UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

NADIA OBROWNICK OKAMOTO SCHALCH

Associação de nanocelulose e nanopartícula de quitosana na estabilização de ácido fólico (vitamina B9)

Pirassununga
2019

NADIA OBROWNICK OKAMOTO SCHALCH

Associação de nanocelulose e nanopartícula de quitosana na estabilização de ácido fólico (vitamina B9)

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre do programa de Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais.

Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais Voltados à Agroindústria.

Orientadora: Profa. Dra. Milena Martelli Tosi

Pirassununga

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O041a Obrownick Okamoto Schalch, Nadia
Associação de nanocelulose e nanopartícula de quitosana na estabilização de ácido fólico (vitamina B9) / Nadia Obrownick Okamoto Schalch ; orientadora Milena Martelli Tosi. -- Pirassununga, 2019.
79 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. nanopartícula. 2. nanocelulose. 3. quitosana. 4. ácido fólico. 5. encapsulação. I. Martelli Tosi, Milena, orient. II. Título.

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - o autor

Universidade de São Paulo

ATA DE DEFESA

Ata de defesa de Dissertação do(a) Senhor(a) Nadia Obrownick Okamoto Schalch no Programa: Engenharia e Ciência de Materiais, do(a) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

Aos 23 dias do mês de agosto de 2019, no(a) Sala ZEB 1 realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Nadia Obrownick Okamoto Schalch, apresentada para a obtenção do título de Mestra intitulada:

"Associação de nanocelulose e nanopartícula de quitosana na estabilização de ácido fólico (vitamina B9)"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Milena Martelli Tosi	Presidente	FZEA - USP	Não Votante
Alessandra Lopes de Oliveira	Titular	FZEA - USP	Aprovado
Gustavo Cesar Dacanal	Titular	FZEA - USP	APROVADA
Ana Carla Kawazoe Sato	Suplente	UNICAMP - Externo	Aprovada

Resultado Final: APROVADA

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Erica Cristina Mello Ferraz _____, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). Pirassununga, aos 23 dias do mês de agosto de 2019.

Alessandra Lopes de Oliveira

Gustavo Cesar Dacanal

Ana Carla Kawazoe Sato

Milena Martelli Tosi
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em 27.08.2019 e, portanto, o(a) aluno(a) _____ jus ao título de Mestra em Ciências obtido no Programa Engenharia e Ciência de Materiais - Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais voltados à Agroindústria.

Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Profª. Drª. Rosemary Aparecida de Carvalho
Presidente da Comissão de
Pós-Graduação
FZEA/USP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu marido, Fernando, que me incentivou e sempre me apoiou. Dedico também aos meus filhos, Cadu e Maria, que compreenderam minha ausência para que este trabalho pudesse ser realizado.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, não posso deixar de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Milena Martelli Tosi, por ser a maior incentivadora desse trabalho, por toda paciência, pelo tempo dedicado e pela orientação prática e teórica neste trabalho. Muito obrigada por ter corrigido meus erros quando necessário sem nunca desmotivar.

Aos meus pais, irmãs e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa. Agradeço, especialmente ao meu marido e meus filhos.

Agradeço a todos os meus colegas do curso de pós-graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, do Laboratório de Encapsulação e Alimentos Funcionais, em especial ao Especialista de Laboratório Marcelo Thomazini.

Desejo agradecer também a todos os meus colegas de graduação do curso de Engenharia de Alimentos, especialmente à Gabriela Brandão Lins e Sabrina Guarda Botelho Pinho por terem ajudado na realização deste trabalho.

Ao Odílio Benedito Garrido de Assis, pela disposição em ajudar e pelos ensinamentos.

À Tais Téo Barros Alexandrino, obrigada pelo auxílio nas análises de caracterização.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), com a concessão da bolsa emergencial de mestrado.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

RESUMO

OKAMOTO-SCHALCH, N. O. **Associação de nanocelulose e nanopartícula de quitosana na estabilização de ácido fólico (vitamina B9).** 2019. 80p – Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

As micro/nanopartículas de quitosana (NQ) vêm sendo amplamente estudadas como agentes encapsulantes de vitaminas, produzidos principalmente pelo método de geleificação iônica com adição de poliânion tripolifosfato de sódio (TPP). Já as nanoceluloses (NC) são utilizadas essencialmente como polímeros de reforço em matrizes biodegradáveis ou estabilizantes de emulsões. A associação destes polímeros ainda não foi estudada e pode ser interessante, visto que NQ são essencialmente catiônicas em meio aquoso ácido e NC são essencialmente aniônicas, características que devem mudar consideravelmente o comportamento dos ativos nelas veiculados. Assim, este trabalho tem como principal objetivo produzir e caracterizar sistemas híbridos nano/micropoliméricos de NQ e NC (quitosana e celulose) como veiculadores ácido fólico (AF) também conhecido como vitamina B_9 e avaliar sua estabilidade (tempo, temperatura e luz) e liberação em pHs ácido e básico. Inicialmente, foram produzidas NC por hidrólise química com H_2SO_4 64% (v/v) a partir de vagem de soja pré-tratada. A suspensão de NC produzida foi utilizada no preparo dos sistemas híbridos NC-NQ por dois métodos: (i) Método A: AF e NC foram adicionados na solução de quitosana e, posteriormente, foi gotejado o TPP para produção das cápsulas, e (ii) Método B: AF e NC foram adicionados na solução TPP e, posteriormente, esta mistura foi gotejada na solução de quitosana para produção das cápsulas. A estabilidade do AF foi avaliada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em amostras expostas ou não à luz ambiente, por 45 dias, e em amostras submetidas ao processamento térmico (até 100°C por 30 min). Enquanto, por Espectroscopia UV-Vis foi determinado o perfil liberação controlada em pH 7,4 e 3 e a estabilidade quando submetidas à radiação ultravioleta (1-4h). As micro/nanopartículas foram caracterizadas quanto ao potencial zeta, tamanho de partícula, microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia no infravermelho e estabilidade térmica. A quantificação de AF por CLAE permitiu concluir que as partículas encapsuladas em NQ apresentaram maior estabilidade, independente da presença de NC. Ou seja, não foi evidenciado um efeito positivo na estabilidade da vitamina em função do tempo pela inclusão de NC na suspensão. Os sistemas híbridos foram capazes de liberar uma maior quantidade de vitamina das partículas, seja em pH

3,0 ou 7,4. E a presença de NC aumentou a proteção do AF contra a degradação pela luz ultravioleta, provavelmente devido à capacidade de dispersão de luz das nanoceluloses. Tanto a morfologia quanto os resultados de ATR-FTIR indicam possível interação físico-química entre estes materiais, embora fracas. A relevância deste trabalho está baseada na importância do melhor entendimento destes materiais para possíveis aplicações tecnológicas.

Palavras-Chave: quitosana, nanocelulose, ácido fólico, encapsulação

ABSTRACT

OKAMOTO-SCHALCH, N. O. **Association of nanocellulose and chitosan nanoparticle in the stabilization of folic acid (vitamin B9).** 2019. 80p – Dissertation (Master) – School of animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2019.

Chitosan micro/nanoparticles (NQ) have been widely studied as vitamin encapsulating agents, mainly produced by the ionic gelation method with the polyanion sodium tripolyphosphate (TPP) as a cross-linker. In contrast, nanocelluloses (NC) are used essentially as reinforcing fillers in biodegradable matrices or emulsion stabilizers. The association of these polymers were no evidenced in the literature and may be interesting, since NQ are essentially cationic in acid aqueous solution, and MC are essentially anionic. These features should change significantly the biological behavior of the encapsulated active compounds. Therefore, the aim of the present study was to produce and characterize the preparation of nano/micropolymer systems (chitosan and cellulose) as carriers of folic acid (AF), known as vitamin B_9, and evaluate its stability (time, temperature and light) and release at acidic and basic pHs. Initially, NC has been produced by chemical hydrolysis with 64% (v/v) H_2SO_4 from pretreated soybean pods. The NC suspension produced was used in the preparation of the NC-NQ hybrid systems by two methodologies: (i) Method A: AF and NC were added to the chitosan solution before dripping TPP solution for the capsule production, and (ii) Method B: AF and NC were added to the TPP solution and subsequently this mixture was dripped into the chitosan solution to produce the capsules. The AF stability was evaluated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), in samples exposed or not to ambient light, for 45 days, and in samples submitted to thermal processing (up to 100°C for 30 min). While, UV-Vis Spectroscopy determined the controlled release profile at 7.4 and 3 pH and stability when subjected to ultraviolet radiation (1-4h). Micro/nanoparticles were characterized for zeta potential, particle size, scanning electron microscopy, infrared spectroscopy and thermal stability. The quantification of FA by HPLC was improved and allowed to conclude that the encapsulated AF in NQ presented greater stability, regardless of the presence of NC. That is, a positive effect on vitamin stability was not evidenced by the inclusion of NC in the suspension as a function of time. Hybrid systems were able to release a greater amount of vitamin from the particles, either at pH 3.0 or 7.4. And the presence of NC in the sample NQ-NC-AF increased the protection of the AF against the degradation of ultraviolet light, probably due to the ability of light scattering of nanocelluloses. However, both the morphology and the results of ATR-FTIR indicate possible physical-

chemical interaction between these materials, although weak. The relevance of this study is based on the importance of better understanding the material interactions for improving technological applications.

Keywords: chitosan, nanocellulose, acid folic, encapsulation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do ácido fólico. 17
Figura 2. (A) Modelo de geleificação da quitosana e TPP por interação entre grupos iônicos e catiônicos; (B) Nanopartículas de quitosana TPP formadas por geleificação. 22
Figura 3. Nanocelulose obtidas a partir da palha de soja mercerizada por hidrólise (A) enzimática ou (B) ácida. 29
Figura 4. Esquema da produção das amostras contendo solução de quitosana, solução de TPP, solução de ácido fólico pelo método A (A) e procedimento realizado pelo método A (B). 33
Figura 5. Esquema da produção das amostras contendo solução de quitosana, solução de TPP, solução de ácido fólico pelo método B (A) e procedimento realizado pelo método B (B). 34
Figura 6. Vagem de soja pré-tratada ou mercerizada. 35
Figura 7. Esquema da produção das amostras contendo solução de quitosana, solução de TPP, suspensão de nanocelulose e solução de ácido fólico pelo método A. 36
Figura 8. Esquema da produção das amostras contendo solução de quitosana, solução de TPP, suspensão de nanofibra e solução de ácido fólico pelo método B. 37
Figura 9. Esquema da produção das amostras contendo solução de quitosana, suspensão de nanofibras e solução de ácido fólico pelo método A. 38
Figura 10. Esquema da produção das amostras contendo solução de quitosana, suspensão de nanofibra e solução de ácido fólico pelo método B. 38
Figura 11. Imagem tirada logo após a produção das amostras contendo AF. 46
Figura 12. Micrografias das partículas sem AF: (A) nanocelulose - NC, (B) micro/nanopartículas de quitosana – NQ, e (C) micro/nanopartículas de quitosana com nanocelulose – NQ-NC. 48
Figura 13. Micrografias das partículas contendo AF: nano/micropartículas de quitosana com AF obtidas pelo método A (A) e pelo método B (B); nano/micropartículas de quitosana com nanocelulose e AF obtidas pelo método A (C) e pelo método B (D), destacadas na figura. 50
Figura 14. Curva padrão do ácido fólico obtido por CLAE. 54
Figura 15. Quantificação de AF por CLAE utilizando primeira metodologia de extração testada. 55
Figura 16. Quantificação de AF por CLAE nas amostras com proteção à luz ambiente no período de 45 dias. 57
Figura 17. Quantificação de AF por CLAE nas amostras sem proteção à luz no período de 45 dias. 58

Figura 18. Quantificação de AF contido nas amostras em função da temperatura: temperatura ambiente, 40, 60, 80, e 100 °C. 59
Figura 19. Espectros de infravermelho das amostras liofilizadas contendo ou não ácido fólico. 61
Figura 20. Termogramas das amostras com AF. 62
Figura 21. Imagens das amostras contendo AF nas concentrações de 0,03; 0,05 e 0,08% após a centrifugação. 63
Figura 22. Curva padrão do ácido fólico obtido por espectroscopia no UV. 64
Figura 23. Espectro UV-Vis das soluções contendo AF utilizado para o cálculo da EE%. 65
Figura 24. Curva de degradação do AF em diferentes pHs. 67
Figura 25. Perfil de liberação controlada das amostras NQ-AF e NQ-NC-AF em pH 3 (A) e em pH 7,4 (B). 68
Figura 26. Esquema de interação entre a nanopartícula de quitosana produzida por geleificação iônica e nanocelulose na estabilização de ácido fólico. 68
Figura 27. Estabilidade do ácido fólico em função da radiação ultravioleta nas amostras NQ-AF e NQ-NC-AF. 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Recomendação diária de ingestão de vitaminas. 18
Tabela 2. Estudos realizados com encapsulação de ácido fólico. 20
Tabela 3. Estudos realizados com encapsulação de compostos ativos utilizando quitosana e TPP por geleificação iônica. 25
Tabela 4. Produção de nanocelulose a partir de resíduos agroindustriais. 27
Tabela 5. Concentração das soluções utilizadas no preparo das amostras e seus respectivos pHs. 32
Tabela 6. Amostras produzidas e suas composições. 39
Tabela 7. Diâmetro médio e índice de polidispersão (IP) das partículas obtidos por espalhamento de luz dinâmico e potencial Zeta (mV) das suspensões. 51
Tabela 8. Áreas encontradas e suas concentrações de AF para construção da curva padrão. .. 53
Tabela 9. Quantificação de AF utilizando a extração com NaOH e tampão. 55
Tabela 10. Eficiência de encapsulação das amostras. 56
Tabela 11. Concentrações e absorbâncias encontradas para construção da curva padrão do AF no espectrofotômetro, em triplicata. 64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14

2. REVISÃO DE LITERATURA 17

2.1. Ácido Fólico 17

2.2. Nanopartículas de quitosana 21

2.3. Nanocelulose 26

3. OBJETIVOS 30

4. MATERIAL E MÉTODOS 31

4.1. Material 31

4.2. Métodos 31

4.2.1. Produção de partículas / suspensões 31

4.2.1.1 Produção das soluções de quitosana, de TPP e de ácido fólico 31

4.2.1.2 Produção das suspensões de quitosana e ácido fólico 32

4.2.1.3 Produção de micro/nanopartículas quitosana e ácido fólico 32

4.2.1.4 Produção de microcompósitos contendo micro/nanocelulose, micro/nanopartículas de quitosana e ácido fólico 34

4.2.1.5 Produção de quitosana, micro/nanofibras de celulose e ácido fólico 37

4.2.1.6 Produção das soluções de quitosana, de micro/nanofibras e de ácido fólico 39

4.2.2. Caracterização física e química das suspensões contendo micro/nanopartículas. 39

4.2.2.1 Microscopia eletrônica de varredura 39

4.2.2.2 Tamanho de partícula por Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial Zeta 40

4.2.2.3 Espectroscopia no Infravermelho (ATR-FTIR) 40

4.2.2.4 Análise termogravimétrica (TGA) 41

4.2.3. Quantificação de ácido fólico 41

4.2.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência 41

4.2.3.2 Espectrofotometria UV-Vis 42

4.2.4. Avaliação da estabilidade do AF 43

4.2.4.1 Estabilidade em função do tempo e da luz 43

4.2.4.2 Estabilidade em função da temperatura 43

4.2.4.3 Estabilidade em função da radiação ultravioleta 44

4.2.5. Liberação *in vitro* 44

4.2.6. Análise Estatística 44

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 46
5.1. Escolha do método de produção de sistema polimérico a base de NQ e NC para encapsulação de ácido fólico 46
5.1.1. Microscopia eletrônica de varredura 47
5.1.2. Tamanho de partícula por Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial Zeta 50
5.1.3. Estabilidade do ácido fólico por CLAE 53
5.1.3.1. Padronização externa do ácido fólico por CLAE 53
5.1.3.2. Teste para quantificação de AF 54
5.1.3.3. Estabilidade do ácido fólico em função do tempo e luminosidade 56
5.1.3.4. Estabilidade do ácido fólico em função da temperatura 58
5.2. Caracterização por ATR-FTIR 59
5.3. Análise termogravimétrica (TGA) 62
5.2. Quantificação de ácido fólico por Espectrometria UV-Vis 63
5.3.1. Padronização externa da ácido fólico 64
5.3.2. Eficiência de encapsulação 65
5.3.3. Estabilidade do ácido fólico em função do pH (perfil de liberação controlada) .. 66
5.3.4. Estabilidade do ácido fólico em função da radiação ultravioleta UV 69
6. CONCLUSÕES 71
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 73

1. INTRODUÇÃO

A encapsulação é empregada para elaboração de cápsulas contendo compostos ativos onde há o empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos, as quais podem liberar o conteúdo de forma controlada e sob condições específicas. As cápsulas aumentam a estabilidade, possibilitam a liberação controlada do ativo, reduzem a volatilidade e a reatividade (FAVARO-TRINDADE; PINHO, 2008).

O ácido fólico (ácido pteroil-L-glutâmico) (AF), também conchecido como vitamina B_9, é um micronutriente essencial para a alimentação que não pode ser sintetizado pelos humanos, sendo uma vitamina solúvel em água. Esta vitamina pode ser encontrada principalmente em fígados, vegetais com folhas verde-escuras, como espinafre e brócolis, lentilhas, dentre outros (DEMAN, 1999). Comercialmente, o AF é composto de folatos, um grupo de compostos com funcionalidade vitamínica. Este composto é importante na suplementação de gestantes para prevenir defeitos do tubo neural em doses efetivas (WLODARCZYK et al., 2006). No entanto, o AF pode degradar quando exposto a fatores externos (luz, calor, oxigênio, pH, concentração ou solução alcalina e luz UV) e, portanto, pode ser encapsulado para melhorar a estabilidade e garantir a biodisponibilidade (GAZZALI et al., 2016; PÉREZ-MASIÁ et al., 2015). Em geral, o pH baixo e os raios de luz UV são os principais responsáveis pela degradação do AF e as condições limitantes para seu processamento (GAZZALI et al., 2016).

A quitosana é um polissacarídeo catiônico, altamente organizado, composto por unidades de glucosamina (β-(1-4)- 2-amino-2-desoxi-D-glicose e β-(1-4)-2-acetamida2-desoxi-D-glicose) e obtido por meio da desacetilação da quitina em meio alcalino (KUMAR et al., 2004). A quitina, por sua vez, constitui a parede celular dos fungos, o exoesqueleto dos artrópodes, como os crustáceos e os insetos. Este polímero tem como principais características a insolubilidade em meio aquoso e solventes orgânicos, as propriedades antibacterianas, a biodegradabilidade e a baixa toxicidade (DEVI; DUTTA, 2017). As nanopartículas de quitosana (NQ) podem ser obtidas por meio de geleificação iônica com tripolifosfato de sódio(TPP), onde o TPP promove a coagulação da solução, pois os grupos amino (cátions) da quitosana ligam-se aos fosfatos (ânions) do TPP (JANES; ALONSO, 2003). Elas também podem ser produzidas através da polimerização em molde pela adição de ácido metacrílico, onde ocorre a protonação dos grupos NH_2 da quitosana (MOURA; AOUADA; MATTOSO, 2008).

As vitaminas C, B_9 e B_{12} foram encapsuladas com quitosana preparadas tanto por geleificação iônica quanto por polimerização em molde (BRITTO et al., 2012, 2014). Foi observado que o método de geleificação iônica foi capaz de produzir nanopartículas mais estáveis. O diâmetro das partículas variou de acordo com a vitamina, sendo que as partículas contendo vitamina B_9 foram maiores (809 nm) que as demais (325 nm), e maiores quando comparadas com o controle NQ (150 nm). A encapsulação das vitaminas depende tanto da estrutura das nanopartículas, quanto da solubilidade das vitaminas, sendo que a vitamina B_9 é praticamente insolúvel em meio ácido, o que justifica o maior tamanho das partículas (BRITTO et al., 2012).

Outro carreador de compostos ativos importante é a celulose. Esta, por sua vez, é o polissacarídeo mais abundante do planeta, sendo o constituinte principal da parede das células vegetais. A estrutura da celulose é composta por duas moléculas de glicose eterificadas por ligações β-1,4-glicosídicas (DAMODARAN; FENNEMA, 2008). Na parede celular dos vegetais, as microfibrilas de celulose são agrupadas por hemiceluloses, sendo posteriormente circundadas em uma matriz de hemiceluloses e lignina (associadas por meio de interações físicas e ligações covalentes). A partir dessas interações, sucessivas estruturas são formadas, dando origem à parede celular das fibras. As moléculas de celulose se agregam na forma de microfibrilas na qual regiões altamente ordenadas (cristalinas) se alternam com regiões menos ordenadas (amorfas) (ANSELL; MWAIKAMBO, 2009). Como consequência dessa estrutura fibrosa, a celulose possui alta resistência à tração e é insolúvel na maioria dos solventes.

Suspensões de nanocelulose têm sido obtidas a partir de diversas fontes lignocelulósicas (KARGARZADEH et al., 2017b), dentre elas a palha da soja mercerizada (MARTELLI-TOSI et al., 2017b, 2018). A produção de grãos de soja, chegou a 96,3 milhões de toneladas em 2016 (FAOSTAT, 2018), sendo que a palha corresponde a 1,2 a 1,5 vezes a quantidade de grãos (BOSE; MARTINS FILHO, 1984) e normalmente é descartada na lavoura durante a colheita. A palha de soja consiste uma importante fonte de material lignocelulósico (biomassa) com 35% de celulose, 21% lignina insolúvel em ácido, 17% de hemiceluloses, 11% de cinzas, 1% lignina solúvel e outros constituintes como proteínas, pectina e substitutos do ácido glucurônico (CABRERA et al., 2015; MARTELLI-TOSI et al., 2017a; WAN; ZHOU; LI, 2011), que variam de acordo com o genótipo da planta (ALEMDAR; SAIN, 2008). NC também têm sido utilizados como sistemas veiculadores de fármacos (AKHLAGHI et al., 2014; CHAUHAN; YAN, 2015; JACKSON et al., 2011; KOLAKOVIC et al., 2012; QING et al., 2016). Os grupos hidroxilas (OH) da superfície de NC são capazes de se ligar aos grupos hidrofóbicos ou não ionizados de outros compostos. Além disso, NCs obtidas por hidrólise com ácido sulfúrico apresentam grupos OSO^{3-} que caracterizam o caráter aniônico dessas partículas.

Outras propriedades desejáveis das NCs para serem usadas como carreadores são: razão de aspecto (comprimento/diâmetro) e grande superfície de contato. Géis ou filmes de nanocelulose foram utilizados como matrizes carreadoras de medicamentos insolúveis em água através da adsorção destas substâncias na matriz fibrosa (KOLAKOVIC et al., 2012).

A hipótese deste trabalho é que o sistema híbrido associando NQ e NC aumenta a estabilidade e possibilita a liberação controlada do ativo.

Até o presente, não há relatos sobre o estudo da associação de NQ e NC para estabilização de compostos ativos. Assim, este trabalho tem como principal objetivo um estudo exploratório para verificar a associação destes polímeros e sua ação na estabilidade de ácido fólico. As micro/nanopartículas foram caracterizadas quanto ao potencial zeta, tamanho de partícula, microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia no infravermelho e estabilidade térmica. As amostras produzidas com ácido fólico foram avaliadas quanto ao seu perfil de liberação controlada e à degradação na luz ultravioleta.

