

## ENCAPSULAÇÃO DO ÁCIDO L-ASCÓRBICO NO BIOPOLÍMERO NATURAL GALACTOMANANA POR SPRAY-DRYING: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Carlos A. G. de Souza<sup>a,\*</sup>, Sônia M. C. Siqueira<sup>a</sup>, Antônia F. V. de Amorim<sup>a</sup>, Selene M. de Moraes<sup>a</sup>, Tamara Gonçalves<sup>c</sup>, Rayane N. Gomes<sup>a</sup>, Arcelina P. Cunha<sup>b</sup> e Nágila M. P. S. Ricardo<sup>b</sup><sup>a</sup>Laboratório de Produtos Naturais, Universidade Estadual do Ceará, 60740-000 Fortaleza – CE, Brasil<sup>b</sup>Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, 60021-970 Fortaleza – CE, Brasil<sup>c</sup>Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, 60430-370 Fortaleza – CE, Brasil

Recebido em 03/09/2014; aceito em 11/05/2015; publicado na web em 22/06/2015

ENCAPSULATION OF L-ASCORBIC ACID WITHIN THE NATURAL BIOPOLYMER—GALACTOMANNAN—USING THE SPRAY-DRYING METHOD: PREPARATION, CHARACTERIZATION, AND EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY. In this study, the *spray drying* technique was used to prepare L-ascorbic acid (AA) microparticles encapsulated with galactomannan—an extract from the seeds of the *Delonix regia* species. The physico-chemical characteristics, antioxidant activity, and encapsulation efficiency of the AA microparticles were evaluated and characterized using thermogravimetric analysis, differential scanning calorimetry, infrared spectroscopy, X-ray diffraction, and scanning electron microscopy. The free-radical scavenging activity of the AA microparticles was determined at different environmental conditions using DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl). X-ray diffraction measurements demonstrated a loss of crystallinity in AA after the encapsulation process, and a DSC scan also showed the loss of the compound's melting peak. Thermogravimetric analysis showed small differences in the thermal stability of galactomannan before and after the incorporation of AA. The mean diameters of the obtained spherical microspheres were in the range of  $1.39 \pm 0.77 \mu\text{m}$ . The encapsulation efficiency of AA microparticles in different environmental conditions varied from 95.40 to 97.92, and the antioxidant activity showed values ranging from 0.487 to 0.550  $\text{mg mL}^{-1}$ .

Keywords: ascorbic acid; microparticles; *Delonix regia*; galactomannan.

## INTRODUÇÃO

O ácido ascórbico (AA) ou Vitamina C é uma vitamina hidrossolúvel muito importante para o organismo. É comum em frutas como goiaba, laranja, maçã, morango, kiwi e vegetais como couve-flor. É essencial na construção da proteína do colágeno, na cicatrização de feridas, na manutenção do sistema imunológico e nervoso saudável e como um antioxidante para ajudar na prevenção de doenças.<sup>1</sup>

De acordo com a IUPAC a Vitamina C é também chamada de 3-oxo-L-gulofuranolactona. A estrutura química e a fórmula molecular do ácido ascórbico são dadas na Figura 1.

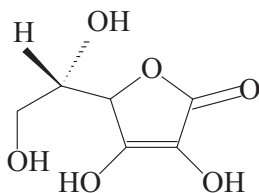


Figura 1. Estrutura do ácido L-ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ )

O AA é estável na forma de pó, entretanto esta característica diminui quando dissolvido em água. Fatores ambientais, tais como temperatura, pH, oxigênio, íons metálicos, UV e raios-x afetam a sua estabilidade.<sup>2</sup> A fim de ultrapassar esta deficiência, a técnica de encapsulação pode ser o método mais adequado.<sup>3</sup> Esta técnica tem solucionado limitações no emprego de ingredientes alimentícios visto que pode reduzir ou eliminar odores indesejáveis, reduzir volatilidade e reatividade e aumentar a estabilidade destes em condições ambientais adversas, como na presença de luz, oxigênio e pH extremos. A

microencapsulação é considerada um processo físico no qual um filme fino ou uma camada polimérica é utilizada para envolver sólidos, líquidos e gasosos.

Entre as várias técnicas que podem ser empregadas na microencapsulação, existe um método amplamente empregado chamado de *spray drying*. Esta técnica oferece algumas vantagens como baixa quantidade de solvente residual no produto final, produção de partículas relativamente uniformes e esféricas, boa eficiência e baixo custo do processo.<sup>4-6</sup> Na indústria de alimentos, a utilização de equipamentos *spray dryer* para encapsulação de aromas e conservação de substâncias tem sido amplamente difundida, porém, há muitas limitações na aplicação deste processo, o que demanda estudos constantes sobre a encapsulação.<sup>7-10</sup>

Palma-Rodríguez e colaboradores utilizaram a técnica de *spray drying* como método de preparação de micropartículas de AA encapsulado por amidos naturais e modificados de milho, batata e arroz, estas micropartículas mostraram um grande potencial de estabilidade do AA, sofrendo uma menor degradação no seu armazenamento.<sup>11</sup> Finotelli e Rocha-Leão prepararam micropartículas por *spray drying* com diferentes quantidades de AA para evitar a sua oxidação, com possível aplicação na indústria de alimentos.<sup>12</sup>

Os polissacarídeos foram estudados nas últimas décadas como materiais poliméricos para o encapsulamento de substâncias terapêuticas, porque estes são facilmente disponíveis, apresentando baixa ou nenhuma toxicidade, de baixo custo, susceptíveis a uma grande variedade de modificações químicas, potencialmente degradáveis e boa biocompatibilidade.<sup>13-15</sup>

A goma da semente da espécie *Delonix regia* (*Flamboyant*) é um polissacarídeo que pertence ao grupo de galactomananas. Normalmente, esses polímeros naturais possuem como cadeia principal unidades repetitivas de  $\beta$ -D-manopiranoses ligadas entre si por ponte de oxigênio do tipo 1-4 e cadeias laterais de

