduzir a síntese de metionina, levando a doenças cardíacas (STAM et al., 2005). Segundo Kim (2007), o aumento da ingestão de ácido fólico através da fortificação de alimentos nos EUA e Canadá propiciou a redução dos níveis plasmáticos de homocisteína.

O folato é importante para a função normal do cérebro através da síntese de ácidos nucleicos e reações de metilação. O fornecimento de cofatores nutricionais para o bom funcionamento do ciclo da metionina pode aumentar as reações de metilação e reduzir o risco de danos cerebrais (MILLER, 2003). Uma vez que o ácido fólico desempenha um papel importante no desenvolvimento do sistema nervoso central, o baixo nível de folato pode estar relacionado com a doença de Alzheimer (SNOWDON et al., 2000). Mattson (2003), em seu estudo utilizando um modelo de rato com doença de Alzheimer, identificou que a suplementação com ácido fólico pode reduzir o dano neuronal ao manter os níveis de homocisteína baixos, o ácido fólico pode proteger os vasos cerebrais e prevenir a acumulação de danos no DNA nos neurônios causados pelo estresse oxidativo e facilitada pela homocisteína.

### **3.6. Fortificação dos alimentos com ácido fólico**

A fortificação corresponde ao acréscimo de vitaminas e minerais em alimentos amplamente consumidos, visando garantir a ingestão diária recomendada do nutriente



pela população (SOEIRO et al., 2008). Tendo em vista a alta incidência de defeitos no tubo neural em recém-nascidos, mais de 50 países possuem legislação para fortificação de farinhas com ácido fólico (CRIDER; BAILEY; BERRY, 2011). No Brasil, a alta incidência de anemia e de doenças causadas pela deficiência de ácido fólico levou o Ministério da Saúde e a ANVISA tornar obrigatória a fortificação das farinhas de trigo e milho. A resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2017) define que farinhas de trigo e de milho vendidas diretamente ao consumidor e as utilizadas como matéria-prima pelas indústrias na fabricação de outros produtos devem ser enriquecidas com ferro e ácido fólico (4,2 mg de ferro e 150 µg de ácido fólico por 100g de farinha), desde junho de 2004. Excluem-se deste regulamento farinha de bijú ou farinha de milho obtida por maceração, farinha de trigo integral e farinha de trigo durum.

Em 13 de abril de 2017, a Anvisa publicou a resolução RDC nº 150, que estipula que as farinhas de trigo e de milho enriquecidas devem conter, até o vencimento do prazo de validade, teor igual ou superior a 140 µg de ácido fólico por 100 g de farinha, tendo como limite máximo de 220 µg de ácido fólico por 100 g de farinha (BRASIL, 2017).

Importantes reduções na prevalência de defeitos do tubo neural após a fortificação de alimentos com ácido fólico também têm sido relatadas em diversos países, com percentuais que variam de 10% a 78% (BLENCOWE et al., 2010, CRIDER et al., 2011, PACHECO et al., 2009). Nos Estados Unidos, a doença diminuiu 36% após a fortificação de cereais com ácido fólico (Centro de controle de prevenção – CDC). Fujimori et al. (2013) realizaram um estudo transversal que analisou prevalência de defeitos do tubo neural, antes e após a fortificação das farinhas de trigo e milho com ácido fólico no Estado de São Paulo, Brasil. Segundo esses autores, a doença diminuiu 35%, de 0,57 para 0,37 por mil nascidos vivos após a fortificação. Segundo López-Camelo (2010), estima-se que 1500 casos de defeitos no tubo neural são prevenidos por ano no Brasil com o programa de fortificação.

### **3.7. Encapsulação do ácido fólico**

A técnica de encapsulação permite a formação de uma barreira física entre o meio externo e o material encapsulado, o que é fundamental para a sua proteção, particularmente contra a umidade, pH, temperatura, luz, oxidação e condições de

processamento. Além disso, a encapsulação também é utilizada para a liberação controlada de moléculas ativas, e para mascarar sabores indesejáveis.

A seleção da técnica de encapsulamento depende da natureza do agente ativo, das características do material de parede, bem como das propriedades da partícula a ser desenvolvida, tais como o seu tamanho e a sua morfologia (AUGUSTIN; SANGUANSRI; HTOON, 2008). A diferença básica entre os métodos de encapsulamento está no tipo de envolvimento ou aprisionamento do material ativo e pelo agente encapsulante, visto que a interação entre o material encapsulante e o agente ativo pode ser de natureza física, química ou físico-química (FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2009).

Entre os métodos físicos de encapsulamento estão o *spray drying*, *spray cooling*, leite fluitizado, extrusão, liofilização, co-cristalização, *electrospraying* e *electrospinning*. Os métodos químicos englobam a inclusão molecular e a polimerização interfacial. Entre os métodos físico-químicos estão a coacervação ou separação de fases, emulsificação seguida de evaporação do solvente, pulverização em agente formador de reticulação e envolvimento lipossômico.

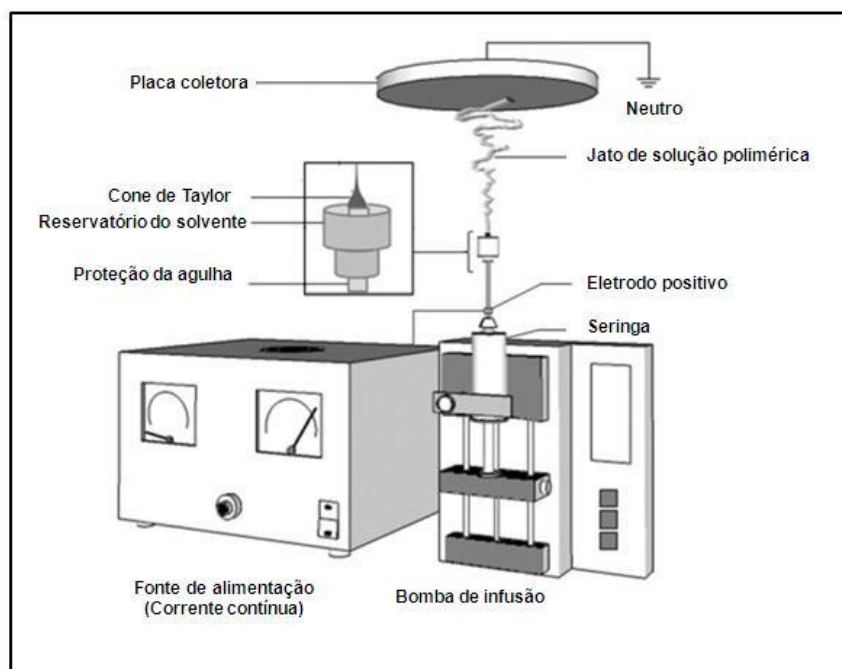
Considerando a importância do ácido fólico para a saúde humana e sua vulnerabilidade a agentes externos bem como os riscos associados à sua ingestão excessiva, o encapsulamento dessa vitamina vem sendo estudado visando reduzir a sua degradação e melhorar a sua biodisponibilidade. O ácido fólico tem sido microencapsulado utilizando amido, alginato e/ou pectinas como material encapsulante através da técnica *spray drying* (LIU et al., 2012; MADZIVA; KAILASAPATHY; PHILLIPS, 2006; SHRESTHA; ARCOT; YULIANI, 2012). Esses autores relataram que a microencapsulação resulta em melhor estabilidade da vitamina durante o processamento, utilizando diferentes matrizes de alimentares. Ariyaratna e Karunaratne (2015) também reportaram que houve proteção do ácido fólico frente a luz e calor utilizando proteína de grão de bico como agente encapsulante quando utilizado o método de interação eletrostática como encapsulação.

Ahmad et al. (2017) utilizaram  $\beta$ -ciclodextrina pela técnica de *spray drying* para encapsular o ácido fólico. Esses autores relataram que as microcápsulas formadas protegeram a vitamina das condições ácidas do estômago e tiveram boa liberação na parte inferior do trato gastrointestinal. Alborzi et al. (2013) também relataram proteção do ácido fólico em condições ácidas quando o mesmo foi incorporado em nanofibras de alginato de sódio, pectina e poli (óxido de etileno) produzidas pela técnica de

*electrospinning*. Um estudo realizado com animais administrando nano partículas de caseína com ácido fólico e a solução aquosa da vitamina demonstrou um aumento da biodisponibilidade oral em 52% quando a vitamina foi administrada na forma encapsulada (PENALVA et al., 2015).

### 3.8. Encapsulação por *electrospinning* e *electrospraying*

Os métodos de encapsulamento de interesse para este estudo são o *electrospinning* e o *electrospraying*. Ambos são processos eletrodinâmicos em que a solução do polímero pode ser girada ou pulverizada pela aplicação de campo elétrico para obter fibras ou partículas, respectivamente.

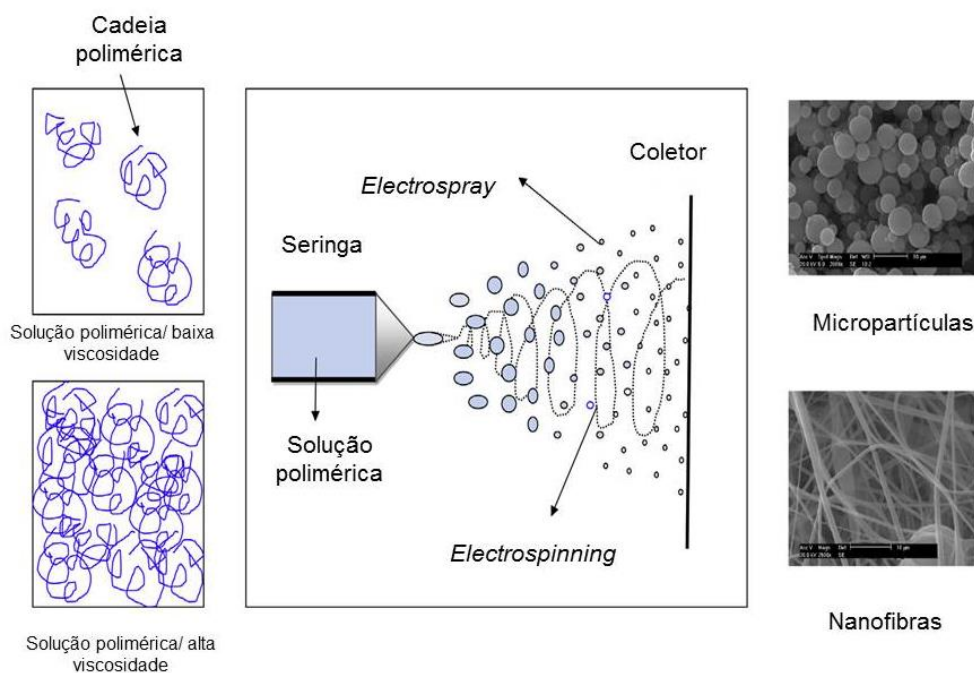


**Figura 3.** Modelo de uma estação de *electrospinning/electrospraying* para a formação de fibras ultrafinas e cápsulas.

A configuração característica do *electrospinning* e *electrospraying* consiste em quatro componentes principais: (1) uma fonte de alta tensão (1-30 kV), (2) uma bomba de infusão de seringa que controla a taxa do fluxo da solução polimérica constante, (3) uma agulha ou capilar de aço inoxidável, (4) um coletor aterrado, quer uma placa fixa ou um tambor rotativo (Figura 3).

O *electrospinning* e *electrospraying* são técnicas semelhantes e poucos aspectos discernem os dois processos (Figura 4). No processo de *electrospinning* a o

jato que sai do capilar possui a forma de um fio e realiza um movimento do tipo chicote até chegar a placa coletora. O solvente é então evaporado durante o trajeto, resultando na deposição de um fio nanométrico sólido (nanofibras ou fibras ultrafinas) sob o anteparo aterrado (JAWOREK e SOBCZYK, 2008). Já no *electrospraying* a utilização de uma solução polimérica de baixa concentração, faz com que haja a formação gotículas. Estas gotas altamente carregadas são auto-dispersivas no espaço e com a evaporação do solvente leva à solidificação resultando em nanocápsulas ou cápsulas, depositadas no coletor (BOCK; DARGAVILLE; WOODRUFF, 2012). Ambos métodos podem ser utilizados para produzir encapsulados com propriedades funcionais, pois permitem o aprisionamento de diferentes compostos e possuem a vantagem de baixo custo (RENEKER e CHUN, 1996; SHEN et al., 2011).



**Figura 4.** Esquema de um processo básico de *electrospinning* (formação de jato) e *electrospraying* (atomização de gotas líquidas). Fonte: Ghorani e Tucker (2015)

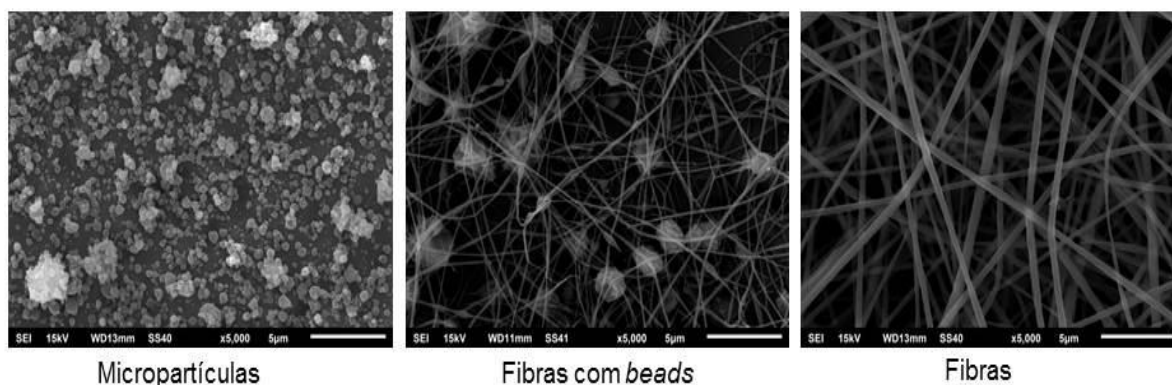
Os principais fatores que influenciam nas estruturas formadas pelas técnicas de *electrospinning* e *electrospraying* são as propriedades da solução polimérica (viscosidade, condutividade e tensão superficial), parâmetros do processo (tensão elétrica, taxa de fluxo e distância ao coletor) e as condições ambientais (umidade relativa e temperatura) (ACEITUNO-MEDINA et al., 2015; CHAKRABORT et al., 2009). Dessa maneira, é possível produzir materiais com diferentes morfologias variando

estes parâmetros (DEITZEL et al., 2001; HEIKKILA e HARLIN, 2008; TEHRANI et al., 2010 ).