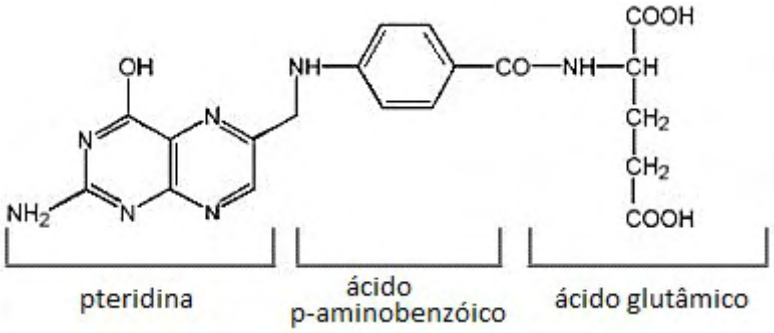
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ácido Fólico

As vitaminas são normalmente divididas em duas classes: as lipossolúveis, tais como A (retinol), D_2 (ergocalciferol), D_3 (colecalciferol), E (α-tocoferol) e K_1 (filoquinona) e as hidrossolúveis, tais como B_1 (tiamina), B_2 (riboflavina), B_3 (niacina), B_5 (ácido pantatênico), B_6 (piridoxina), B_7 (biotina), B_9 (ácido fólico), B_{12} (cobalamina) e C (ácido ascórbico) (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009). A recomendação diária de vitamina varia de acordo com a idade e são apresentados na Tabela 1. Para crianças (1-4 anos), recomenda-se 200 mg de AF diariamente e para idades superiores a 10 anos, a recomendação é o dobro, enquanto para gestantes ou lactantes, o triplo.

Neste trabalho, optou-se por estudar a encapsulação de uma das vitaminas hidrossolúveis: o ácido fólico (ácido pteroil-L-glutâmico) também conhecida como vitamina B_9, visto que é um micronutriente essencial para a alimentação que não pode ser sintetizado pelos humanos. A estrutura química do AF está apresentada na Figura 1. O derivado tetrahidrofolato do ácido fólico é o cofator de enzimas que quebra as unidades de carbono em vários estados oxidativos, como resíduos de grupos aldeídos ou hidroximetilas. A degradação térmica ocorre pela clivagem das moléculas de folato devido à perda de porções de ácido glutâmico. Neste processo, os folatos (uma mistura de tetrahidrofolatos de poliglutamil e resíduos de glutamato) são divididos entre a ligação C-9 e N-10, produzindo compostos de pteridina e p-aminobenzoilglutamato que não possuem atividade biológica (JANENICKE, 1970).

Figura 1. Estrutura química do ácido fólico.



Fonte: Adaptado de MATTOS, D. L. C. et al. Quim. Nova,. v. 34, n. 2, p. 335–340, 2011.

Tabela 1. Recomendação diária de ingestão de vitaminas.

Idade	A (mg Retinol)	D (µg)	E (mg)	C (mg)	B_1 (mg)	B_2 (mg)	B_3 (µg)	B_6 (µg)	B_7 (µg)	B_9 (µg)	B_{12} (µg)
<1	0,5-0,6	10	3-4	50-55	0,2-0,4	0,3	2-5	0,1-0,3	5-10	60-80	0,4-0,8
1-4	0,6	5	6	60	0,6	0,7	7	0,4	10-15	200	1,0
4-10	0,7-0,8	5	8-10	70-80	0,8-1,0	0,9-1,1	10-12	0,5-0,7	15-20	300	1,5-1,8
10-15	0,9-1,1	5	10-14	90-100	1,0-1,3	1,2-1,6	13-18	1,0-1,4	20-35	400	2,0-3,0
15-25	0,9-1,1	5	15	100	1,0-1,3	1,2-1,5	13-17	1,2-1,6	30-60	400	3,0
25-51	0,8-1,0	5	14	100	1,0-1,2	1,2-1,4	13-16	1,2-1,5	30-60	400	3,0
52-65	0,8-1,0	5	13	100	1,0-1,1	1,2-1,3	13-15	1,2-1,5	30-60	400	3,0
>65	0,8-1,0	10	12	100	1,0	1,2	13	1,2-1,4	30-60	400	3,0
Mulher grávida	1,1	5	13	100	1,2	1,5	15	1,9	30-60	600	3,5
Mulher lactante	1,5	5	17	150	1,4	1,6	17	1,9	30-60	600	4,0

Adaptado de BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. FOOD CHEMISTRY. [s.l.] Springer, 2009.

O ácido fólico permite que o corpo execute muitas funções essenciais, incluindo a prevenção de deformidades fetais principalmente na formação do tubo neural, sendo, portanto, extremamente indicado para mulheres grávidas (WLODARCZYK et al., 2006). Também desempenha papel importante no metabolismo de diversos aminoácidos, portanto sendo fundamental na síntese de DNA (VANNUCCHI; MONTEIRO, 2010).

Por não ser sintetizado pelo organismo, a deficiência de folato pode ocorrer de diversas formas: ingestão alimentar insuficiente, falhas na absorção e aumento na necessidade e na excreção (VANNUCCHI; MONTEIRO, 2010). Nos alimentos, a ocorrência das vitaminas está principalmente relacionada com sua solubilidade. As principais fontes de AF são: vegetais escuros, fígados, lentilhas, dentre outros (DEMAN, 1999). No entanto, sabe-se que o AF é geralmente instável e diferentes fatores estão associados a esse fenômeno. Cinco fatores podem degradar o AF: a luz, calor, oxigênio, pH e a concentração. O AF possui estabilidade em temperaturas amenas, pH entre 8 e 10 (LIANG; ZHAO; HAO, 2013) e baixa estabilidade na presença da luz UV A e UV B (GAZZALI et al., 2016; PÉREZ-MASIÁ et al., 2015). Estudos mostram que a radiação UV é capaz de degradar o AF, produzindo o ácido pterina-6-carboxílico e o ácido p-aminobenzoil-1-glutâmico (AKHTAR; KHAN; AHMAD, 2003). Akhtar, Khan e Ahmad (2003) estudaram a fotodegradação do ácido fólico em diferentes pHs. A concentração de AF inicial era de $5{,}00 \times 10^5$ M e chegou a $3{,}63 \times 10^5$ M em 5 horas de exposição à radiação UV e pH de 5,5. Eles também estudaram o perfil da taxa de pH e demonstraram que o AF em meio ácido é altamente suscetível à fotólise. Off et al. (2005) também estudaram a fotodegradação do ácido fólico e quando exposto à radiação UV, e observaram que seu espectro de absorção muda. A absorbância nos comprimentos de onda menores (<270 nm) aumenta, enquanto o pico de absorção em 280 nm e o ombro em 300 nm diminuem. O pico a 350 nm é desviado para comprimentos de onda mais longos após 20 minutos de exposição aos raios UV. Após 40 min este pico é deslocado para comprimentos de onda menores, indicando que a fotodegradação do AF é um processo de duas etapas e que um fotoproduto intermediário é formado.

Neste contexto, a encapsulação é uma alternativa promissora para melhorar a estabilidade e assegurar a atividade biológica do AF e viabilizar sua aplicação em alimentos e fármacos. Pesquisadores tem investigado várias metodologias para encapsular este micronutriente. A Tabela 2 apresenta resumidamente os estudos que foram realizados encapsulando o ácido fólico, o material utilizado, a concentração de AF e a eficiência de encapsulação obtido.

Pérez-Masiá et al. (2015) estudaram a encapsulação de ácido fólico utilizando dois polímeros diferentes: proteína concentrada de soro de leite (WPC) e amido resistente. Eles também utilizaram duas técnicas distintas de produção, uma por *spray drying* e outra por eletropulverização. Verificaram que a eficiência de encapsulação (EE) foi maior para o polímero WPS (83,9 ± 7,8) enquanto o de amido resistente foi de 52,5 ± 7,6 no processo por *spray drying*. Entretanto o processo utilizado não teve efeito significativo na EE. Também foi avaliado a estabilidade durante o armazenamento e observaram que o WPC protegeu o ácido fólico contra a degradação em ambas as situações (solução aquosa e seco). Pelo contrário, as partículas contendo amido resistente diminuíram a estabilidade do ácido fólico quando as cápsulas foram suspensas em solução aquosa.

Tabela 2. Estudos realizados com encapsulação de ácido fólico.

Referência	Material de encapsulação	[AF]	EE (%)
Perez-Masia et al.(2015)	WPS ou amido de milho (spray drying e eletropulverização)	1,5% m/m de polímero	44 a 84
Lopera et al. (2009)	Maltodextrina e goma arábica	3,3% m/m (seco)	88 a 98
Alborzi, Lim e Kakuda (2013)	Alginato e pectina (fibras eletromagnéticas)	9,5 e 16,1 mg/g fibra	-
Aceituno-Medina et al. (2015)	Fibras de amaranto	100 mg/g de biopolímero	95,6 ± 0,2
Britto et al (2014)	Quitosana e trimetil quitosana	15% m/m de quitosana	42,4 a 44,8

Fonte: Própria autoria.

Lopera et al. (2009) utilizaram como materiais encapsulantes a goma arábica e a maltodextrina e a concentração de AF de 1% m/m, sendo após a secagem uma concentração de 1,5 mg de AF em 46 mg de micropartículas (3,3% m/m). Eles estudaram a influência de diferentes proporções dos materiais encapsulantes (100:0, 80:20, 70:30, 50:50 considerando goma arábica: maltodextrina) e encontraram a melhor EE de 97,34% ± 2,43 para a amostra 50:50. Já as amostras 70:30 e 80:20 obtiveram os menores resultados 88,95% ± 1,62 e 88,05% ± 2,29, respectivamente. Quando a goma e a maltodextrina são adicionadas em concentrações semelhantes, há a formação de uma dupla camada, onde o AF é cercado por goma e são penetradas com as pequenas moléculas de maltodextrina, que agem como um aglutinante, formando assim uma dupla parede pouco porosa que favorece o aprisionamento de AF. Entretanto, nas misturas de 70-30 e 80-20, existe uma competição entre a disposição da goma

e a maltodextrina na interface, formando uma camada interna mais fraca que a de 100% goma, e por outro, a quantidade do carboidrato na camada externa não é suficiente para dar origem a uma boa ação de ligação.

Alborzi, Lim e Kakuda (2013) estudaram a encapsulação de AF com o uso de alginato de média viscosidade (MSA) e baixa viscosidade (LSA) e pectina de alta metoxilação (PEO). Os autores observaram que a estabilidade do ácido fólico encapsulado nestas fibras a pH 3 sob condições escuras e claras, em 3% MSA / PEO (70/30) e 5% LSA / PEO (70/30), alcançou cerca de 97% de retenção após 41 dias de armazenamento no escuro. Entretanto, o ácido fólico não encapsulado foi completamente degradado no primeiro dia de armazenamento quando exposto à luz, e no escuro, 8% de ácido fólico não encapsulado não degradou após 1 dia de armazenamento em pH 3. Esses resultados mostraram que essas partículas produzidas são promissoras para proteger ácido fólico em condições de baixo pH na ausência de luz, mas eles forneceram proteção mínima contra a reação de degradação induzida pela luz.

Outro estudo realizado com o AF foi para encapsular com amaranto para fotoproteção do composto ativo (ACEITUNO-MEDINA et al., 2015). Obtiveram EE de 95,6% ± 0,2 e quando exposto aos raios UV, o ácido fólico não protegido foi degradado, o que provocou uma mudança em seu espectro de absorção na região entre 320-370 nm e os máximos de absorção foram deslocados para comprimentos de onda mais curtos (320nm), essas alterações foram observadas após 60 min de exposição a UV em solução de PBS pH 7. Já o AF encapsulado não teve alteração do espectro.

Outra pesquisa realizada com encapsulação de AF (na concentração de 15%) foi utilizando trimetil quitosana (TMC) e quitosana de médio peso molecular por reticulação com TPP (BRITTO et al., 2014). Quando comparado a EE a TMC apresentou 44,8% de eficiência enquanto a quitosana/TPP 42,4%. Também avaliaram a encapsulação com quitosana em outras concentrações de AF, 10% e 5%, e a EE encontrada foi mais baixa (5,7%) na concentração de 5% de AF. Assim, as nanopartículas de quitosana são promissoras para encapsulação de vitaminas, entretanto a eficiência de encapsulação deve ser melhorada.

2.2. Nanopartículas de quitosana

A quitosana (Ch) é um polissacarídeo catiônico composto essencialmente de unidades de glucosamina (poli-(β(1→4)-2-amino-2-deoxi-D-glucopiranose) (Figura 2A) e tem sido bastante estudada devido à sua biodegradabilidade, habilidade em formar filmes, propriedades antifúngicas e antimicrobianas (DEVLIEGHERE; VERMEULEN; DEBEVERE, 2004; DUTTA et al., 2009; NO et al., 2007; VÁSCONEZ et al., 2009). A quitosana é produzida a

partir da desacetilação da quitina, um polissacarídeo natural encontrado principalmente na parede celular dos fungos e no exoesqueleto dos artrópodes, como revisado por Kumar (2000).

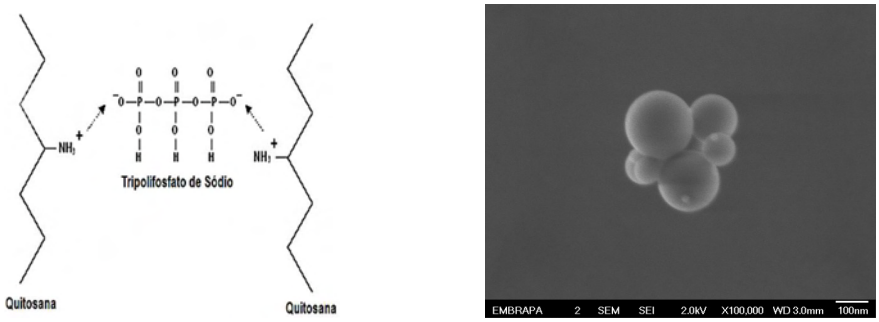
As técnicas de produção de partículas usando quitosana incluem: geleificação iônica, *spray drying*, separação por emulsão de fase, coacervação simples e complexa, recobrimento com solução *coating*, como descrito na revisão de Peniche et al. (2003). A capacidade de geleificação em contato com poliânions específicos consiste em uma propriedade muito interessante da quitosana. Esse processo se deve à formação de reticulação inter e intramolecular mediada por esses poliânions (KUMAR, 2000). A natureza mucoadesiva torna a quitosana uma boa alternativa para prolongar o tempo de permanência e aumentar o tempo de liberação de compostos ativos no trato gastrointestinal. Devido a essa propriedade, a quitosana é usada em produtos de emagrecimento, pois se liga à gordura no trato gastrointestinal (SHAHIDI; ARACHCHI; JEON, 1999). Além disso, a quitosana é insolúvel em pH acima de 6,5. Os grupos aminas são altamente reativos e podem ainda ser modificados (BRITTO et al., 2012).

Nanopartículas de quitosana (NQs) podem ser obtidas por geleificação iônica com tripolifosfato (TPP) de sódio (JANES; ALONSO, 2003) ou por polimerização em molde pela adição de poli(ácido metacrílico) (MOURA; AOUADA; MATTOSO, 2008).

No primeiro caso, o TPP atua como um contra-íon provocando a coagulação da mistura pela formação de ligações intra e intermoleculares entre os fosfatos negativamente carregados do TPP e os grupos amino positivamente carregados da quitosana, segundo o modelo e imagem ilustrativa da Figura 2. É importante ressaltar que as NQs obtidas por geleificação iônica, em baixas concentrações (0,2%, 0,5% e 0,8% m/m), não apresentaram toxicidade em estudos *in vitro* (LIMA et al., 2010).

Figura 2. (A) Modelo de geleificação da quitosana e TPP por interação entre grupos iônicos e catiônicos; (B) Nanopartículas de quitosana TPP formadas por geleificação.

(A) (B)



Fonte: Esquema adaptado e microscopia de nanopartículas de quitosana obtidas por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (Embrapa Instrumentação).

No segundo caso, quando a polimerização começa, ocorre a protonação dos grupos NH_2 da quitosana pelo poli(ácido metacrílico). Segundo Aouada (2009), a propagação das cadeias resulta em um aumento de densidade de carga, de modo que, ao tornar-se crítica, os complexos polieletrólitos insolúveis entre a quitosana e o poli(ácido metacrílico) se formam através de interações eletrostáticas.

A grande variedade de estudos encontrados na literatura mostram o crescente interesse na encapsulação de compostos ativos, tanto compostos hidrofílicos como hidrofóbicos em NQs produzidas por geleificação iônica. O tamanho destas partículas varia consideravelmente de acordo com a concentração de Ch e TPP (CARVALHO et al., 2019; FAN et al., 2012), além de outras variáveis, como velocidade de gotejamento, altura entre gota de TPP e a solução de quitosana, dentre outras (FAN et al., 2012; HASSANI et al., 2015).

Fan et al. (2012) estudaram a produção de nanopartículas de quitosana e TPP utilizando quitosana de baixo peso molecular com alto grau de desacetilação. Os resultados indicaram que o tamanho das partículas aumentou com o aumento da concentração de quitosana ou TPP. Para evitar a formação de micro-partícula, a concentração de quitosana ou TPP deveria ser inferior a 1,5 mg/mL e 1,0 mg/mL, respectivamente. À medida que a concentração de quitosana aumenta (até 2 mg/mL), as moléculas de quitosana se aproximam, formando partículas maiores, mas ainda em nanoescala. Acima desta concentração, verificaram que as micropartículas são facilmente formadas, provavelmente devido à abundância de moléculas de quitosana envolvidas na reticulação de uma única partícula. Eles também avaliaram o aumento do volume de TPP de 2,5 mL para 3,6 mL, com uma solução de 10 mL de quitosana 0,5 mg/mL. O tamanho de partícula diminuiu gradualmente de 172 nm para 133 nm devido ao aumento da reticulação entre Ch e TPP, entre 2,5 mL e 3,3 mL de TPP. Quando o volume aumentou de 3,3 para 3,5 mL, o tamanho das partículas aumentaram drasticamente para 237 nm, pois as moléculas de quitosana estavam reticuladas e o excesso de TPP levaria a formação da partícula com maior número de moléculas de quitosana, resultando em maior tamanho. Já com 3,6 mL de TPP resultou em precipitação de partículas já que a baixa densidade de carga na superfície não foi manteve a estabilidade.

Moura et al. (2009) também estudaram a influência das concentrações de quitosana e TPP nos valores de tamanho das partículas. Um aumento gradual no tamanho das partículas foi observado com o aumento da concentração de Ch e TPP. As nanopartículas com menor tamanho (85 nm) foram obtidas quando foi utilizada a concentração de 2,14 e 0,3 mg/mL de Ch e TPP, respectivamente.

Quando usadas para encapsulação, normalmente as partículas se tornam maiores pois contém o composto ativo encapsulado. A Tabela 3 apresenta os resultados de tamanho de

partícula e EE de alguns estudos realizados com encapsulação por geleificação iônica e as concentrações de quitosana, TPP e ativo que foram utilizadas nesses trabalhos.

Na encapsulação de carvacrol (KEAWCHAOON; YOKSAN, 2011), a EE e o tamanho de partícula variaram com a concentração do ativo. A concentração de quitosana e TPP não mudou, foi de 6 : 0,67 mg/mL, respectivamente. As menores partículas foram as que não continham composto ativo (518,5 nm ± 17,1) e este tamanho foi maior com o aumento da concentração de carvacrol, quando adicionado 1:1,25 de quitosana : carvacrol o diâmetro médio encontrado foi de 716,8 nm ± 56,7. Já a EE variou de 13,6% ± 2,2 à 31,4 % ±1,3, sendo o maior valor encontrado referente à concentração de carvacrol de 1,2% e ao adicionar 1,5%, a EE diminuiu pela limitação de encapsulação.

Britto et al. (2012), estudaram a encapsulação das vitaminas C, B_9 e B_{12} com N, N, N-trimetilquitosana preparada por geleificação iônica. A medição do potencial zeta e a análise do tamanho das partículas demonstraram que o tamanho das nanopartículas, sem as vitaminas, foi otimizado (196,8 nm) quando as menores quantidades de quitosana e TPP foram usadas, ou seja, 0,86 mg mL^{-1} e 0,114 mg mL^{-1}, respectivamente. À medida que as concentrações de quitosana e / ou TPP aumentam, o tamanho resultante das nanopartículas aumentam consideravelmente. Quando as vitaminas (B_9, B_{12} e C) foram testadas como aditivos, e em geral, a incorporação de vitaminas aumentou todos os tamanhos originais de nanopartículas, sendo que carregado com vitamina C o diâmetro máximo foi de 534 nm ± 20. A presença de vitaminas também diminui o potencial zeta, com uma exceção observada quando se usa vitamina C.

Em outra pesquisa, a concentração de quitosana (3 mg/mL) e TPP (0,7 mg/mL) foi fixa (BRITTO et al., 2014). A análise do tamanho das partículas mostrou que, o sistema teve grande variação no tamanho com a quantidade de vitaminas adicionadas: por exemplo, para a vitamina B_9, o tamanho de partícula variou de 150 nm ± 5 a 809 nm ± 150. A EE foi de 42,2%, 31,0% e 5,7% para diferentes concentrações de vitamina: 15%, 10% e 5% de vitamina respectivamente. Além disso, verificou-se diferentes perfis de liberação para as vitaminas C, B_9 e B_{12} em uma solução neutra. A liberação máxima de vitamina C ocorreu após 2 h e com liberação de 36%, já a vitamina B_9 foi com 24 h e com liberação de 52% e a vitamina B_{12} teve liberação de somente 16% com 4 h.

Hosseini et al (2013) também estudaram a liberação controlada do OEO e verificaram que a concentração do ativo influenciou sua taxa de liberação. A nanopartícula com 0,5 mg/mL de OEO liberou cerca de 82% em 3 horas enquanto a amostra com 8,0 mg/mL de OEO liberou 12% no mesmo período.

Tabela 3. Estudos realizados com encapsulação de compostos ativos utilizando quitosana e TPP por geleificação iônica.

Referência	Composto ativo	Composto ativo e concentração (mg/mL)	[Ch] x [TPP] (mg/mL)	Solução onde foi adicionado o composto ativo	Tamanho de partícula (nm)	EE (%)
Britto et al. (2014)	AF	0,225	1,5 x 0,35	TPP	809 ± 150	42,4
Britto et al. (2014)	AF	0,15	1,5 x 0,35	TPP	-	31,0
Britto et al. (2014)	AF	0,075	1,5 x 0,35	TPP	-	5,7
Britto et al. (2014)	AF	0,225	1,0 (Ch modificada) x 0,30	TPP	606 ± 10	44,8
Britto et al. (2014)	Vitamina C	0,225	1,5 x 0,67	TPP	325 ± 24	17,1
Britto et al. (2014)	Vitamina C	0,15	1,5 x 0,67	TPP	-	28,0
Britto et al. (2014)	Vitamina C	0,075	1,5 x 0,67	TPP	-	15,0
Keawchaoon e Yoksan (2011)	Carvacrol	1,5	6 x 2,5	Ch	532,5	13,6
Keawchaoon e Yoksan (2011)	Carvacrol	3,0	6 x 2,5	Ch	543,9	20,0
Keawchaoon e Yoksan (2011)	Carvacrol	4,5	6 x 2,5	Ch	575,6	17,7
Keawchaoon e Yoksan (2011)	Carvacrol	6,0	6 x 2,5	Ch	695,9	31,4
Keawchaoon e Yoksan (2011)	Carvacrol	7,5	6 x 2,5	Ch	716,8	27,8
Hosseini et al. (2013)	Óleo essencial orégano	0,5	5,0 x 2,0	Ch	309,8	24,7
Hosseini et al. (2013)	Óleo essencial orégano	1,0	5,0 x 2,0	Ch	331,4	14,7
Hosseini et al. (2013)	Óleo essencial orégano	2,0	5,0 x 2,0	Ch	366,6	8,53
Hosseini et al. (2013)	Óleo essencial orégano	4,0	5,0 x 2,0	Ch	402,2	5,45

Fonte: Própria autoria.

Óleos essenciais também foram encapsulados utilizando a técnica de geleificação iônica, como o óleo essencial de orégano (OEO) (HOSSEINI et al., 2013). Por ser um composto hidrofóbico, foi feito em duas etapas, sendo a primeira a emulsificação óleo-água e posteriormente a geleificação. Foi utilizado a quitosana de peso molecular médio na concentração de 5 mg/mL e TPP na concentração de 2 mg/mL. A concentração do composto ativo foi variada (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg/mL). A EE variou de 5,45% ± 0,45 à 24,72% ± 4,39 para a menor concentração de OEO e para a maior concentração de OEO, respectivamente. O tamanho de partícula das amostras sem ativo foi de 281,5 nm ± 24,1 enquanto o maior tamanho encontrado foi nas partículas com a maior concentração de OEO (402,2 ± 10,7).