\*e-mail: cagsouz@gmail.com

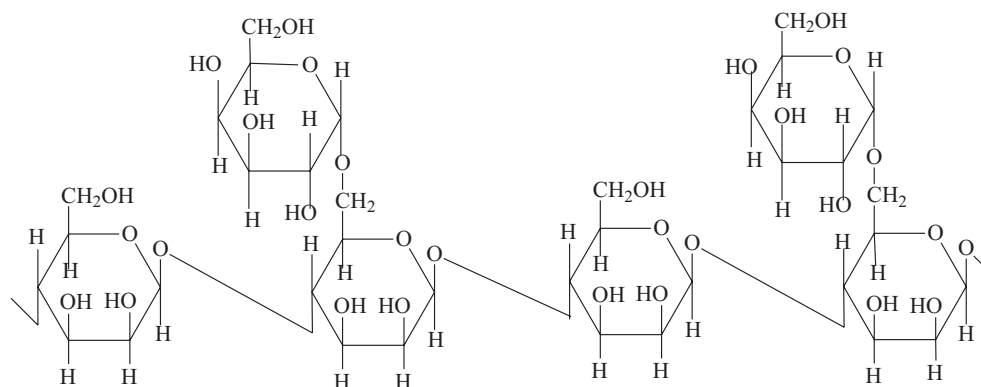


Figura 2. Estrutura da galactomanana obtida a partir das sementes da *D. Regia*<sup>16</sup>

$\alpha$ -D-galactopiranosose ligadas do tipo 1 $\rightarrow$ 6. (razão manose / galactose 2:1). A razão manose / galactose é semelhante a da goma guar, mas diferem em termos de posição da ligação OH na cadeia principal: goma *flamboyant* tem  $\alpha$ -D-manose, enquanto a goma guar tem  $\beta$ -D-manose (Figura 2).<sup>16</sup>

Este polímero apresenta uma série de características atraentes para aplicações biofarmacêuticas, entre as quais a sua alta capacidade de gelificação devem ser destacada.<sup>17</sup> A goma da semente de flamboyant carboximetilada foi usada por Betancur e colaboradores na microencapsulação da papaína e polissacarídeos semelhantes, como goma guar (*Cyamopsis tetragonolobus*), goma alfarroba (*Ceratonia siliqua*) e goma guapuruvu (*Schizolobium parahybae*) foram investigadas com a mesma finalidade.<sup>18-22</sup>

A variedade de propriedades físico-químicas torna esse polissacarídeo um material bastante versátil utilizado pelo homem de inúmeras formas, entre elas, na indústria têxtil, farmacêutica, alimentícia, cosmética e na biomedicina.<sup>13,23</sup>

Os objetivos do presente trabalho foram preparar micropartículas do ácido L-ascórbico em galactomanana pela técnica *spray drying*, caracterizá-las e investigá-las quanto sua capacidade antioxidante. As micropartículas foram preparadas como alternativa para um potencial aumento da estabilidade do fármaco, com melhor desempenho para possíveis aplicações na área de alimentos e de biotecnologia.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiais

O ácido ascórbico ( $C_6H_8O_6$ ; 176,12 g mol<sup>-1</sup>) foi adquirido na CAQ (Casa da Química) Brasil; metanol (SYNTH) Brasil; etanol (grau de pureza 95%, SYNTH) Brasil; DPPH (SIGMA) EUA.

### Fonte do polissacarídeo

As sementes da espécie *D. regia* foram coletadas na Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza – CE, Brasil, em janeiro de 2013. Um total de 300 g de sementes foi coletado. A exsiccata da espécie encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará sob número 53140.

### Isolamento da galactomanana

O isolamento da galactomanana seguiu a metodologia proposta por Vieira e colaboradores, com modificações.<sup>24</sup> As sementes foram à inativação enzimática em água a 98 °C em constante agitação por 1 hora. Em seguida as sementes foram imersas em água destilada por 24 horas e, após esse período de intumescimento, o endosperma foi separado manualmente do tegumento e do embrião. Para a obtenção

da galactomanana, os endospermas isolados foram submetidos a três extrações aquosas exaustivas.

Em cada extração fez-se uso de 900 mL de água destilada para cada 150 g de endosperma a 75 °C por um período de 4 horas, sob agitação, até a formação de uma solução viscosa. Após esse procedimento, a solução foi filtrada e armazenada a 4 °C e o sólido retido, submetido a mais duas extrações até que todo o endosperma fosse completamente desfeito, restando apenas fibras insolúveis. Ao final das três extrações exaustivas, os líquidos armazenados foram reunidos e submetidos a uma filtração a vácuo, sendo em seguida adicionado etanol na proporção 2:1 (etanol/filtrado) para precipitação das galactomananas. Estas foram coletadas e posteriormente liofilizadas num liofilizador da *Labconco Freeze Dryer*, Modelo 7.750.020.

### Determinação da massa molar por cromatografia de permeação em gel (GPC)

Foi preparada uma solução de 0,1% da goma em água e em seguida foi filtrada com membrana *Milipore* de porosidade 0,45  $\mu$ m.

A determinação da massa molar foi determinada por cromatografia de permeação em gel (GPC) em um instrumento Shimadzu *LC-10AD* com detector de índice de refração RID-10A a 40 °C. A análise foi realizada com uma coluna *Ultrasphere linear* 7,8 x 300 mm, fase móvel de NaNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>, fluxo de 0,5 mL min<sup>-1</sup>. O volume injetado da amostra foi de 20  $\mu$ L.

### Análise por ressonância magnética nuclear do próton (RMN <sup>1</sup>H)

A estrutura da galactomanana da *D. regia* foi determinada usando a espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H. A ressonância do próton foi relacionada com bases nos dados reportada na literatura para galactomananas.<sup>25,26</sup> Foram preparadas soluções das amostras da galactomanana (*D. regia*) em D<sub>2</sub>O na concentração de 0,045 mg  $\mu$ L<sup>-1</sup>, sendo as amostras deixadas em água deuterada nessa concentração por 24 horas sob agitação constante e a temperatura de 80 °C. Os espectros de ressonância magnética nuclear do hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) foram obtidos por meio do espectrômetro *Bruker Spectrometers*, modelo *Avance DRX-500*, com transformada de *Fourier*, no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da ressonância magnética nuclear (CENAUREMN), operando na frequência do hidrogênio a 500,13 MHz e utilizando uma sonda dual de 5 mm. Os espectros foram registrados à temperatura de 80 °C. Foi usado um composto 2,2-dimetil-2 silapentano-5-sulfonato de sódio (DSS) como padrão interno (0,00 ppm para 1H) nas amostras dissolvidas em água deuterada. Para os espectros de RMN <sup>1</sup>H são integrados os sinais dos hidrogênios pertencentes aos carbonos anômico da amostra. Por meio das integrações desses de dois sinais,

em torno de 5,19 e 5,47 ppm, foi calculada a razão manose:galactose (M:G) da galactomanana da *D. regia*.<sup>27</sup>