### 3.8.1. Parâmetros da solução polimérica

#### 3.8.1.1. Concentração do polímero e viscosidade da solução

A concentração do polímero está diretamente relacionada a viscosidade da solução desempenhando assim um papel importante na morfologia do material (DEITZEL et al., 2001). O estiramento do jato é afetado pela alteração da concentração da solução polimérica. Quando a concentração da solução polimérica é baixa, o campo elétrico aplicado e a tensão superficial fazem com que as cadeias do polímero se quebrem em fragmentos antes de atingir o coletor (HAIDER et al., 2013;PILLAY et al., 2013). Estes fragmentos provocam a formação de partículas ou nanofibras com gotas (tambem chamadas de *beads*).O aumento da concentração da solução polimérica proporcionará uma maior viscosidade fazendo com que o material supere a tensão superficial, resultando assim em fibras contínuas e uniformes (Figura 5). Entretanto, o aumento da concentração proporcionando uma viscosidade muito elevada dificulta o fluxo da solução através da agulha, a solução de polímero seca na ponta da agulha metálica e bloqueia-a, resultando em nanofibras defeituosas (HAIDER et al., 2013).



**Figura 5.** Diferenças morfológicas do material produzido utilizando as técnicas de *electrospraying/electrospinning* com variações na concentração da solução polimérica. Fonte: Arquivo pessoal.

Zong et al. (2012) ao produzir fibras utilizando poli (D,L-láctico) (PDLA) e poli (L-láctico) (PLLA), observaram a formação de *beads* com mudanças de viscosidade.O

efeito da concentração/viscosidade na morfologia das nanofibras foi relatado por Doshi e Reneker (1995) utilizando PEO; os autores concluíram que a viscosidade ótima para a produção de nanofibras é de 800-4000 cp.

Além da concentração do polímero, o peso molecular também pode ter efeito sobre as propriedades reológicas e elétricas do processo de *electrospinning* e *electrospraying* (HAGHI e AKBARI, 2007). Gupta et al. (2005) ao estudar o efeito do peso molecular do polimetil-metacrilato, com variação entre 12,47 a 365,7 kDa, sobre a formação de fibras por *electrospinning* observaram. Esses autores relataram que o aumento do peso molecular foi favorável a formação de fibras e pesos moleculares menores levou a formação de partículas esféricas.

### **3.8.1.2. Condutividade**

A condutividade da solução polimérica não só afeta a formação do cone de Taylor como também ajuda a controlar o diâmetro das nanofibras e nanopartículas. O processo de *electrospinning/electrospraying* depende da força entre as cargas presente na superfície do fluido e da força devido ao campo elétrico externo. Se a solução polimérica não tem cargas suficientes para se mover até a superfície do fluido, a força eletrostática gerada pelo campo elétrico não será capaz de iniciar o processo (Sun et al., 2014). A condutividade da solução, em geral, pode ser controlada pela adição de um sal apropriado. A adição do sal faz com que os íons tenham uma maior mobilidade em solução, assim com a aplicação de um campo elétrico, estas cargas se orientam permitindo que a gota sofra um maior alongamento, resultando em segmentos menos espessos e numa diminuição no diâmetro do material. Zong et al. (2012) avaliaram o efeito de diferentes sais ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{NaCl}$  em 1%;p/v) no diâmetro de fibras preparadas com poli (D, ácido L- lático). Esses autores relataram que após a adição dos sais à solução do polímero, as fibras formadas foram mais lisas e com menor diâmetro em comparação com as fibras sem adição dos sais.

### **3.8.1.3. Solvente**

Durante o processo de *electrospinning/electrospraying*, o solvente tem como objetivo solubilizar as moléculas de polímero para permitir a formação do jato e transportar as moléculas dissolvidas até o coletor (OHKAWA et al., 2004). A escolha do solvente adequado está relacionada com a formação das nanofibras ou

nanopartículas uniformes. Além da solubilização completa do polímero, o ponto de ebulição do solvente deve ser considerado, pois esse está diretamente relacionado com a sua volatilidade. Solventes com alta volatilidade devem ser evitados, pois a alta taxa de evaporação pode causar a secagem da solução na ponta da agulha e bloquear o processo. No entanto, solventes com alto ponto de ebulição também devem ser evitados porque dificultam a secagem do jato, havendo assim, a deposição de material úmido no coletor (LANNUTTI et al., 2007; SILL e RECUM, 2008). Estudos que utilizaram diferentes polímeros e seus respectivos solventes no processo de *electrospinning* estão mostrados na Tabela 1. Além disso, também estão apresentados os valores de diâmetro médio das fibras e suas aplicações.

**Tabela 1.** Diferentes polímeros e seus respectivos solventes utilizados na produção de fibras utilizando o processo de *electrospinning*.

Polímeros	Solventes	Diâmetro das fibras (nm)	Aplicações	Referências
Fibroína de seda/PEO	Água	590 ± 60*	Engenharia de tecidos ósseos	Li et al. (2006b)
Gelatina	Ácido acético/fórmico	109 a 761	Engenharia de tecidos	Songchotikunpan et al. (2008)
Colágeno tipo I	HFP <sup>a</sup>	100 a 600	Ciência e engenharia de materiais	Yang et al. (2008)
Colágeno tipo II	HFP	496	Engenharia de cartilagem	Shields et al. (2004)
Gelatina/Álcool polivinílico	Ácido fórmico	133 a 447	Liberação controlada de drogas	Yang et al. (2007)
Quitosana	Ácido acético	130	Aplicações biomédicas	Geng et al. (2005)
Álcool polivinílico	Água	250 a 300	Entrega de drogas	Zeng et al. (2005)
Chitosana/Álcool polivinílico	Ácido fórmico, TFA <sup>b</sup> , HCL	330	Engenharia de tecidos	Ohkawa et al. (2004a)
Acetato de celulose	Acetona, DMF <sup>c</sup> , trifluoroetano	200 a 1000	Filtração	Ma et al. (2005b)
Ácido hialurônico/gelatina	DMF/água	190 a 500	Engenharia de tecidos	Li et al. (2006a)
Fibrogenio	HFP	80 ± 30*	Reparação de feridas	Wnek et al. (2003)
Poliamida-6	m-cresol, Ácido fórmico	98,3 ± 8,2*	Aplicações biomédicas	Mit-uppatham et al. (2004)
Poliuretano	Água	100 a 500	Engenharia de tecidos	Pedicini eFarris (2003)
Policaprolactona	DMF + Cloridrato de metileno	200	Cicatrização de feridas	Lee et al. (2003b)
Colágeno/quitosana	HFP/TFA	300 a 500	Engenharia de tecidos	Chen et al., 2007
Quitina	HFP	163	Cicatrização de feridas	Noh et al. (2006)
Policaprolactona/Gelatina	TFE <sup>d</sup>	470 ± 120*	Cicatrização de feridas	Chong et al. (2007)
Polianilina	HFP	61 ± 13*	Engenharia de tecidos	Li et al. (2006c)

<sup>a</sup>Hexafluoroisopropanol, <sup>b</sup>Ácido trifluoroacético, <sup>c</sup>Dimetilformamida, <sup>d</sup>Trifluoroetileno, \*± desvio padrão.Fonte: Bhardwaj eKundu (2010).



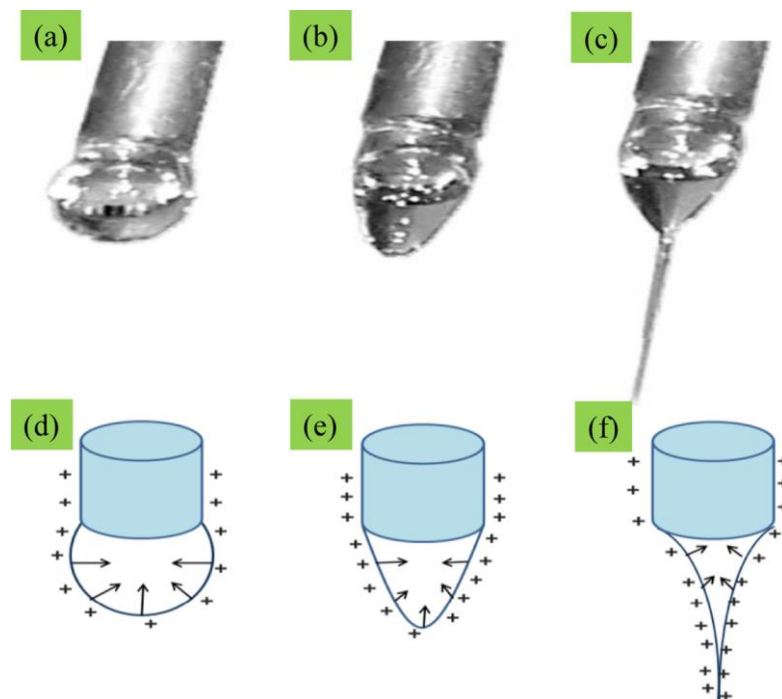
### **3.8.2. Parâmetros do processo**

#### **3.8.2.1. Tensão superficial**

A tensão superficial surge como resultado do desequilíbrio entre as forças que atuam sobre as moléculas da superfície em relação àquelas que se encontram no interior da solução (BEHRING; LUCAS; BARCELLOS, 2004). Os solventes utilizados para o preparo das soluções poliméricas contribuem com diferentes tensões superficiais. Em geral, uma tensão superficial elevada inibe o processo de *electrospinning*, devido à instabilidade do jato e favorece a geração de gotículas pulverizadas (*electrospraying*) (HOHMAN et al., 2001). De acordo com Fong, Chun e Reneker (1999), a formação das fibras com defeitos em forma de *beads* é devido a uma instabilidade capilar do jato, atribuído ao desequilíbrio causado pelas flutuações na forma e densidade de cargas elétricas do jato. Segundo os mesmos autores, a redução da tensão superficial, leva a uma tendência ao rompimento do jato, o que causa a formação das contas.

#### **3.8.2.2. Tensão elétrica**

A tensão aplicada no processo de *electrospraying/electrospinning* é responsável pela formação de um campo elétrico entre a saída da solução polimérica (ponta da agulha) e o coletor (Figura 6). Dessa forma, a tensão e o campo elétrico formado atuam sobre o alongamento e carregamento do jato do polímero, e conseqüentemente têm influência sobre a morfologia e diâmetro do material formado (MEGELSKI et al., 2002). Arya et al. (2007) avaliaram a morfologia de partículas de quitosana variando a tensão elétrica entre 22 e 34 kV. Esses autores relataram que as partículas formadas utilizando a tensão de 28 kv apresentaram morfologia uniforme, enquanto que nas outras tensões avaliadas houve a formação de partículas irregulares e aglomeradas.



**Figura 6.** Imagens digitais (a-c) apresentam a deformação de três estágios da gota sob a influência do aumento do campo elétrico. (d-f) Desenho ilustrativo do mecanismo do efeito das cargas nas gotículas poliméricas. Fonte: Laudenslager e Sigmund (2012).

Huang et al. (2008) relataram a formação de partículas menores quando uma tensão elétrica maior é aplicada. O mesmo acontece com o diâmetro das nanofibras, pois o aumento na tensão elétrica leva ao alongamento das gotículas, devido a maior carga agindo sobre as mesmas. No entanto, se a tensão elétrica exceder o valor crítico (tensão necessária para a formação de fibras uniformes), haverá formação de fibras desuniformes com maior diâmetro e ocorre a presença de gotas (*beads*) (SILL e RECUM, 2008).

### 3.8.2.3. Taxa de alimentação

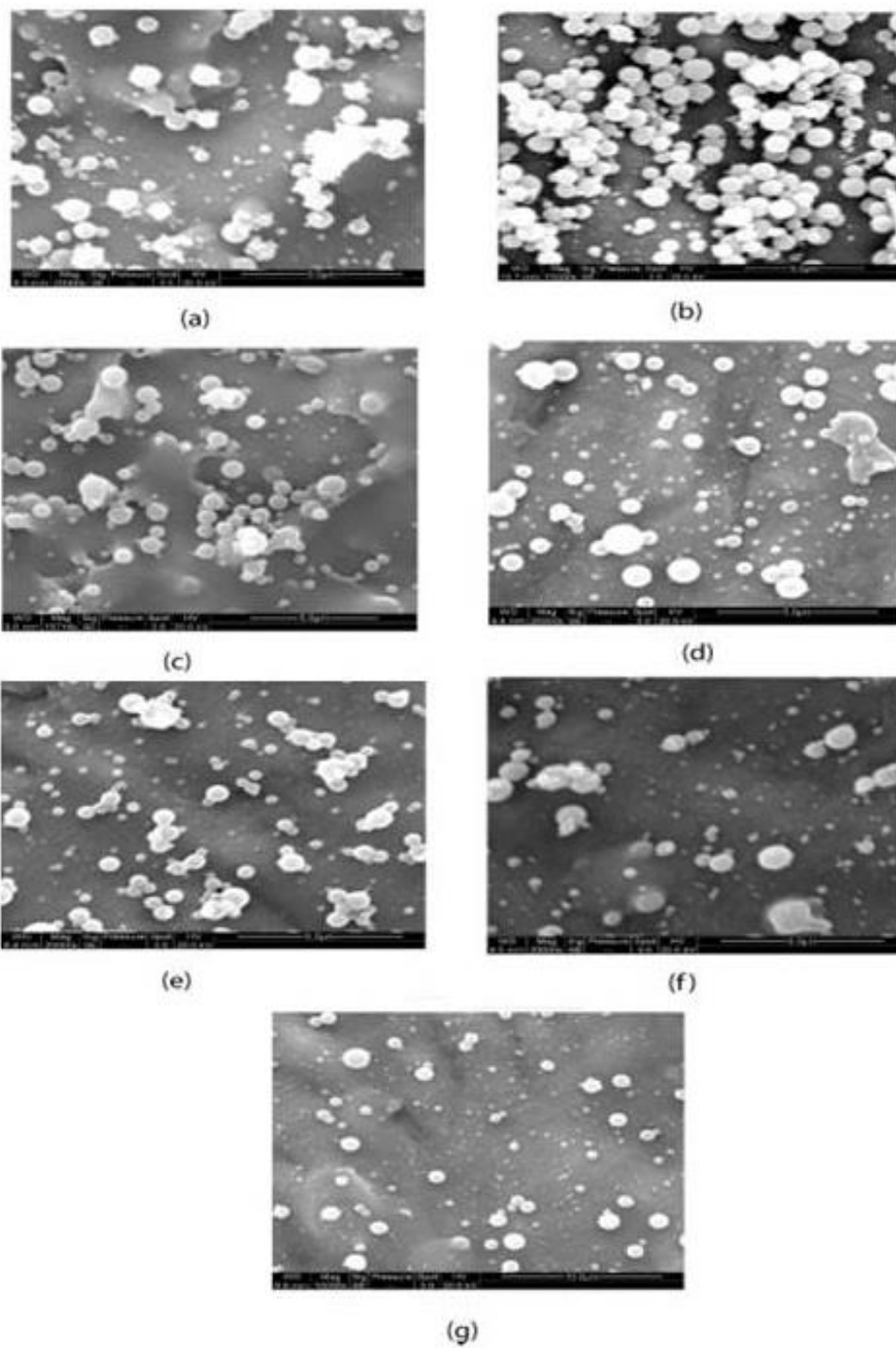
O fluxo da solução polimérica é controlado através da taxa de alimentação estabelecida na bomba de infusão. A taxa de alimentação para a formação de partículas ou fibras é determinada conforme as características da solução polimérica utilizada no sistema, pois é essencial que a vazão aplicada permita a completa evaporação do solvente. Em geral, um fluxo muito intenso dificulta a remoção do solvente do sistema, o que leva a formação de partículas com tamanhos desuniformes

e fibras espessas com a presença de *beads* (YUAN et al., 2004). Megelski et al. (2002) analisaram a formação de nanofibras de poliestireno e relataram que com o fluxo de 0,10 mL/min houve formação de nanofibras com gotas, enquanto empregando a taxa de 0,07 mL/min, as fibras foram uniformes. Além disso, o aumento dos poros nas fibras obtidas com altas taxas de fluxo, provavelmente relacionadas aos maiores diâmetros das fibra (YUAN et al., 2004). O tamanho médio das partículas aumenta com o aumento da taxa de fluxo que a solução polimérica é submetida (Park et al., 2009).