2.3. Nanocelulose

As fibras vegetais são sistemas complexos e extremamente abundantes no Brasil, possuem diferentes propriedades químicas, físicas e mecânicas. Elas podem ser originadas ou não de resíduos, entretanto atualmente há um crescente interesse no uso de resíduos agroindustriais, como pode ser observado na Tabela 4.

Estudos realizados com a palhada de soja indicam que a composição da palhada de soja (constituída de caule, folhas e vagem) é de 35 - 40% de celulose, 17 - 23% de hemicelulose, 11 - 21% de lignina insolúvel em ácido, 1 - 2,3% de lignina solúvel em ácido e outros como cinza, proteína e pectina (CABRERA et al., 2015; WAN; ZHOU; LI, 2011).

As microfibrilas tem atraído muita atenção pois tem excelentes propriedades mecânicas sendo um polímero natural, biodegradável. A celulose é o principal constituinte da parede celular de vegetais, sendo o polissacarídeo mais abundante da Terra. A estrutura da celulose é composta por duas moléculas de glicose eterificadas por ligações b-1,4-glicosídicas (DAMODARAN; FENNEMA, 2008). Na parede celular dos vegetais, as microfibrilas de celulose são agrupadas por hemiceluloses, sendo posteriormente circundadas em uma matriz de hemiceluloses e lignina (associadas por meio de interações físicas e ligações covalentes). A partir dessas interações, sucessivas estruturas são formadas, dando origem à parede celular das fibras. As moléculas de celulose se agregam na forma de microfibrilas na qual regiões altamente ordenadas (cristalinas) se alternam com regiões menos ordenadas (amorfas). Como consequência dessa estrutura fibrosa, a celulose possui alta resistência à tração e é insolúvel na maioria dos solventes.

Tabela 4. Produção de nanocelulose a partir de resíduos agroindustriais.

Resíduo agroindustrial	**Tratamentos para o processamento das NCs**	**Dimensões das NCs**	**Referências**
Palha de trigo(WS) e palha de soja (SB)	Tratamento alcalino, ácido e mecânico	WS: diâmetro:30 - 40 nm SB: Diâmetro 20 - 120nm Comprimento: > 100 nm	(ALEMDAR; SAIN, 2008)
Palha de trigo	Tratamento alcalino e à vapor, seguido de tratamento ácido (HCl)	diâmetro: 10-50 nm	(KAUSHIK; SINGH, 2011)
Beterraba	Tratamento alcalino, branqueamento e homogeneização a alta pressão	Diâmetro: 30-100 nm Comprimento: > 1μm	(LEITNER et al., 2007)
Fibras da batata	Tratamento alcalino, branqueamento e homogeneização a alta pressão	Diâmetro:2 - 4 nm Comprimento: > 1 μm	(DUFRESNE; DUPEYRE; VIGNON, 2000)
Fibras do Sisal	Hidrólise ácida, branqueamento e extração alcalina	Diâmetro: 2 - 11 nm Comprimento: 360 - 1700 nm	(MORÁN et al., 2008)
Fibras da ervilha	Hidrólise ácida e branqueamento	Diâmetro: 7 - 12 nm Comprimento: 240 - 400 nm	(CHEN et al., 2009)
Bagaço de mandioca	Hidrólise ácida e ultrasom	Diâmetro:2 - 11 nm Comprimento: 360 - 1700 nm	(TEIXEIRA et al., 2009)
Curauá (C) e bagaço de cana (SB)	Tratamento alcalino e branqueamento, seguido de tratamento enzimático (hemicelulases/pectinases/endoglucanases) e ultrasom	C: Diâmetro:55 - 109 nm Comprimento: 1.3 - 4.1 μm SB: Diâmetro:20 - 40nm Comprimento: 0.25 - 0.82 μm	(CAMPOS et al., 2013)
Polpa de madeira	Hidrólise enzimática (endoglucanases) e ultrasom	Diâmetro:30 - 80 nm Comprimento: 100 nm a 1,8 μm	(FILSON; DAWSON-ANDOH; SCHWEGLER-BERRY, 2009)
Celulose de madeira	Hidrólise enzimática (endoglucanase)	Diâmetro:5-6 nm	(PÄÄKKO et al., 2007)
Fibra de algodão	Hidrólise enzimática (endo e exoglucanases) e centrifugação	Diâmetro:40 nm Comprimento: 120 nm	(SATYAMURTHY et al., 2011)

Fonte: Própria autoria.

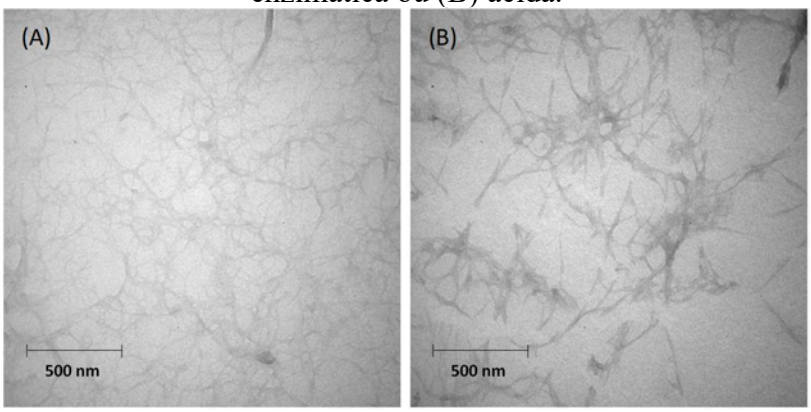
Quando as microfibrilas de celulose são clivadas transversalmente ao longo das regiões amorfas (espessura de 2 a 10 nm e 100 a 1000 nm de comprimento), pode-se obter nanocelulose a partir de hidrólise enzimática ou ácida, seguida por processos mecânicos. Quando o tamanho de uma partícula é reduzido, novos fenômenos intrínsecos são observados e se tornam predominantes na nanoescala (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006). De forma geral, as NC são normalmente produzidas em três etapas: (1) tratamento químico para preparar o material (hidrólise das hemiceluloses e deslignificação), (2) hidrólise ácida (ALEMDAR; SAIN, 2008; CHEN et al., 2009; MORÁN et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2011) ou enzimática (MARTELLI-TOSI et al., 2017b, 2018) para agir nas estruturas amorfas, e (3) fragmentação mecânica.

A produção de NC em dimensões na ordem de 10^{-9} tem sido estudada por alguns autores e provenientes de várias fontes (EICHHORN, 2011; KARGARZADEH et al., 2017a). Suspensões de NC têm sido obtidas a partir de resíduos agroindustriais provenientes de fontes vegetais ou animais, apresentado na Tabela 4. Como pode ser observado, processos combinados são empregados para a obtenção de materiais lignocelulósicos que podem influenciar nas características das NC obtidas. O uso de ácidos fortes, normalmente empregados na etapa de hidrólise, apresentam desvantagens importantes, como a degradação da celulose, corrosividade, além da geração de resíduos. Assim, por ser menos agressiva e ambientalmente mais amigável, a hidrólise enzimática tem sido explorada para este fim (CAMPOS et al., 2013; FILSON; DAWSON-ANDOH; SCHWEGLER-BERRY, 2009; PÄÄKKO et al., 2007; SATYAMURTHY et al., 2011). Filson et al. (2009) e Campos et al. (2013) produziram NC por via enzimática a partir da madeira e de fibras do curauá e do bagaço de cana, respectivamente. Em ambos os estudos, foi verificado que o tratamento mecânico de ultrassom posterior ao enzimático foi determinante na produção efetiva das NC.

Corrêa (2009) utilizou fibras de curauá para a obtenção de NC. Neste estudo foi realizado mercerização com soluções com 5, 10, 15 e 17,5% de NaOH e hidrólise ácida com H_2SO_4, HCl e uma mistura de ambos os ácidos de 2:1 v/v respectivamente, em temperaturas de 45 e 60°C. As NC foram aplicadas no desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos com EVA. Foi observado que os compósitos apresentaram melhores propriedades mecânicas, principalmente no módulo elástico. Flauzino Neto et al. (2013) obtiveram nanocristais de celulose a partir de casca de soja por hidrólise com H_2SO_4 a 64% (30 mL/g fibra) a 40°C durante 30 ou 40 min. Os resultados mostraram que as condições de hidrólise mais drásticas (40 min) resultaram em nanocristais menores e causou alguns danos na estrutura cristalina da celulose. No tempo de hidrólise de 30 minutos, os nanocristais apresentaram cristalinidade elevada (73,5%), com comprimento médio de 122,66 ± 39,40 nm, um diâmetro de 2,77 ± 0,67 nm,

apresentando, por conseguinte, um grande potencial de reforço em preparações de nanocompósitos.

Figura 3. Nanoceluloses obtidas a partir da palha de soja mercerizada por hidrólise (A) enzimática ou (B) ácida.



Fonte: MARTELLI-TOSI, M. et al. Soybean straw nanocellulose produced by enzymatic or acid treatment as a reinforcing filler in soy protein isolate films. **Carbohydrate Polymers**, v. 198, p. 61-68, 2018.

NCs também têm sido utilizados como sistemas veiculadores de fármacos (AKHLAGHI et al., 2014; CHAUHAN; YAN, 2015; JACKSON et al., 2011; KOLAKOVIC et al., 2012; QING et al., 2016). Os grupos hidroxilas (OH) da superfície de NC são capazes de se ligar formando pontes de hidrogênio. Além disso, NC obtidos por hidrólise com ácido sulfúrico apresentam grupos OSO^{3-} que caracterizam o caráter aniônico dessas partículas. A natureza hidrofílica da NC é devido à presença dos grupos hidroxilas. Outras propriedades desejáveis das NC para serem usadas como carreadores são: razão de aspecto (comprimento/diâmetro) e grande superfície de contato. Géis ou filmes de NC foram utilizados como matrizes carreadoras de medicamentos insolúveis em água através da adsorção destas substâncias na matriz fibrosa (KOLAKOVIC et al., 2012).

Assim, optou-se por estudar NCs obtidas a partir da hidrólise química devido à sua menor razão de aspecto e devido aos grupos OSO^{3-} que caracterizam seu caráter aniônico. A partir destas propriedades, espera-se que a interação com as nanopartículas de quitosana sejam mais favorecidas, em comparação com as cadeias de nanocelulose obtidas por processos enzimáticos.

.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi produzir e caracterizar sistemas híbridos nano/micropoliméricos de NQ e NC como veiculadores de ácido fólico.

Os objetivos específicos estão discriminados a seguir:

- Produção de nanocelulose a partir de vagem de soja por hidrólise ácida;

- Produção e caracterização físico-química de nanopartículas de quitosana contendo ou não o ácido fólico, na presença ou ausência de NC.

- Avaliação do efeito dos sistemas de encapsulação na estabilidade do ácido fólico em função do tempo (até 45 dias), temperatura, da incidência de radiação ultravioleta e do pH.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

A quitosana de massa molecular média (catálogo n. 448877, com grau de desacetilação de 75-85%), o tripolifostato de sódio, o ácido fólico (97% de pureza) e a membrana de celulose para tubos de diálise com 76 mm de largura plana foram obtidos da Sigma-Aldrich (San Luis, EUA). O fostato de sódio monobásico anidro e compostos utilizados na solução *phosphate-bufferid saline* (PBS) (cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de sódio bibásico e fosfato de potássio monobásico) foram obtidos da Dinâmica Química Contemporânea (Indaiatuba, Brasil) e o ácido sulfúrico da Labsynth (Diadema, Brasil).

4.2. Métodos

4.2.1. Produção de partículas / suspensões

4.2.1.1 Produção das soluções de quitosana, de TPP e de ácido fólico

A quitosana foi solubilizada em solução de ácido acético 1% na concentração de 0,2% (w/v) de solução final. Em seguida, a solução foi alocada em um agitador magnético *Color Squid* (IKA, Guangzhou, China) durante 16 h.

A solução de tripolifostato de sódio foi feita na concentração de 0,06% de solução final (w/v).

A concentração de ácido fólico utilizada foi de 0,1% (w/v) e de 0,01% (w/v) de solução final solubilizada em solução tampão de fosfato de sódio monobásico anidro com pH de 6,7-6,8 por 20 minutos.

Para a solução de PBS foi utilizado 4 g de cloreto de sódio, 100 mg de cloreto de potássio, 720 mg de fosfato de sódio bibásico e 120 mg de fosfato de potássio monobásico, dissolvidos em 500 mL. O pH desta solução era de 7,4 e para a solução PBS pH 3,0, o ajuste foi feito com ácido clorídrico 1M.

Na Tabela 5 estão apresentadas as concentrações das soluções preparadas tanto em relação à solução final como com relação a cada solução preparada. Também está especificado o pH de cada solução utilizada para a produção das amostras.

Tabela 5. Concentração das soluções utilizadas no preparo das amostras e seus respectivos pHs.

Soluções	Concentração em relação ao volume final (% w/v)	Concentração em relação a solução (mg/mL)	pH
Solução tampão com AF	0,01	0,33	6,38
Solução de TPP	0,06	2	9,28
Solução de quitosana	0,2	6,6	3,59
Água	-	-	5,52
Suspensão de NC	0,03	1,3	5,89

Fonte: Própria autoria.

4.2.1.2 Produção das suspensões de quitosana e ácido fólico

A produção dessas amostras foi feita em triplicata com a mistura da solução de ácido fólico e da solução de quitosana sob agitação magnética (Amostra Ch-AF), por 5 minutos em rotação de 1000 rpm.

Amostras sem ácido fólico também foram produzidas como controle (Amostra Ch).

Após o preparo, todas as amostras foram sonificadas em um ultrassom de ponteira (Branson SFX Sonifier, Branson Ultrasonics Corp, Danbury, EUA) por 30 s, contínuo e amplitude de 30% (potência 550W).

4.2.1.3 Produção de micro/nanopartículas quitosana e ácido fólico

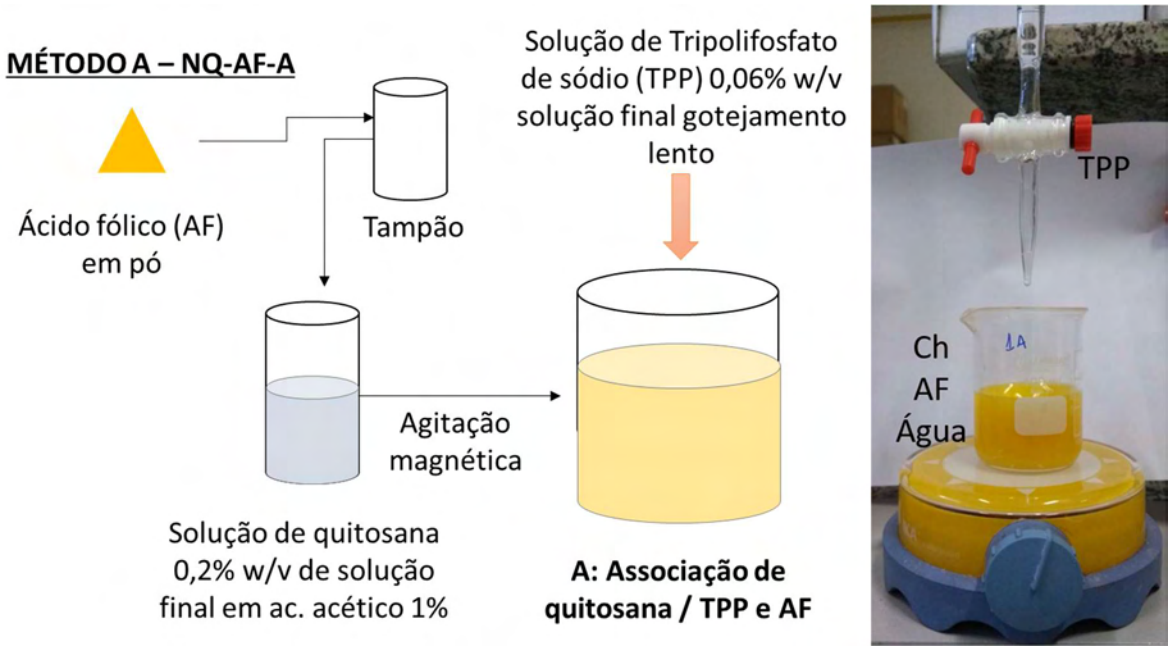
As micropartículas foram produzidas de acordo com o procedimento descrito por Britto et al. (2012), com algumas modificações, em triplicata.

Para o método A, a vitamina foi adicionada juntamente com a quitosana (Figura 4). 10 mL de solução de ácido fólico (5 mg/mL ou 0,5 mg/mL) e 10 mL de água ultrapura foram misturadas em 15 mL de solução de quitosana (6,6 mg/mL) sob agitação magnética 1000 rpm por 30 s. Em seguida, 15 mL de solução de TPP (2 mg/mL) foi gotejada com taxa de adição de aproximadamente 1 mL/min na quitosana (Figura 4A: Amostra NQ-AF-A). A bureta permaneceu sempre na mesma altura, em relação à solução.

Amostras sem ácido fólico também foram produzidas como controle (Amostra NQ).

Figura 4. Esquema da produção das amostras contendo solução de quitosana, solução de TPP, solução de ácido fólico pelo método A (A) e procedimento realizado pelo método A (B).

(A) (B)

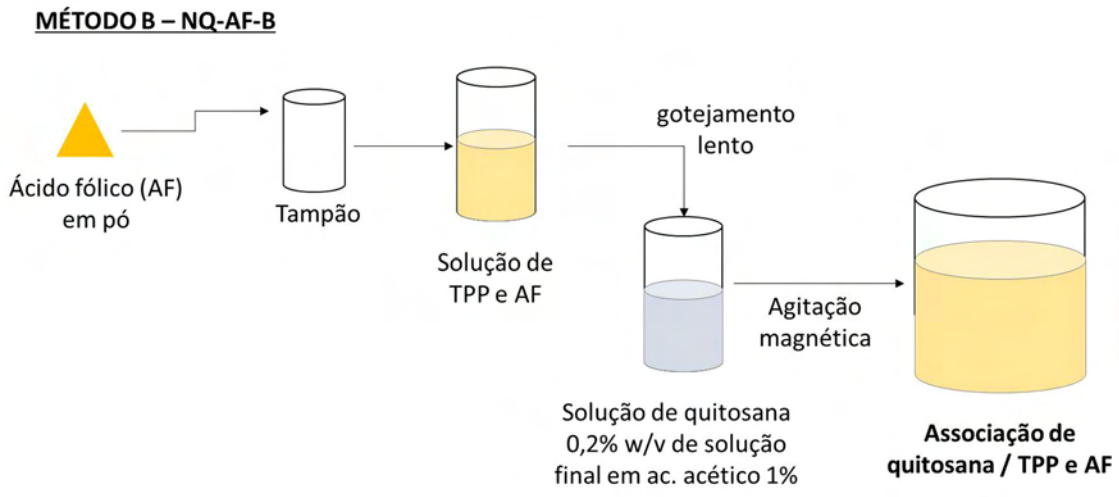


Fonte: Própria autoria.

Para o método B, a solução de vitamina (5 mg/mL ou 0,5 mg/mL) e a água foram misturadas com a solução de TPP (2 mg/mL) em agitador magnético a 1000 rpm por 30 s. Esta solução foi gotejada em 15 mL de solução de quitosana (6,6 mg/mL) mantendo os parâmetros descritos no método A (velocidade de gotejamento e altura da bureta) (Figura 5) (Amostra NQ-AF-B).

Figura 5. Esquema da produção das amostras contendo solução de quitosana, solução de TPP, solução de ácido fólico pelo método B (A) e procedimento realizado pelo método B (B).

(A)



(B)

Fonte: Própria autoria.

4.2.1.4 Produção de microcompósitos contendo micro/nanocelulose, micro/nanopartículas de quitosana e ácido fólico

A produção de nanocelulose foi realizada de acordo com a metodologia adaptada de Flauzino Neto et al. (2013) a partir da vagem mercerizada de soja (MARTELLI-TOSI et al., 2017b). A palha foi fornecida pela Embrapa Soja (Londrina- Paraná- Brasil). As vagens foram

separadas, lavadas, e secas em estufa a 50ºC até massa constante, moídas e peneiradas em peneiras de 35 "mesh Tyler" (abertura 0,425 mm).

Em seguida, o material foi pré-tratado com NaOH 17,5% (w/v) por 15h à temperatura ambiente, seguido de branqueamento com H_2O_2 4% (v/v) + NaOH 2% (w/v) + $MgSO_4$ $7H_2O$ 0,3% (w/v) por 3 h à 90 °C, seguido de lavagens sucessivas até pH neutro, de acordo com tratamento apresentado por Martelli et al. (2017b). A amostra pré-tratada foi seca em estufa a 50ºC até massa constante e pode ser observada na Figura 6.

A hidrólise ácida foi realizada a 70°C por 40 minutos sob agitação vigorosa e constante com 30 mL de H_2SO_4 64% (v/v) por grama de amostra (MARTELLI-TOSI et al., 2018). A suspensão foi diluída 10 vezes com água fria e foi deixada para decantação das fibras por 24 h. O precipitado foi colocado em membrana semipermeável e dialisado com água da torneira para remover grupos sulfatos não reativos, sais e açúcares solúveis, até o pH neutro ser alcançado (5-7 dias). A suspensão foi passada então por um dispersor tipo UltraTurrax (IKA T18 Basic, Guangzhou, China) por 5 min a 14.000 rpm e sonicada por 3 min contínuo e amplitude de 50 em ultrassom de ponteira de 550W de potência (Branson Ultrasonics Corp, Danbury, EUA).

Figura 6. Vagem de soja pré-tratada ou mercerizada.

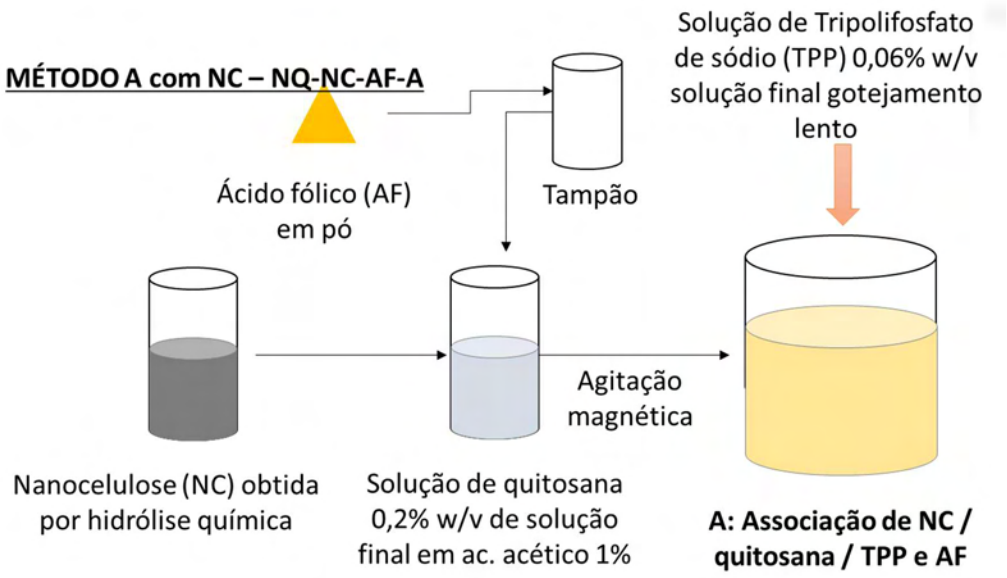
Fonte: Própria autoria.