### Preparação das micropartículas

Para a preparação das micropartículas, 2,0 g de galactomanana liofilizada foi pesada e dissolvida em água destilada em agitação constante e aquecimento de 40 °C por 24 h. Em seguida foi adicionado 200 mg de ácido ascórbico com agitação por 1 hora. Logo após, a solução foi atomizada em aparelho de *spray dryer Buchi-290*, usando temperatura de entrada de 120 °C; temperatura de saída de 90 °C; eficiência do exaustor de 90% e fluxo de bomba de 30%. As micropartículas foram coletadas, armazenadas e cobertas com papel alumínio, à temperatura ambiente para evitar uma possível oxidação sob ação da luz.

### Eficiência de encapsulamento

#### Curva padrão

A solução estoque do AA foi preparada em solução de metanol na concentração de 100 µg mL<sup>-1</sup>. Diferentes alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL cobertos com papel alumínio e o volume completado com metanol a fim de obter soluções de diferentes concentrações (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 µg mL<sup>-1</sup>). A absorbância das soluções foi determinada por espectrometria na região UV-Vis em 243 nm, usando o metanol como branco. A partir da curva de calibração foi obtida a equação 1 de regressão linear entre o valor da absorbância e a concentração do fármaco em µg mL<sup>-1</sup>.

$$Y = 0,0427X - 0,061, \text{ onde } R^2=0,9991 \quad (1)$$

#### Quantificação de ácido ascórbico nas micropartículas por espectrofotometria UV-Vis.

Foi pesado 2 mg de 10 amostras das micropartículas de galactomanana contendo AA, uma amostra padrão protegida do ambiente e as outras em diferentes condições ambientais [temperatura 25 °C, 60 °C e sobre ação da luz ( $\lambda$ )] por sete dias e dissolvidas em 10 mL de metanol para obter a solução de 200 µg mL<sup>-1</sup> em 10 frascos diferentes, as quais foram analisadas em espectrômetro na região UV-Vis a 243 nm (n=3). A concentração do fármaco foi determinada usando a curva padrão, e a eficiência de encapsulação foi calculada de acordo com a equação 2 :

$$EE (\%) = \left[ \frac{QTD}{QTA} \right] \times 100 \quad (2)$$

EE= Eficiência de Encapsulação; QTD= Quantidade de fármaco determinado no sistema polimérico; QTA= Quantidade de fármaco teoricamente adicionado no sistema polimérico.

Para calcular o teor de fármaco encapsulado, foi utilizada a equação 3:

$$TF (\%) = \left[ \frac{TTF \cdot EE}{100} \right] \quad (3)$$

TF (%) = Teor de fármaco encapsulado; TTF (%) = Teor teórico de fármaco encapsulado; EE (%) = Eficiência de Encapsulação.

### Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos utilizando um espectrofotômetro modelo *Shimadzu FT-IR 8300*. As amostras foram trituradas com brometo de potássio de grau espectroscópico

(KBr) em pó para obtenção das pastilhas. A medição IV foi feita no intervalo de números de onda de 500-4000 cm<sup>-1</sup>.

### Morfologia das micropartículas

A morfologia das amostras de AA, galactomanana (G) e micropartículas de galactomanana contendo ácido ascórbico (GAA) foi mostrada nas micrografias produzidas pelo microscópio eletrônico de varredura, modelo *Zeiss DSM 940A* (Oberkochen, Alemanha) operando a 15 kV. As amostras foram preparadas em stubs, camada metálica de platina (60 nm de espessura) no evaporador EMS.

### Análises térmicas

As propriedades térmicas das amostras foram determinadas usando Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e análise termogravimétrica (TGA). As curvas de DSC foram realizadas em um equipamento *Shimadzu* modelo DSC-50, utilizando cadinho de platina e atmosfera de nitrogênio, com uma vazão de 50 mL min<sup>-1</sup> no intervalo de temperatura de 25-500 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>. A massa das amostras foi de 5 mg. As curvas termogravimétricas das amostras foram obtidas por um equipamento *Shimadzu* modelo TGA-50, usando um cadinho de platina, atmosfera de ar sintético, com 50 mL min<sup>-1</sup>, entre as bandas de temperatura de 25 a 800 °C, com taxas de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>. A massa inicial das amostras analisadas foi de 10 mg.

### Difração de raios-X

As amostras foram analisadas em difratômetro *Panalytical, Xpert Pro MPD* (Holanda) do departamento de Física da Universidade Federal do Ceará, utilizando radiação CoK $\alpha$ , uma tensão de 40 kV e uma corrente de 40 mA. A taxa de varredura empregada foi de 0,5° min<sup>-1</sup> em região de 3° a 90° de ângulo de difração (2 $\theta$ ). As amostras foram trituradas para obtenção de um pó fino antes da análise.

### Atividade antioxidante frente ao radical DPPH

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi realizada seguindo metodologia usual de Yopez e colaboradores, com algumas modificações.<sup>28</sup> Foram pesados 15 mg de AA não encapsulados nas seguintes condições: temperaturas de 25 °C e 60 °C, protegido da luz e exposto a luz por 7 dias. Da mesma forma, foram pesados 15 mg de micropartículas de galactomanana contendo ácido ascórbico (GAA) nas mesmas condições ambientais. Em seguida, as amostras foram diluídas em metanol para obtenção da concentração de 10 mg mL<sup>-1</sup> e submetidas ao banho ultrassônico do Modelo USC 1400 para liberação do AA das micropartículas no meio e aumentar a solubilidade das micropartículas frente ao metanol, das quais foram retiradas alíquotas para obter as concentrações finais de 5, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01 e 0,005 mg mL<sup>-1</sup>. Foram preparados posteriormente 500 mL da solução metanólica do radical livre DPPH (0,026 mg mL<sup>-1</sup>). O AA foi utilizado como padrão, devido a sua comprovada ação antioxidante. Em cada tubo de ensaio foram colocados 3,9 mL de solução metanólica de DPPH de coloração púrpura e 0,1 mL da solução metanólica da amostra. O teste foi realizado em triplicata. Depois de 1 hora mediu-se a absorbância em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 515 nm.