#### **3.8.2.4. Distância da agulha ao coletor**

A distância entre a ponta da agulha e o coletor metálico desempenha um papel essencial na determinação da morfologia das partículas e fibras formadas por *electrospraying/electrospinning*. Essa distância deve ter um valor mínimo para garantir a total evaporação do solvente e um valor máximo para que o campo elétrico seja efetivo na estabilização do cone de Taylor (GHORANI e TUCKER, 2015).

Estudos relatam que uma maior distância entre a ponta da agulha e o coletor favorecem a formação de fibras com menor diâmetro, pois resulta em maior estiramento da solução polimérica e maior tempo para evaporação do solvente (MATABOLA e MOUTLOALI, 2013; WANG e KUMAR, 2006; AHN et al., 2006; YUAN et al., 2004). Arya et al. (2007) estudaram o efeito da distância entre a agulha e o coletor (faixa de 6 a 12 cm) sobre a morfologia e o tamanho de micro/nanopartículas de quitosana (Figura 7). Os autores relataram que a distância de 6 cm levou a deposição de partículas molhadas com tamanho médio de 455 nm, enquanto que a distância de 7 cm houve uma deposição significativa do material e as partículas apresentaram forma esférica e tamanho médio de 855 nm (Figura 7 a-b). No entanto, quando a distância foi de 8, 9, 10, 11 e 12 cm, a deposição das partículas foi menor e foi observado alta dispersibilidade (Figura 7 c-d-e-f-g).



**Figura 7.** Efeito da distância da ponta da agulha ao coletor sobre a morfologia de cápsulas produzidas por *electrospraying*: (a) 6 cm; (b) 7 cm; (c) 8 cm; (d) 9 cm; (e) 10 cm; (f) 11 cm; (g) 12 cm. Fonte: Arya et al. (2007).

### 3.8.3. Parâmetros ambientais

Além dos parâmetros da solução e do processamento, os fatores ambientais tais como a umidade relativa e temperatura também influenciam a formação de nanofibras e nanopartículas (HUAN et al., 2015; PELIPENKO et al., 2013). Quando a umidade relativa é muito baixa, os solventes voláteis tendem a secar rapidamente e ocorrer a obstrução no orifício de saída da solução polimérica, devido à secagem e aglomeração de polímero. No entanto, com a umidade relativa do ambiente elevada, pode haver a evaporação incompleta dos solventes, levando a deposição de material úmido na placa coletora e no caso das nanofibras a formação de *beads* (BAUMGARTEN, 1971, HUAN et al., 2015).

A temperatura está relacionada com a taxa de evaporação do solvente e a viscosidade da solução polimérica. A redução no diâmetro de nanofibras com o aumento da temperatura do ambiente foi observada por Mit-Uppatham et al. (2004), utilizando poliamida-6. Resultado semelhante foi relatado por Vrieze et al. (2009), utilizando acetato de celulose (CA) e poli (vinilpirrolidona) (PVP). Os autores atribuíram a redução do diâmetro dessas fibras à diminuição da viscosidade das soluções poliméricas e à alta temperatura, uma vez que existe uma relação inversa entre viscosidade e temperatura.

### 3.9. Zeína

A zeína é a principal proteína de armazenamento do milho e consiste em uma mistura de polipeptídeos que podem ser identificados por eletroforese em gel de poliacrilamida em 6 frações, divididas em classes:  $\delta$ -zeína (10 kDa),  $\beta$ -zeína (16 kDa e 14 kDa),  $\alpha$ -zeína (19 kDa e 22 kDa) e  $\gamma$ -zeína (27 kDa) (MOMANY, 2006; PRASANNA, 2001; SHUKLA; CHERYAN, 2001). Em relação à composição de aminoácidos, existe a predominância de grupos apolares – 75% (prolina, isoleucina, alanina, fenilalanina, metionina, valina, leucina) e em menor proporção – 25% os aminoácidos polares (treonina, cisteína, tirosina, asparagina, histidina, ácido glutâmico, arginina, glutamina, glicina). A zeína é insolúvel em água, acetona e álcoois anidros, porém solúvel em álcoois (60, 70 e 80%), éter etílico, solução alcalina (pH 11 ou superior) e glicóis (PRASANNA, 2001).

Pesquisas sobre encapsulação de compostos bioativos utilizando nanofibras de zeínas produzidas pela técnica de *electrospinning* reportaram o aumento da

estabilidade e a biodisponibilidade de compostos como ácido gálico (Neo et al., 2013),  $\beta$ -caroteno (Fernandez, Torres-Giner, e Lagaron, 2009), curcumina (Brahatheeswaran et al., 2012),  $\alpha$ -tocoferol (Saowakon Wongsasulak; Pathumban; Yoovidhya, 2014), ácido ferúlico (Yang et al., 2013), tanino (Oliveira et al., 2014). Torres-Giner et al. (2010) produziram cápsulas de zeína por processo de *electrospraying* com o ácido docosa-hexaenoico (DHA- Ômega 3) e reportaram o retardo das reações de oxidação e aumento da estabilidade química do DHA. Peñalva et al. (2015) avaliaram nanopartículas de zeína, obtidas pelo técnica de spray dryer, para administração oral de ácido fólico em ratos Wistar. Os resultados demonstraram que a encapsulamento da vitamina em nanopartículas de zeína melhorou sua biodisponibilidade cerca de duas vezes quando comparada com administração da solução aquosa de ácido fólico.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material

O ácido fólico e a zeína utilizados foram da marca Sigma-Aldrich. Os demais reagentes foram de grau analítico.

### 4.2. Delineamento experimental

A Tabela 2 apresenta o delineamento experimental utilizado para obtenção e caracterização de fibras ultrafinas e cápsulas de zeína produzidas por *electrospinning* e *electrospraying*, respectivamente, incorporadas de ácido fólico.

**Tabela 2.** Delineamento experimental para obtenção e caracterização de fibras e cápsulas de zeína incorporadas com ácido fólico

Tratamentos	Variáveis independentes			Variáveis dependentes
	<i>Electrospinning</i> ou <i>Electrospraying</i>	Zeína (%)	Ácido fólico (%)	
1		30	0,0	Caracterização das soluções poliméricas
2	Fibras	30	0,5	Morfologia e diâmetro
3		30	1,0	Grupos funcionais
4		30	1,5	Decomposição térmica
5		9	0,0	Eficiência de encapsulação
6	Cápsulas	9	0,5	Estabilidade térmica
7		9	1,0	Fotodegradação
8		9	1,5	

### 4.3. Preparo das soluções poliméricas

Foram realizados testes com soluções poliméricas de zeína nas concentrações entre 2% e 30% para verificar qual era mais adequada para formação de cápsulas e fibras ultrafinas. Definiu-se as concentrações de 30% de zeína para o preparo das fibras e 9% para as cápsulas (p/v). As soluções foram preparadas com dissolução do polímero em etanol 70% (v/v) e carbonato de sódio 0,01M sob agitação magnética

durante 2 h. As soluções de zeína com ácido fólico foram preparadas nas mesmas condições anteriores, porém com acréscimo do ácido fólico nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5% (p/v), conforme mostrado na Tabela 2.

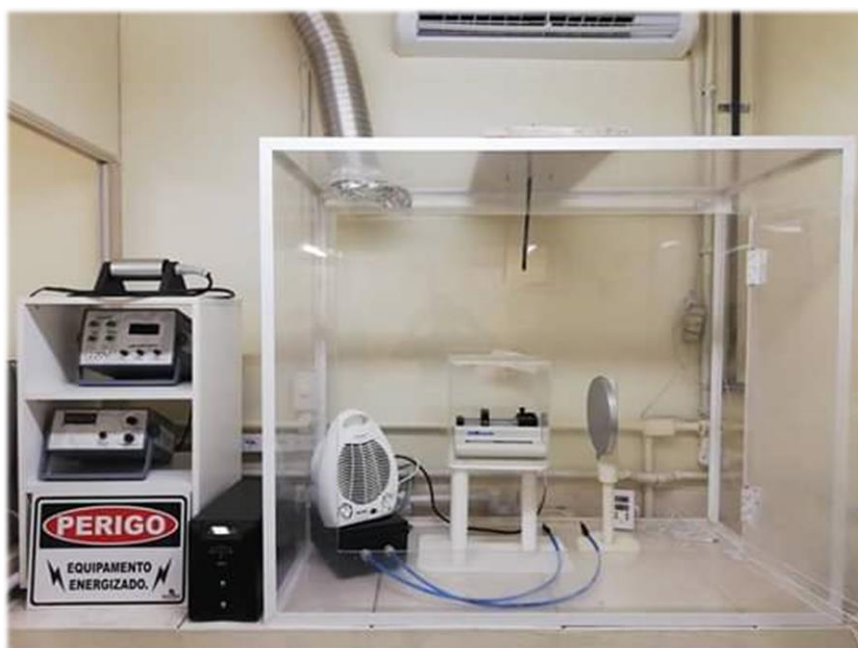
#### **4.4. Caracterização das soluções poliméricas**

As soluções poliméricas foram caracterizadas quanto à viscosidade aparente e condutividade elétrica segundo Perez-Maziá et al. (2015). A viscosidade aparente foi determinada em viscosímetro digital Brookfield com spindle nº18 (Model DV – II, USA). A condutividade elétrica foi avaliada através de um condutímetro (Tecnopom modelo – mCA-150P, expresso em  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). Aproximadamente 20 mL de amostra foram necessárias para cada análise, sendo todas realizadas em triplicata e em temperatura ambiente ( $\pm 23^\circ\text{C}$ ).

#### **4.5. Produção de fibras ultrafinas/cápsulas por *electrospinning/electrospraying***

O equipamento, localizado dentro de uma câmara fechada, constituído de uma fonte de alta tensão (-30/+30 kV, Instor, Inglaterra), uma bomba de infusão (kdScientific, Modelo 200, Inglaterra) e um coletor fixo, montado na horizontal, foi utilizado para elaboração das fibras ultrafinas e cápsulas (Figura 8). Cada solução polimérica, individualmente, foi colocada em uma seringa de 1 mL com orifício de saída de aço inoxidável com diâmetro de 0,7 mm. Para a produção de fibras e cápsulas a partir de testes preliminares definiu-se a taxa de alimentação para o processo de 1 mL/h e 0,6 mL/h, respectivamente. O processo de *electrospinning/electrospray* foi realizado através da utilização dois eletrodos, conectados a uma fonte de alta tensão com corrente contínua, com uma tensão elétrica de +16kV e -2,8kV para formação de fibras ultrafinas e 16kV E -8kV para elaboração de cápsulas. O eletrodo positivo foi acoplado diretamente na ponta do orifício metálico na saída da seringa e o eletrodo negativo conectado a um alvo metálico coberto com folha de alumínio, posicionado no sentido horizontal à bomba de infusão a uma distância de 16cm (fibras) e 10cm (cápsulas) da ponta da agulha até o alvo coletor, para a deposição do material. No decorrer do processo, a temperatura ambiente foi controlada a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $45 \pm 2\%$ .





**Figura 8.** Fotografia da estação de *electrospinning/electrospraying* utilizada neste estudo.

## **4.6. Caracterização das fibras ultrafinas e cápsulas**

### **4.6.1. Morfologia e diâmetro**

A morfologia das fibras ultrafinas e cápsulas foram avaliadas segundo Peñalva et al., (2015), com modificações. Foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (Jeol, JSM-6610LV, USA). Uma pequena porção do material foi fixado em *stubs* com auxílio de uma fita dupla face e cobertos com ouro utilizando um metalizador (Sputtering, Deston Vacuum Deskv, USA). As imagens foram feitas sob tensão de aceleração igual a 10 kV e amplitudes de 1000 e 10000 vezes para as fibras ultrafinas e 5000 e 30000 vezes para as cápsulas. O diâmetro médio foi obtido a partir das imagens do MEV, utilizando o programa computacional *ImageJ*, através da medida do diâmetro de 50 fibras/cápsulas.

### **4.6.2. Grupos funcionais**

Os grupos funcionais e as interações do ácido fólico não encapsulado e encapsulado na forma de fibras ultrafinas e cápsulas de zeína foram avaliados segundo Aceituno-Medina et al. (2015), com modificações. Utilizou-se um

espectrômetro na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (Shimadzu, IRAffinity, Japão), com acessório ATR (Refletância Total Atenuada). Varreduras na faixa espectral de 800 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  foram realizadas e recolhidas 32 leituras a uma resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$ . Os sinais foram processados utilizando o software GRAMS (Galactic Industries Corp., Salem, NH, EUA).

#### **4.6.3. Propriedades térmicas por análise termogravimétrica (TGA)**

A decomposição térmica do ácido fólico não encapsulado e encapsulado na forma de fibras ultrafinas e cápsulas de zeína foi avaliada através de um analisador termogravimétrico (TGA, TA-60WS, Shimadzu, Kyoto, Japão) conforme Arytarathna e Karunaratne (2015), com modificações. As amostras (aproximadamente 5 mg) foram aquecidas em cadinho de platina em uma faixa de 30 a 600  $^{\circ}\text{C}$ , com taxa de aquecimento de 10  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  e um fluxo de nitrogênio de 50  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Um cadinho de platina vazio foi utilizado como referência.