A matéria seca da suspensão de NC foi determinada em triplicata. As placas de petri foram colocadas na estufa a 105°C por 24 horas. Com auxílio de pinça e luvas, as placas foram retiradas e transferidas para um dessecador até seu resfriamento. As placas foram pesadas e uma alíquota de 5 mL de amostra foi inserida e pesada. As placas foram colocadas na estufa novamente a 105°C durante 2 dias.

A produção das micropartículas na presença de nanocelulose também foi realizada pelos dois métodos descritos anteriormente, A e B, em triplicata.

Para o método A, primeiramente, 10 mL de solução de ácido fólico (5 mg/mL ou 0,5 mg/mL), 10 mL de suspensão de nanocelulose (1,3 mg/mL) e 15 mL de solução de quitosana (6,6 mg/mL) foram misturadas sob agitação magnética. Em seguida, 15 mL de solução de TPP foi gotejada na suspensão de Ch/NC/AF com taxa de adição de aproximadamente 1 mL/min (Figura 7 : Amostra NQ-NC-AF-A).

Figura 7. Esquema da produção das amostras contendo solução de quitosana, solução de TPP, suspensão de nanocelulose e solução de ácido fólico pelo método A.

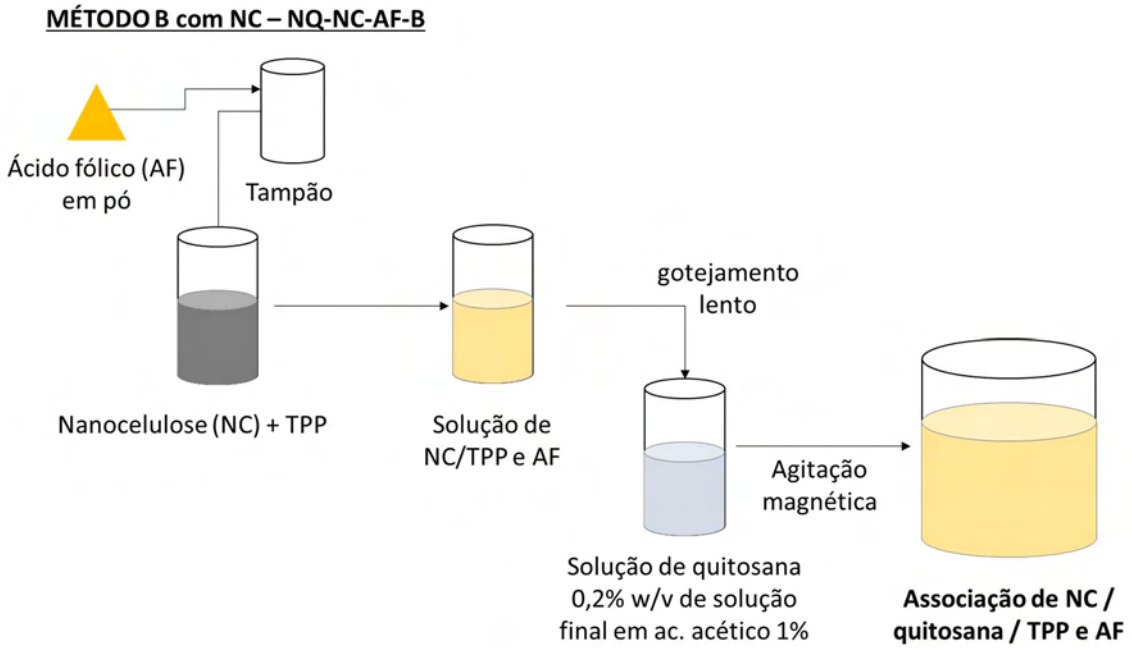


Fonte: Própria autoria.

No método B, foram misturados 10 mL de solução de ácido fólico (5 mg/mL ou 0,5 mg/mL), 10 mL de suspensão de nanoceluloses (1,3 mg/mL) e 15 mL de solução de TPP (6,6 mg/mL). Esta mistura foi gotejada em 15 mL de solução de quitosana (6,6 mg/mL) mantendo as mesmas condições de agitação e taxa de gotejamento (Figura 8 : Amostra NQ-NC-AF-B).

Amostras sem ácido fólico também foram produzidas como controle (Amostra NQ-NC).

Figura 8. Esquema da produção das amostras contendo solução de quitosana, solução de TPP, suspensão de nanofibra e solução de ácido fólico pelo método B.



Fonte: Própria autoria.

4.2.1.5 Produção de quitosana, micro/nanofibras de celulose e ácido fólico

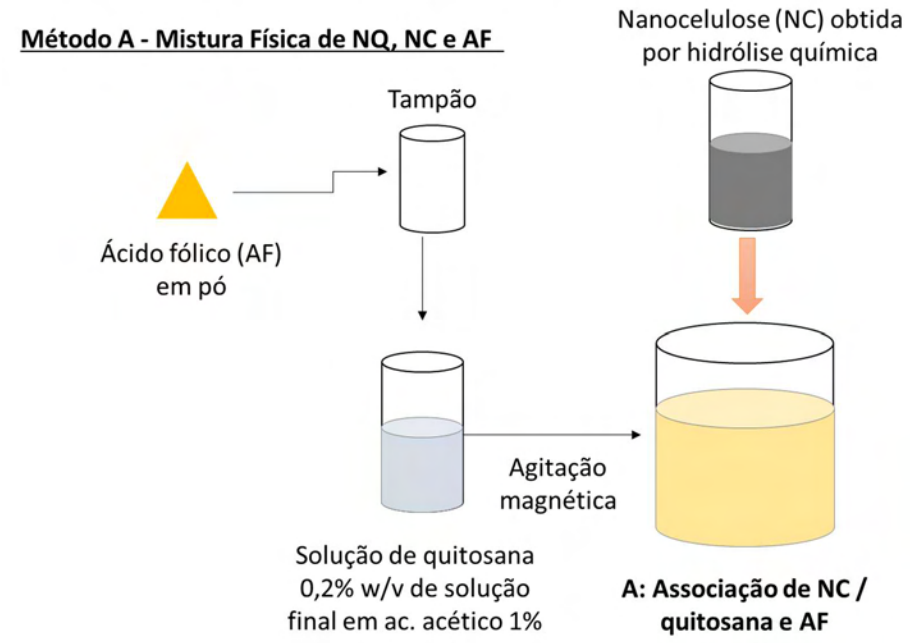
Com o intuito de verificar a interação das micro/nanocelulose e a quitosana, as amostras foram produzidas em triplicata sem a solução de TPP.

A produção dessas amostras foi feita com gotejamento pelos dois métodos A e B.

O método A (Figura 9) foi realizado adicionando 10 mL de solução de ácido fólico (5 mg/mL) e 15 mL de água ultra pura em 15 mL de solução de quitosana (6,6 mg/mL) sob agitação magnética e 10 mL de suspensão de NC (1,3 mg/mL) foi gotejada (Amostra Ch-AF-NC-A).

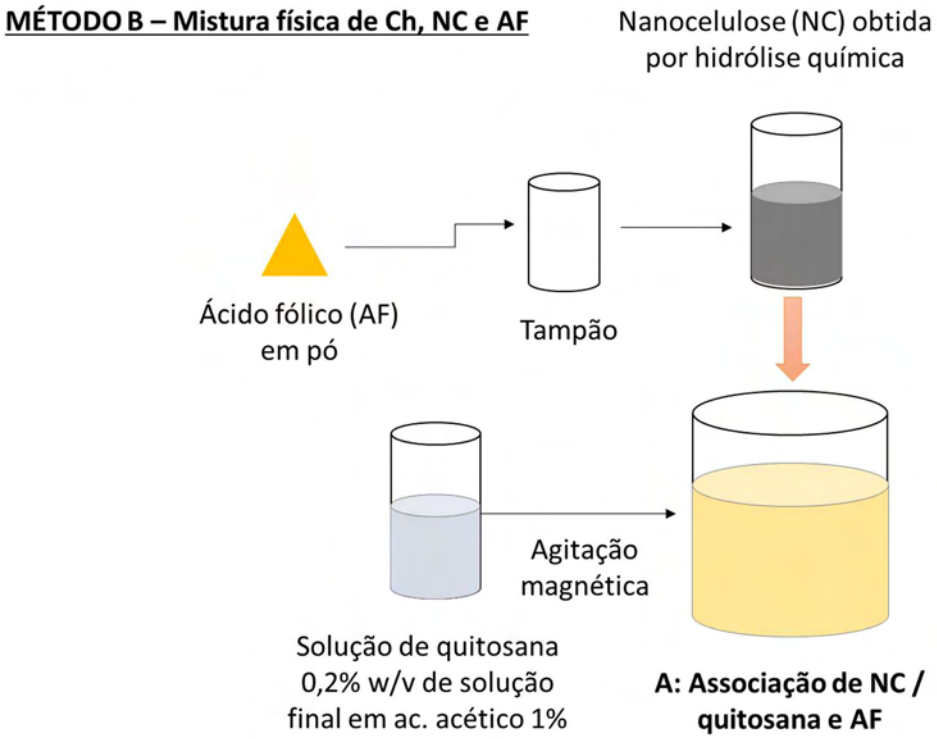
O método B foi realizado adicionando 10 mL de solução de ácido fólico (5 mg/mL) e 15 de água ultrapura em 10 mL de suspensão de NC (1,3 mg/mL) e gotejando na solução de quitosana sob agitação magnética (Figura 10) (Ch-NC-AF-B).

Figura 9. Esquema da produção das amostras contendo solução de quitosana, suspensão de nanofibras e solução de ácido fólico pelo método A.



Fonte: Própria autoria.

Figura 10. Esquema da produção das amostras contendo solução de quitosana, suspensão de nanofibra e solução de ácido fólico pelo método B.



Fonte: Própria autoria.

4.2.1.6 Produção das soluções de quitosana, de micro/nanofibras e de ácido fólico

Amostras contendo AF foram produzidas somente fazendo homogeneização em agitador magnético do AF em solução tampão (Amostra AF). Assim também foram produzidas as amostras contendo nanofibras e ácido fólico (Amostra NC-AF) e contendo quitosana e ácido fólico sem TPP (Amostra Ch-AF) em triplicata.

Na Tabela 6 estão especificadas as nomenclaturas utilizadas para cada amostra e suas composições em volume adicionado. Todas as amostras foram produzidas em triplicata.

Tabela 6. Amostras produzidas e suas composições.

AMOSTRAS	Método de produção	Solução de quitosana (mL, 0,2%)	Solução de TPP (mL, 0,06%)	Solução de NC (mL, 0,03%)	Solução de AF (mL, 0,1 ou 0,01%)
AF	-	-	-	-	10
NC-AF	-	-	-	10	10
Ch-AF	-	15	-	-	10
Ch-NC-AF-A	A	15	-	10	10
Ch-NC-AF-B	B	15	-	10	10
NQ-AF-A	A	15	15	-	10
NQ-AF-B	B	15	15	-	10
NQ-NC-AF-A	A	15	15	10	10
NQ-NC-AF-B	B	15	15	10	10
NC	-	-	-	10	-
Ch	-	15	-	-	-
NQ	-	15	15	-	-
NQ-NC	-	15	15	10	-

Fonte: Própria autoria.

4.2.2. Caracterização física e química das suspensões contendo micro/nanopartículas

4.2.2.1 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia das micro/nanopartículas foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura com fonte de emissão de campo (FEG-SEM) com o microscópio JSM-6701F FEG (Jeol, Massachusetts, USA). As suspensões foram submetidas a banho ultrassônico por 15 minutos, diluídas em água mili-Q quando em uma proporção de 1:30 e 1:60. As amostras diluídas foram depositadas em lâmina de silício 48 h antes da observação para a secagem em

dessecador. As imagens foram capturadas com uma tensão de 2kV e distância de trabalho (WD) de 3,0 mm.

4.2.2.2 Tamanho de partícula por Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial Zeta

Uma técnica muito utilizada para analisar o tamanho dessas partículas é a de espalhamento de luz dinâmico (DLS). O princípio desta técnica está baseado no movimento browniano das partículas ou moléculas em suspensão. Quando o laser atravessa as partículas, a luz se espalha com intensidades diferentes relacionadas ao movimento das partículas e o tamanho é então calculado usando a relação de Stokes-Einstein (NEMEN; LEMOS-SENNA, 2011; SHAW, 2013). A partir desta correlação, o software fornece o diâmetro médio das partículas e o índice de polidispersão (IP), que é relacionado com a homogeneidade da distribuição de tamanho de partículas.

A distribuição de tamanho e a carga superficial das partículas foram obtidos por DLS sendo, então, analisadas por um Zeta Potential Analyser – Nano Series- Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., England). As amostras foram diluídas 6x e as medidas foram realizadas a temperatura ambiente (25°C). Estas medidas foram realizadas em triplicata para cada amostra, sendo que 3 amostras de cada tratamento foram analisadas.

4.2.2.3 Espectroscopia no Infravermelho (ATR-FTIR)

A espectroscopia no infravermelho se baseia na frequência de vibração específica que as ligações químicas das substâncias possuem, chamados de níveis vibracionais. Esta técnica pode ser usada para identificar um composto ou investigar a composição de uma amostra.

Para a aquisição de espectros de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (*Attenuated Total Reflection Fourier-Transform Infrared* Spectroscopy – ATR-FTIR), as amostras foram congeladas pela imersão dos tubos em nitrogênio líquido e, em seguida liofilizadas no equipamento Thermo – Pirani 501 (Edwards, London, England).

Para esta análise, 3 espectros por replicata foram obtidos no Espectrômetro de Infravermelho Vertex 70 (Bruker, Massachusetts, EUA) em comprimentos de onda que variam de 4000 a 400 cm^{-1} e 64 scans por amostra. Os espectros médios foram obtidos e corrigidos em linha de base com auxílio de *software* OMNIC^{TM} da *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, MA USA).

4.2.2.4 Análise termogravimétrica (TGA)

Análise termogravimétrica é uma técnica destrutiva no ramo de análises térmicas, na qual se monitora a variação da massa de uma amostra em função da temperatura em atmosfera controlada.

A análise termogravimétrica foi realizada no equipamento TGA Q-500 (TA Instruments, New Castle, EUA) para acompanhar a variação da massa das amostras, em função da temperatura. Foi colocado de 5 a 10 mg de amostra liofilizada na panela aberta de platina do equipamento. As condições de análise foram as seguintes: razão de aquecimento de 10 °C/min até 800 °C sob vazão de nitrogênio e ar de 40 mL/min e 60 mL/min, respectivamente.

4.2.3. Quantificação de ácido fólico

4.2.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A quantificação de ácido fólico foi realizada com auxílio de um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE; em inglês: High Performance Liquid Chromatography, HPLC) (Shimadzu, Prominence, Japão), de acordo com as metodologias descritas por Catharino et al. (2003). O sistema é equipado com bomba de fase móvel quaternária, degaseificados online, injetor automático, compartimento de coluna termostatizado e detector por arranjo de diodos. A coluna analítica foi mantida a 35ºC. Metanol e acetonitrila foram usados como fase móvel na proporção respectiva de 90 :10 (v/v) com vazão constante de 1,6 $mL.min^{-1}$. Foi injetada 10µL das amostras com detecção espectrofotométrica em 282 nm (Vit-B_9) e tempo total de corrida igual a 9 min. A identificação foi realizada por comparação com o tempo de retenção da substância padrão (Vit-B_9: 8,6 min) da Sigma-Aldrich (EUA).

A quantificação de ácido fólico foi realizada por padronização externa a partir das áreas obtidas das análises de 9 níveis de concentrações dos ativos. Foi feito uma diluição de 22,6 mg de ácido fólico em 25 mL de solução tampão (876,88 µg/mL, considerando a pureza de 97 %). A partir desta solução foram feitas diluições de 0,050; 0,100; 0,150; 0,300; 0,500; 1,000; 1,500; 2,000 e 2,500 mL desta solução em balão de 10 mL. Portanto as soluções utilizadas para a quantificação de ácido fólico foram de: 4,3844; 8,7688; 13,1532; 26,3064; 43,844; 87,688; 131,532; 175,376; 219,22 µg/mL. A partir das áreas obtidas na cromatografia, foi construída a curva padrão, e utilizando os coeficientes da reta obtida foi possível calcular a concentração de ácido fólico nas amostras.

Para realizar a extração de ácido fólico foram realizados testes preliminares a fim de se obter um protocolo de extração eficiente para quantificação de ácido fólico das amostras. Primeiramente uma alíquota de 1 mL foi retirado das amostras e diluídas em 10 mL de solução tampão, deixadas em banho de ultrassom por 10 minutos e passadas na centrífuga por 5 min e 4500 rpm. O sobrenadante foi coletado e inserido no vial de vidro para quantificação por CLAE. O segundo teste foi utilizando solução de NaOH devido à alta solubilidade do AF nessa solução, portanto, 1 mL de amostra foi diluída em 3 mL de solução de NaOH 0,1M, 6 mL de solução tampão e HCl para correção do pH. Essa solução foi deixada em banho de ultrassom por 10 minutos e passada na centrífuga por 5 min e 4500rpm. O sobrenadante foi coletado e inserido no vial de vidro para quantificação por CLAE.

Para o cálculo de eficiência de encapsulação foi feita a extração do sobrenadante. Uma alíquota das amostras foi centrifugada por 10 min em 13000 rpm, 1 g do sobrenadante foi retirado e seguiu-se com o procedimento de extração do segundo teste, onde adicionou-se 3 mL de solução de NaOH 0,1M, 6 mL de solução tampão e HCl para correção do pH. Foi feita a quantificação de AF por CLAE.

A eficiência de encapsulação foi calculada de acordo com a equação 1:

$$EE\ (\%) = ([AF]total - [AF]sobrenadante)/[AF]total * 100 \qquad \text{(Equação 1)}$$

Onde [AF]total e [AF]sobrenadante são a concentração de ácido fólico no total da amostra (adicionada) e no sobrenadante (depois da centrifugação), respectivamente. Portanto, a diferença entre essas concentrações corresponde a quantidade de ácido fólico encapsulado.

4.2.3.2 Espectrofotometria UV-Vis

A quantificação de ácido fólico também foi realizada por espectrofotometria no UV-Vis pois o equipamento que realiza a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência entrou em manutenção sendo necessário a substituição da metodologia.

Portanto a quantificação de ácido fólico nas suspensões também foi realizada com o auxílio de um Espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), de acordo com as metodologias descritas por Britto et al. (2012). Para tanto, foi realizada a padronização externa do AF a partir das absorbâncias em 282 nm obtidas das análises de diferentes concentrações do ativo em solução tampão, considerando a pureza de 97%. A partir das absorbâncias obtidas no espectrofotômetro, foi construída a curva padrão, e utilizando os coeficientes da reta obtidos foi possível calcular a concentração de ácido fólico nas amostras.

Para quantificação utilizando esta técnica, foi realizado um teste para verificar o excesso de AF que continha nas amostras. Foi feita a diluição de AF em uma solução semelhante à amostra, em diferentes concentrações (0,01%, 0.03%, 0,05% e 0,08%) e então centrifugada. A concentração utilizada nesse procedimento foi aquela em que não ocorreu precipitação na centrifugação.

Para o cálculo de eficiência de encapsulação, utilizando a espectroscopia UV-Vis foi feita a quantificação de AF no sobrenadante. Uma alíquota das amostras foi centrifugada por 10 min em 13000 rpm, e o sobrenadante foi analisado no espectro.

A eficiência de encapsulação foi calculada de acordo com a equação 1:

$$EE\ (\%) = ([AF]total - [AF]sobrenadante)/[AF]total * 100 \qquad \text{(Equação 2)}$$

Onde [AF]total e [AF]sobrenadante são a concentração de ácido fólico no total da amostra (adicionada) e no sobrenadante (depois da centrifugação), respectivamente.

4.2.4. Avaliação da estabilidade do AF

4.2.4.1 Estabilidade em função do tempo e da luz

Para realizar as análises de estabilidade do AF em função do tempo / luz, foi utilizado as suspensão produzidas pelo método A e B com 0,1% de vitamina. As amostras foram armazenadas em condição ambiente e hermeticamente fechadas, em triplicata. Cada amostra foi armazenada de duas formas diferentes, com e sem abrigo de luz. As amostras sem abrigo de luz foram colocadas em tubos falcon transparente e acondicionadas em estantes de tubos. Já as amostras com abrigo de luz foram armazenadas nos tubos falcon cobertos com papel alumínio e guardadas em estante dentro de uma caixa de papelão devidamente fechada. O teor de composto ativo foi analisado em CLAE de 15 em 15 dias (até 45 dias), utilizando a extração com NaOH 0,1M.

4.2.4.2 Estabilidade em função da temperatura

As suspensões foram colocadas em banho maria com temperaturas diferentes (temperatura ambiente, 40, 60, 80 e 100) durante 30 minutos. Após o tempo estipulado, as amostras foram retiradas do banho e deixadas em cama de gelo para atingir a temperatura

ambiente (25°C). Foi feita a quantificação de AF por CLAE, utilizando a metodologia do segundo teste de extração.

4.2.4.3 Estabilidade em função da radiação ultravioleta

As análises de estabilidade em função da radiação ultravioleta foram realizadas somente com as amostras NQ-AF e NQ-NC-AF do método A e com concentrações finais de 0,01% de AF, 0,2% (w/v) de Ch, 0,06% (w/v) de TPP e 0,03% (w/v) de NC. 2 mL de cada amostra foram colocados em tubo de ensaio de vidro e deixado exposto na radiação ultravioleta (30W) por até 4 h. A degradação do AF foi quantificada pela vitamina residual por espectroscopia nos tempos de 0, 1, 2, 3 e 4 h.

4.2.5. Liberação *in vitro*

A liberação *in* vitro foi realizada com as amostras NQ-AF e NQ-NC-AF do método A e com concentrações finais de 0,01% de AF, 0,2% (w/v) de Ch, 0,06% (w/v) de TPP e 0,03% (w/v) de NC. Uma alíquota de 2 mL de amostra foi centrifugada por 10 min em 13000 rpm à 4°C no equipamento Centrifuge 5430 R Eppendorff, Hamburg, Alemanha. O precipitado foi ressuspendido em 0,8 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) de pH 7,4 ou 3,0. As amostras ressuspendidas foram alocadas em banho orbital (Tecnal Dubnoff TE-053, Piracicaba, Brasil), na temperatura de 25°C e 200 rpm por até 48 h de acordo com Britto et al. (2014).

Nos tempos de 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 12,0; 24,0 e 48,0 h, foram retiradas as amostras em triplicata e centrifugada por 10 min em 13000 rpm à 4°C. O sobrenadante foi analisado no espectrofotômetro e a absorbância avaliada com a curva padrão.

A fim de se obter um estudo sobre o comportamento do AF nos pHs utilizados, foi feita uma amostra controle de concentração 0,2 mg/mL de AF (valor aproximado à concentração do precipitado) na mesma solução das amostras produzidas, entretanto sem quitosana, TPP e NC. 0,3 g dessa amostra controle (valor aproximado da massa do precipitado) foi coletada e adicionada à 0,8 mL de solução PBS (pH 7,4 ou 3,0).

