

HEIDEGRID SIEBERT KOOP

**HIDROGÉIS BINÁRIOS DE POLISSACARÍDEOS VISANDO ESTABILIDADE E  
LIBERAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em  
Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito  
para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

CURITIBA

2007

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

Ao Walter, meu querido marido,  
Aos meus maravilhosos filhos Juliano e  
Maureen,  
com muito amor, pelo carinho, paciência,  
apoio e por terem estado sempre ao meu lado  
nesta jornada.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por esta conquista, possibilitando a oportunidade de treinar a perseverança e coragem.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Joana Lea Meira Slveira pela orientação, consideração, dedicação e empenho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz pela co-orientação e colaboração.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fany Reicher pela oportunidade, paciência e colaboração.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Martinez pelo auxílio e orientação no uso do HPLC.

Aos companheiros de turma, Caroline, Francine, Luciana e Marco pelo incentivo, companheirismo e amizade sincera.

Aos companheiros de laboratório Ana Paula, Andréia, Andréia T., Eneida, João, Lúcia, Mariana, Marianna pela amizade, apoio e espírito de cooperação.

Ao colega doutorando Marco Cardoso pelos momentos dedicados no auxílio do manuseio do HPLC.

A todos os professores, pós-graduandos e funcionários do Dept<sup>o</sup>. de Bioquímica.

A equipe da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas pela assistência.

A empresa “O Boticário”, nas pessoas de Sr. Israel Henrique Feferman (Diretor Técnico), Sr. Carlos Eduardo de Oliveira Praes (Coordenador Técnico), Sr<sup>a</sup>. Ronit Mazer Sauerman (Pesquisadora), Sr<sup>a</sup>. Paola Patriarca (Pesquisadora) , Sr<sup>a</sup>. Ângela Dakiw Piaciski (Pesquisadora).

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS .....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xiii</b>
<b>PROBLEMÁTICA .....</b>	<b>xiv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1 ÁCIDO ASCÓRBICO E SEUS DERIVADOS .....	02
1.2 ESTRUTURA DA EPIDERME .....	09
1.2.1 Vias de permeação dos fármacos.....	10
1.3 PERMEAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	13
1.4 GALACTOMANANAS : XANTANA .....	16
1.5 REOLOGIA .....	21
1.5.1 Medição da Viscoelasticidade .....	25
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
3.1 MATERIAL.....	33
3.2 OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>Mimosa scabrella</i> .....	33
3.3 ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS .....	34
3.3.1 Determinação de Açúcar Total .....	34
3.3.2 Determinação de Proteínas .....	34
3.3.3 Determinação da Composição Monossacarídica.....	34
3.3.4 Determinação da Homogeneidade por Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Performance.....	35
3.4 PREPARO DOS HIDROGÉIS BINÁRIOS GALACTOMANANAS : XANTANA.....	35
3.5 MÉTODOS REOLÓGICOS .....	37