#### **4.6.4. Eficiência de encapsulamento**

A eficiência de encapsulamento foi determinada segundo Perez-Maziá et al. (2015), com modificações. Para avaliar a eficiência de encapsulamento do ácido fólico nas fibras ultrafinas e cápsulas de zeína, foi identificado o total de ácido fólico presente no material e o conteúdo de ácido fólico encapsulado. Para determinar o total de ácido fólico presente na amostra foi adicionado etanol 70% e hidróxido de sódio, homogeneizado em vórtex por 2 min e para completa solubilização foi utilizado um banho ultrassônico por 5 min. O material foi centrifugado por 5 min a 2935 x g e filtrado (nylon 0,22 $\mu\text{m}$ ). Para determinar o conteúdo de ácido fólico encapsulado, primeiramente foi realizada uma lavagem com água ultrapura para remoção do ácido fólico que não havia sido encapsulado e após foi realizado o rompimento do material conforme descrito acima. Esses materiais foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE; Shimadzu, Japão) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de vóo (EM-QTV) Maxis Impact, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Para a separação cromatográfica foi utilizada a coluna Diol - 75 x 2 mm (MicroSolv Technology Corporation, Leland, NC, USA). As fases móveis foram: água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (eluente A) e acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico (eluente B). O fluxo foi de 0,2  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e a

temperatura da coluna foi mantida a 40°C. O espectrômetro de massas foi operado no modo ESI positivo, com espectros adquiridos ao longo de uma faixa de massa de  $m/z$  50 a 1200. Os parâmetros de aquisição foram: tensão elétrica do capilar em 4 kV, pressão do gás de nebulização ( $N_2$ ) de 2 bar, gás de secagem em 8 L.min<sup>-1</sup>, temperatura da fonte de 180°C, colisão de RF de 150 Vpp ; transfer 70 mS e armazenamento pré-pulso de 5 mS. O equipamento foi calibrado com formiato de sódio 10mM, cobrindo toda a faixa de aquisição (de  $m/z$  50 até 1200). Além disso, experimentos automáticos de MS/MS foram realizadas ajustando os valores de energia de colisão como se segue :  $m/z$  100 , 15 eV ;  $m/z$  500 , 35 eV ;  $m/z$  1000, 50 eV , e usando nitrogênio como gás de colisão. A eficiência de encapsulamento (%(E)) foi calculada conforme a Equação 1.

$$\% (E) = \frac{\text{Conteúdo de ácido fólico encapsulado}}{\text{Conteúdo de ácido fólico total}} \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

#### 4.6.5. Estabilidade térmica e a irradiação UVA

A estabilidade térmica e a irradiação UVA foram determinadas de acordo com determinada segundo Perez-Maziá et al. (2015), com modificações. A estabilidade do ácido fólico não encapsulado e encapsulado na forma de fibras ultrafinas e cápsulas nas concentrações de 0,5%,1,0% e 1,5% foi avaliada nas temperaturas de 100°C, 140°C e 180°C durante 45 min ou sob exposição a luz UVA ( $\lambda$  365) durante 1 h, 12 h e 24 h. Após a exposição ao aquecimento ou irradiação, amostras de 10 mg contendo 0,5, 1,0 ou 1,5% (p / p) de fibras ou cápsulas, foram diluídas em 5, 10 ou 15 mL de etanol (70%; v / v), respectivamente, e homogeneizado em um vortex por 2 min. Para solubilização completa, as amostras foram ultrassonidas durante 5 min. O material foi centrifugado por 5 min a 2395 × g e filtrado com membrana de nylon (0,22  $\mu$ m). A amostra de 10 mg de ácido fólico não encapsulado foi diluída primeiro em 10 mL de etanol (70%; v / v) e uma alíquota desta solução foi diluída a 125 × para calibração. O ácido fólico foi analisado por Cromatografia Líquida - Espectrometria de Massas (LC-MS), conforme descrito no item 4.5.4. As quantidades de ácido fólico encapsulado foram expressas em  $\mu$ g / mg de fibras ou cápsulas e o ácido fólico não encapsulado em  $\mu$ g / mL de etanol.

Os produtos de degradação do ácido fólico não encapsulado, expostos a 180 ° C ou 24 h de irradiação UVA, foram avaliados por LC-MS. Os dados de MS foram analisados usando o software Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). A identificação foi realizada comparando os valores precisos de m/z e os padrões de fragmentação MSn com dados de bancos de dados (METLIN, KEGG compostos, PubChem, Mass Bank, Maven, FooDB e ReSpect) e literatura de referência com uma janela de precisão de massa de 5 ppm.

#### **4.7. Análise estatística**

Os dados médios de condutividade elétrica e viscosidade para diferentes concentrações de solução de zeína com ácido fólico (0, 0,5, 1,0 e 1,5%; p/p) e médias dos dados para eficiência de encapsulação, estabilidade térmica, irradiação do encapsulamento e porcentagem de ácido foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de significância por análise de variância (ANOVA).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização das soluções poliméricas

#### 5.1.2. Viscosidade aparente e condutividade elétrica das soluções poliméricas

A condutividade elétrica e a viscosidade aparente das soluções de zeína com diferentes concentrações de ácido fólico estão apresentadas na Tabela 3. A condutividade elétrica da solução é influenciada pelo tipo e concentração do polímero, solvente e pela disponibilidade de compostos ionizáveis (BHARDWAJ e KUNDU, 2010). Os valores de condutividade elétrica das soluções com 30% de zeína foram maiores que das soluções com 9% (p/v) do polímero (Tabela 3).

**Tabela 3.** Viscosidade aparente e condutividade elétrica das soluções de zeína 30% e 9% com diferentes concentrações de ácido fólico.

Solução polimérica		Condutividade* elétrica ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	Viscosidade* aparente( $\text{cP}\cdot\text{cm}^{-1}$ )
Zeína (%; m/v)	Ácido fólico (%; m/v)		
30	0,0	1330,0 $\pm$ 4,3 <sup>a</sup>	104,9 $\pm$ 6,3 <sup>d</sup>
30	0,5	1255,7 $\pm$ 4,5 <sup>b</sup>	121,3 $\pm$ 3,4 <sup>c</sup>
30	1,0	1201,7 $\pm$ 5,9 <sup>c</sup>	133,3 $\pm$ 3,2 <sup>b</sup>
30	1,5	1158,0 $\pm$ 4,3 <sup>d</sup>	143,3 $\pm$ 2,0 <sup>a</sup>
9	0,0	1046,7 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	n.d <sup>**</sup>
9	0,5	1041,3 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>	n.d
9	1,0	995,3 $\pm$ 1,6 <sup>c</sup>	n.d
9	1,5	988,0 $\pm$ 0,5 <sup>d</sup>	n.d

\*Letras distintas entre a mesma concentração, na mesma coluna representam diferença significativa entre as médias submetidas ao teste de Tukey a 5% de significância. \*\* n.d: não detectada

A maior condutividade elétrica nas soluções com maior concentração de zeína está associada ao aumento dos grupos ionizáveis em solução. Houve também uma interação de hidrogênio entre o NH da zeína e o CO do ácido fólico. Em ambas as soluções, 30% e 9% de zeína, a adição de ácido fólico reduziu a condutividade elétrica. Entretanto, essa redução não afetou a formação de fibras e cápsulas, uma vez que houve formação de jato contínuo e estável permitindo a produção de fibras ultrafinas e cápsulas contínuas, indicando que a incorporação da vitamina não afetou negativamente o processo de *electrospinning/electrospraying*.

Em relação a viscosidade aparente, não foi possível a mensuração na solução de zeína 9% (m/v), uma vez que a solução polimérica teve uma viscosidade muito baixa, não sendo possível a determinação pelo equipamento utilizado. A adição do ácido fólico na solução polimérica de zeína com 30% aumentou a viscosidade aparente, sugerindo a interação do ácido fólico com a proteína. Segundo Aytac et al. (2016), o aumento da viscosidade aparente é devido ao maior emaranhamento de cadeias de polímero em solução.

## **5.2. Caracterização das fibras ultrafinas e cápsulas**

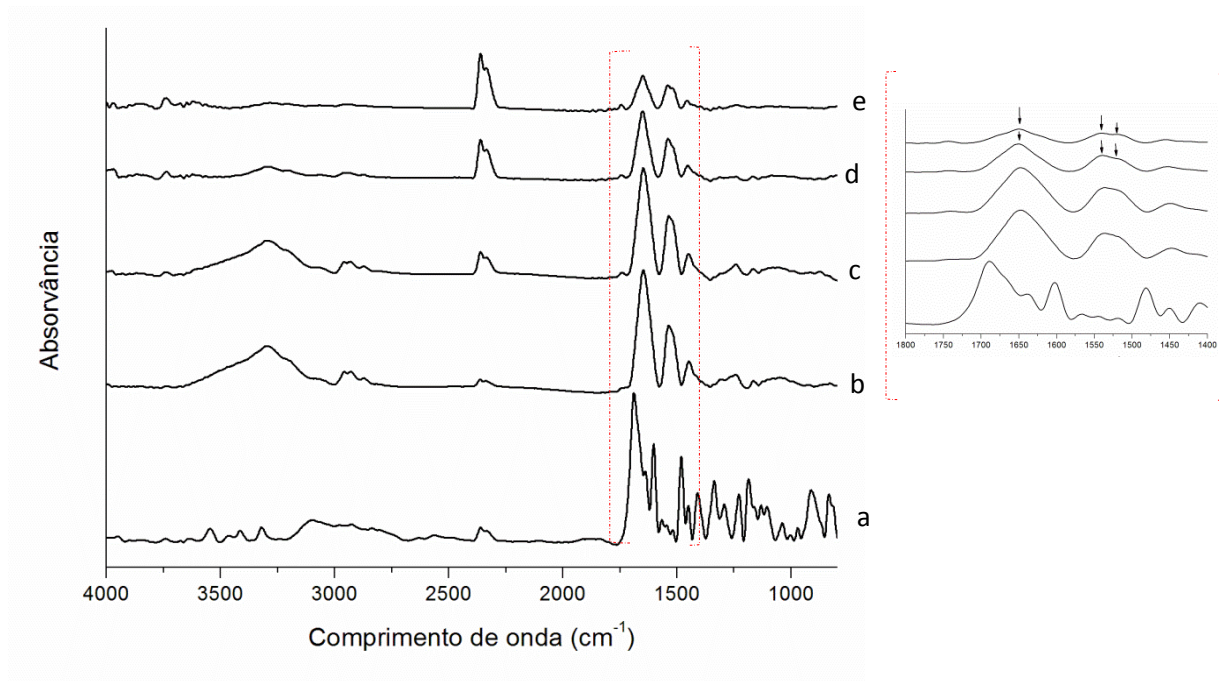
### **5.2.1. Grupos funcionais**

A análise de FTIR foi realizada para indentificar se houve interação entre a zeína e o ácido fólico (Figuras 9 e 10). O espectro do ácido fólico puro não encapsulado foi caracterizado pelas bandas de absorção nas regiões de  $4000\text{cm}^{-1}$  e  $\sim 900$  (Figura 9a e 10a). Bandas características de deformação C=O foram observadas em  $\sim 1695\text{cm}^{-1}$ , enquanto a banda sobreposta ( $\sim 1607\text{cm}^{-1}$ ) refere-se a vibração N-H. A banda  $1481\text{cm}^{-1}$  é atribuída a vibração do anel fenil e pteridina. As bandas do ácido fólico observadas nesse estudo estão de acordo com os trabalhos de Aceituno-Medina et al. (2015) e Assadpour, Jafari e Maghsoudlou (2017).

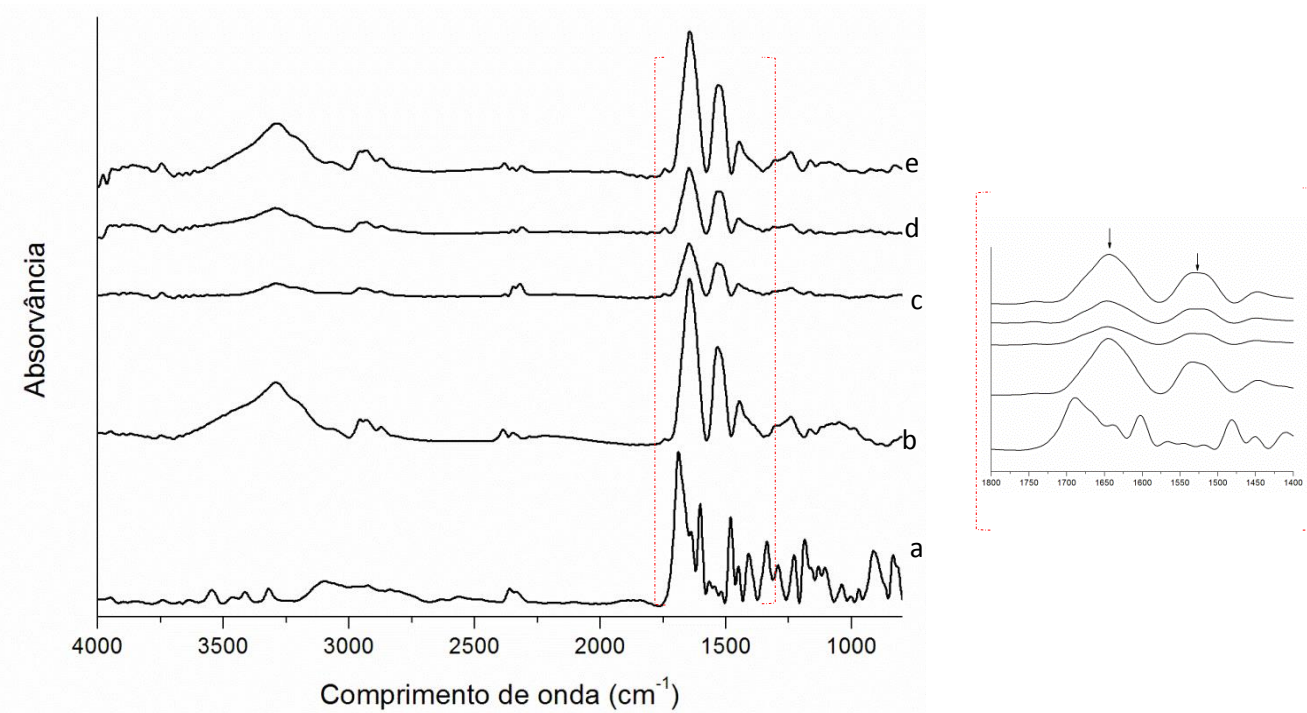
As fibras ultrafinas e cápsulas de zeína pura apresentaram bandas de amida I e II identificadas em  $\sim 1643\text{cm}^{-1}$  e  $\sim 1530\text{cm}^{-1}$ , respectivamente (Figuras 9b e 10b). A banda da amida I está relacionada ao estiramento da ligação C=O e a banda da amida II está associada à deformação simétrica da ligação N-H. Enquanto as bandas na região de  $3995$  a  $2872\text{cm}^{-1}$  são referentes ao estiramento O-H sobreposto ao estiramento N-H e, estiramentos assimétricos e simétricos C-H, relativos aos derivados de ácidos graxos livres presentes na zeína (DASHDORJ et al., 2015).

O encapsulamento de 1,0 e 1,5% de ácido fólico nas fibras ultrafinas de zeína promoveu um deslocamento da banda amida I, sendo  $1643\text{ cm}^{-1}$  nas fibras de zeína pura e foi alterada para  $1651\text{ cm}^{-1}$  nas fibras contendo ácido fólico, para ambas concentrações. Houve uma sobreposição das bandas características do ácido fólico da amida II, observado como um pequeno ombro, em  $1515\text{ cm}^{-1}$ , em que nas fibras ultrafinas de zeína eram observadas em  $1539\text{ cm}^{-1}$  (Figura 9a). Nesses espectros foi observado um o desaparecimento da banda característica de estiramento O-H ( $\sim 3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ ), o que sugere a formação de interações de hidrogênio entre os componentes da fibra (CHEN, XIUMEI, e FENGLING, 2007). Aceituno-Medina et al. (2015) relataram espectros semelhantes para as fibras desenvolvidas com ácido fólico a partir de proteína de amaranto e pululana.