4.2.6. Análise Estatística

Os dados experimentais de tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey ao nível de 5% de

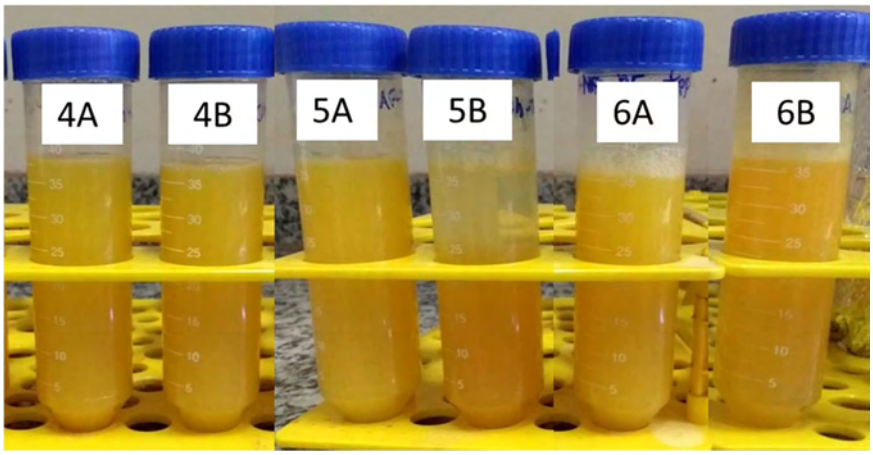
significância para a comparação entre as médias utilizando o programa XLSTAT (Versão 2018.6). Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão (DP).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Escolha do método de produção de sistema polimérico a base de NQ e NC para encapsulação de ácido fólico

Com o intuito de preparar um novo sistema polimérico na carreação de ácido fólico, foram testados os dois métodos de produção das partículas com associação de quitosana/nanocelulose/TPP. Na Figura 11, pode-se observar o aspecto visual das amostras contendo AF (0,1%) após o preparo. A coloração amarela característica do AF é evidente nas amostras. É possível observar uma separação de fase nas amostras de nanopartículas de quitosana com ácido fólico (NQ-AF-B) produzidas pelo método B (Figura 11:5B). Embora não seja visual, a amostra NQ-NC-AF-B (Figura 11 : 6B) também separou rapidamente, dentro da primeira hora após produção. Essa separação não é desejável pois indica que houve produção de partículas grandes com maior massa ocorrendo a precipitação.

Figura 11. Imagem tirada logo após a produção das amostras contendo AF.



Nessa figura: **4A** – Amostra Ch-NC-AF-A, mistura física de quitosana, nanocelulose e ácido fólico; **4B** – Amostra Ch-NC-AF-B, mistura física de quitosana, nanocelulose e ácido fólico; **5A** – Amostra NQ-AF-A, nanopartícula de quitosana com ácido fólico; **5B** – Amostra NQ-AF-B, nanopartícula de quitosana com ácido fólico; **6A** – Amostra NQ-NC-AF-A, nanopartícula de quitosana e nanocelulose com ácido fólico e **6B** – Amostra NQ-NC-AF-B nanopartícula de quitosana e nanocelulose com ácido fólico. Sendo letra **A** para amostras produzidas pelo método A (ácido fólico com ou sem nanocelulose adicionado à solução de quitosana) e letra **B** para amostras produzidas pelo método B (ácido fólico com ou sem nanocelulose adicionado à solução de TPP). Fonte: Própria autoria.

5.1.1. Microscopia eletrônica de varredura

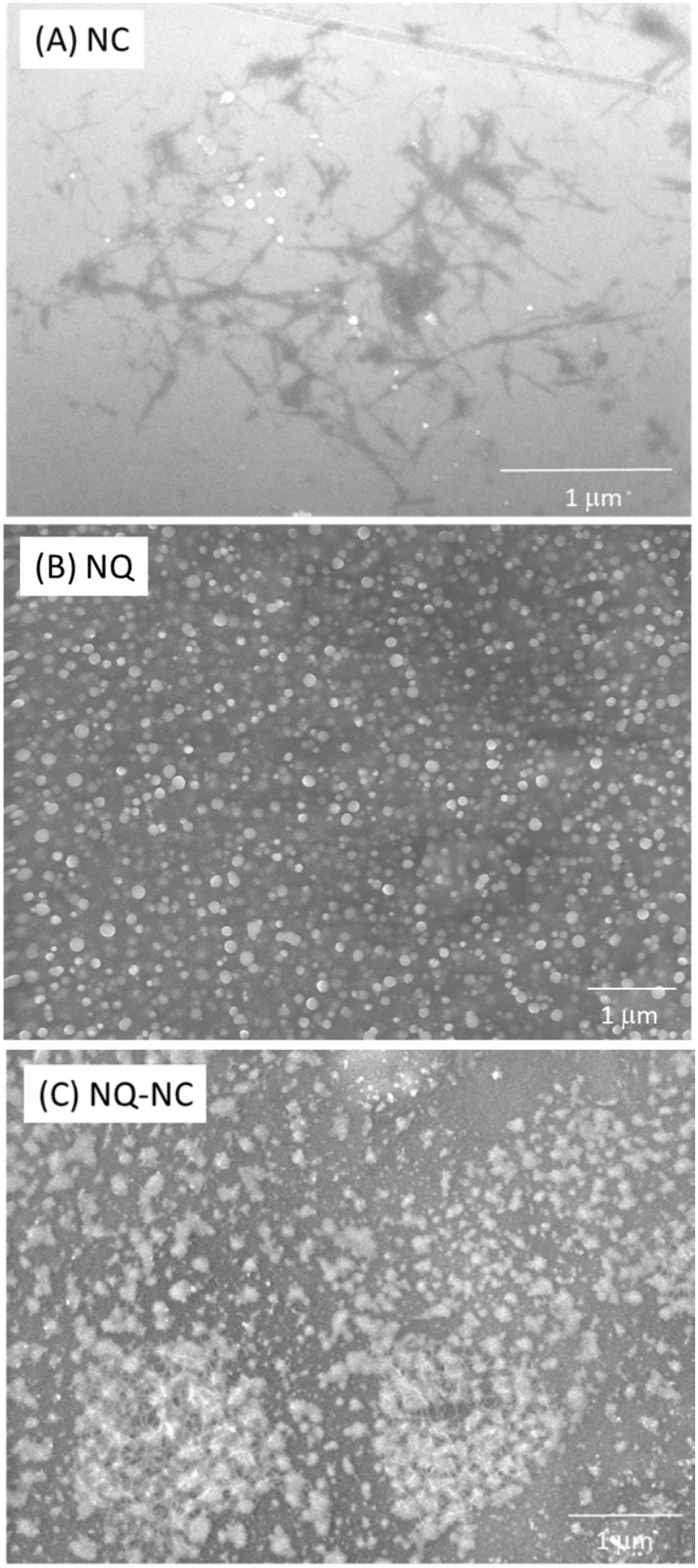
Os resultados da micrografia FEG-SEM para as amostras NC, NQ e NQ-NC estão apresentados na Figura 12 e para aquelas contendo AF (NQ-AF-A, NQ-AF-B, NQ-NC-AF-A e NQ-NC-AF-B), na Figura 13.

As nanoceluloses apresentaram espessuras nanométricas (<100 nm), com comprimentos de até 2 μm (Figura 12A), como esperado de acordo com os tratamentos de hidrólise com H_2SO_4 e sonificação utilizados no processo de produção (ALEMDAR; SAIN, 2008; MARTELLI-TOSI et al., 2018).

Na microscopia das NQs produzida pela reticulação com TPP via geleificação iônica, formatos esféricos com diâmetro nanométricos e submicrométricos são predominantes (Figura 12B), conforme já constados em outros estudos (BARROS-ALEXANDRINO; MARTELLI-TOSI; ASSIS, 2019). Algumas irregularidades no formato destas partículas podem ser decorrentes do preparo da amostra para a microscopia, principalmente no processo de secagem.

Na formação do sistema híbrido, a adição de NCs em suspensão de NQ interferiu na aglutinação iônica gerando aglomerados com padrões irregulares (Figura 12C). Poucas estruturas de NCs foram observadas isoladamente nas imagens, apenas aglomeradas nas NQs. Este resultado supõe que as partículas tendem a interagir física ou quimicamente entre elas.

Figura 12. Micrografias das partículas sem AF: (A) nanocelulose - NC, (B) micro/nanopartículas de quitosana – NQ, e (C) micro/nanopartículas de quitosana com nanocelulose – NQ-NC.

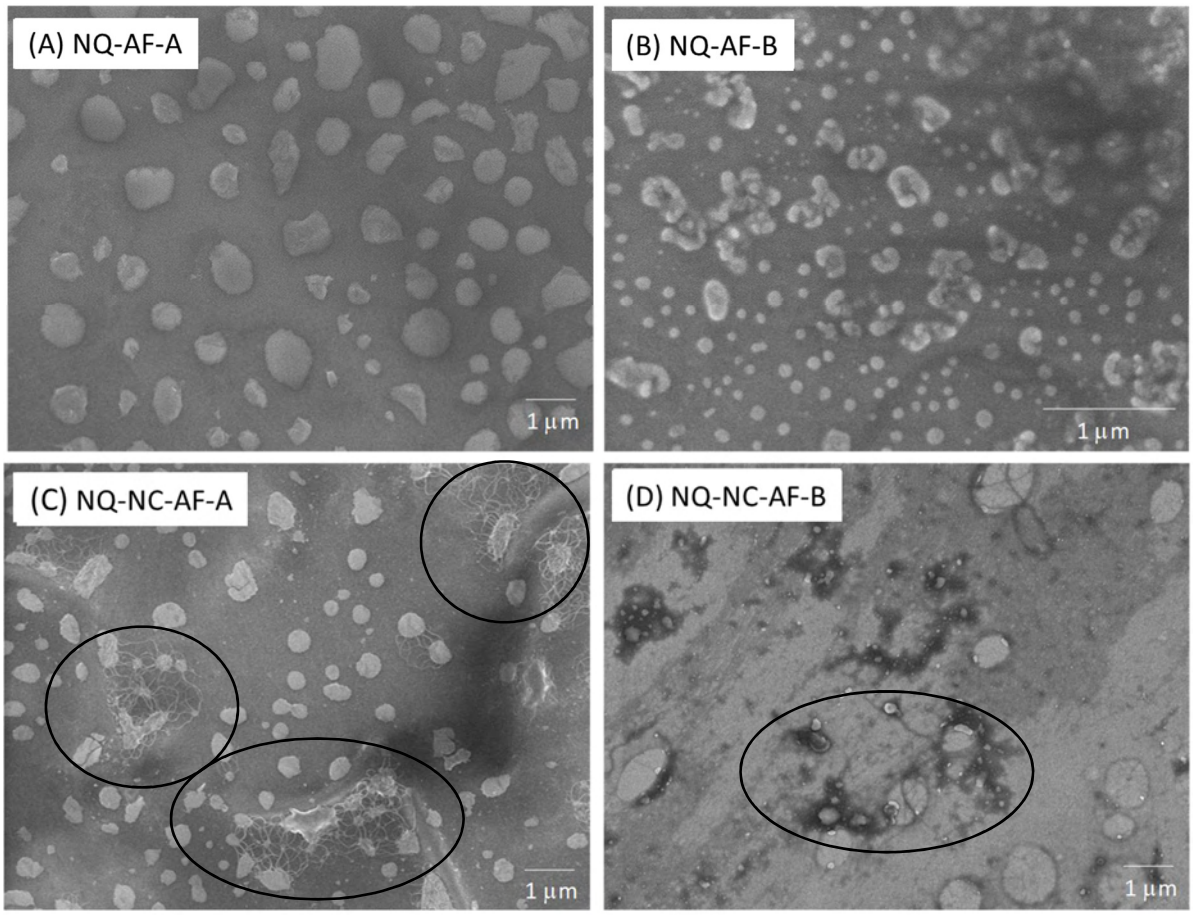


Fonte: Própria autoria.

Quando AF foi adicionado nos sistemas híbridos, as estruturas da NC estão presentes em ambas as metodologias (Figura 13C e Figura 13D), sendo mais evidentes nas partículas obtidas pelo método A (NQ-NC-AF-A, Figura 13C), as estruturas foram mais homogêneas e as fibras foram observadas entre os agrupamentos de NQ estabelecendo uma rede tridimensional. Além disso, foram observadas NQs isoladas, sem interação com as NCs, visto que a concentração de NQ foi mais de 6 vezes maior que de NC (0,2% : 0,03% w/m, NQ : NC respectivamente).

Assim, os métodos de produção de partículas testados podem ter interferido na morfologia das partículas sem NC. É importante ressaltar que, visivelmente, as amostras processadas pelo método B continham aglomerados.

Figura 13. Micrografias das partículas contendo AF: nano/micropartículas de quitosana com AF obtidas pelo método A (A) e pelo método B (B); nano/micropartículas de quitosana com nanocelulose e AF obtidas pelo método A (C) e pelo método B (D), destacadas na figura.



Nessa figura: **Amostra NQ-AF-A** (Figura 13A) - nanopartícula de quitosana com ácido fólico; **Amostra NQ-AF-B (**Figura 13B) - nanopartícula de quitosana com ácido fólico; **Amostra NQ-NC-AF-A** (Figura 13C) - nanopartícula de quitosana e nanocelulose com ácido fólico e **Amostra NQ-NC-AF-B** (Figura 13D) - nanopartícula de quitosana e nanocelulose com ácido fólico. Sendo letra **A** para amostras produzidas pelo método A (ácido fólico com ou sem nanocelulose adicionado à solução de quitosana) e letra **B** para amostras produzidas pelo método B (ácido fólico com ou sem nanocelulose adicionado à solução de TPP). Fonte: Própria autoria.

5.1.2. Tamanho de partícula por Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial Zeta

Na Tabela 7 é possível verificar o diâmetro médio das partículas e o índice de polidispersão (Ip) obtido pela técnica de DLS.

A amostra NQ foi caracterizada por partículas com diâmetro médio de 270 nm, de acordo com as micrografias, onde as partículas possuíram diâmetros, variando de 100 a 300 nm (Figura 12B). As amostras NQ carregadas com AF foram caracterizadas por partículas maiores que a amostra controle, com diâmetros de aproximadamente 680 nm. A maior intensidade foi

observada pela população com diâmetro de partícula de 710 nm, de acordo com as micrografias (Figura 13A).

O cálculo de tamanho de partícula é valido para amostras esféricas. Assim, como as NCs apresentam diâmetro na ordem nanométrica e comprimentos micrométricos, as técnicas de medida que envolvem equacionamentos complexos levando em consideração o formato das partículas não são os melhores métodos para avaliar o tamanho das mesmas. Neste caso, a microscopia é a técnica mais adequada. Entretanto, optou-se por avaliar todas as amostras para fins de comparação.

Tabela 7. Diâmetro médio e índice de polidispersão (IP) das partículas obtidos por espalhamento de luz dinâmico e potencial Zeta (mV) das suspensões.

AMOSTRAS	Diâmetro médio das partículas (nm)	IP	Potencial zeta (mV)
Ch-NC-AF-A	2148 ± 921^{a}	$0,4 \pm 0,1^{c}$	$+ 57 \pm 2^{ab}$
Ch-NC-AF-B	2044 ± 84^{ab}	$0,37 \pm 0,02^{c}$	$+ 60 \pm 4^{a}$
NQ-AF-A	680 ± 90^{abcd}	$0,67 \pm 0,08^{b}$	$+ 29 \pm 1^{cd}$
NQ-AF-B	793 ± 519^{abcd}	$0,7 \pm 0,1^{abcd}$	$+ 21 \pm 2^{d}$
NQ-NC-AF-A	1986 ± 1113^{abc}	$0,3 \pm 0,1^{cd}$	$+ 30 \pm 3^{cd}$
NQ-NC-AF-B	969 ± 295^{abcd}	$0,6 \pm 0,2^{abcd}$	$+ 22 \pm 1^{d}$
NC	608 ± 225^{bcd}	$0,81 \pm 0,01^{ab}$	$- 19 \pm 1^{e}$
NQ	270 ± 70^{d}	$0,8 \pm 0,1^{a}$	$+ 23 \pm 1^{d}$
NQ-NC	292 ± 237^{d}	$0,98 \pm 0,02^{a}$	$+ 23 \pm 2^{d}$

Nessa tabela: **Amostra Ch-NC-AF-A** - mistura física de quitosana, nanocelulose e ácido fólico; **Amostra Ch-NC-AF-B** - mistura física de quitosana, nanocelulose e ácido fólico; **Amostra NQ-AF-A -** nanopartícula de quitosana com ácido fólico; **Amostra NQ-AF-B** - nanopartícula de quitosana com ácido fólico; **Amostra NQ-NC-AF-A** - nanopartícula de quitosana e nanocelulose com ácido fólico e **Amostra NQ-NC-AF-B** - nanopartícula de quitosana e nanocelulose com ácido fólico. Sendo letra **A** para amostras produzidas pelo método A (ácido fólico com ou sem nanocelulose adicionado à solução de quitosana) e letra **B** para amostras produzidas pelo método B (ácido fólico com ou sem nanocelulose adicionado à solução de TPP). **Amostra NC** – Solução de nanocelulose; **Amostra NQ** – nanopartícula de quitosana; **Amostras NQ-NC** – nanopartícula de quitosana e nanocelulose. Os valores apresentam a média ± desvio padrão (n =3). $^{a-e}$ Médias seguidas de letrais iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância. Fonte: Própria autoria.

Os diâmetros hidrodinâmicos de partículas da amostra NQ-NC, sem AF, têm tamanhos de partículas de cerca de 292 nm. Estes valores correspondem às menores partículas observadas por FEG-SEM na Figura 12C. Os aglomerados não foram evidenciados pela análise de DLS. No entanto, para a amostra NQ-NC-AF foram observadas partículas com 34 nm de diâmetro e aglomerados com 2944 nm. O pico mais intenso refere-se ao diâmetro hidrodinâmico dos

aglomerados e o menor ao diâmetro das partículas isoladas. Esses aglomerados correspondem à rede tridimensional composta por nanopartículas de quitosana e nanocelulose (Figura 13D).

O IP fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos. Como as amostras obtidas neste trabalho tiveram valores de IP altos, entre 0,3 e 1,0, pode-se concluir que foram produzidos sistemas polidispersos (NEMEN; LEMOS-SENNA, 2011).

Nas amostras contendo ácido fólico encapsulado com quitosana por geleificação iônica (NQ-AF), apenas partículas nanométricas foram observadas (picos em 38, 122 e 220 nm). Na comparação entre os métodos de produção das partículas contendo ácido fólico, pode-se observar que o método B, em que o ácido fólico foi adicionado na solução de TPP e posteriormente gotejado na quitosana, as partículas tiveram índice de polidispersão maior do que aquelas produzidas pelo método A (Tabela 7), como constatado nas imagens FEG-SEM (Figura 13A e Figura 13B).

Pode-se verificar também que as amostras que encapsularam o ácido fólico (NQ-AF-A, NQ-AF-B, NQ-NC-AF-A e NQ-NC-AF-B) ficaram maiores que as sem AF (NQ e NQ-NC) devido à estrutura mais complexa. Yoksan et al. (2010) verificaram que o diâmetro médio das partículas de quitosana era de ~2,5 µm, entretanto as partículas carregadas com palmitato de ascorbila apresentaram diâmetro menores. Esses resultados refletiram que a agregação das partículas de quitosana carregadas com o palmitato foram menores que as partículas de quitosana, sendo resultado da hidrofobicidade das moléculas de palmitato aprisionadas no interior das partículas de quitosana. Já no caso do AF, ele é uma vitamina solúvel, portanto esse fenômeno não foi percebido, pelo contrário, partículas com o composto ativo se mostraram maiores do que aquelas sem composto ativo. Xue et al. (2015) verificaram que as partículas de um fármaco (Bay 41-4109) encapsulado com quitosana por geleificação com TPP possuíram diâmetro entre 151 e 800 nm, variando com a concentração dos compostos.

O potencial zeta medido nas amostras produzidas estão apresentados na Tabela 7 este parâmetro indica a estabilidade das amostras a partir da magnitude da repulsão ou da atração eletrostática ou das cargas entre partículas. De acordo com Oropeza (2011), sistemas com potenciais zeta menores que -30 mV e maiores que 30 mV apresentam maior estabilidade devido à maior repulsão entre as partículas evitando aglomeração.

As NCs apresentam potencial zeta negativo (-19 ± 1 mV) devido à hidrólise com ácido sulfúrico, mantendo grupos sulfatos (SO_3^-) distribuídos aleatoriamente sobre a superfície da NC. A associação das NCs e AF também apresentaram valores negativos (- 37 ± 2 mV), porém ligeiramente mais baixos que os compostos isolados. O AF, quando colocado em suspensão de NC, poderia contribuir com as cargas negativas na superfície das fibras, provavelmente devido à predominância dos grupos COO^- do ácido glutâmico (Figura 1).

A solução de nanopartículas de quitosana apresenta potencial zeta positivo (+ 23 ± 1 mV). Este resultado confirma a presença dos grupos amino na superfície das partículas em pH próximo de 3,5, na sua forma predominantemente protonada (NH_3^+). Nos sistemas híbridos NQ-NC, pode-se observar que as cargas superficiais das partículas também foram predominantemente positivas e semelhantes aos valores encontrados para NQs. Este resultado pode ser atribuído à presença de quitosana na superfície do compósito ou ainda à predominância de NQ em relação às NQ-NC. Comparando os dois métodos de produção, os maiores valores de potencial zeta foram observados para as partículas produzidas pelo método A, onde o ácido fólico com ou sem nanocelulose foi adicionado à solução de quitosana, indicando maior estabilidade das mesmas em suspensão (Tabela 7).

5.1.3. Estabilidade do ácido fólico por CLAE

Para a quantificação de AF por CLAE, primeiramente foi realizada a construção de curva padrão. Em seguida, testes preliminares de extração foram realizados, em água ou NaOH.

5.1.3.1. Padronização externa do ácido fólico por CLAE

Para a quantificação de AF por CLAE, foi necessário construir uma curva padrão. Para isso, foram analisadas 9 níveis de concentrações dos ativos e os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Áreas encontradas e suas concentrações de AF para construção da curva padrão.

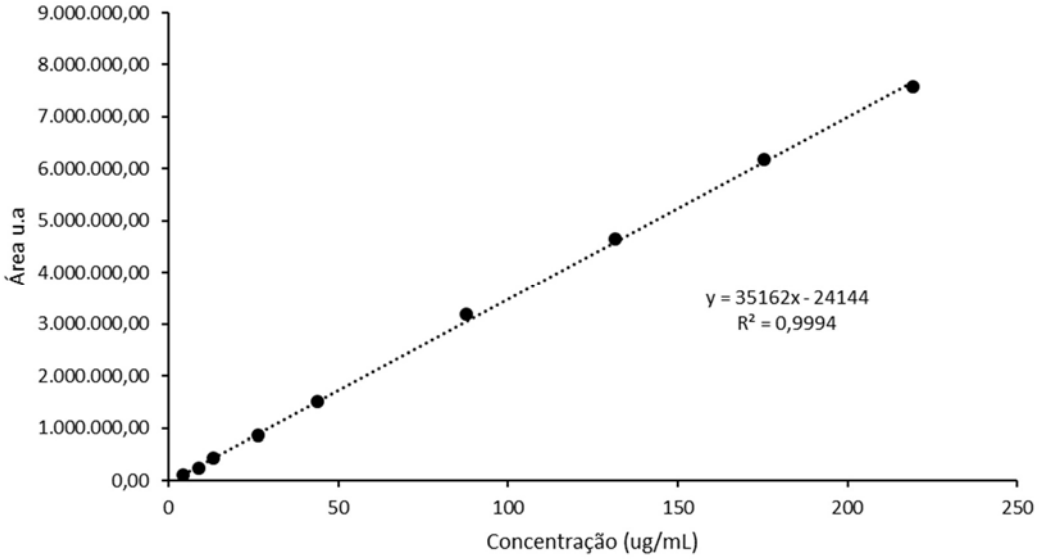
Nível	Concentração de AF (ug/mL)	Área u.a.* (282 nm)	Fator Linear.
1	4,3844	113.288,4	25839
2	8,7688	233.619,3	26642
3	13,1532	435.184,2	33086
4	26,3064	862.970,1	32805
5	43,844	1.512.196,5	34490
6	87,688	3.189.068,5	36368
7	131,532	4.653.957,1	35383
8	175,376	6.173.911,4	35204
9	219,22	7.583.244,1	34592

Fonte: Própria autoria.
*u.a.: unidades arbitrárias

A curva padrão do ácido fólico pode ser visualizada na Figura 14, onde são relacionadas as áreas obtidas na cromatografia com a concentração do ativo analisada. Essa

curva possibilita o cálculo da concentração de AF nas amostras a partir dos coeficientes da reta obtida.

Figura 14. Curva padrão do ácido fólico obtido por CLAE.



Fonte: Própria autoria.