Finalmente, foi calculado o percentual de inibição da amostra (PI%), por meio da equação 4, na qual AbsDPPH é a absorbância inicial da solução de DPPH e AbsAMOSTRA é a absorbância final.

$$PI\% = \frac{AbsDPPH - AbsAMOSTRA}{AbsDPPH} \times 100 \quad (4)$$

Com os resultados dos PI% obtidos na leitura da absorbância das diferentes concentrações de cada uma das amostras foi possível calcular o índice capaz de inibir 50% dos radicais livres ( $CI_{50}$ ) em relação ao teor de fármaco incorporado na matrix polimérica na proporção de 15 mg de cada amostra das micropartículas nas diferentes condições ambientais.<sup>29</sup>

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização química da galactomanana

A massa molar da galactomanana obtida das sementes da *D. regia* determinada pelo cromatógrafo de permeação em gel foi de  $2,5 \times 10^5$  g mol<sup>-1</sup>, um valor próximo ao encontrado na literatura por Tamaki e colaboradores.<sup>30</sup> A proporção de D-manose e D-galactose foi estimada em 4,46 : 1,00 pela medida direta das áreas relativas aos sinais de <sup>1</sup>H (Man) e <sup>1</sup>H (Gal) (Figura 3). Este resultado está de acordo com trabalhos anteriores para outras galactomananas, incluindo a goma da *D. regia*.<sup>30,31</sup> Com base no assinalamento dos sinais de hidrogênios anoméricos atribuídos por Kapoor e colaboradores foram identificados os sinais de H-1 de β-D-galactose (5,47 ppm) e de α-D-manose (5,19 ppm).<sup>32</sup>

### Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação das micropartículas GAA que foi realizada na proporção 10:1 (galactomanana: ácido ascórbico), está descrita na Tabela 1.

Estes resultados estão de acordo com os de Lee e colaboradores quando relataram a microencapsulação do AA com o poliácilglicerol mono estearato para evitar a oxidação do leite.<sup>33</sup> O poliácilglicerol mono estearato foi utilizado como um material de revestimento para microencapsular o AA e complexo de ferro. A maior eficiência de

**Tabela 1.** Eficiência de encapsulação das micropartículas contendo ácido ascórbico

Amostra	TTAA (%)	EE (%)	TIAA (%)	TIAA (mg)
GAA (T 25 °C)	10	95,40 ± 0,38	9,54 ± 0,04	0,1908 ± 0,04
GAA (T 60 °C)	10	96,56 ± 0,59	9,66 ± 0,06	0,1932 ± 0,06
GAA (λ)	10	97,92 ± 0,65	9,79 ± 0,06	0,1958 ± 0,06
GAA (P)	10	96,19 ± 0,32	9,62 ± 0,03	0,1924 ± 0,03

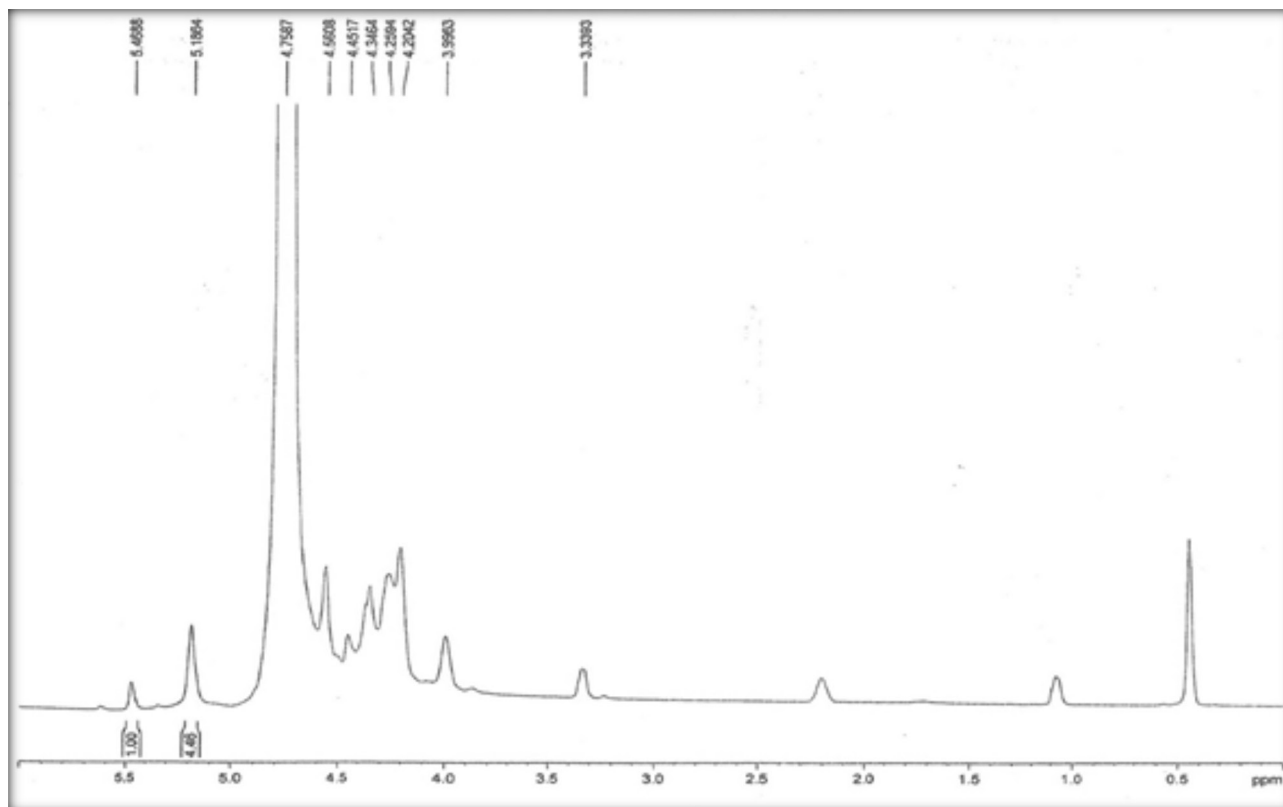
Legenda: GAA - galactomanana + ácido ascórbico, T - temperatura, λ - presença de luz por 7 dias, P - protegido da luz, TTAA - teor teórico de ácido ascórbico, EE - eficiência de encapsulação, TIAA - teor incorporado de AA.

microencapsulação (94,2%) foi encontrada com a relação 5:1 de poliácilglicerol mono estearato/AA. Os resultados mostrados na Tabela 1 também estão próximos aos de Stevanovic e colaboradores, quando relataram o processo de obtenção de nanopartículas de AA com o poli (D,L-láctideo-co-glicolídeo) (DLPLG) em que sua maior eficiência (98,2%) de microencapsulação foi na proporção 85/15% de DLPLG/AA.<sup>34</sup> Os resultados também mostram que as diferentes condições ambientais interferiram pouco na eficiência de encapsulação do AA.