Os espectros de FTIR-ATR para as cápsulas de zeína pura e de zeína contendo ácido fólico estão apresentados na Figura 10. Em geral, não houve modificação da estrutura secundária da proteína, uma vez que não foram observados deslocamentos das bandas espectrais para as cápsulas 0,5 e 1,0% de ácido fólico. No entanto, para a cápsulas com 1,5% de ácido fólico, houve deslocamento nas bandas amida I e II, uma vez que nas cápsulas de zeína pura foram observadas em  $1643\text{ cm}^{-1}$  e  $1530\text{ cm}^{-1}$ , e nas cápsulas contendo ácido fólico foram deslocadas para as bandas  $1642\text{ cm}^{-1}$  e  $1523\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Alguns estudos relataram que o ácido fólico é capaz de se conjugar a diferentes polímeros através de uma interação da amida II (N-H) com o grupo carboxílico do bioativo (C=O) o que pode ser comprovado a partir do deslocamento observado para as cápsulas contendo 1,5% de ácido fólico (SUDIMACK e LEE, 2000; TENG et al., 2013). A interação do polímero com a vitamina é importante para melhorar sua estabilidade a diferentes condições de exposição no processamento, bem como após seu consumo. As cápsulas de zeína podem ajudar a proteger o ácido fólico do ambiente gástrico, onde o ácido fólico livre pode se precipitar e atuar como carregadores de ácido fólico para a membrana absorptiva do intestino. As propriedades da zeína seriam responsáveis por um aumento na vida útil do ácido fólico no trato gastrointestinal superior, onde sua absorção é favorecida (Peñalva et al., 2015).



**Figura 9.** Espectros de FTIR-ATR para ácido fólico puro não encapsulado (a), fibras ultrafinas de zeína pura (b), fibras ultrafinas de zeína com 0,5% de ácido fólico (c), fibras ultrafinas de zeína com 1,0% de ácido fólico (d) e fibras ultrafinas de zeína com 1,5% de fólico (e).



**Figura 10.** Espectros de FTIR-ATR para ácido fólico não encapsulado (a), cápsulas de zeína pura (b), cápsulas de zeína com 0,5% de ácido fólico (c), cápsulas de zeína com 1,0% de ácido fólico (d) e cápsulas de zeína com 1,5% de fólico (e).

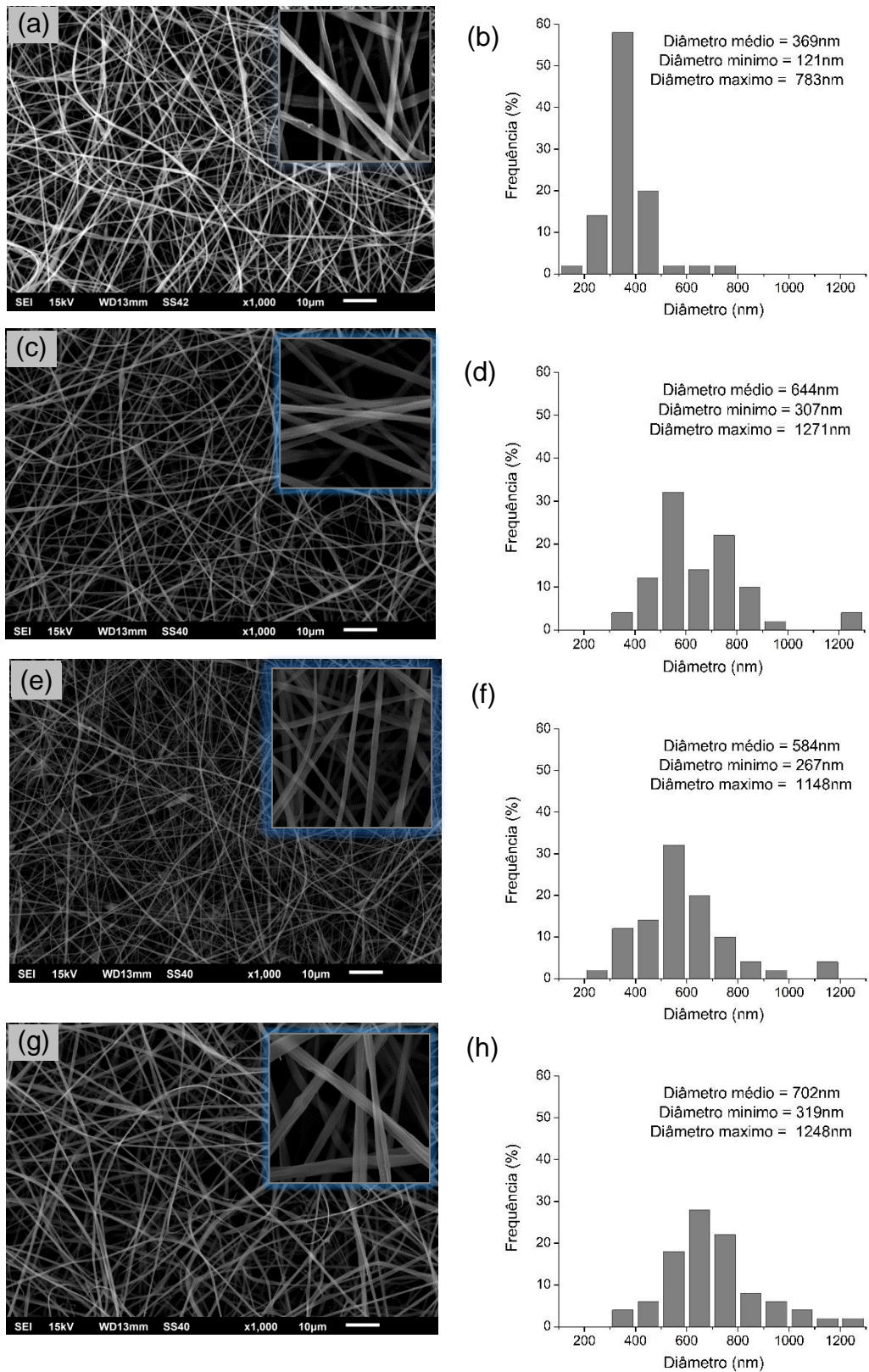


### 5.2.2. Morfologia e distribuição do diâmetro

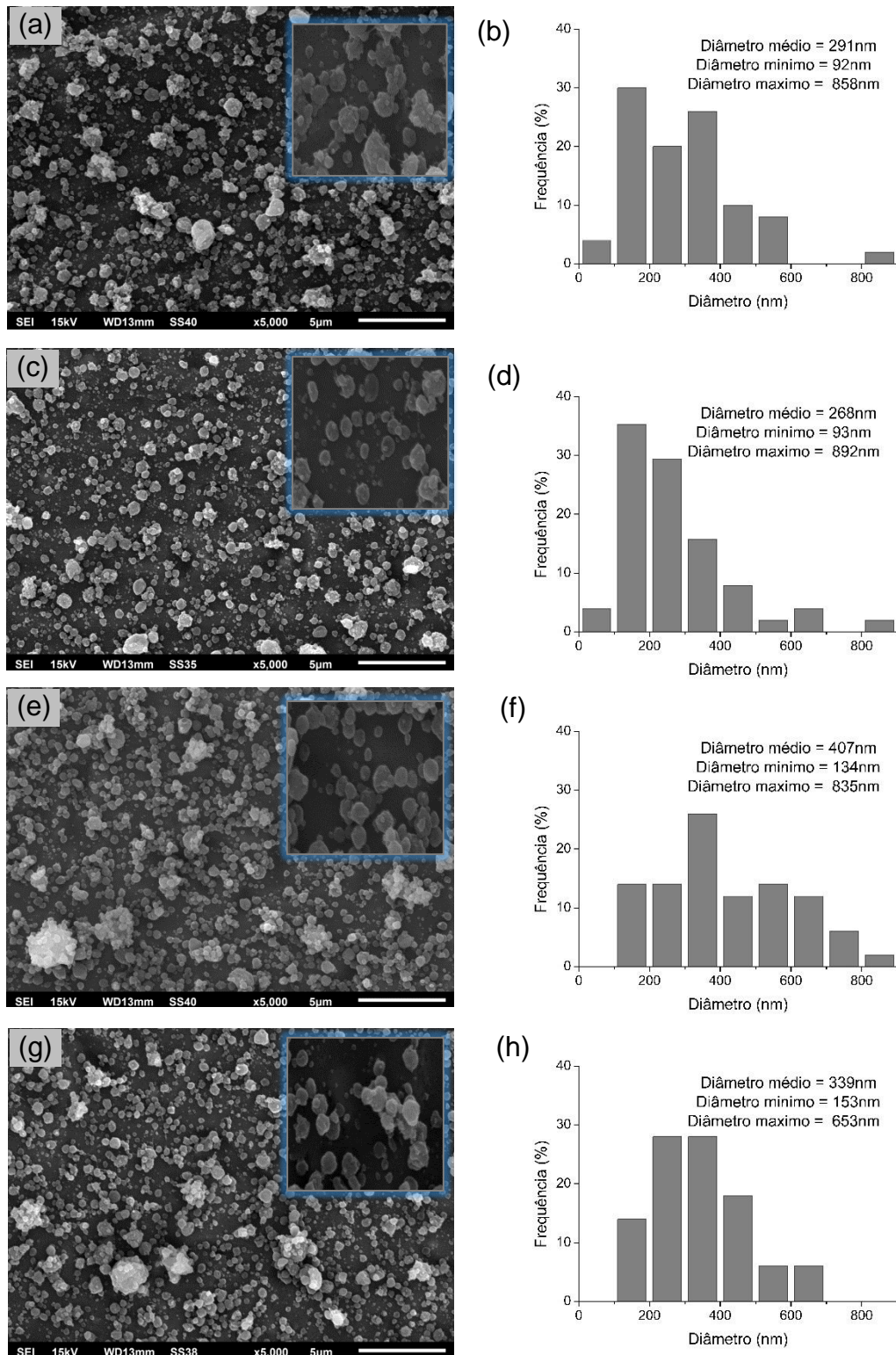
As fibras ultrafinas e cápsulas de zeína contendo 0,0%, 0,5%, 1,0% e 1,5% de ácido fólico encapsulado foram observadas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), a fim de caracterizar sua morfologia e o diâmetro médio (Figuras 11 e 12). As condições utilizadas nos processos permitiram a formação de fibras ultrafinas homogêneas e contínuas, enquanto a morfologia das cápsulas apresentaram-se heterogêneas.

A incorporação de ácido fólico não afetou a morfologia das fibras ultrafinas e cápsulas, no entanto, o diâmetro médio em ambos tratamentos foi alterado e isso pode ser atribuído ao aumento da viscosidade das soluções ao incorporar o ácido fólico (Tabela 3). Em geral, uma viscosidade mais elevada e condutividade elétrica mais baixa, resulta em um menor estiramento do jato da solução, produzindo assim fibras mais espessas (WEN et al., 2016). O diâmetro médio variou entre 369 a 702 nm, para fibras ultrafinas apenas com zeína e fibras ultrafinas com zeína e ácido fólico 1,5%, respectivamente (Figuras 11a-b e 11g-h). Aceituno-Medina et al. (2015) relataram diâmetro médio de  $377,9 \pm 101$  nm para fibras com ácido fólico desenvolvidas a partir de proteína de amaranto e pululana (80:20).

As cápsulas que apresentaram o diâmetro médio mais baixo foram as com 0,5% de ácido fólico (268nm), enquanto que as cápsulas com 1% de ácido fólico apresentaram o maior diâmetro médio (407nm) (Figuras 12c-d e 12e-f). Altan, Aytac e Uyar (2018) também usaram 30% de soluções de zeína e relataram um diâmetro médio de fibras de zeína pura a 604 nm, enquanto que as fibras de zeína contendo 5, 10 e 20% de carvacrol apresentaram diâmetros de 647, 539 e 553. nm, respectivamente. Baspinar et al. (2018) usaram 5% de solução de zeína para o encapsulamento de curcumina por *electrospinning* e observaram uma faixa de diâmetros de cápsula entre 300 e 600 nm.



**Figura 11.** Morfologia das fibras ultrafinas e respectiva distribuição de tamanho: zeína pura (a-b), zeína com 0,5% de ácido fólico (c-d), zeína com 1% de ácido fólico (e-f) e zeína com 1,5% de ácido fólico (g-h). Amplitudes (1000x e 10000 x).

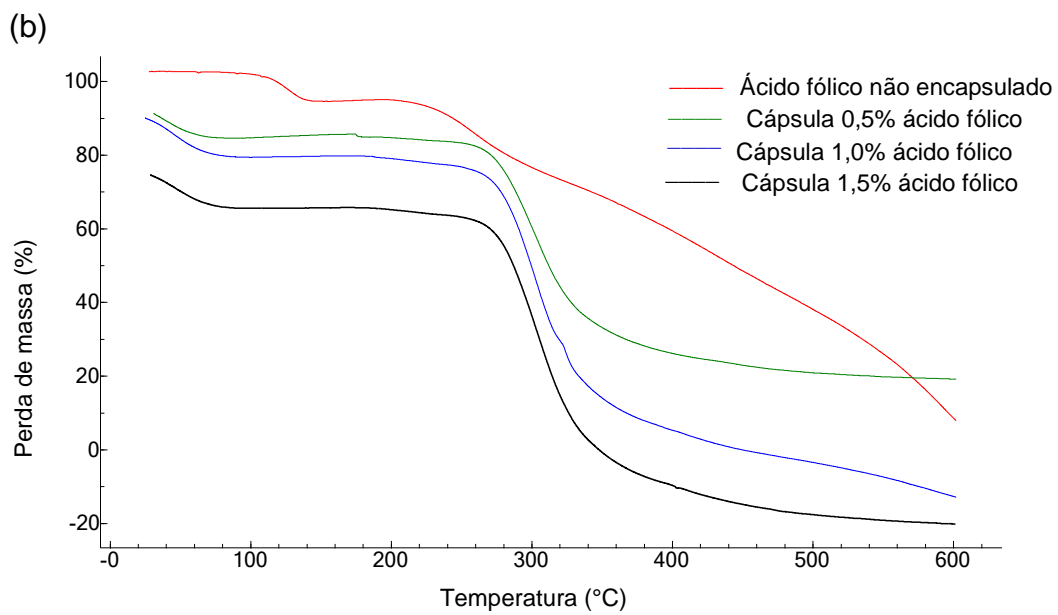
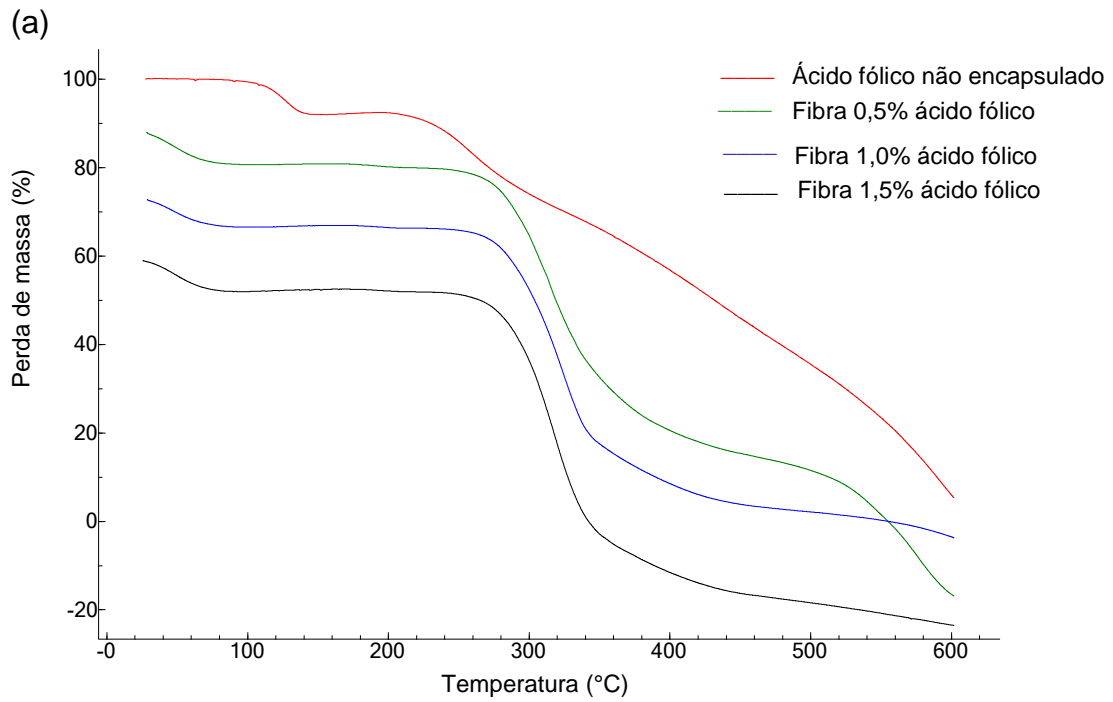


**Figura 12.** Morfologia das cápsulas ultrafinas e respectiva distribuição de tamanho: zeína pura (a-b), zeína com 0,5% de ácido fólico (c-d), zeína com 1,0% de ácido fólico (d-e) e zeína com 1,5% de ácido fólico (f-g). Amplitudes (5000 x e 30000 x).