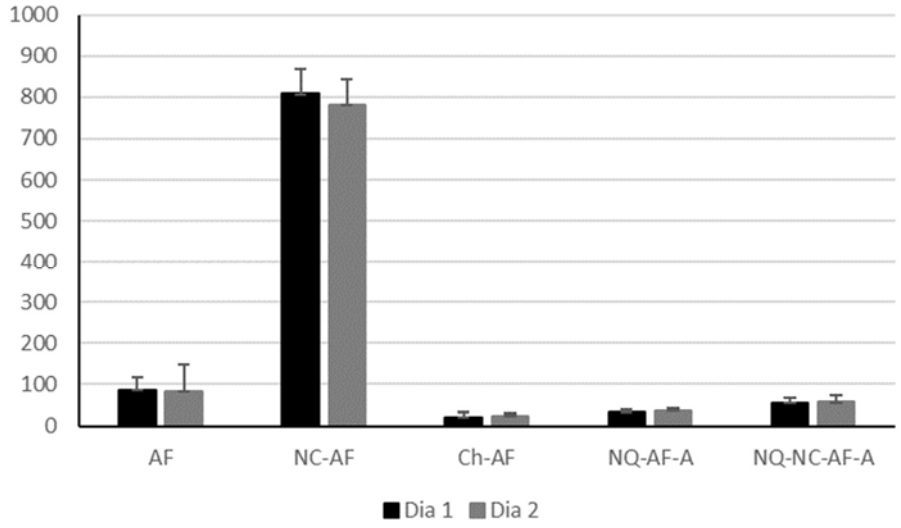
Portanto a curva padrão foi obtida por regressão linear, resultando na equação 2 (R^2 = 0,9994).

$$A_{282} = 35162 * [AF] - 24144 \qquad \text{(Equação 3)}$$

5.1.3.2. Teste para quantificação de AF

O primeiro teste foi realizado com solução tampão fosfato pH 6,7 somente nas amostras AF, Ch-AF e NQ-AF-A a fim de se obter o melhor protocolo para extração. Como pode ser observado na Figura 15 somente as amostras que contêm NC foram possíveis de quantificação, contendo 807 µg de AF/g de amostra, muito possivelmente porque elas não encapsulam o AF e, portanto, ele está livre e pode ser quantificado nessas amostras. O AF livre apresentou baixo teor na quantificação por CLAE utilizando solução tampão (83 µg de AF/g de amostra) considerando que a quantidade de AF adicionado foi de 1000 µg de AF/g de amostra. Esse fato pode ter ocorrido pelo excesso que separou durante a centrifugação. Já nas amostras que contêm quitosana, o AF pode estar ligado a essas partículas e no momento da centrifugação decanta junto com a quitosana. Portanto essa extração não se mostrou viável para esta quantificação.

Figura 15. Quantificação de AF por CLAE utilizando primeira metodologia de extração testada.



Nessa figura: **Amostra AF** – Solução de AF em solução tampão; **Amostra NC-AF –** Suspensão de nanocelulose e ácido fólico; **Amostra Ch- AF** - mistura física de quitosana e ácido fólico; **Amostras NQ-NC** – nanopartícula de quitosana e nanocelulose; **Amostra NQ-AF-A -** nanopartícula de quitosana com ácido fólico e **Amostra NQ-NC-AF-A** - nanopartícula de quitosana e nanocelulose com ácido fólico. Sendo letra **A** para amostras produzidas pelo método A (ácido fólico com ou sem nanocelulose adicionado à solução de quitosana) Fonte: Própria autoria.

O segundo teste foi realizado para extração utilizando NaOH 0,1M. Esta extração foi mais eficiente para quantificação do AF, pois o hidróxido de sódio solubiliza o AF e desestabiliza a estrutura das partículas, possibilitando a extração e posterior quantificação da vitamina. Visualmente foi possível perceber essa eficiência, visto que depois da centrifugação o precipitado não estava amarelo, estava transparente e parecido com a amostra de quitosana sem AF. Os resultados encontrados para este teste estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Quantificação de AF utilizando a extração com NaOH e tampão.

Amostra	**Área u.a. (282 nm)**	**Concentração de AF (µg/g de amostra)**
AF	2970420,1	851,6
Ch-AF	3032337,1	869,2
NQ-AF-A	2953394,8	846,8

Fonte: Própria autoria.

As amostras apresentaram quantidades de AF similares no primeiro dia de produção, em torno de 856 µg de AF/g de amostra. Este teste foi o mais coerente considerando a quantidade inicial adicionada de AF (1000 µg/g de amostra) e a possível degradação ou perdas durante os processos de extração e quantificação. Frommherz et al. (2014) utilizaram um

método semelhante para quantificar AF em suco. Os autores adicionaram 1:1 de suco : solução de NaOH 0,1%.

Assim, esta metodologia de extração e quantificação foi a única utilizada para os demais resultados.

A EE de AF foi calculada apenas para as amostras contendo partículas em suspensão, ou seja, para o AF encapsulado com NQs (5A e 5B), e para o AF encapsulado no sistema híbrido NQ/NC (6A e 6B). Os resultados estão apresentados na Tabela 10. Independente da presença das nanocelulose, e do método de produção utilizado, a eficiência de encapsulação foi alta, em torno de 98%.

Tabela 10. Eficiência de encapsulação das amostras.

Amostra	EE (%)
NQ-AF-A	98,91 ± 0,02[a]
NQ-AF-B	98,79 ± 0,03[a]
NQ-NC-AF-A	98,6 ± 0,4[a]
NQ-NC-AF-B	98,6 ± 0,6[a]

Nessa tabela: **Amostra NQ-AF-A -** nanopartícula de quitosana com ácido fólico; **Amostra NQ-AF-B** - nanopartícula de quitosana com ácido fólico; **Amostra NQ-NC-AF-A** - nanopartícula de quitosana e nanocelulose com ácido fólico e **Amostra NQ-NC-AF-B** - nanopartícula de quitosana e nanocelulose com ácido fólico. Sendo letra **A** para amostras produzidas pelo método A (ácido fólico com ou sem nanocelulose adicionado à solução de quitosana) e letra **B** para amostras produzidas pelo método B (ácido fólico com ou sem nanocelulose adicionado à solução de TPP). * Os valores apresentam a média ± desvio padrão (n =3). ** Médias seguidas de letrais iguais na mesma coluna não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Fonte: Própria autoria.

5.1.3.3. Estabilidade do ácido fólico em função do tempo e luminosidade

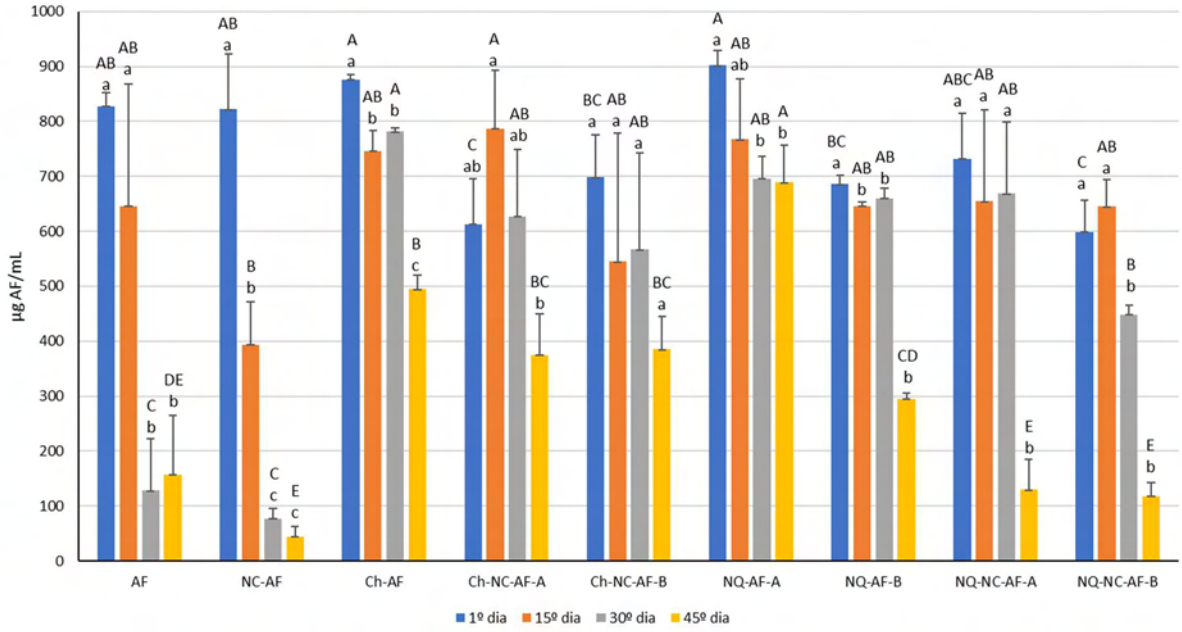
Foi realizada a quantificação de AF por CLAE e as Figura 16 e Figura 17 apresentam os valores encontrados após o 1º, 15º, 30º e 45º dias de produção para as amostras com proteção da luz ambiente e sem proteção, respectivamente. Em geral, pode-se observar a gradativa degradação do AF, independente da proteção da luz ambiente.

A concentração de AF na solução controle, sem encapsulação, diminui de 827,6 a 646,1 µg/g de amostra já nos primeiros 15 dias das amostras com proteção da luz. No AF colocado na suspensão de NC também houve degradação semelhante ao controle nos 15 primeiros dias, evidenciando que as NC não apresentaram efeito positivo na estabilidade do AF. Entretanto, quando o AF foi encapsulado com quitosana por geleificação iônica, a concentração de ativo permaneceu estável até aproximadamente 30 dias, sendo de 650 µg/g

enquanto o AF controle nesse mesmo período era de 157 µg/g. É interessante notar, que a própria solução de quitosana tem efeito positivo na estabilização do composto ativo.

Godoy et al. (2004) estudaram a degradação de AF em leite durante o período de estocagem, e perceberam que houve perda acentuada nos níveis de AF dos leites analisados. Sendo que em 120 dias de estocagem a perda chegou à 61,5 ± 6,2 no leite em pó, 29, 0 ± 5,4 no leite esterelizado e 20, 0 ± 2,6 no achocolatado.

Figura 16. Quantificação de AF por CLAE nas amostras com proteção à luz ambiente no período de 45 dias.

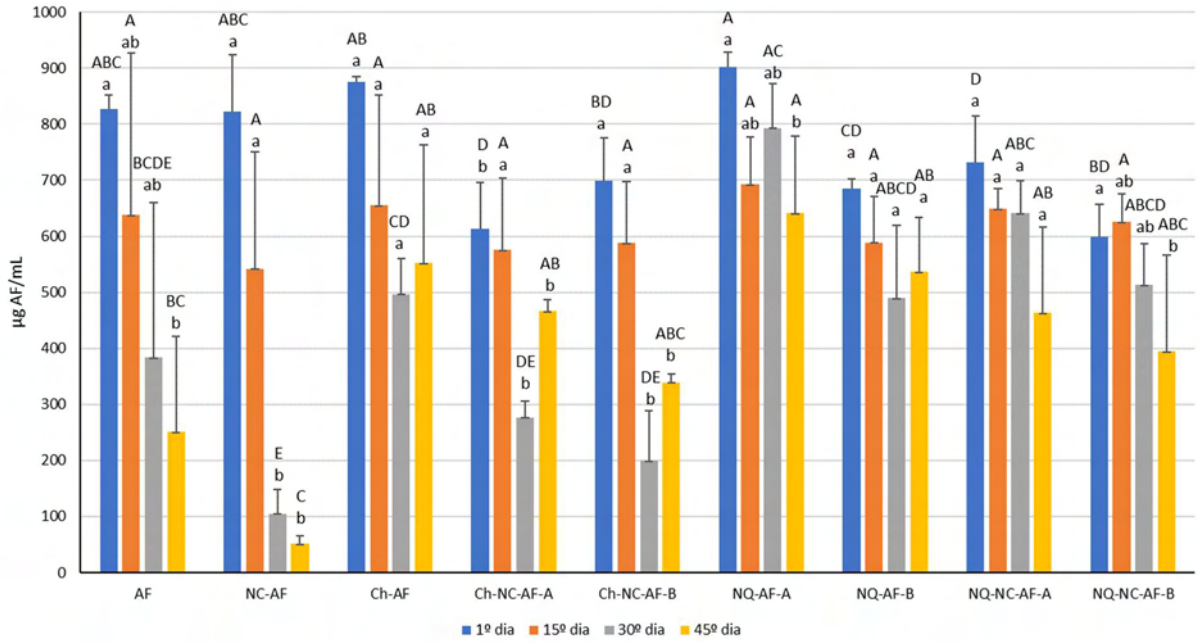


Nessa figura: **Amostra AF** – Solução de AF em solução tampão; **Amostra NC-AF** – Suspensão de nanocelulose com AF; **Amostra Ch-AF** – Solução de quitosana com AF; **Amostra Ch-NC-AF-A** - mistura física de quitosana, nanocelulose e ácido fólico; **Amostra Ch-NC-AF-B** - mistura física de quitosana, nanocelulose e ácido fólico; **Amostra NQ-AF-A -** nanopartícula de quitosana com ácido fólico; **Amostra NQ-AF-B** - nanopartícula de quitosana com ácido fólico; **Amostra NQ-NC-AF-A** - nanopartícula de quitosana e nanocelulose com ácido fólico e **Amostra NQ-NC-AF-B** - nanopartícula de quitosana e nanocelulose com ácido fólico. Sendo letra **A** para amostras produzidas pelo método A (ácido fólico com ou sem nanocelulose adicionado à solução de quitosana) e letra **B** para amostras produzidas pelo método B (ácido fólico com ou sem nanocelulose adicionado à solução de TPP). * Os valores apresentam a média ± desvio padrão (n =3). ** Barras identificadas com letras maiúsculas iguais para um mesmo intervalo de tempo, assim como letras minúsculas iguais para uma mesma amostra ao longo do tempo não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Fonte: Própria autoria.

Um estudo realizado com suco enriquecidos com AF também indicou uma não linearidade do processo de degradação desta vitamina durante um ano (46 %), sendo observado uma taxa maior no primeiro mês. (FROMMHERZ et al., 2014). Neste estudo também verificaram que embalagens transparentes apresentaram maior degradação quando

armazenadas sob influência da luz comparadas com as armazenadas no escuro. Entretanto, esses sucos não mostraram diferença na degradação quando comparadas as outras embalagens.

Figura 17. Quantificação de AF por CLAE nas amostras sem proteção à luz no período de 45 dias.



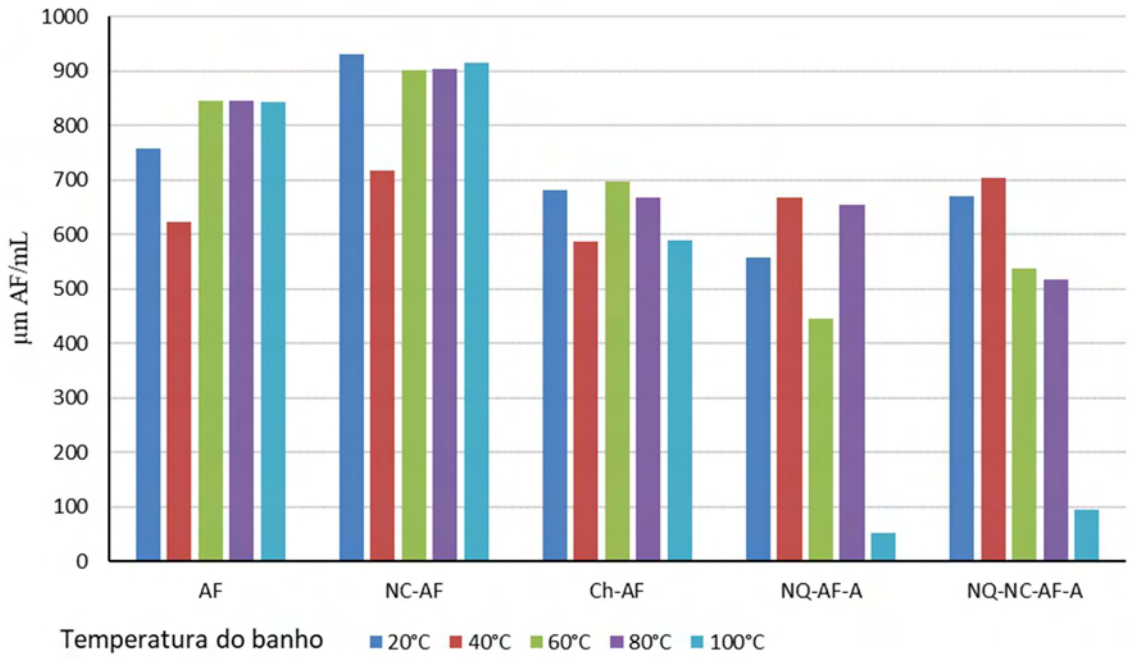
Nessa figura: **Amostra AF** – Solução de AF em solução tampão; **Amostra NC-AF** – Suspensão de nanocelulose com AF; **Amostra Ch-AF** – Solução de quitosana com AF; **Amostra Ch-NC-AF-A** - mistura física de quitosana, nanocelulose e ácido fólico; **Amostra Ch-NC-AF-B** - mistura física de quitosana, nanocelulose e ácido fólico; **Amostra NQ-AF-A -** nanopartícula de quitosana com ácido fólico; **Amostra NQ-AF-B** - nanopartícula de quitosana com ácido fólico; **Amostra NQ-NC-AF-A** - nanopartícula de quitosana e nanocelulose com ácido fólico e **Amostra NQ-NC-AF-B** - nanopartícula de quitosana e nanocelulose com ácido fólico. Sendo letra **A** para amostras produzidas pelo método A (ácido fólico com ou sem nanocelulose adicionado à solução de quitosana) e letra **B** para amostras produzidas pelo método B (ácido fólico com ou sem nanocelulose adicionado à solução de TPP). * Os valores apresentam a média ± desvio padrão (n =3). ** Barras identificadas com letras maiúsculas iguais para um mesmo intervalo de tempo, assim como letras minúsculas iguais para uma mesma amostra ao longo do tempo não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Fonte: Própria autoria.

5.1.3.4. Estabilidade do ácido fólico em função da temperatura

A Figura 18 apresenta os resultados de concentração de AF (µg/g de amostra) para o primeiro teste da influência da temperatura na degradação do AF não encapsulado e encapsulado com NQ, NC, e no sistema híbrido NQ/NC. A partir destes resultados, pode-se observar que o ácido fólico puro em solução tampão não degradou em nenhuma das temperaturas testadas. Foi possível observar a degradação apenas na temperatura do banho de 100ºC para as amostras 5A e 6A, isso ocorreu pois a quitosana se degrada nessa temperatura e

libera o AF. A solução da amostra possui pH médio de 3,7, sendo portanto favorável à degradação do AF.

Figura 18. Quantificação de AF contido nas amostras em função da temperatura: temperatura ambiente, 40, 60, 80, e 100 °C.



Nessa figura: **Amostra AF** – Solução de AF em solução tampão; **Amostra NC-AF** – Suspensão de nanocelulose com AF; **Amostra Ch-AF** – Solução de quitosana com AF; **Amostra NQ-AF-A -** nanopartícula de quitosana com ácido fólico e **Amostra NQ-NC-AF-A** - nanopartícula de quitosana e nanocelulose com ácido fólico. Sendo letra **A** para amostras produzidas pelo método A (ácido fólico com ou sem nanocelulose adicionado à solução de quitosana). Fonte: Própria autoria.

Portanto como conclusões parciais dos resultados obtidos até esta etapa do trabalho, foi possível constatar que não houve diferenças entre os métodos A e B em relação à eficiência de encapsulação. Além disso, o Método B apresentou partículas com formatos mais irregulares e mais próximos dos diâmetros da amostra controle.

Assim, a caracterização por espectroscopia, termogravimetria e liberação *in vitro* foram realizadas apenas para as partículas obtidas pelo método A. Nesta etapa do projeto, houve um problema com o equipamento de CLAE e o mesmo ficou aguardando manutenção por 9 meses. Assim, foi necessário adaptar a quantificação do AF por espectrometria UV-Vis para as etapas seguintes.

5.2. Caracterização por ATR-FTIR

Foi feita a caracterização das amostras liofilizadas por ATR-FTIR para identificar alterações moleculares nos polímeros obtidos ou nas interações AF / polímero. Os espectros

estão apresentados na Figura 19 nas regiões de 1800 a 600cm $^{-1}$, onde as principais bandas de absorbância são observadas estão descritas.

Para NC, o pico fraco centrado em 1730 cm^{-1} no espectro de FTIR pode ser atribuído à vibração de estiramento C = O da ligação éster do grupo carboxílico dos ácidos ferúlico e p-cumárico e o pico a 1642 cm^{-1} corresponde à vibração estrutural aromática da lignina remanescente (REDDY; YANG, 2009). Os picos de absorbância observados na região espectral 1649-1641 cm^{-1} também podem ser atribuídos à curvatura de O-H da água adsorvida (LE TROËDEC et al., 2009). Os picos entre 1172 e 1052 cm^{-1} no espectro de NCs foram relacionados às vibrações de éter glicosídico da celulose (MORÁN et al., 2008). A faixa mais intensa no espectro de NCs foi centrada em torno de 1030 cm^{-1} e foi atribuída à contribuição de várias vibrações associadas à vibração assimétrica de CH e ao estiramento de CO das ligações β-glicosídicas entre as unidades de β-D-glucopiranosil em celulose. A faixa de absorção significativa de 950 a 820 cm^{-1} devido à curvatura C = C também pode estar associada às ligações β -glicosídicas (MANDAL; CHAKRABARTY, 2014).

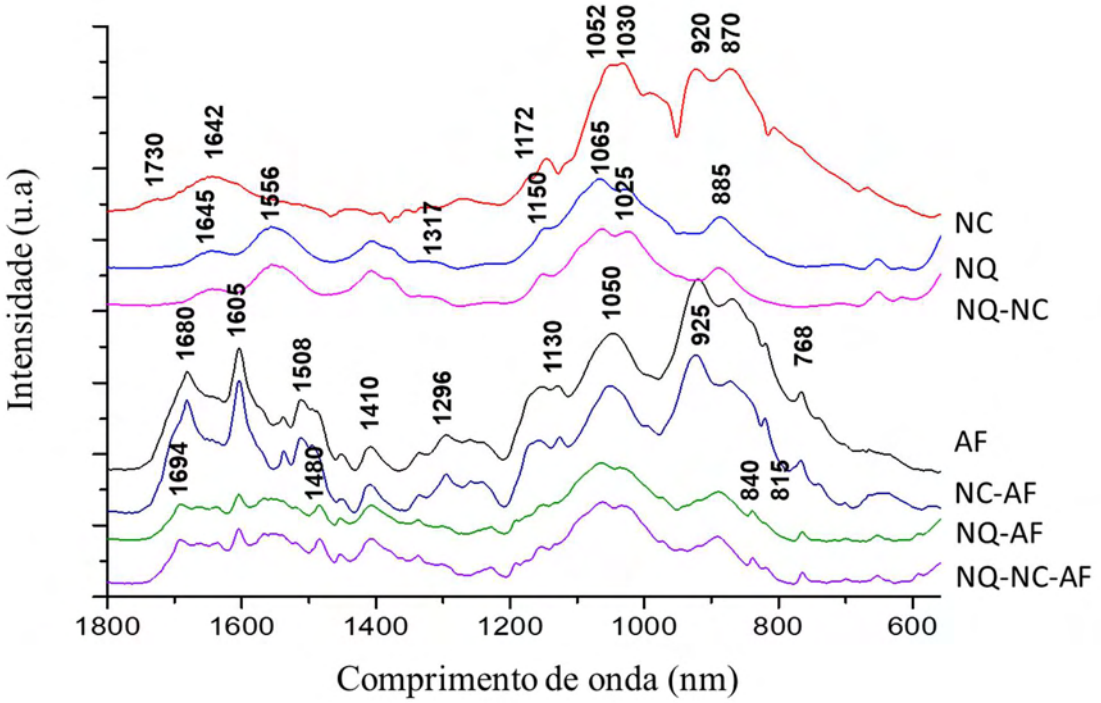
As nanopartículas de quitosana (NQ) apresentam bandas típicas de polissacarídeos com um amplo alongamento de grupos O-H próximos a 3250 cm^{-1}. Uma banda de baixa intensidade centrada em 2880 cm^{-1} surge da deformação axial de CH_2 de CH_2 e grupos CH_3 da unidade de glucosamina na estrutura de quitosana. A banda de 1645 cm^{-1} é atribuída à posição C_2 no grupo NH_2 da amina, e os sinais de pico a 1556 cm^{-1} correspondem à flexão de NH da amida II no modo vibracional. Uma vibração de intensidade média a 1317 cm^{-1} é característica dos grupos -OH, -NH_2 ou -CO. As intensidades médias de bandas de 1360 a 1080 cm^{-1} são atribuídas a CN que se estende a partir de grupos amina. As vibrações mais intensas em 1150 e 1065 cm^{-1} estão associadas ao estiramento-C-O-C na ligação glicosídica. O pico centrado em 885 cm^{-1} é atribuído à dobra fora do plano do CH presente na estrutura de quitosana.