Para confirmar os resultados obtidos da Tabela 1 foi realizado um tratamento estatístico por meio do teste Q para o intervalo de 95% de confiança, no qual as médias da eficiência de encapsulação podem ser consideradas estatisticamente verdadeiras.

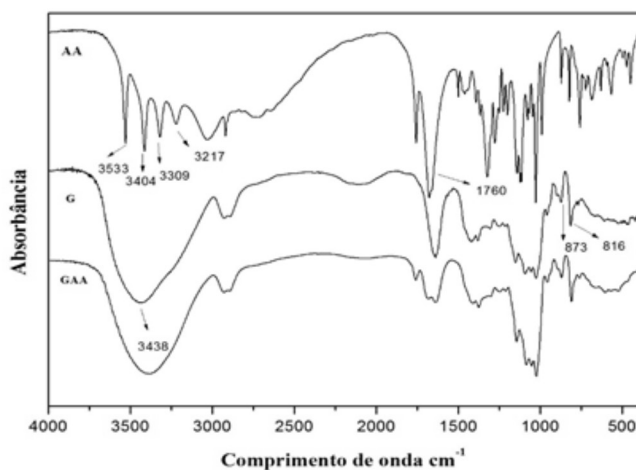
### Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

A Figura 4 mostra o espectro do IV das amostras de AA, galactomanana (G) e das micropartículas GAA analisadas. O espectro de IV do AA mostra as bandas principais proporcionadas pelos grupos funcionais da molécula, tais como: estiramentos C=O lactona (1760 cm<sup>-1</sup>), C=C (1668 cm<sup>-1</sup>), OH (3217, 3309, 3404, 3533 cm<sup>-1</sup>),



**Figura 3.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN da galactomanana da *D. regia*

-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>- ou grupos-CH (2750- 2981 cm<sup>-1</sup>), C-O (1024 cm<sup>-1</sup>). O espectro de IV da amostra G mostra bandas de absorção características com picos a 816 e 873 cm<sup>-1</sup>, que estão relacionados com a presença de ligações glicosídicas, atribuída à α-D-galactopiranosose e β-D-manopiranosose, respectivamente, a absorção de 1154 cm<sup>-1</sup> relacionada com a vibração de estiramento C-O devido ao anel de piranose, uma grande banda em torno de 3438 cm<sup>-1</sup> atribuída ao estiramento OH e uma absorção em 2913 cm<sup>-1</sup> atribuída ao estiramento C-H. A comparação dos espectros obtidos para o AA, G e as micropartículas GAA com os espectros de IV característicos para o ácido ascórbico e galactomanana dada na literatura confirma que as micropartículas obtidas são compostos de galactomanana e ácido ascórbico.<sup>32,35-38</sup> As amostras G e GAA apresentaram uma grande semelhança nos seus espectros de IV, o que mostra que as absorbâncias específicas dos grupos funcionais da G na superfície das micropartículas têm quase as mesmas características químicas da G pura. O estudo sugere que as interações moleculares que podem alterar a estrutura química da G ou AA não ocorreram. Por isso, presume-se que não houve interação química entre os grupos funcionais da galactomanana e o ácido ascórbico.



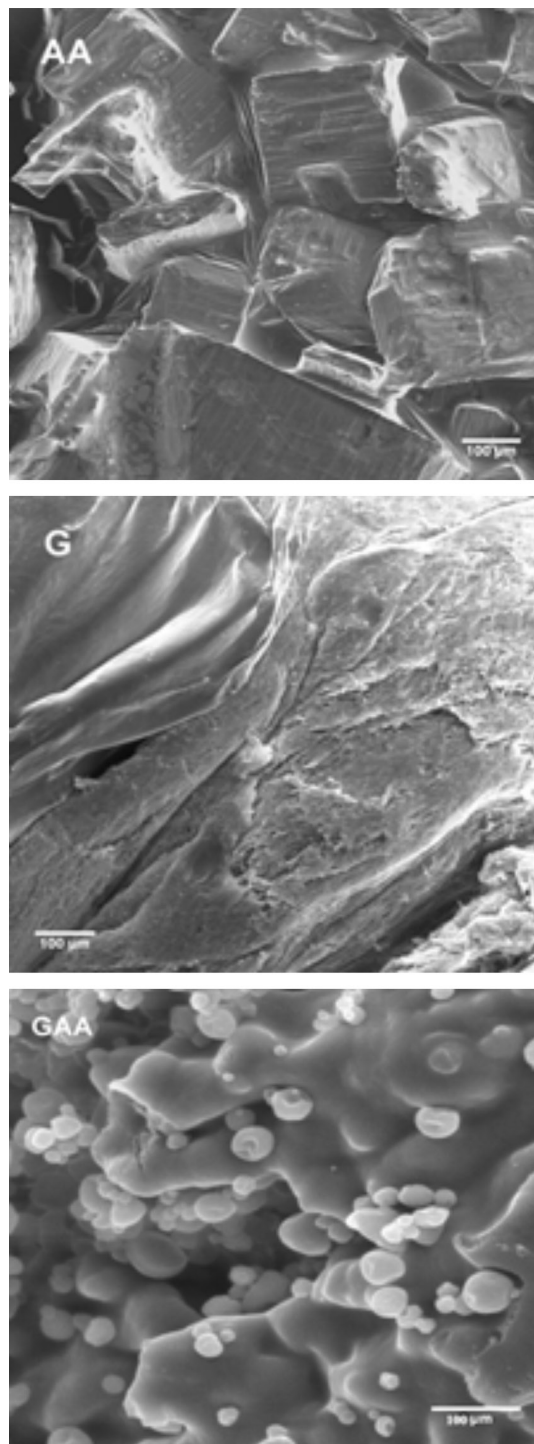
**Figura 4.** Espectro no IV do ácido L-ascórbico (AA), galactomanana (G) e das micropartículas de galactomanana e AA (GAA)

### Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O AA, a galactomanana (G) e as micropartículas GAA foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 5), pela qual foram observadas algumas características morfológicas. A imagem MEV do AA mostra a presença de cristais de forma cúbica. A micrografia da G revela uma aparência fibrosa em que as fibras são dispostas de forma aleatória, com variação de tamanho e espessura. A figura da amostra GAA apresenta uma imagem com micropartículas na forma esférica e com um tamanho médio de  $1,39 \pm 0,77 \mu\text{m}$ . Por meio da análise das imagens foi possível observar a ausência dos cristais de AA evidenciados na Figura 5 (GAA), sugerindo um eficiente encapsulamento do AA.

### Análises térmicas

As análises de DSC e TGA foram realizadas a fim de compreender o comportamento térmico e análise das micropartículas. A Figura 6 mostra os termogramas de DSC do AA, galactomanana (G) e micropartículas de GAA. O DSC foi usado para estudar as transições térmicas que ocorrem sob uma atmosfera inerte. O termograma DSC do AA mostrou um pico endotérmico de 194,38 °C na temperatura correspondente ao seu ponto de fusão, o que explica a sua



**Figura 5.** Micrografias de microscopia eletrônica de varredura do AA, da galactomanana (G) e das micropartículas (GAA)

cristalinidade.<sup>39</sup> Já o termograma DSC da G apresenta picos típicos de polissacarídeo natural<sup>40-42</sup> com eventos endotérmicos na faixa de temperatura entre 80,88 °C e 155,30 °C, aproximadamente, o que pode ser explicado pela evaporação da água. Resultados semelhantes foram observados em outras galactomananas.<sup>35,41</sup>

O segundo evento foi atribuído a um pico endotérmico entre 283,37 °C e 302,47 °C, associada a decomposição térmica do material. O pico endotérmico forte do AA, que é interpretado como uma temperatura de fusão de uma região cristalina, desapareceu na curva DSC das micropartículas de GAA. Desta forma, a mudança de estado físico do AA sugere que ele tenha perdido a sua estrutura cristalina

original.<sup>43</sup> A ausência do pico de fusão do AA indica também que o AA pode ter sido completamente encapsulado.

A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) é um parâmetro relacionado com a mobilidade do sistema e é definido como a temperatura abaixo da qual um polímero amorfo se torna duro e frágil (estado vítreo), e acima da qual o mesmo polímero é macio (estado “borrachoso”), de acordo com Roos & Karel.<sup>44</sup> As análises de TGA foram realizadas a fim de compreender o comportamento térmico da galactomanana e como ela pode ser influenciada pela presença do AA (Figura 1S, material suplementar). Foram registrados dois eventos de perda de massa para G.

A primeira ocorre próximo de 29,32 °C e pode ser atribuída à perda de água adsorvida e estrutural. O segundo evento de perda de massa em 202,27 °C pode ser associado à decomposição térmica de polissacarídeos. Estes valores são próximos aos relatados na literatura para outras fontes de galactomanana.<sup>41,42,45,46</sup>

Comparando as curvas obtidas para G e GAA observa-se que não foram detectadas mudanças significativas no valor de  $T_g$  (191 °C a 330 °C) correspondente a galactomanana após a incorporação do AA.

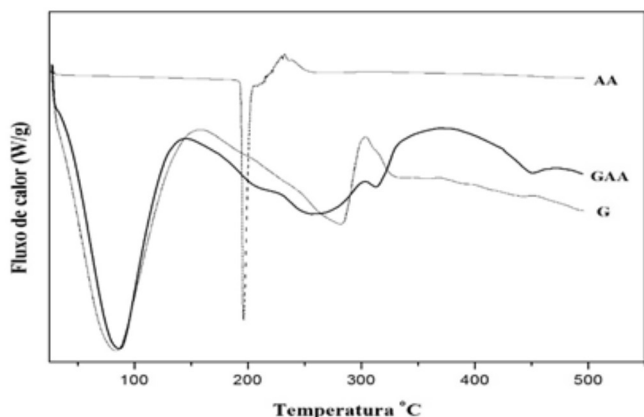


Figura 6. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) do AA, da galactomanana (G) e das micropartículas (GAA)

### Difração de raios-X

A difração de raios-X (DRX) é uma técnica que pode ser utilizada para confirmar a eficiência de encapsulação de fármacos em micropartículas, em que a ausência dos picos de difração do fármaco cristalino nas micropartículas indica a eficiência de encapsulação, devido à dispersão formada na matriz polimérica.<sup>47</sup> O estado cristalino do AA foi evidenciado no difratograma de DRX (Figura 7); o perfil exibiu vários picos bem definidos em 2 $\theta$ , dentre eles, os principais são: 10.17, 17.58, 25.29 e 54.36, que são similares aos relatados na literatura por Chang e colaboradores.<sup>48</sup>

O difratograma das micropartículas contendo o AA (GAA) apresentou picos semelhantes do polímero puro (G), indicando que o fármaco pode estar encapsulado no sistema, na forma amorfa. Estes resultados estão de acordo com outros relatos de estudos de encapsulação.<sup>6,43,49-52</sup> A análise DRX do AA encapsulado pela galactomanana não mostrou a presença do AA cristalino, tal como já foi confirmado por análise de DSC e MEV.