### 5.2.3 Propriedades termogravimétricas

Os termogramas do ácido fólico puro, fibras ultrafinas e cápsulas de zeína com 0,5, 1,0 e 1,5% de ácido fólico encapsulados estão apresentados na Figura 13. A análise termogravimétrica foi realizada para observar se houve a decomposição térmica do ácido fólico nas fibras ultrafinas e cápsulas de zeína. O ácido fólico puro apresentou uma perda de água em aproximadamente 125°C e, a sua temperatura de decomposição foi de 257,73°C. Houve o deslocamento das temperaturas de decomposição quando o ácido fólico está na presença de zeína, seja na forma de fibras ultrafinas ou cápsulas. A temperatura de decomposição do ácido fólico nas fibras variou de 305 a 313°C, enquanto que para as cápsulas variou de 298 a 303°C (Figura 13a). Portanto, a incorporação de ácido fólico a fibras ultrafinas e cápsulas, produzidas por *electrospinning/electrospraying*, contribuíram para a estabilidade térmica da vitamina.

Estes resultados sugerem que a forma encapsulada pode ser usada no processamento térmico, como produtos de panificação, que usam altas temperaturas. Aceituno-Medina et al. (2015) também relataram um aumento da estabilidade térmica do ácido fólico em fibras de isolado proteico de amaranto e pululana. Ariyaratna e Karunaratne (2015) reportaram uma temperatura de decomposição de 293°C para o ácido fólico encapsulado em proteína de grão de bico utilizando a técnica de freeze dryer.



**Figura 13.** Termogramas: (a) ácido fólico puro e fibras ultrafinas de zeína com ácido fólico 0,5, 1,0 e 1,5%, (b) ácido fólico puro e cápsulas de zeína com ácido fólico 0,5, 1,0 e 1,5%.

#### 5.2.4 Eficiência de encapsulamento e estabilidade térmica e a irradiação UVA

A eficiência de encapsulação e a estabilidade térmica do ácido fólico puro não encapsulado e encapsulado em fibras ultrafinas e cápsulas de zeína pode ser observada na Tabela 4. Os tratamentos com 0,5% e 1,0% de ácido fólico apresentaram maior eficiência de encapsulamento, tanto para fibras ultrafinas quanto para as cápsulas. O menor valor de eficiência de encapsulamento para os tratamentos com 1,5% de ácido fólico é devido, possivelmente a um excesso da vitamina, dificultando a sua incorporação na matriz proteica.

**Tabela 4.** Eficiência de encapsulamento do ácido fólico encapsulado em fibras ultrafinas e cápsulas de zeína.

Forma de encapsulação	Ácido fólico (%)	Eficiência de encapsulação (%)
Fibras	0,5	92,9±0,1 <sup>a</sup>
	1	91,7±0,1 <sup>a</sup>
	1,5	82,1±0,1 <sup>b</sup>
Cápsulas	0,5	98,6±2,3 <sup>a</sup>
	1	92,9±0,3 <sup>a</sup>
	1,5	73,7±1,7 <sup>b</sup>

\* Eficiência de encapsulamento: Valores com letras diferentes na mesma coluna para fibras ou cápsulas são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) por um teste de Tukey.

Um maior percentual de encapsulamento utilizando as técnicas de *electrospinning/electrospraying* foi observado neste estudo quando comparado a trabalhos que utilizaram *spray-drying* para encapsular ácido fólico no qual foram observadas eficiências de encapsulamento variando de ~ 25 a 89% (SHRESTHA, ARCOT, YULIANI, 2012). Pérez-Masiá et al. (2015) obtiveram resultados semelhantes ao nosso estudo para a eficiência de encapsulação do ácido fólico em proteína de soro do leite utilizando *electrospraying* (83,9%) ou *spray-drying* (80,8%). No entanto, aplicando as mesmas técnicas de encapsulação, esses autores relataram menor

percentual de encapsulação, quando se utilizou como matriz amido resistente, sendo a eficiência de 44,0% para fibras ultrafinas e de 52,5% para cápsulas.

O ácido fólico tem uma importância mundial na fortificação de alimentos, em especial em farinhas de trigo e milho. Sabendo que o ácido fólico em pó é comumente misturado às farinhas de trigo e milho com a finalidade de fortificação, foi realizada uma abordagem sobre a estabilidade do ácido fólico em pó e encapsulado ao aquecimento em estufa por 45 min nas temperaturas de 100, 140 e 180°C. Isto se deve ao fato destes ingredientes serem consumidos seguidos de um processamento térmico.

O ácido fólico não encapsulado exposto a 140°C e 180°C apresentou reduções de aproximadamente 11% e 70%, respectivamente, após o tratamento térmico (Tabela 5). Com base na análise termogravimétrica (Figura 13a-b), a temperatura de decomposição do ácido fólico é de 257,73°C; entretanto, Vora et al. (2002) relataram que, a 180 ° C, ocorre a quebra das ligações do ácido glutâmico e, portanto, a função ativa da vitamina é perdida.

**Tabela 5.** Estabilidade térmica do ácido fólico não encapsulado e encapsulado em fibras ultrafinas e cápsulas de zeína.

Forma de encapsulação	Ácido fólico (%)	Sem exposição	Tratamento térmico (°C)		
			100	140	180
Ácido fólico (µg/mL)**					
Ácido fólico não encapsulado		17,17±1,35 <sup>a</sup>	17,62±1,98 <sup>ab</sup>	15,60±0,14 <sup>b</sup>	5,44±0,08 <sup>c</sup>
Ácido Fólico (µg/mg)**					
Fibras	0,5	2,91±0,15 <sup>a</sup>	2,71±0,25 <sup>a</sup>	2,85±0,03 <sup>a</sup>	2,67±0,16 <sup>a</sup>
	1	6,38±0,13 <sup>a</sup>	6,53±0,44 <sup>a</sup>	6,28±0,36 <sup>a</sup>	6,00±0,12 <sup>a</sup>
	1,5	9,73±1,20 <sup>a</sup>	9,10±0,94 <sup>ab</sup>	7,95±0,37 <sup>b</sup>	8,88±0,07 <sup>ab</sup>
Cápsulas	0,5	2,74±0,15 <sup>a</sup>	2,84±0,22 <sup>a</sup>	2,83±0,08 <sup>a</sup>	2,84±0,05 <sup>a</sup>
	1	6,22±0,03 <sup>a</sup>	5,63±0,24 <sup>b</sup>	5,63±0,21 <sup>b</sup>	5,60±0,01 <sup>b</sup>
	1,5	8,84±0,55 <sup>a</sup>	7,26±0,19 <sup>b</sup>	7,49±0,06 <sup>b</sup>	7,69±0,27 <sup>b</sup>

\*\* Conteúdo de ácido fólico: Valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (p <0,05) pelo teste de Tukey.

Os tratamentos térmicos de 100, 140 e 180°C, não influenciaram o teor de ácido fólico encapsulado em fibras ultrafinas de zeína quando comparado às fibras ultrafinas

sem exposição ao tratamento térmico, indicando que houve a proteção térmica da vitamina. A Tabela 5 mostra que os tratamentos térmicos a 100, 140 e 180 ° C não influenciaram o conteúdo de ácido fólico encapsulado nas fibras ultrafinas de zeína nos níveis de 0,5% e 1,0% quando comparado às fibras ultrafinas sem exposição ao tratamento térmico, indicando que houve proteção térmica da vitamina. Uma ligeira redução na estabilidade térmica foi observada em fibras ultrafinas contendo 1,5% de ácido fólico. As cápsulas com 0,5% de ácido fólico expostas a todos os tratamentos térmicos apresentaram comportamento semelhante às cápsulas sem exposição à alta temperatura, enquanto as cápsulas com 1,0% e 1,5% de ácido fólico apresentaram uma leve diminuição no teor de ácido fólico (Tabela 5). Arytarathna e Karunaratne (2015) encapsularam ácido fólico em proteína de grão-de-bico por liofilização e avaliaram a degradação térmica a 80, 120 e 160°C por 30 min. Eles relataram degradações térmicas de 18,3%, 29,0% e 33,8%, respectivamente, para o ácido fólico encapsulado; enquanto para o ácido fólico não encapsulado, houve degradação térmica de 25,9%, 42,7% e 52,9%, respectivamente.

A Tabela 6 apresenta os resultados da estabilidade do ácido fólico puro e incorporado a fibras ultrafinas e cápsulas de zeína, no período de 1h, 12h e 24h de irradiação. O ácido fólico não encapsulado exposto à irradiação UVA por 1 h apresentou redução de aproximadamente 26% em relação ao ácido fólico sem exposição à irradiação UVA.

As fibras ultrafinas de zeína contendo 0,5, 1,0 e 1,5% de ácido fólico, quando expostas por 1 ou 24 h de irradiação UVA, mostraram estabilidade comparável às fibras não expostas à irradiação (Tabela 6). As fibras ultrafinas expostas por 12 e 24 h de irradiação tiveram uma pequena redução na estabilidade da vitamina. As cápsulas de zeína, em geral, mostraram estabilidade à irradiação UVA, com exceção da cápsula contendo 1,0% de ácido fólico, exposta à irradiação por 12 h, onde foi observada uma redução na estabilidade do composto. A perda de vitaminas, mesmo quando protegida na matriz de zeína, é muito pequena quando comparada com a do ácido fólico não encapsulado. Assim, a proteção do composto por encapsulação utilizando *electrospinning* e *electrospraying* foi satisfatória.

Segundo Juzeniene et al. (2013), o ácido fólico é sensível a luz UV devido a excitação da ligação entre o C<sub>9</sub>-N<sub>10</sub>, levando a sua clivagem etendo como produtos da fotodegradação o p-aminobenzoil-L-ácido glutâmico, 6-formilpterina ou 6-carboxipterina. A zeína é caracterizada pela predominância de aminoácidos



hidrofóbicos tais como a prolina, isoleucina, alanina, fenilalanina, metionina, valina, e leucina e o ácido fólico por sua vez é um composto hidrofílico (PRASANNA, 2001). Possivelmente, a estabilidade do ácido fólico tanto nas fibras ultrafinas como nas cápsulas está relacionada à interação da vitamina com esses aminoácidos o que dificulta a oxidação da ligação C<sub>9</sub>-N<sub>10</sub> do ácido fólico. Perez-Maziá et al. (2015) encapsularam ácido fólico (1,5% p / v) em proteína de soro de leite e amido resistente por *electrospraying*, e avaliaram sua fotodegradação utilizando irradiação natural e na ausência de irradiação no período de 60 dias. Os autores observaram que quando o ácido fólico foi encapsulado com a proteína, a concentração de ácido fólico foi reduzida em 41% quando exposta à irradiação; enquanto na ausência de irradiação, a degradação foi de apenas 9%. Além disso, o ácido fólico encapsulado com amido resistente apresentou 88% de degradação na presença de irradiação e, no escuro, essa degradação foi reduzida para 37%.

**Tabela 6.** Estabilidade a irradiação do ácido fólico não encapsulado e encapsulado em fibras ultrafinas e cápsulas de zeína.