Apenas poucas diferenças foram observadas nos espectros do sistema híbrido NQ/NC (amostra 10). O pico a 1030 cm^{-1} (para NC) foi deslocado para 1025 cm^{-1} e foi mais forte no compósito. Além disso, o pico a 1097 cm^{-1} foi mais pronunciado no compósito, mostrando a possível interação entre NC e NQ por vibração assimétrica de CH e o alongamento OCO das ligações glicosídicas entre o aldeído presente em NC e NQ com os grupos OH, também apresentado em ambos os carboidratos. Além disso, os carboidratos podem ser conectados por ligações de hidrogênio, mas isso não é evidente nos espectros de FTIR. Essas interações podem explicar as fibras de celulose envolvidas no NQ observadas nas imagens microscópicas (Figura 12C).

Para os espectros FTIR do ácido fólico puro (AF), foram observadas principalmente vibrações de estiramento C = O a 1680 cm^{-1}, o modo de flexão do grupo NH em 1605 cm^{-1} e a

absorção do anel aromático (C = C) a 1508 cm $^{-1}$ (BAKHSHI et al., 2013). Bandas características de carboidratos foram observadas de 1200 a 800 cm $^{-1}$ relacionadas a vibrações de estiramento dos grupos C-O e C-C e vibração de flexão do grupo C-O-H (KAČURÁKOVÁ; MATHLOUTHI, 1996). Uma faixa característica do ácido fólico foi observada em torno de 768 cm^{-1} atribuída à curvatura C-H aromática, que não foi sobreposta com a faixa de vibração de NC e NQ.

Figura 19. Espectros de infravermelho das amostras liofilizadas contendo ou não ácido fólico.



Nessa figura: **Amostra NC** – Suspensão de nanocelulose; **Amostra NQ** – nanopartícula de quitosana; **Amostra NQ-NC** – nanopartícula de quitosana e nanocelulose; **Amostra AF** – Solução de AF em solução tampão; **Amostra NC-AF** – Suspensão de nanocelulose com AF; **Amostra NQ-AF -** nanopartícula de quitosana com ácido fólico; **Amostra NQ-NC-AF** - nanopartícula de quitosana e nanocelulose com ácido fólico. Fonte: Própria autoria.

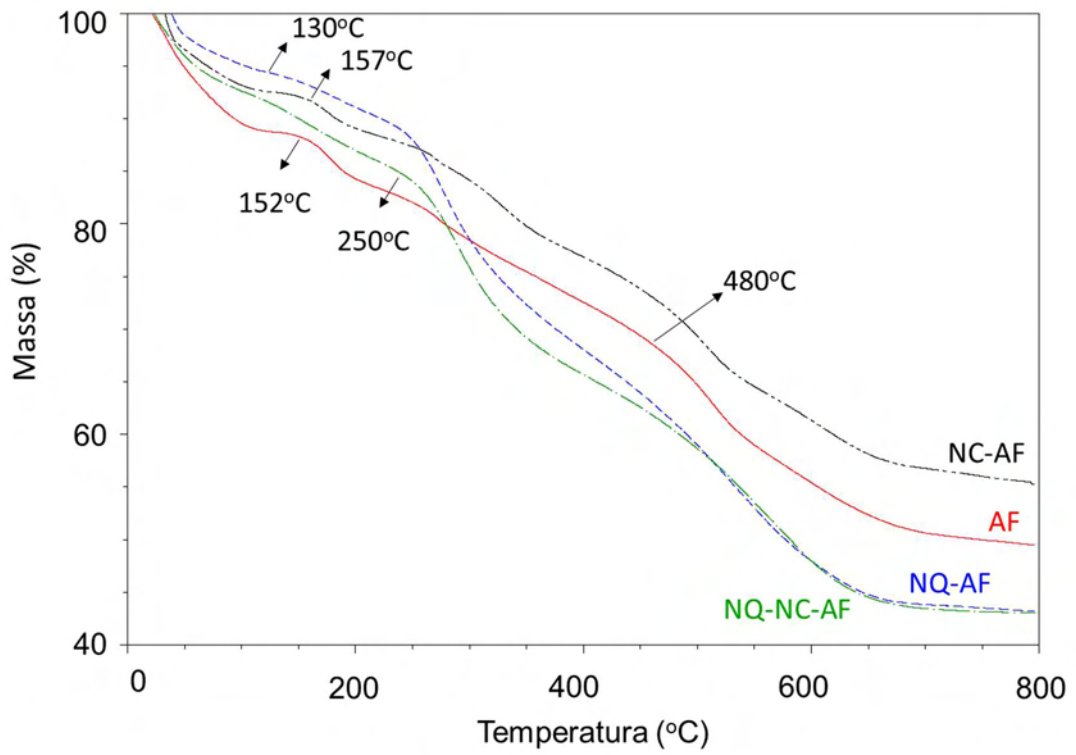
Os espectros de amostras contendo AF (2, 5A e 6A) revelam a presença de AF. Não foram observadas diferenças significativas para amostras contendo NC e AF, sugerindo que não houve interação química. No entanto, para amostras produzidas por geleificação iônica com quitosana e TPP, o deslocamento do pico do grupo carboxila de 1680 cm $^{-1}$ para 1694 cm $^{-1}$ pode indicar a formação de ligação éster entre FA e quitosana (VARSHOSAZ; TAYMOURI; HAMISHEHKAR, 2014). O pico centrado em 1508 cm^{-1} atribuído à absorção do anel aromático do FA foi deslocado para 1480 cm^{-1} para as amostras 5A ou 6A. A presença de C = C e C-H curvando-se a 840 e 815 cm^{-1}, respectivamente, sugere a interação química entre os polímeros e a vitamina, que foi mais pronunciada nos sistemas híbridos.

5.3. Análise termogravimétrica (TGA)

As estabilidades térmicas do AF e das partículas liofilizadas são comparadas nos termogramas da Figura 20, de acordo com as análises de TG. A degradação do AF começa no início da elevação da temperatura até 152°C. Esta perda de massa inicial de 11,4% é atribuída à dessorção de água ligada fisicamente e quimicamente, então, 6,4% da massa degradam até 250°C. Segundo Vora et al. (2002), o ácido fólico é completamente degradado à 195°C. A terceira degradação ocorre de 250 a 480°C e ocorreu 14% de degradação da massa. Estes dois eventos estão de acordo com a degradação do ácido fólico (CAMACHO et al., 2019; VORA et al., 2002). Após essa etapa, ocorreram descarbonilação e decomposição pirolítica e o AF foi degradado em fragmentos de carbono, conforme evidenciado por Vora et al. (2002). Ao final da análise à 800°C, a massa corresponde à 49,5% da massa inicial.

As partículas liofilizadas (NQ-AF-A), em geral, apresentaram uma perda de massa inicial, relacionada à água e a perda de massa variou de 6,5% a 8,0%. O segundo evento corresponde à degradação de AF com pequenas diferenças entre as amostras.

Figura 20. Termogramas das amostras com AF.



Nessa figura: **Amostra AF** – Solução de AF em solução tampão; **Amostra NC-AF** – Suspensão de nanocelulose com AF; **Amostra NQ-AF -** nanopartícula de quitosana com ácido fólico; **Amostra NQ-NC-AF** - nanopartícula de quitosana e nanocelulose com ácido fólico. Fonte: Própria autoria.

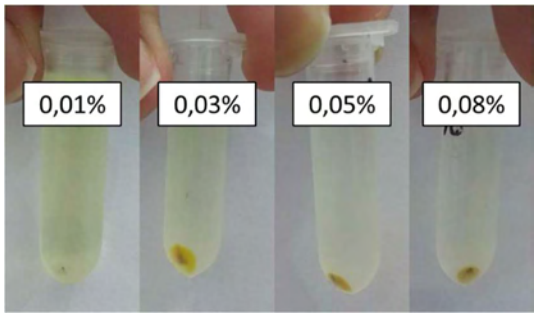
Para as amostras NC-AF, o segundo evento começou em 157°C até 250°C com 4,3% de perda de massa, seguido de outros três eventos até 800°C. Esses eventos estão correspondendo a uma perda de massa de 30,2% relacionada à degradação irreversível dos principais compostos (lignina, hemicelulose e celulose) (LIU et al., 2014). Os resíduos sólidos foram responsáveis por 55% de perda de massa à 800°C.

A degradação térmica de NQ-AF e NQ-NC-AF foi semelhante. A degradação inicial ocorre até 130°C em ambos os casos. No entanto, a água contida no NQ-NC-AF foi superior a NQ-AF, correspondendo a 5,8 e 7,2%, respectivamente. O segundo evento foi caracterizado por uma perda de massa de 5,5 e 6% para NQ-AF e NQ-NC-AF, indicando que o sistema híbrido mantém a estabilidade do AF e que a amostra NQ-NC-AF tinha mais concentração de AF do que NQ-AF. Após a temperatura de 250°C, o perfil de degradação é caracterizado por dois eventos principais devido à degradação da quitosana e NC, relacionados à degradação da estrutura polimérica (MARTELLI-TOSI et al., 2018; MARTINS; MORGADO; ASSI, 2016).

5.2. Quantificação de ácido fólico por Espectrometria UV-Vis

Como método analítico optou-se pela espectrofotometria, por sua simplicidade e precisão. A AF tem dois máximos de absorção, a 280 e 350 nm em meio aquoso (MATIAS et al., 2014); o primeiro máximo é atribuído ao ácido aminobenzóico e o segundo ao grupo pteridina. A absorbância a 280 nm foi selecionada por ser a de maior pico de absorção e, portanto, a sensibilidade é maior. Esse método foi proposto e utilizado para a quantificação de AF por Lopera et al. (2009).

Figura 21. Imagens das amostras contendo AF nas concentrações de 0,03; 0,05 e 0,08% após a centrifugação.



Fonte: Própria autoria.

Para esta avaliação, foi realizado um teste para verificar o excesso de AF que continha nas amostras. Os resultados indicaram que a concentração de 0,01% era a mais indicada para

esta avaliação porque não houve precipitação de AF e não comprometeria a ressuspensão com a presença desse excesso. Na Figura 21 pode ser observado que as concentrações de 0,03; 0,05 e 0,08% tiveram formação de precipitado de AF.

5.3.1. Padronização externa da ácido fólico

A quantificação foi realizada por padronização externa a partir das absorbâncias em 282 nm obtidas das análises de diversos níveis de concentrações dos ativos (Tabela 11).

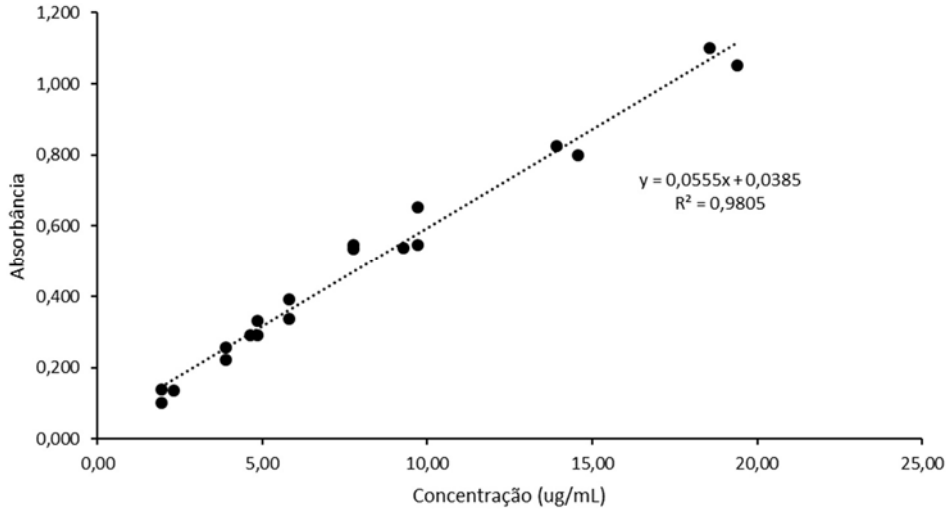
A partir das absorbâncias obtidas no espectrofotômetro, foi construída a curva padrão e o coeficiente da reta obtida foi possível calcular a concentração de ácido fólico nas amostras.

Tabela 11. Concentrações e absorbâncias encontradas para construção da curva padrão do AF no espectrofotômetro, em triplicata.

Concentração de AF (ug/mL)	Absorbância (282 nm)	Concentração de AF (ug/mL)	Absorbância (282 nm)	Concentração de AF (ug/mL)	Absorbância (282 nm)
19,4	1,052	20,95	1,409	23,2	1,354
14,55	0,799	15,71	1,014	18,56	1,101
9,700	0,55	10,48	0,654	13,92	0,825
7,760	0,55	8,38	0,534	9,28	0,539
5,820	0,34	6,29	0,391	4,64	0,29
4,850	0,29	5,238	0,33	2,32	0,137
3,88	0,22	4,1904	0,256	-	-
1,94	0,10	2,0952	0,14	-	-

Fonte: Própria autoria.

Figura 22. Curva padrão do ácido fólico obtido por espectroscopia no UV.



Fonte: Própria autoria.

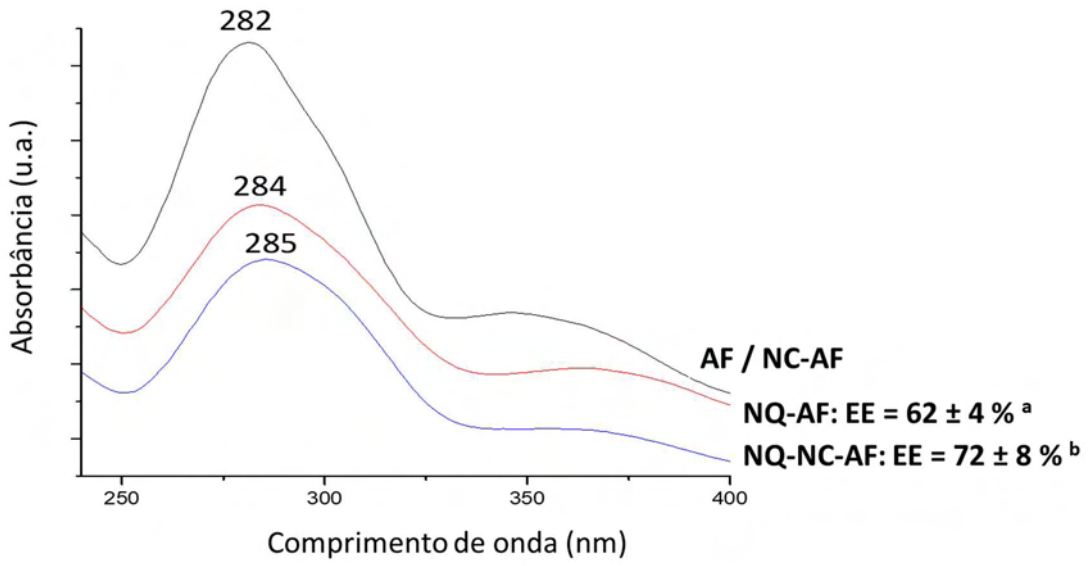
A partir das absorbâncias obtidas na espectroscopia, foi construída a curva padrão (Figura 22), resultando na equação 3 (R^2 = 0,9805).

$$A_{282} = 35162 * [AF] - 24144 \quad \text{(Equação 3)}$$

5.3.2. Eficiência de encapsulação

As partículas carregadas com AF e a mistura física NC-AF foram caracterizadas por espectroscopia UV-vis e os espectros estão apresentados na Figura 23. A vitamina absorveu no comprimento de onda de 282 nm (comprimento de onda máximo) (MATIAS et al., 2014).

Figura 23. Espectro UV-Vis das soluções contendo AF utilizado para o cálculo da EE%.



Nessa figura: **Amostra AF** – Solução de AF em solução tampão; **Amostra NC-AF** – Suspensão de nanocelulose com AF; **Amostra NQ-AF -** nanopartícula de quitosana com ácido fólico e **Amostra NQ-NC-AF** - nanopartícula de quitosana e nanocelulose com ácido fólico. * Os valores apresentam a média ± desvio padrão (n =3). ** Médias seguidas de letrais iguais não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Fonte: Própria autoria.

Como pôde ser observado na Figura 23, as amostras de NQ-AF e NQ-NC-AF não tiveram absorção máxima no mesmo comprimento de onda do AF livre (282 nm). NQ-AF teve maior absorção no comprimento de onda de 284 nm enquanto que NQ-NC-AF, em 285 nm. A mudança de absorção está provavelmente relacionada à ligação iônica entre os grupos $–NH_2$ de quitosana e –OH de AF alterando a densidade de matriz e as interações espectroscópicas como atribuídas por Chakraborty et al (2012). A redução proporcional da intensidade nesse comprimento de onda pode ser atribuída à quantidade relativa de vitamina retida. A diferença de intensidade foi de cerca de 42% e 54% para NQ-AF e NQ-NC-AF, respectivamente.

Portanto, a NC pode melhorar a carga vitamínica nas nanopartículas de quitosana devido à rede tridimensional do sistema híbrido NQ-NC-AF (Figura 13C e D).

Para confirmar estas observações, a eficiência de encapsulação (EE,%) foi determinada medindo a diferença entre a concentração de AF adicionada, e a concentração livre medida no sobrenadante após a centrifugação (equação 1). Os valores de EE foram 62 ± 4 % para o NQ-AF, e maiores valores foram observados para o NQ-NC-AF (EE = 72 ± 8). Estes resultados confirmaram ainda mais o efeito positivo da adição de NC no processo de encapsulação de AF com nanopartículas de quitosana. Estes resultados foram superiores aos encontrados na literatura. Britto et al (2014) também encapsulou a vitamina B_9 utilizando nanopartículas de quitosana obtidas por meio de geleificação iônica com tripolifosfato de sódio (TPP). Sua EE foi muito menor: 5,7%. Pérez-Masiá et al (2015) obteve um EE de 44,0 a 83,9% com 1,5% de bioativo, dependendo do polímero (concentrado proteico de soro de leite e amido resistente) e do processo de encapsulamento (*spray drying* e *electrospraying*). Além do processo, essas diferenças podem estar relacionadas à relação vitamina / polímero. Estudos variando estas concentrações devem ser realizados para otimizar a metodologia,

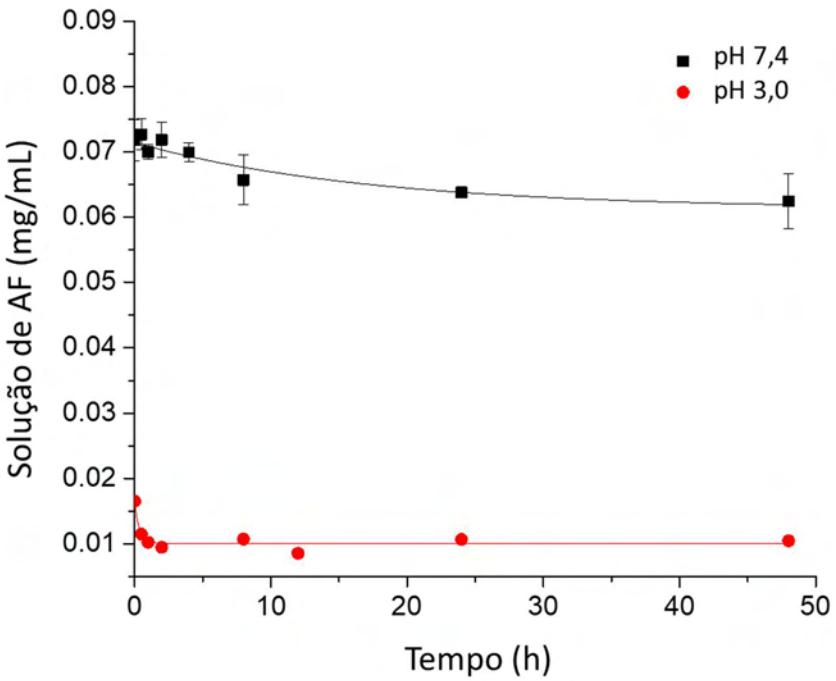
5.3.3. Estabilidade do ácido fólico em função do pH (perfil de liberação controlada)

Estudos de liberação foram realizados para avaliar a capacidade da nanopartícula de quitosana e do veículo NC em controlar a liberação de ácido fólico de acordo com o pH da solução.

O estudo da solução de AF em meio semelhante às amostras é um parâmetro importante para a avaliação do ativo porque indica a resposta de tal composto em diferentes situações. Dessa forma, esse estudo mostrou que o composto ativo em solução ácida (pH 3,0) se degrada enquanto na solução neutra há uma estabilidade, conforme mostra a Figura 24. Nos primeiros minutos, a concentração de AF na solução ácida já decai para 0,016 mg/mL. Esse valor está 4,4x menor do que a quantidade de AF adicionada (0,07 mg/mL). A concentração vai diminuindo para aproximadamente 0,001 mg/mL com o decorrer das horas. Isto indica que o AF em solução ácida degrada rapidamente e que ao se analisar as amostras com partículas esse resultado deve ser considerado.

Já na solução de AF em pH neutro, a concentração de AF se mantém constante nas primeiras horas, próximo de 0,07 mg/mL e ao final atinge 0,06 mg/mL. Portanto, não há degradação do AF durante o teste de liberação controlada neste pH.

Figura 24. Curva de degradação do AF em diferentes pHs.

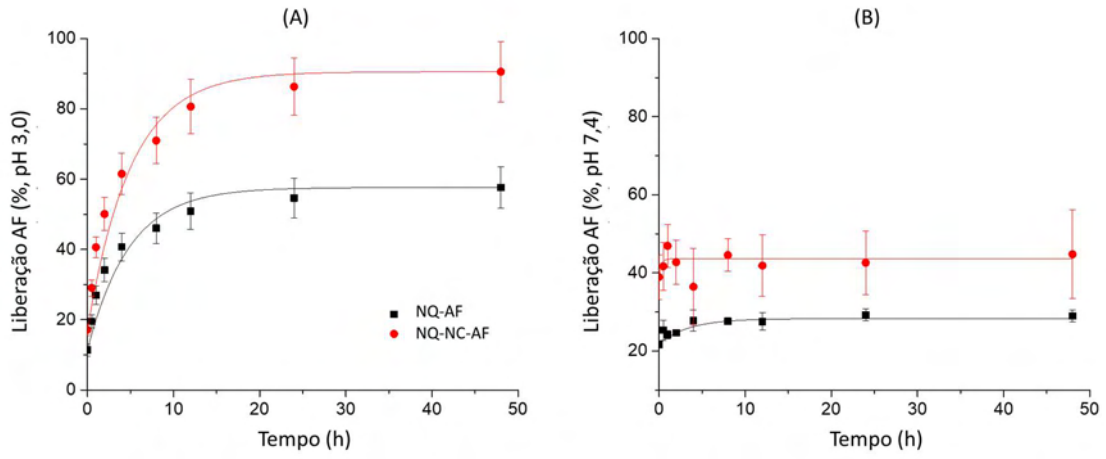


Fonte: Própria autoria.