### Atividade antioxidante frente ao radical DPPH

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos de atividade antioxidante do AA e das micropartículas de AA em galactomanana (GAA) em diferentes condições ambientais em relação ao teor de fármaco encapsulado em cada amostra. A atividade antioxidante do AA não encapsulado protegido da luz (P) está de acordo com aquelas descritas

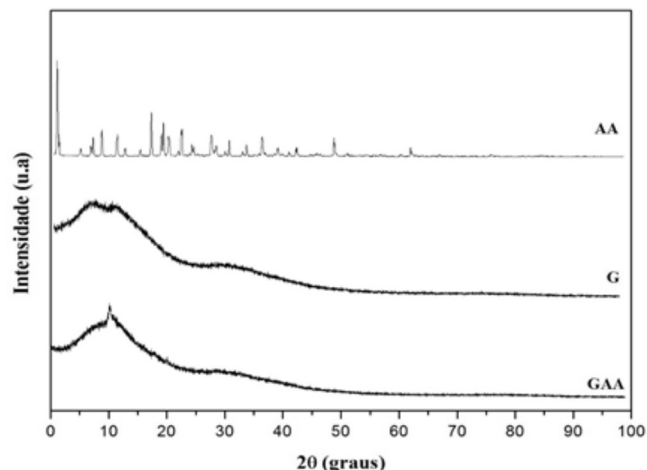


Figura 7. Difração de Raios-X para o AA, a galactomanana (G) e as micropartículas (GAA)

por Ahmed e colaboradores<sup>53</sup> e Li e colaboradores.<sup>54</sup>

Por meio da análise dos resultados obtidos na Tabela 2, observou-se que houve uma redução da atividade antioxidante do AA nas diferentes condições ambientais testadas, quando comparado com o AA protegido de interferências ambientais, demonstrando sua instabilidade frente às diferentes condições aplicadas.<sup>2</sup>

As amostras de AA encapsulado na galactomanana tiveram a sua capacidade antioxidante reduzida quando comparadas com o AA não encapsulado, entretanto, observa-se que apesar da redução nos valores de  $CI_{50}$  nas diferentes condições ambientais é notório que a galactomanana protegeu o AA e que as micropartículas apresentam uma boa atividade antioxidante devido a sua liberação durante o processo da solubilidade das amostras. Esses resultados sugerem que a encapsulação pode ser uma estratégia de proteção para substâncias cujas estabilidades são afetadas por fatores ambientais adversos como presença de luz e temperatura, assim como um sistema de liberação do fármaco para redução de perdas das suas propriedades funcionais.

Tabela 2. Atividade antioxidante frente ao radical DPPH do ácido ascórbico e das micropartículas de AA com galactomanana em diferentes condições ambientais

Amostras	$CI_{50} \pm DP$ (mg mL <sup>-1</sup> )
GAA (T 25 °C)	0,487 ± 0,012
GAA (T 60 °C)	0,550 ± 0,005
GAA ( $\lambda$ )	0,505 ± 0,004
GAA (P)	0,525 ± 0,006
AA (P)	0,220 ± 0,003
AA (T 25 °C)	0,301 ± 0,006
AA (T 60 °C)	0,307 ± 0,008
AA ( $\lambda$ )	0,304 ± 0,003

Legenda: AA- ácido ascórbico, GAA - galactomanana mais ácido ascórbico, T- temperatura,  $\lambda$  - na presença de luz por 7 dias, P - protegido da luz.

### CONCLUSÃO

A técnica do *spray drying*, utilizada neste trabalho, possibilitou a obtenção de micropartículas de galactomanana com alta eficiência de encapsulação do ácido ascórbico (AA). Esse método de microencapsulação assume um papel importante na superação da sua instabilidade química. Os resultados, tanto das características físico-químicas como da atividade antioxidante do AA microencapsulado

com a galactomanana obtida da espécie *D. regia* estimulam estudos posteriores com maior intervalo de tempo que possam caracterizar com mais eficácia a maior estabilidade das micropartículas, pois apresentam potencial para serem utilizadas em diferentes formas de produtos, ou seja, na forma de comprimidos, gel, *sprays*, etc., na cosmologia, indústrias de alimentos como agente protetor da oxidação dos alimentos e como antioxidante na dieta humana.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

O material suplementar refere-se às análises de TGA que foram realizadas a fim de compreender o comportamento térmico da galactomanana e como ela pode ser influenciada pela presença do AA e está disponível em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