Forma de encapsulação	Ácido fólico (%)	Sem exposição	Tempo de irradiação (h)		
			1	12	24
Ácido fólico (µg/mL)**					
Ácido fólico não enzecapsulado		17,17±1,35 <sup>a</sup>	12,58±0,62 <sup>b</sup>	12,05±1,44 <sup>b</sup>	14,07±0,44 <sup>b</sup>
Ácido Fólico (µg/mg)**					
Fibras	0,5	2,91±0,15 <sup>a</sup>	2,59±0,33 <sup>a</sup>	2,93±0,29 <sup>ab</sup>	2,27±0,13 <sup>b</sup>
	1	6,38±0,13 <sup>a</sup>	5,05±0,32 <sup>ab</sup>	5,05±0,88 <sup>b</sup>	4,85±0,58 <sup>b</sup>
	1,5	9,73±1,20 <sup>a</sup>	8,02±1,00 <sup>ab</sup>	7,92±0,48 <sup>b</sup>	8,88±0,05 <sup>ab</sup>
Cápsulas	0,5	2,74±0,15 <sup>a</sup>	2,50±0,16 <sup>a</sup>	2,68±0,13 <sup>a</sup>	2,50±0,30 <sup>a</sup>
	1	6,22±0,03 <sup>a</sup>	5,04±0,53 <sup>ab</sup>	4,67±0,30 <sup>b</sup>	5,56±1,1 <sup>ab</sup>
	1,5	8,84±0,55 <sup>a</sup>	7,75±0,51 <sup>a</sup>	7,93±1,30 <sup>a</sup>	7,88±1,60 <sup>a</sup>

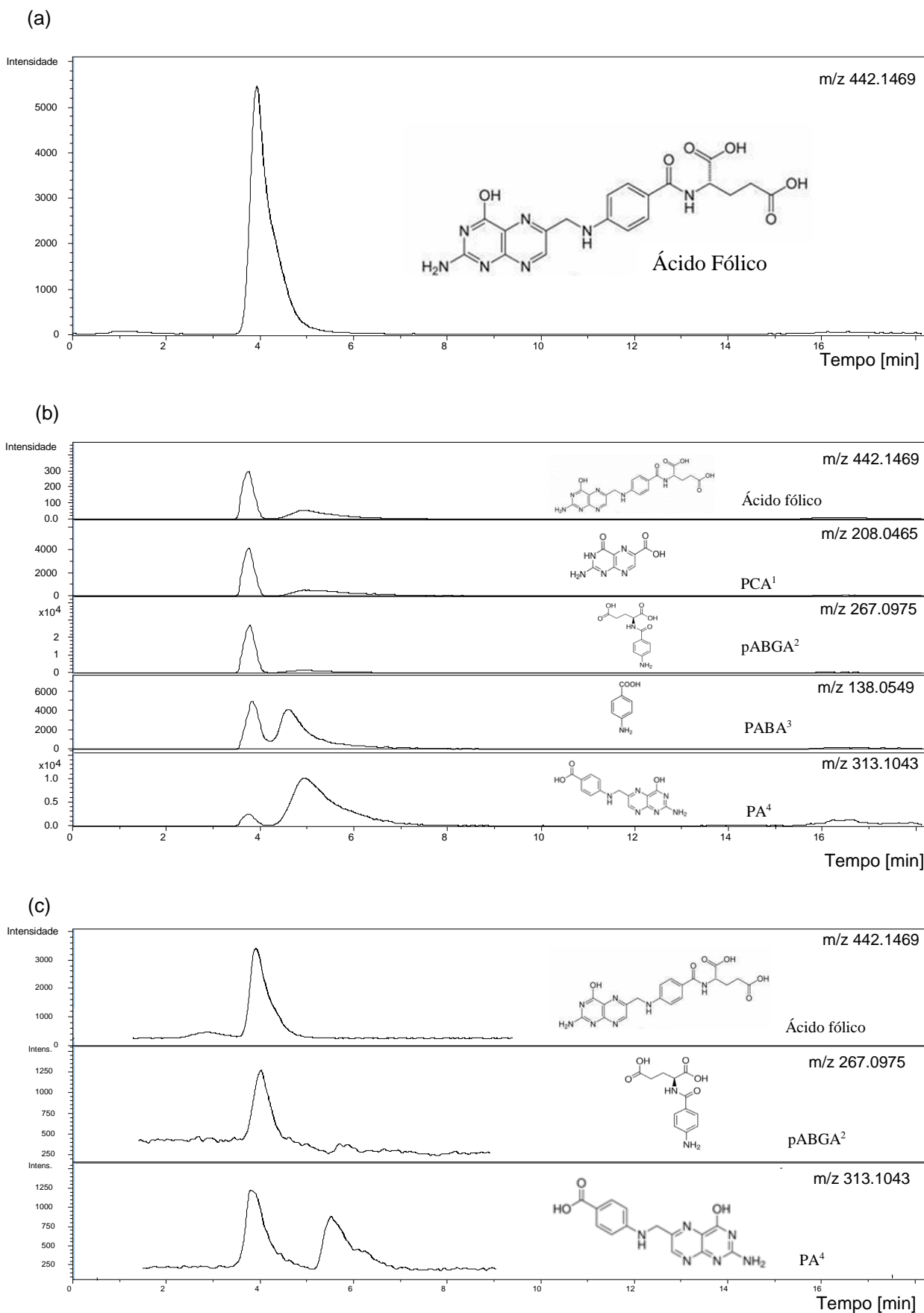
\*\* Conteúdo de ácido fólico: Valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (p <0,05) pelo teste de Tukey.

### 5.2.5. Produtos de degradação do ácido fólico

Com base nos resultados de estabilidade do ácido fólico, foi possível observar que a exposição do ácido fólico não encapsulado tanto em altas temperaturas quanto a luz promove a degradação da vitamina. Portanto, os compostos de degradação formados nesses processos foram investigados. A temperatura de 180°C e a exposição a luz no período de 24 horas foram os parâmetros escolhidos para identificar esses compostos formados, tendo em vista que foram os tratamentos que houve maior degradação do composto (Tabelas 5 e 6).

O ácido fólico foi identificado pela presença do íon  $[M+H]$  de  $m/z$  442,1469 (Figura 14a). O comportamento do ácido fólico a temperatura de 180°C por 45 min está apresentado na Figura 14b. O conteúdo de ácido fólico submetido ao tratamento térmico foi menor quando comparado ao controle do ácido fólico (sem tratamento térmico). Além disso, a formação de produtos de degradação, tais como 6-carboxipterina (PCA), p-aminobenzoil-L-ácido glutâmico (pABGA), ácido p-aminobenzóico (PABA) e ácido pteróico (PA) foram identificados pela presença do  $[M + H] + m/z$  208,0465, 267,0975, 138,0549 e 313,1043, respectivamente. Vora et al. (2002) estudaram a termo-estabilidade do ácido fólico e sugeriram que inicialmente a fração glutamato do ácido fólico se rompe deixando a amida como componente principal. Em seguida a pterina e o PABA se decompõe em um mecanismo de *overlapping*. Esses autores também reportaram que a 195°C não é possível discernir os grupos presentes, indicando uma completa decomposição da vitamina nesta temperatura. Segundo Ball (2016), o ácido fólico não tem ponto de fusão definido, mas a 250°C já se observa um importante grau de carbonização.

Os compostos de degradação p-aminobenzoil-L-ácido glutâmico (pABGA) ( $[M + H] + m / z$  267,0975) e o ácido pteróico (PA) ( $[M + H] + m/z$  313,1043) foram identificados após exposição do ácido fólico à irradiação UVA por 24 h. O pABGA é formado pela clivagem fotoquímica da ligação C9-N10, enquanto o PA é o produto da ligação amida do ácido fólico entre a porção glutamato e a porção p-aminobenzóico. Akhtar et al. (1999, 2003) estudaram os efeitos de diferentes níveis de pH na fotodegradação de ácido fólico por UV e encontraram PABA, PCA, pABGA e PA como seus principais produtos de degradação.



**Figura 14.** Produtos de degradação do ácido fólico (a) ácido fólico, (b) ácido fólico exposto a temperatura 180°C, (c) ácido fólico exposto a irradiação 24 horas.

<sup>1</sup>PCA: 6-carboxipterina, <sup>2</sup>pABGA: p-aminobenzoil-L-ácido glutâmico, <sup>3</sup>PABA: ácido p-aminobenzóico, <sup>4</sup>PA: ácido pteróico.

## 6. CONCLUSÕES

As soluções de zeína 30% pura e com ácido fólico encapsulado foram capazes de formar fibras ultrafinas contínuas e uniformes de diâmetro médio entre 369 a 702 nm, enquanto soluções de zeína 9% pura e adicionadas de ácido fólico, permitiram a formação de cápsulas com diâmetro médio de 268 a 407 nm. Na análise termogravimétrica foi possível constatar um aumento da estabilidade térmica do ácido fólico quando está protegido na forma de fibras ou cápsulas.

As fibras ultrafinas e as cápsulas de zeínas apresentaram alta eficiência de encapsulação do ácido fólico (>80%). O ácido fólico não encapsulado apresentou uma intensa degradação quando exposto a 180°C (perda de aproximadamente 70%), enquanto que encapsulado em fibras ultrafinas ou em cápsulas houve estabilidade da vitamina. A fotodegradação de ácido fólico não encapsulado foi de aproximadamente 26% após 1 h de irradiação UVA; no entanto, quando o ácido fólico foi incorporado às fibras ultrafinas de zeína, a resistência à radiação foi, em geral, observada.

As fibras ultrafinas e cápsulas de zeína com ácido fólico desenvolvidas nesse trabalho, apresentaram características promissoras para aplicação em alimentos que necessitam de processamentos térmicos e exposição a luz. Por fim, sugere-se como trabalhos futuros a aplicação de fibras ultrafinas e cápsulas de zeína 1% em matrizes alimentares com exposição térmica e a irradiação UVA.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEITUNO-MEDINA, M; MENDOZA, S.; LAGARON. J.M.; LOPEZ-RUBIO, A. Photoprotection of folic acid upon encapsulation in food-grade amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) protein isolate e Pullulan electrospun fibers. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n.2, p. 970-975, 2015.
- ACEVEDO-FANI, A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Photoprotection and controlled release of folic acid using edible alginate/chitosan nanolaminates. **Journal of Food Engineering**, p. 1-11, 2018.
- ACHANTA, K.; BOENEKE, C.A.; ARYANA, K.J. Characteristics of reduced fat milks as influenced by the incorporation of folic acid. **Journal of Dairy Science**, v.90,n.1,p.90-98, 2007.
- AGRAWAL, A.; MURPHY, R. F.; AGRAWAL, D. K. DNA methylation in breast and colorectal Cancers. **Modern Pathology**, v. 20, n.7, p. 711–721, 2007.
- AHMAD, M.; QURESHI, S.; MAQSOOD, S.; GANI, A.; MASOODI, F.A. Microencapsulation of folic acid using horse chestnut starch and b-cyclodextrin: Microcapsule characterization, release behavior & antioxidant potential during GI tract conditions. **Food Hydrocolloids**, v. 66, p. 154-160, 2017.
- AHN, Y. C.; PARK, S. K.; KIM, G. T.; HWANG, Y. J.; LEE, C. G.; SHIN, H. S. Development of high efficiency nanofilters made of nanofibers. **Current Applied Physics**, v. 6, n. 6, p. 1030-1035, 2006.
- AKHTAR, M.J.; KHAN, M.A.; AHMAD, I. High performance liquid chromatographic determination of folic acid and its photodegradation products in the presence of riboflavin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.16, p. 95–99, 1997.
- AKHTAR, M.J.; KHAN, M.A.; AHMAD, I. Photodegradation of folic acid in aqueous solution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 25, p. 269–275, 1999.
- AKHTAR, M.J.; KHAN, M.A.; AHMAD, I. Identification of photoproducts of folic acid and its degradation products pathways in aqueous solution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, p. 579-588, 2003.

- ALABURDA, J.; DE ALMEIDA, A.P.; SHUNDO, L.; RUVIERI, V.; SABINO, M. Determination of folic acid in fortified wheat flours. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.21, p. 336-342, 2008.
- ALBORZI, S.; LIM, L-T.; KAKUDA, Y. Release of folic acid from sodium alginate-pectin-poly(ethylene oxide)electrospun fibers under in vitro conditions. **Food Science and Technology**, v. 59, p. 383-388, 2014.
- ARAUJO, M.M; MARCHIONI, E.; BERGAENTZLE, M.; ZHAO, M.; KUNTZ, F.; VILLAVICENCIO, A.L.C.H. Irradiation stability of folic acid in powder and aqueous solution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,v. 59, n. 4, p. 1244-1248, 2011.
- ARCOT, J.; SHRESTHA, A. Folate: method of analysis. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, n. 6, p. 253-266, 2005.
- ARIYARATHNA, I.R.; KARUNARATNE, D. N. Use of chickpea protein for encapsulation of folate to enhance nutritional potency and stability. **Food and Bioproducts Processing Food and Bioproducts Processing**, v. 95, n.1, p. 76-82, 2015.
- ARYA, N; CHAKRABORTY; DUBE N, KATTI, D.S. Electrospinning: a facile technique for synthesis of chitosan based micro/nanospheres for drug delivery applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**,v. 88, n. 16, p. 17-31, 2007.
- ASSADPOUR, E.; JAFARI, S-M.; MAGHSOUDLOU. Y. Evaluation of folic acid release from spray dried powder particles of pectin-whey protein nano-capsules. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.95, n.1, p. 238-244, 2017.
- AYTAC, Z., KUSKU, S. I., DURGUN, E., UYA, T. Encapsulation of gallic acid/cyclodextrin inclusion complex in electrospun polylactic acid nanofibers: Release behavior and antioxidant activity of gallic acid. **Materials Science and Engineering**, v. 63, p. 231–239, 2016.
- BALL, G.F.M., **Vitamins in Foods: Analysis, Bioavailability and Stability**, Florida, FL: CRC Press (Taylor and Francis Group), 2006.
- BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 325–347, 2010.

- BHUSHANI, J. A.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications. **Food Science & Technology**, v. 38, n. 1, p. 1-13, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n.344, de 13 de dezembro de 2002.. RDC nº 150, de 13 de abril de 2017 Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/344\\_02rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/344_02rdc.htm). Acesso em: 23/06/2017.
- CHAKRABORTY, S.; LIAO, I. C.; ADLER, A.; LEONG, K. W. Electrohydrodynamics: a facile technique to fabricate drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.61, n.12, p. 1043-1054, 2009.
- CHEN, Z.; XIUMEI, M.; & FENGLING, Q. Electrospinning of collagen-chitosan complex. **Materials Letters**, v. 61, n.1, p. 3490-3494, 2007.
- CRIDER, K. S; BAILEY, L.B; BERRY, R.J. Folic acid food fortification– its history, effect, concerns, and future directions. **Nutrients**, v.3, n.61, p.370-384, 2011.
- DASHDORJ, U.; REYES, M. K.; UNNITHAN, A. R.; TIWARI, A. P.; TUMURBAATAR, B.; PARK, C. H.; KIM, C. S. Fabrication and characterization of electrospun zein/Agnanocomposite mats for wound dressing applications, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 1–7, 2015.
- DEITZEL, J. M.; KLEINMEYER, J.; HARRIS, D.; TAN, N. C. B. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. **Polymer**, v. 42, p. 261–272, 2001.
- DELCHIER, N.; HERBIG, A.-L.; RYCHLIK, M.; RENARD, C.M. Foliates in fruits and vegetables: contents, processing, and stability. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.1, n.15, p. 506-528, 2016.
- GAZZALI, A.M; LOBRY, M.; COLOMBEAU, L.; ACHERAR, S.; AZAÏS, H.; MORDON, S.; SARNOUX, P.; BAROS, F.; VANDERESSE, R.; FROCHOT, C. Stability of folic acid under several parameters. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, p. 419-430, 2016.
- GHORANI, B; TUCKER, N. Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. **Food Hydrocolloids**, v.51, n.1, p.227-240, 2015.

- GUO, H.X.; HEINAMAKI J.; YLIRUUSI J. Stable aqueous film coating dispersion of zein. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.32, n. 1. p. 478-484, 2008.
- HAYNES W.G. Hyperhomocysteinemia, vascular function and atherosclerosis: effects of vitamins. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v.16, n.5, p.391-399, 2002.
- HEIKKILA, P.; HARLIN, A. Parameter study of electrospinning of polyamide-6. **European Polymer Journal**, v. 44, n.10, p. 3067-3079, 2008.
- HUANG, J.; LIU Y.; HOU, HAOQING, YOU, T. Simultaneous electrochemical determination of dopamine, uric acid and ascorbic acid using palladium nanoparticle-loaded carbon nanofibers modified electrode, **Biosensors and bioelectronics**, v. 24. n.4. p.632-637, 2008.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Alimentares. **Consumo alimentar domiciliar “per capita”: Brasil e Grandes regiões**. Disponível em: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acesso em: 23/06/2017.
- JANKOVI, B. Thermal stability investigation and the kinetic study of Folvic® degradation process under nonisothermal conditions. **AAPS PharmSciTech**. v.11, n.11, p.103–112, 2009.
- JAWOREK, A.; SOBCZYK, A.T. Electrospinning route to nanotechnology: Na overview. **Journal of Electrostatics**, v. 66, n.4, p. 197-219, 2008.
- JUZENIENE, A.; TAM, T.T.T.; IANI, V.; MOA, J. The action spectrum for folic acid photodegradation in aqueous solutions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.1, n.126, p.11-16, 2013.
- KEAGY, P. M. Folic acid: Microbiological and animal assays. In: Augustin, J.; Klein, B. P.; Venugopal, P. B. **Methods of Vitamin Assay**, v. 4, n. 1, p. 445-471, 1985.
- KIM, Y. Role of folate in colon cancer development and progression. **Journal Nutrition**, v.11, n.1, p.3731-3739, 2003.
- LANNUTTI, J.; RENEKER, D.; MA, T.; TOMASKO, D.; FARSON, D. Electrospinning for tissue engineering scaffolds. **Materials Science and Engineering: C**, v. 7, n. 3, p.504–509, 2007.
- LAUDENSLAGER, M.J., SIGMUND, W.M., “Electrospinning” encyclopedia of nanotechnology. Springer publishers, pp. 769–775, 2012.