O perfil de liberação é uma ferramenta utilizada para avaliar a durabilidade do composto ativo encapsulado. De acordo com Britto et al (2014), a propriedade particular da vitamina influencia esse perfil, portanto vitaminas de molécula pequena e solúvel em água são rapidamente liberadas da cápsula. Já vitaminas como a vitamina B9 (AF) a liberação é mais lenta chegando no patamar máximo em 24 h em pH 7,4, enquanto a vitamina C atinge em 2 h. Nesse estudo, pode ser observado na Figura 25 essa liberação também ocorreu em 24 h tanto para as amostras com NC como as sem NC.

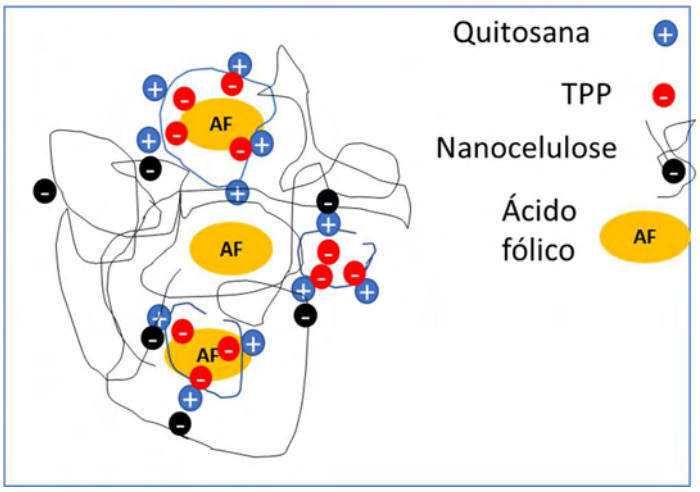
A Figura 25 (A) apresenta a liberação do AF em pH ácido (pH 3,0) e foi calculada considerando a perda por degradação, portanto os valores considerados são acumulativos. Como as NQs são solúveis em ácido, a liberação ocorre de forma mais intensa quando comparada com a liberação em meio neutro (Figura 25 B). A amostra NQ-NC-AF consegue atingir valor de liberação acima de 90%, enquanto a amostra sem NC atinge abaixo de 60%. Quando se compara as duas amostras com e sem NC, pode ser observado que a NC consegue manter a estabilidade do AF em meio ácido. Kolakovic et al. (2012) produziram filmes de nanocelulose carregados com fármaco e conseguiram uma liberação sustentada por até 15-30 dias enquanto a dissolução do fármaco puro se dissolveria completamente em 24 h.

Figura 25. Perfil de liberação controlada das amostras NQ-AF e NQ-NC-AF em pH 3 (A) e em pH 7,4 (B).



Fonte: Própria autoria.

Figura 26. Esquema de interação entre a nanopartícula de quitosana produzida por geleificação iônica e nanocelulose na estabilização de ácido fólico.



Fonte: Própria autoria.

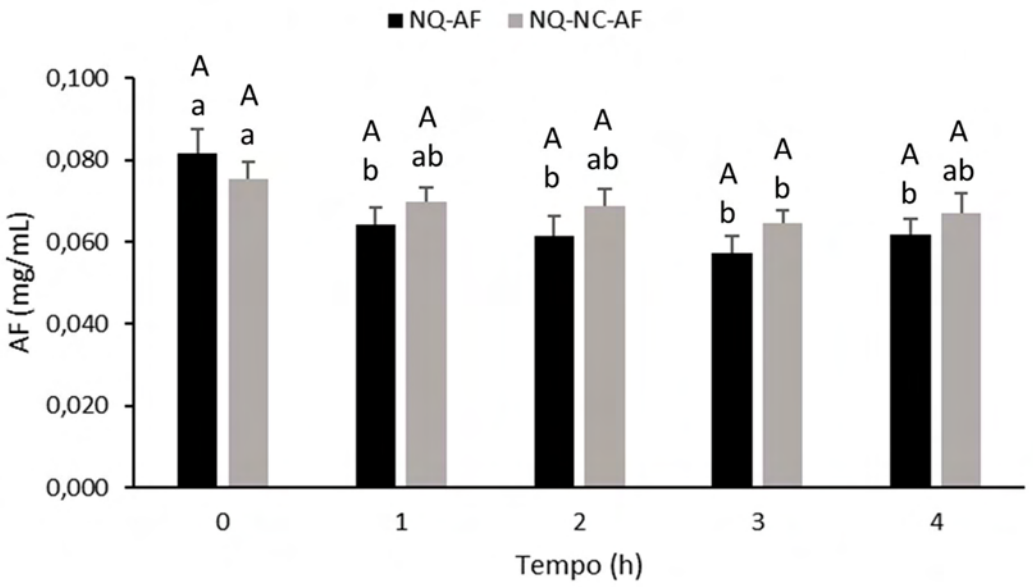
A Figura 25 (B) apresenta a liberação em pH neutro (7,4) e há uma maior liberação do AF na amostra contendo NC. Neste pH, a liberação ocorreu principalmente por causa da difusão e maior solubilidade do AF. A liberação de vitamina atingiu 28,3% para NQ-AF e 43,6% para NQ-NC-AF. Portanto, a liberação de AF ao longo do tempo também é maior para o sistema híbrido, indicando alguma interação das partículas na fibra-quitosana-vitamina. O esquema de interação proposto está apresentado na Figura 26. Portanto, o AF pode estar encapsulado na NQ, ou aprisionado na rede tridimensional composto por NQ e NCs.

5.3.4. Estabilidade do ácido fólico em função da radiação ultravioleta UV

O efeito protetor do encapsulamento contra a degradação da luz ao longo do tempo foi representado pelas quantidades de AF nas amostras (Figura 27).

Pode ser observado que todas as suspensões sofreram degradação já na primeira hora e não houve alteração significativa dessa degradação no decorrer do tempo analisado. Entretanto, houve uma diferença entre as amostras que contem ou não NC. No início do teste, havia maior concentração de AF nas suspensões NQ-AF e após a primeira hora, houve maior perda de AF nessas amostras comparando com a NQ-NC-AF, que se manteve em maior concentração nas outras medições. A degradação de AF na suspensão sem NC foi de 24,4% enquanto a que continha NC foi de 10,7%.

Figura 27. Estabilidade do ácido fólico em função da radiação ultravioleta nas amostras NQ-AF e NQ-NC-AF.



Nessa figura: **Amostra NQ-AF -** nanopartícula de quitosana com ácido fólico; **Amostra NQ-NC-AF** - nanopartícula de quitosana e nanocelulose com ácido fólico. * Os valores apresentam a média ± desvio padrão (n =3). ** Barras identificadas com letras maiúsculas iguais para um mesmo intervalo de tempo, assim como letras minúsculas iguais para uma mesma amostra ao longo do tempo não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Fonte: Própria autoria.

A redução da degradação da luz na NQ-NC-AF é um resultado da distribuição da nanocelulose na matriz de encapsulação. As NCs têm uma capacidade elevada de espalhar luz. Quando distribuídas de forma homogênea no material, as propriedades ópticas são

consideravelmente alteradas reduzindo a intensidade da radiação atingida no núcleo das nanopartículas (TUMMALA et al., 2017).

6. CONCLUSÕES

O desenvolvimento do presente estudo permitiu obter as seguintes conclusões:

- Foi possível produzir sistemas híbridos compostos por nanopartículas de quitosana e nanoceluloses. Esta estrutura foi caracterizada por partículas de quitosana envolvidas na estrutura fibrosa das NCs. Poucas estruturas de NCs foram observadas isoladamente propondo que as partículas tendem a interagir física ou quimicamente entre elas, mesmo que por interações fracas. Na presença de ácido fólico, as fibras foram observadas entre os agrupamentos de NQs estabelecendo uma rede tridimensional.
- Nos sistemas híbridos NQ-NC, pode-se observar que a carga superficial das partículas foi semelhante ao valor encontrado para NQs. Este resultado pode ser atribuído à presença de quitosana na superfície do compósito ou ainda à predominância de NQ em relação às NQ-NC na suspensão. As suspensões do Método A (ácido fólico com ou sem nanocelulose adicionadas na quitosana) apresentaram maior estabilidade.
- Não houve diferenças significativas entre as amostras com ou sem NC, mas a encapsulação com quitosana melhorou a estabilidade do AF nos testes ao abrigo da luz, ou à exposição da luz ambiente.
- Os métodos de encapsulação foram eficientes para manter a estabilidade do AF por 45 dias.
- Em geral, os sistemas híbridos foram capazes de liberar uma maior quantidade de vitamina das partículas, seja em pH 3,0 ou 7,4. Além disso, a rede tridimensional das partículas NQ-NC-AF aumentou a proteção do AF contra a degradação da luz ultravioleta, provavelmente devido às NCs possuírem maior capacidade para dispersar luz.
- Resultados de FTIR mostraram que os picos de características de AF foram mais pronunciados nas partículas compostas, embora não tenham ocorrido interações fortes entre NQ e NC. Análises de degradação térmica corroboram esses resultados.

A relevância deste estudo baseia-se na importância de compreender melhor as interações dos materiais estudados para melhorar as aplicações tecnológicas. Portanto, NQ-NC poderia ser um novo material compósito para ser considerado como veiculador de compostos ativos.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos neste estudo, sugere-se a aplicação das nanopartículas com NC em filmes biodegradáveis para produção de embalagens/coberturas ativas. A presença da rede tridimensional NC-NQ contribuiria não apenas para a melhoria das propriedades mecânicas, mas também para a proteção do composto ativo encapsulado.

Outros compostos ativos puros ou obtidos a partir de extratos vegetais podem ser utilizados para encapsulação neste sistema a fim de avaliar seu potencial uso na encapsulação de compostos ativos de diferentes solubilidades.

É necessário ainda estudar a toxicidades *in vitro* destas partículas, bem como realizar estudos de digestibilidade das amostras produzidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEITUNO-MEDINA, M. et al. Photoprotection of folic acid upon encapsulation in food-grade amaranth (Amaranthus hypochondriacus L.) protein isolate - Pullulan electrospun fibers. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 2, p. 970–975, 2015.

AKHLAGHI, S. P. et al. Comparative release studies of two cationic model drugs from different cellulose nanocrystal derivatives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 1, p. 207–215, 1 set. 2014.

AKHTAR, M. J.; KHAN, M. A.; AHMAD, I. Identification of photoproducts of folic acid and its degradation pathways in aqueous solution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, n. 3, p. 579–588, 2003.

ALBORZI, S.; LIM, L. T.; KAKUDA, Y. Encapsulation of folic acid and its stability in sodium alginate-pectin-poly(ethylene oxide) electrospun fibres. **Journal of Microencapsulation**, v. 30, n. 1, p. 64–71, 2013.

ALEMDAR, A.; SAIN, M. Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues – Wheat straw and soy hulls. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1664–1671, 1 abr. 2008.

ANSELL, M. P.; MWAIKAMBO, L. Y. The structure of cotton and other plant fibres. **Handbook of Textile Fibre Structure**, p. 62–94, 1 jan. 2009.

AOUADA, M. R. DE M. **Aplicação de nanopartículas em filmes utilizados em embalagens para alimentos**. 2019. 138 p. Tese - Departamento de Química, Universidade de São Carlos, São Carlos, 2009.

BAKHSHI, P. K. et al. Application of Electrohydrodynamic Technology for Folic Acid Encapsulation. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 7, p. 1837–1846, 2013.

BARROS-ALEXANDRINO, T. T.; MARTELLI-TOSI, M.; ASSIS, O. B. G. Comparison Between Chitosan Nanoparticles and Cellulose Nanofibers as Reinforcement Fillers in Papaya Puree Films: Effects on Mechanical, Water Vapor Barrier, and Thermal Properties. **Polymer Engineering and Science**, v. 59, n. October 2018, p. E287–E292, 2019.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 4. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009.

BOSE, M. L. V.; MARTINS FILHO, J. G. O papel dos resíduos agroindustriais na alimentação de ruminantes. **Informe Agropecuário**, p. 3–7, 1984.

BRITTO, D. et al. N,N,N-trimethyl chitosan nanoparticles as a vitamin carrier system. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 487–493, 1 jun. 2012.

BRITTO, D. et al. Entrapment characteristics of hydrosoluble vitamins loaded into chitosan and N,N,N-trimethyl chitosan nanoparticles. **Macromolecular Research**, v. 22, n. 12, p. 1261–1267, 2014.

CABRERA, E. et al. Comparison of industrially viable pretreatments to enhance soybean straw biodegradability. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 1–6, 1 out. 2015.

CAMACHO, D. H. et al. Encapsulation of folic acid in copper-alginate hydrogels and it's slow in vitro release in physiological pH condition. **Food Research International**, v. 119, n. January, p. 15–22, 2019.

CAMPOS, A. et al. Obtaining nanofibers from curauá and sugarcane bagasse fibers using enzymatic hydrolysis followed by sonication. **Cellulose**, v. 20, n. 3, p. 1491–1500, 2013.

CARVALHO, F. G. et al. Synthesis and characterization of TPP/chitosan nanoparticles: Colloidal mechanism of reaction and antifungal effect on C. albicans biofilm formation. **Materials Science and Engineering C**, v. 104, n. October 2018, 2019.

CATHARINO, R. R.; VISENTAINER, J. V.; GODOY, H. T. Avaliação das condições experimentais de CLAE na determinação de ácido fólico em leites enriquecidos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 389–395, 2003.

CHAKRABORTY, P. et al. Improved mechanical and photophysical properties of chitosan incorporated folic acid gel possessing the characteristics of dye and metal ion absorption. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 38, p. 20291, 2012.

CHAUHAN, P.; YAN, N. Nanocrystalline cellulose grafted phthalocyanine: A heterogeneous catalyst for selective aerobic oxidation of alcohols and alkyl arenes at room temperature in a green solvent. **RSC Advances**, v. 5, n. 47, p. 37517–37520, 2015.

CHEN, Y. et al. Pea starch-based composite films with pea hull fibers and pea hull fiber-derived nanowhisker. **Polymer Engineering and Science2**, p. 360–378, 2009.

CORRÊA, A. C. et al. Nanofibras de Celulose a Partir de Fibras de Curauá. **10 ° Congresso Brasileiro de Polímeros**, p. 9, 2009.

DAMODARAN, S.; FENNEMA, K. L. **Fennema's Food Chemistry**. New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008.

DEMAN, J. M. **Principles of Food Chemistry**. 3. ed. New York: Springer US, 1999.

DEVI, N.; DUTTA, J. Preparation and characterization of chitosan-bentonite nanocomposite films for wound healing application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1897–1904, 1 nov. 2017.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, v. 21, n. 6, p. 703–714, 1 dez. 2004.

DUFRESNE, A.; DUPEYRE, D.; VIGNON, M. R. Cellulose microfibrils from potato tuber cells: processing and characterization of starch-cellulose microfibril composites. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 76, p. 2080–2092, 2000.

DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. DE. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artliber, 2006.

DUTTA, P. K. et al. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1173–1182, 15 jun. 2009.

EICHHORN, S. Raman spectroscopy and x-ray scattering for assessing the interface in natural fibre composites. **Interface Engineering of Natural Fibre Composites for Maximum Performance**, p. 379–400, 1 jan. 2011.

FAN, W. et al. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, n. 1, p. 21–27, 2012.

FAOSTAT. **Food and agriculture organization**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C. DE. Revisão : Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, p. 103–112, 2008.

FILSON, P. B.; DAWSON-ANDOH, B. E.; SCHWEGLER-BERRY, D. Enzymatic-mediated production of cellulose nanocrystals from recycled pulp. **Green Chemistry**, v. 11, n. 11, p. 1808, 2009.

FLAUZINO NETO, W. P. et al. Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue - Soy hulls. **Industrial Crops and Products**, v. 42, n. 1, p. 480–488, 2013.

FROMMHERZ, L. et al. Degradation of folic acid in fortified vitamin juices during long term storage. **Food Chemistry**, v. 159, p. 122–127, 15 set. 2014.

GAZZALI, A. M. et al. Stability of folic acid under several parameters. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, p. 419–430, 10 out. 2016.

GODOY, H. T.; LIMA, J. A.; CATHARINO, R. R. Ácido Fólico Em Leite E Bebida Láctea Enriquecidos – Estudo Da Vida-De-Prateleira 1. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 1, p. 82–87, 2004.

HASSANI, S. et al. Preparation of chitosan-TPP nanoparticles using microengineered membranes - Effect of parameters and encapsulation of tacrine. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 482, p. 34–43, 2015.

HOSSEINI, S. F. et al. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 50–56, 2013.

JACKSON, J. K. et al. The use of nanocrystalline cellulose for the binding and controlled release of drugs. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 321–330, 2011.

JANENICKE, L. **The biochemistry of folic acid and related pteridines**. Amsterdam-London: North-Holland, 1970.

JANES, K. A.; ALONSO, M. J. Depolymerized chitosan nanoparticles for protein delivery: Preparation and characterization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 88, n. 12, p. 2769–2776, 2003.

KAČURÁKOVÁ, M.; MATHLOUTHI, M. FTIR and laser-Raman spectra of oligosaccharides in water: characterization of the glycosidic bond. **Carbohydrate Research**, v. 284, n. 2, p. 145–157, 30 abr. 1996.

KARGARZADEH, H. et al. Methods for Extraction of Nanocellulose from Various Sources. **Handbook of Nanocellulose and Cellulose Nanocomposites**, p. 1–49, 2017a.

KARGARZADEH, H. et al. Recent developments on nanocellulose reinforced polymer nanocomposites: A review. **Polymer**, v. 132, p. 368–393, 6 dez. 2017b.

KAUSHIK, A.; SINGH, M. Isolation and characterization of cellulose nanofibrils from wheat straw using steam explosion coupled with high shear homogenization. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 1, p. 76–85, jan. 2011.

KEAWCHAOON, L.; YOKSAN, R. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 163–171, 2011.

KOLAKOVIC, R. et al. Nanofibrillar cellulose films for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, n. 2, p. 308–315, 2012.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1–27, 2000.

KUMAR, M. N. V. R. et al. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 12, p. 6017–6084, 2004.

LE TROËDEC, M. et al. Influence of various chemical treatments on the interactions between hemp fibres and a lime matrix. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 29, n. 10, p. 1861–1868, 1 jul. 2009.

LEITNER, J. et al. Sugar beet cellulose nanofibril-reinforced composite. **Cellulose**, v. 14, p. 419–425, 2007.

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, set. 2013.

LIMA, R. et al. Evaluation of the genotoxicity of chitosan nanoparticles for use in food packaging films. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 6, p. 89–96, 2010.

LIU, C. et al. Catalytic fast pyrolysis of lignocellulosic biomass. **Chem. Soc. Rev.**, v. 43, n. 22, p. 7594–7623, 2014.

LOPERA, S. M. C. et al. 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.

MANDAL, A.; CHAKRABARTY, D. Studies on the mechanical, thermal, morphological and barrier properties of nanocomposites based on poly(vinyl alcohol) and nanocellulose from sugarcane bagasse. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 462–473, 2014.

MARTELLI-TOSI, M. et al. Chemical treatment and characterization of soybean straw and soybean protein isolate/straw composite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, 2017a.

MARTELLI-TOSI, M. et al. Chemical treatment and characterization of soybean straw and soybean protein isolate/straw composite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 512–520, fev. 2017b.

MARTELLI-TOSI, M. et al. Soybean straw nanocellulose produced by enzymatic or acid treatment as a reinforcing filler in soy protein isolate films. **Carbohydrate Polymers**, v. 198, p. 61–68, out. 2018.

MARTINS, C. S.; MORGADO, D. L.; ASSI, O. B. G. Cashew gum-chitosan blended films: Spectral, mechanical and surface wetting evaluations. **Macromolecular Research**, v. 24, n. 8, p. 691–697, 2016.

MATIAS, R. et al. A UV spectrophotometric method for the determination of folic acid in pharmaceutical tablets and dissolution tests. **Analytical Methods**, v. 6, n. 9, p. 3065, 2014.

MORÁN, J. I. et al. Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers. **Cellulose**, v. 15, n. 1, p. 149–159, 2008.

MOURA, M. R. DE et al. Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles. **Journal of Food Engineering**, v. 92, n. 4, p. 448–453, 2009.

MOURA, M. R.; AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C. Preparation of chitosan nanoparticles using methacrylic acid. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 321, n. 2, p. 477–483, 15 maio 2008.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 408–413, 2011.

NO, H. K. et al. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A review. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 5, 2007.

OROPEZA, M. V. C. **Síntese e caracterização de nanopartículas núcleo-casca de poliestireno e polimetacrilato de metila obtidas por polimerização em emulsão sem emulsificante e fotoiniciada.** São Paulo: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 19 set. 2011.

PÄÄKKO, M. et al. Enzymatic hydrolysis combined with mechanical shearing and high-pressure homogenization for nanoscale cellulose fibrils and strong gels. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1934–1941, 2007.

PENICHE, C. et al. Chitosan: An Attractive Biocompatible Polymer for Microencapsulation. **Macromolecular Bioscience**, v. 3, n. 10, p. 511–520, 2003.

PÉREZ-MASIÁ, R. et al. Encapsulation of folic acid in food hydrocolloids through nanospray drying and electrospraying for nutraceutical applications. **Food Chemistry**, v. 168, p. 124–133, 1 fev. 2015.

QING, W. et al. The modified nanocrystalline cellulose for hydrophobic drug delivery. **Applied Surface Science**, v. 366, p. 404–409, 15 mar. 2016.

REDDY, N.; YANG, Y. Natural cellulose fibers from soybean straw. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 14, p. 3593–3598, 2009.

SATYAMURTHY, P. et al. Preparation and characterization of cellulose nanowhiskers from cotton fibres by controlled microbial hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 1, p. 122–129, 1 jan. 2011.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y.-J. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 2, p. 37–51, 1 fev. 1999.

SHAW, D. J. **Introduction to colloid and surface chemistry**. 4. ed. Reino Unido: Butterworth-Heinemann, 2013.

TEIXEIRA, E. DE M. et al. Cassava bagasse cellulose nanofibrils reinforced thermoplastic cassava starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 3, p. 422–431, 15 out. 2009.

TEIXEIRA, E. DE M. et al. Sugarcane bagasse whiskers: Extraction and characterizations. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 1, p. 63–66, 1 jan. 2011.

TUMMALA, G. K. et al. Light scattering in poly(vinyl alcohol) hydrogels reinforced with nanocellulose for ophthalmic use. **Optical Materials Express**, v. 7, n. 8, p. 2824, 2017.

VANNUCCHI, H.; MONTEIRO, T. H. Ácido Fólico. **ILSI Brasil - Internacional Life Sciences Institute**, v. 10, p. 1–22, 2010.

VARSHOSAZ, J.; TAYMOURI, S.; HAMISHEHKAR, H. Fabrication of polymeric nanoparticles of poly(ethylene-co-vinyl acetate) coated with chitosan for pulmonary delivery of carvedilol. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 1, p. 1–8, 2014.

VÁSCONEZ, M. B. et al. Antimicrobial activity and physical properties of chitosan–tapioca starch based edible films and coatings. **Food Research International**, v. 42, n. 7, p. 762–769, 1 ago. 2009.

VORA, A. et al. Thermal stability of folic acid. **Thermochimica Acta**, v. 392–393, p. 209–220, 2002.

WAN, C.; ZHOU, Y.; LI, Y. Liquid hot water and alkaline pretreatment of soybean straw for improving cellulose digestibility. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6254–6259, 1 maio 2011.

WLODARCZYK, B. J. et al. Spontaneous neural tube defects in splotch mice supplemented with selected micronutrients. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 213, n. 1, p. 55–63, 15 maio 2006.

XUE, M. et al. Development of chitosan nanoparticles as drug delivery system for a prototype capsid inhibitor. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 495, n. 2, p. 771–782, 30 nov. 2015.

YOKSAN, R.; JIRAWUTTHIWONGCHAI, J.; ARPO, K. Encapsulation of ascorbyl palmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, n. 1, p. 292–297, 1 mar. 2010.