## REFERÊNCIAS

- Reavley, N.; *Vitamins etc.*, Bookman Press: Melbourne, 1998.
- Uddin, M. S.; Hawlader, M. N. A.; Zhu, H. J.; *J. Microencapsulation* **2001**, *18*, 199.
- Pierucci, A. P.; Andrade, L. R.; Baptista, E. B.; Volpato, N. M.; Rocha-Leão, M. H.; *J. Microencapsulation* **2006**, *23*, 654.
- Vila Jato, J. L.; *Tecnología farmacéutica: Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas*, Síntesis Editorial: Madri, 1999.
- Santos, A. B.; Favaro-Trindade, C. S.; Grosso, C. R. F.; *Cienc. Tecnol. Aliment.* **2005**, *25*, 322.
- Sansone, F.; Rossi, A.; Del Gaudio, P.; De Simone, F.; Aquino, R. P.; Lauro, M. R.; *AAPS PharmSciTech* **2009**, *10*, 391.
- Sáenz, C.; Tapia, S.; Chávez, J.; Robert, P.; *Food Chem.* **2009**, *114*, 616.
- Dian, N. L. H. M.; Sudin, N.; Yusoff, M. S. A.; *J. Sci. Food Agric.* **1996**, *70*, 422.
- Yoshii, H.; Soottitawat, A.; Liu, X. D.; Atarashi, T.; Furuta, T.; Aishima, S.; Ohgawara, M.; Linko, P.; *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* **2001**, *2*, 55.
- Gharsallaoui, A.; Roudaut, G.; Chambin, O.; Voilley, A.; Saurel, R.; *Food Res. Int.* **2007**, *40*, 1107.
- Palma-Rodríguez, H. M.; Agama-Acevedo, E.; Gonzalez-Soto, R. A.; Vernon-Carter, J. E.; Alvarez-Ramirez, J.; Bello-Perez, L. A.; *Starch -Stärke* (2013) doi: 10.1002/star.201200200
- Finotelli, P. V.; Rocha-Leão, M. H. M.; *2<sup>nd</sup> Mercosur Congress on Chemical Engineering and 4<sup>th</sup> Mercosur Congress on Process Systems Engineering*, Rio de Janeiro, Brasil, 2005.
- Bharadwaj, T. R.; Kanwar, M.; Lal, R.; Gupta, A.; *Drug. Dev. Ind. Pharm.* **2000**, *26*, 1025.
- Satturwar, P. M.; Fulzele, S. V.; Dorle, A. K.; *AAPS PharmSciTech* **2003**, *4*, 1.
- Morkhade, D. M.; Joshi, S. B.; *Indian J. Pharm. Sci.* **2007**, *69*, 263.
- Kapoor, V. P. A.; *Phytochemistry* **1972**, *11*, 1129.
- Grenha, A.; *J. Pharm. Bioallied. Sci.* **2012**, *4*, 175.
- Betancur, A. D.; Pacheco, A. J.; Castellanos, R. A.; Chel, G. L.; *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* **2011**, *12*, 67.
- Dionísio, M.; Grenha, A.; *J. Pharm. BioAllied Sci.* **2012**, *4*, 175.
- Ansari, S. A.; Matricardi, P.; Cencetti, C.; Di Meo, C.; Carafa, M.; Mazzuca, C.; Coviello, T.; *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*, 1.
- Koop, H. S.; Freitas, R. A. D.; Souza, M. M. D.; Savi-Jr, R.; Silveira, J. L. M.; *Carbohydr. Polym.* (2014) doi: 10.1016/j.carbpol.2014.07.043.
- Maiti, S.; Chowdhury, M.; Chakraborty, A.; Ray, S.; Sa, B.; *J. Sci. Ind. Res.* **2014**, *73*, 21.
- Davison, E.; *Aridus* **2003**, *16*, 1.
- Vieira, I. G. P.; Mendes, F. N. P.; Gallão, M. I.; Brito, E. S.; *Food Chem.* **2007**, *101*, 70.
- Egorov, A. V.; Mestechkina, N. M.; Shcherbukhin, V. D.; *Appl. Biochem. Microbiol.* **2003**, *39*, 398.
- Egorov, A. V.; Mestechkina, N. M.; Shcherbukhin, V. D.; *Appl. Biochem. Microbiol.* **2004**, *40*, 314.
- Buriti, F. C. A.; Santos, K. M. O.; Sombra, V. G.; Maciel, J. S.; Sá, D. M. A. T.; Sales, H. O.; Oliveira, G. O.; de Paula, R. C. M.; Feitosa, J. P. A.; Moreira, A. C. O. M.; Moreira, R. A.; Egito, A. S.; *Food Hydrocolloids* **2014**, *35*, 512.
- Yepez, B.; Espinosa, M.; López, S.; Bolaños, G.; *Fluid Phase Equilib.* **2002**, *194*, 879.
- Lee, S. E.; Hwang, H. J.; Ha, J. S.; Jeong, H. S.; Kim, J. H.; *Life Sci.* **2003**, *73*, 167.
- Tamaki, Y.; Teruya, T.; Tako, M.; *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2010**, *74*, 1110.
- Bento, J. F.; Mazzaro, I.; Silva, L. M. A.; Moreira, R. A.; Ferreira, M. L. C.; Reicher, F.; Petkowicz, C. L. O.; *Carbohydr. Polym.* **2013**, *92*, 192.
- Kapoor, V. P.; Taravel, F. R.; Joseleau, J. P.; Milas, M.; Chanzy, H.; Rinaudo, M.; *Carbohydr. Res.* **1998**, *306*, 231.
- Lee, J.-B.; Ahn, J.; Lee, J.; Kwak, H. S.; *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2004**, *68*, 495.
- Stevanovic, M.; Savic, J.; Jordovic, B.; Uskokovic, D.; *Colloids Surf.* **2007**, *59*, 215.
- Cerqueira, M. A.; Souza, B. W. S.; Simões, J.; Teixeira, J. A.; Domingues, M. R. M. D.; Coimbra, M. A.; Vicente, A. A.; *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83*, 179.
- Yuen, S. N.; Choi, S. M.; Phillips, D. L.; Ma, C. Y.; *Food Chem.* **2009**, *114*, 1091.
- Dinda, E.; Si, S.; Kotal, A.; Mandal, T. K.; *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 5528.
- Stevanović, M.; Bračko, I.; Milenković, M.; Filipović, N.; Nunić, J.; Filipič, M.; Uskoković, D. P.; *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 151.
- Garnero, C.; Longhi, M.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *45*, 536.
- Zohuriaan, M. J.; Shokrolahi, F.; *Polym. Test.* **2004**, *23*, 575.
- Vendruscolo, C. W.; Ferrero, C.; Pineda, E. A. G.; Silveira, J. L. M.; Freitas, R. A.; Jiménez-Castellanos, M. R.; Bresolin, T. M. B.; *Carbohydr. Polym.* **2009**, *76*, 86.
- Chaires, M. L.; Salazar, M. J. A.; Ramos, R. E. G.; *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 1669.
- Neo, Y. P.; Ray, S.; Jin, J.; Nikolaidis, M. G.; Nieuwoudt, M. K.; Liu, D.; Quek, S. Y.; *Food Chem.* **2013**, *136*, 1013.
- Roos, Y.; Karel, M.; *J. Food Sci.* **1991**, *56*, 38.
- Varma, A. J.; Kokane, S. P.; Pathak, G.; Pradhan, S. D.; *Carbohydr. Polym.* **1997**, *32*, 111.
- Yi, J. Z.; Zhang, L. M.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2007**, *103*, 3553.
- Asada, N.; Namba, M.; Kodama, T.; Kyogoku, Y.; *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2004**, *56*, 1.
- Chang, D.; Abbas, S.; Hayat, K.; Xia, S.; Zhang, X.; Xie, M.; Kim, J. M.; *Int. J. Food Sci. Technol.* **2010**, *45*, 1895.
- Mello, V. A.; Ricci-Júnior, E.; *Quim. Nova* **2011**, *34*, 933.
- Li, X.; Chang, S.; Du, G.; Li, Y.; Gong, J.; Yang, M.; Wei, Z.; *Int. J. Pharm.* **2012**, *433*, 79.
- Pralhad, T.; Rajendrakumar, K.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *34*, 333.
- Xie, C.; Li, X.; Luo, X.; Yang, Y.; Cui, W.; Zou, J.; Zhou, S.; *Int. J. Appl. Pharm.* **2010**, *391*, 55.
- Ahmed, M.; Akter, M. S.; Lee, J. C.; Eun, J. B.; *Food Sci. Technol.* **2010**, *43*, 1307.
- Li, F.; Chen, B.; Ping, Z.; Jia, X.; Guo, X.; Xiao, L.; Liu, L.; *Macromol. Biosci.* **2014**, *14*, 280.