- LESKOVA, E.; KUBIKOVA, J.; KOVACIKOVA, E.; KOSICKA, M.; PORUBSKA, J.; HOLCIKOVA, K. Vitamin losses: retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 4, p. 252-276, 2006.
- LIANG, X.S.; ZHAO, F.Q.; HAO, L.X. Research on stability of synthetic folic acid. **Advanced Materials Research**, v. 781-784, p. 1215-1218, 2013.
- LIMA, J. A.; CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T. Ácido fólico em leite e bebida láctea enriquecidos - estudo da vida-de-prateleira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 1, n. 24, p.82-87, 2004.
- LIMA-PALLONE, J. A.; CATHARINO, R.H.; GODOY, H. T. Avaliação do comportamento do ácido fólico no processo de leites enriquecidos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 1, p. 57-62, 2006.
- LIU, X.; LIN, T.; GAO, Y.; XU, Z.; HUANG, C.; YAO, G.; JIANG, L.; TANG, Y.; WANG, X. Antimicrobial electrospun nanofibers of cellulose acetate and polyester urethane composite for wound dressing. **Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials**, v. 100, n. 6, p. 1556–1565. 2012.
- LOPERA, S. M. C.; GUZMÁN, C. O.; CATAÑO, C. R.; GALLARDO, C. C. Development and characterization of folic acid microparticles formed by spray-drying with gum arabic and maltodextrin. **Vitae**, v. 16, n. 1, p. 55–65, 2009.
- LÓPEZ CAMELO, J. La fortificación de harinas com ácido fólico reduce la frecuencia de los defectos del tubo neural en Sudamérica. **Journal of Basic and Applied Genetics**, v. 21, n. 2, p. 1852- 6233, 2010.
- MADZIVA, H.; KAILASAPATHY, K.; PHILLIPS, M. (2005). Alginate-pectin microcapsules as a potential for folic acid delivery in foods. **Journal of Microencapsulation**, v. 22, n. 4, p. 343-351, 2005.
- MARCHETTI, C.; PALAIA, I.; GIORGINI, M.; DE MEDICI, C.; IADAROLA, R.; VERTECHY, L.; DOMENICI, L.; DI DONATO, V.; TOMAO, F.; MUZII, L.; PANICI, P.B. Targeted drug delivery via folate receptors in recurrent ovarian cancer: a review. **Onco Targets Therapy**, v. 7, n.1.p. 1223–1236, 2014.
- MARTÍNEZ-HUITLE, C.A.; FERRO, S.; DE BATTISTI, Ch., FERRO, S.; De BATTISTI, A. Electrochemical incineration of oxalic acid: Reactivity and engineering parameters. **Journal Applied Electrochemistry**, v. 11, p. 1087, 2005.

- MATABOLA, K.P.; MOUTLOALI, R.M. The influence of electrospinning parameters on the morphology and diameter of poly (vinylidene fluoride) nanofibers-effect of sodium chloride. **Journal Materials Science**, v. 48, n. 16, p. 5475, 2013.
- MATTSON, M. P. Will caloric restriction and folate protect against AD and PD? **Neurology**, v. 60, n. 4, p. 690-695, 2003.
- MEGELSKI, S.; STEPHENS; J.S., BRUCE CHASE, D.; RABOLT, J.F. Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. **Macromolecules**, v.35, n. 22, p. 8456–8466, 2002.
- MELO, G.J.O. A importância do ácido fólico para o desenvolvimento embrionário e seu papel protetor de ocorrência de gestações afetadas pelos defeitos do tubo neural fetal. **Cadernos Interdisciplinares: Saúde Tecnologia e Questão Social**, v.1, p. 1-20, 2004.
- MILLER, A. L. The methionine-homocysteine cycle and its effects on cognitive diseases. **Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic**, v.8 n. 1, p. 7-19, 2003.
- MIT-UPPATHAM, C.; NITHITANAKUL, M.; SUPAPHOL, P. Ultrafine electrospun polyamide-6 fibers: effect of solution conditions on morphology and average fiber diameter. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 205, p. 2327–2338, 2004.
- MOMANY, F.A.; SESSA, D.J.; LAWTON, J.W.; SELLING, G.W.; HAMAKER, S.; Willett, J.L. Structural characterization of a-zein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 543-547, 2006.
- MORAN, V.H. Nutritional status in pregnant adolescents: a systematic review of biochemical markers. **Matern Child Nutrition**, v.3. n.2. p.74-93, 2007.
- NEO, Y. P.; RAY, S.; JIN, J.; GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, M.; NIEUWOUDT, M. K.; LIU, D. Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: a physicochemical study based on zeinegallic acid system. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 1013-1021, 2013.
- NGUYEN, M. T.; OEY, I.; VERLINDE, P.; VAN LOEY, A.; HENDRICKX, M. Model studies on the stability of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid degradation during thermal treatment in combination with high hydrostatic pressure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, V. 51, N. 11, p. 3352–3357, 2003.

- NUKOLOVA, N. V.; OBEROI, H. S.; COHEN, S. M.; KABANOV, A. V.; BRONICH, T. K. Folate-decorated nanogels for targeted therapy of ovarian cancer. **Biomaterials**, v. 32, p. 5417-5426, 2011.
- OFF, M. K.; STEINDAL, A. E.; POROJNICU, A. C.; JUZENIENE, A.; VOROBAY, A.; Johnsson, A. Ultraviolet photodegradation of folic acid. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 80, p. 47-55, 2005.
- OHKAWA, K.; KIM, H.; LEE, K.; YAMAMOTO H. Electrospun non-woven fabrics of poly (ε-caprolactone) and their biodegradation by pure cultures of soil filamentous fungi. **Macromolecular Symposia**, v. 216, p. 301–306, 2004.
- ORO, T. **Adaptação dos métodos de avaliação da qualidade tecnológica da farinha de trigo integral**. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 195p., 2013
- PACHECO, S.S.; BRAGA, C.; SOUZA, A.I.; FIGUEIROA, J.N. Efeito da fortificação alimentar com ácido fólico na prevalência de defeitos do tubo neural. **Revista Saúde Pública**, v. 43, p. 565-71, 2009.
- PADGETT, T.; HAN, I.; DAWSON, P. Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 1330-1335, 1998.
- PARK, CH.; LEE, J. Electrospayed polymer particles: effect of the solvent properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 114, n.1, p. 430-437, 2009.
- PELIPENKO, J.; KRISTL, J.; JANKOVIC´, B.; BAUMGARTNER, S.; KOCBEK, P. The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers. **Internacional Journal Pharmaceutics**, v. 456, n. 1, p. 125–134, 2013.
- PENALVA, R.; ESPARZA, I.; AGUEROS, M.; GONZALEZ-NAVARRO; FERRERO, C.G.; IRACHE, J.M. Casein nanoparticles as carriers for the oral delivery of folic acid. **Food Hydrocolloids**, v. 44, n. 1, p.399-406, 2015.
- PEÑALVA, R.; ESPARZA, I.; GONZALEZ-NAVARRO, C. J QUINCOCES, G.; PEÑUELAS, I.; IRACHE, J, M. Zein nanoparticles for oral folic acid delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 30, p. 450-457, 2015.

- PÉREZ-MASIÁ, R.; LÓPEZ-NICOLÁS, R.; PERIAGO, M.J.; ROS, G.; LAGARON, J.M.; LÓPEZ-RUBIO, A. Encapsulation of folic acid in food hydrocolloids through nanospray drying and electrospraying for nutraceutical applications. **Food Chemistry**, v.168, n.1, p.124–133, 2015.
- PILLAY, V.; DOTT, C.; CHOONARA, Y.E.; TYAGI, C.; TOMAR, L.; KUMAR, P.; DU TOIT, L.C.; NDESENDO, V.M.K. A review of the effect of processing variables on the fabrication of electrospun nanofibers for drug delivery applications. **Journal Nanomaterials**, p. 1-22, 2013.
- PRASANNA, B. M.; VASAL, S. K.; KASSAHUN, B.; SINGH, N. N. Quality protein maize. **Current Science**, v. 81, n. 10, p. 1308-1319, 2001.
- RENEKER, D. H.; CHUN, I. Nanometre diameter fibres of polymer produced by electrospinning. **Nanotechnology**, v. 7, p. 216–223, 1996.
- ROURE, M. C. El déficit de ácido fólico. **Formación Médica Continuada em Atención Primaria**, v. 17, n. 2, p. 94-100, 2010.
- SANTOS, L. M. P.; PEREIRA, M. Z. Efeito da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural. **Caderno de Saúde Pública**, n. 23, n. 1, p. 17-24, 2007.
- SCOTT, J.; REBEILL, F.; FLETCHER, J. Review: folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, n.7, p. 795-824, 2000.
- SELLING, G.W.; BISWAS, A.; PATEL, A.; WALLS, D.J.; DUNLAP, C.; WEI, Y. Impact of solvent on electrospinning of zein and analysis of resulting fibers. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 208, p. 1002-1010, 2007.
- SHEN, X.; YU, D.; ZHU, L.; BRANFORD-WHITE, C.; WHITE, K.; CHATTERTON, N. P. Electrospun diclofenac sodium loaded Eudragit\_ L 100–55 nanofibers for colontargeted drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408, p. 200–207, 2011.
- SHRESTHA, A. K.; ARCOT, J.; YULIANI, S. Susceptibility of 5-methyltetrahydrofolic acid to heat and microencapsulation to enhance its stability during extrusion processing. **Food Chemistry**, v. 130, n.1, p.291-298, 2012.
- SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products**, v. 13, n. 3, p. 171-192, 2001.

- SILL, T.J.; VON RECUM, H.A. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. **Biomaterials**, v. 29, n.13, p. 1989– 2006, 2008.
- SNOWDON, D. A.; TULLY, C. L.; SMITH, C. D.; RILEY, K. P.; MARKESBERY, W. R. Serum folate and the severity of atrophy of the neocortex in Alzheimer disease: findings from the Nun study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n.4, p. 993-998. 2000.
- SOEIRO, B. T.; BOEN, T. R.; PEREIRA FILHO, E. R. ; LIMA- PALLONE , J. A. Investigação da qualidade de farinhas enriquecidas utilizando análise por componentes principais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 618-624, 2010.
- STAM, F.; SMULDERS, Y.M.; van GULDENER, C.; STEHOUWER, C.D.; de MEER, K. Folic acid treatment increases homocysteine remethylation and methionine transmethylation in healthy subjects. **Clinical Science**, v. 108, n.5, p. 449-456.
- SUDIMACK, J.; LEE, R. J. Targeted drug delivery via the folate receptor. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.41, n.2, p. 147–162, 2000.
- THERANI, A. H.; ZADHOUSH, A.; KARBASI, S.; KHORASANI, S. N. Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of poly(3 hydroxybutyrate) scaffolds: structural characteristics. **Journal of Applied Polymer Science**, v.18. n.5, p. 2682-2689, 2010.
- THOMAS, A. H.; SUAREZ, G.; CABRERIZO, F. M.; MARTINO, R.; CAPPARELLI, A. L. Study of the photolysis of folic acid and 6-formylpterin in acid aqueous solutions. **Journal of Photochemistry and Photobiology Chemistry**, v. 135, n.2 p. 147-154, 2000.
- TORRES-GINER, S.; MARTINEZ-ABAD, A.; OCIO, M. J.; LAGARON, J. M. Stabilization of a nutraceutical Omega-3 fatty acid by encapsulation in ultrathin electrospayed zein prolamine. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 6, p. 69-79, 2010.
- VORA, A.; RIGA, A.; DOLLIMORE, D.; ALEXANDER, K.S. Thermal stability of folic acid. **Thermochimica Acta**, v. 392, n. 15, p. 209–220, 2002.
- WALS, P.D.; TAIROU, F.; ALLEN, V.M.I.; UH, S.H.; LOWRY, R.B.; SIBBALD, B.; EVANS, J.A.; HOF, M.C.V.D.; ZIMMER, P.; CROWLEY, M.H.S.A.; FERNANDEZ,

- M.; LEE, B.; NIYONSENGA, N.S.T. Reduction in neural-tube defects after folic acid fortification in Canada. **Journal Medicine**, v. 357, p.135–142, 2007.
- WANAT, S.; BRAZIER, M.; BOITTE, F.; LEMAY, C. Études concentrations sériques en vitamines B9 et B12 dans une population de femmes ayant porté un fœtus atteint de malformation du tube neural. **Immuno-analyse & Biologie spécialisée**, n. 20, p. 28–31, 2005.
- WANG, T.; KUMAR, S. Electrospinning of polyacrylonitrile nanofibers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 102, n. 2, p. 1023–1029, 2006.
- WEN, H. F.; YANG, C.; YU, D. G.; LI, X. Y.; ZHANG, D. F. Electrospun zein nanoribbons for treatment of lead-contained Wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 290, p. 263–272, 2016.
- WONGSASULAK, S.; PATHUMBAN, S.; YOOVIDHYA, T. Effect of entrapped  $\alpha$ -tocopherol on mucoadhesivity and evaluation of the release, degradation, and swelling characteristics of zein-chitosan composite electrospun fibers. **Journal of Food Engineering**, v. 120, p.110-117, 2014.
- YAKUBU, S.; MUAZU, J. Effects of variables on degradation of folic acid. **Pharmacia Sinica**, v.1, n. 3, p. 55–58, 2010.
- YANG, J.-M.; ZHA, L.-S.; YU, D.-G.; LIU, J. Coaxial electrospinning with acetic acid for preparing ferulic acid/zein composite fibers with improved drug release profiles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 737-743, 2013.
- YUAN, X.; ZHANG, Y.; DONG, C.; SHENG, J. Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning. **Polymer International**, v. 53, n. 11, p. 1704-1710, 2004.
- ZONG, X.; KIM, K.; FANG, D.; RAN, S.; HSIAO, B.S.; CHU, B. Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. **Polymer**, v. 43, n. 16, p. 4403–4412, 2002.
- ZUSSMAN, E. Encapsulation of cells within electrospun fibers. **Polymers for Advanced Technologies**, v.22, n. 1, p. 366-371, 2011.