3.6	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO NOS GÉIS .....	38
3.7	TESTE DE ESTABILIDADE .....	39
3.8	ANÁLISE DE PERMEÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	40
3.8.1	Membranas de Poli L-Ácido Lático .....	40
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>41</b>
4.1	OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	42
4.1.1	Obtenção e purificação da galactomanana de Bracatinga.....	42
4.1.2	Análise química das galactomananas.....	44
4.1.3	Análise por Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Performance (HPSEC) .....	45
4.2	DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO PARA DETECÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO.....	46
4.3	DESENVOLVIMENTO DOS HIDROGÉIS BINÁRIOS XANTANA: GALACTOMANANA COM ÁCIDO ASCÓRBICO E ASCORBIL FOSFATO DE SÓDIO .....	51
4.4	ANÁLISES REOLÓGICAS.....	52
4.5	TESTE DE ESTABILIDADE .....	55
4.5.1	Análise do pH dos Hidrogéis .....	56
4.5.2	Avaliação Organoléptica dos Hidrogéis .....	56
4.5.3	Análises Reológicas .....	57
4.5.4	Análise do Teor de AA nos Hidrogéis.....	59
4.6	TESTE DE PERMEÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	61
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>82</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA DO ÁCIDO ASCÓRBICO E VIAS DE OXIDAÇÃO E DEGRADAÇÃO.....	4
FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO ASCÓRBICO, PALMITATO DE ASCORBILA E ASCORBIL FOSFATO DE MAGNÉSIO .....	6
FIGURA 3 - ESQUEMA DA PELE.....	10
FIGURA 4 - ESQUEMA DE VIAS DE PERMEAÇÃO DE FÁRMACOS NO ESTRATO CÓRNEO ATRAVÉS DOS CORNEÓCITOS (VIA TRANSCELULAR) E VIA MATRIZ LIPÍDICA ENTRE OS CORNEÓCITOS (VIA INTERCELULAR).....	12
FIGURA 5 - CONCEITOS DE DOSAGEM EM EXPERIMENTOS DE PERMEAÇÃO.....	14
FIGURA 6 - ESTRUTURA GENÉRICA DA GALACTOMANANA .....	17
FIGURA 7 - ESTRUTURA GENÉRICA DA XANTANA .....	20
FIGURA 8 - PERFIL DE VISCOSIDADE DE FLUÍDOS.....	22
FIGURA 9 - FREQUÊNCIA DE OSCILAÇÃO EM FUNÇÃO DE G' E G''.....	27
FIGURA 10 - VARREDURA DE FREQUÊNCIA DE GÉIS DE XANTANA COM ADIÇÃO DE CÁTIOS .....	28
FIGURA 11 - VARREDURA DE FREQUÊNCIA DE EMULSÕES POLIMÉRICAS CONTENDO GOMA ACÁCIA E POLIQUATERNÁRIOS .....	29
FIGURA 12 - FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DE GALACTOMANANA DE BRACATINGA.....	43
FIGURA 13 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS DA GALACTOMANANA EXTRAÍDA DA BRACATINGA.....	46
FIGURA 14 - VARREDURA DE ABSORÇÃO EM ESPECTROFOTÔMETRO DE ULTRAVIOLETA DOS COMPONENTES DO GEL BINÁRIO	

DE POLISSACARÍDEOS E ÁCIDO OXÁLICO .....	47
FIGURA 15 -ELUIÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO, ÁCIDO ASCÓRBICO OXIDADO E ÁCIDO OXÁLICO.....	49
FIGURA 16- ELUIÇÃO DOS GÉIS X:GBAA E X:GGAA COM ADIÇÃO DE PROPILENOGLICOL, ÁLCOOL BENZÍLICO E ETILHEXIL- GLICERINA, GEL X:GB E GEL X:GG COMPARADOS COM A ELUIÇÃO DO AA.....	50
FIGURA 17 -VARREDURA DE FREQUÊNCIA DO HIDROGEL X:GBAA DISSOLVIDO EM H <sub>2</sub> O OU TAMPÃO KP COM PROPILENOGLICOL E CONSERVANTES, SEM E COM AA.....	53
FIGURA 18 - VARREDURA DE FREQUÊNCIA DO HIDROGEL DE X:GG COM E SEM ADIÇÃO DE 10% DE AF .....	54
FIGURA 19 - VARREDURAS DE FREQUÊNCIA DOS HIDROGÉIS X:GG E X:GB, COM E SEM ADIÇÃO DE 5% DE AA.....	55
FIGURA 20 -VARREDURAS DE FREQUÊNCIA DOS HIDROGÉIS BINÁRIOS, COM E SEM ADIÇÃO DE 5% DE AA, APÓS ANÁLISE DE ESTABILIDADE POR 12 SEMANAS DE EXPOSIÇÃO À TEMPERATURA AMBIENTE E 45°C .....	56
FIGURA 21 -ANÁLISE DA ESTABILIDADE POR HPLC DOS HIDROGÉIS BINÁRIOS X:GBAA E X:GGAA.....	60
FIGURA 22 -PERMEAÇÃO DO AA NO EXPERIMENTO EM CONDIÇÕES ÁCIDAS E EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS .....	61
FIGURA 23 -ELUIÇÃO DO AA, DHA E ALÍQUOTA REFERENTE A ANÁLISE DE PERMEAÇÃO DO HIDROGEL X:GBAA A 32°C E pH7,4.....	64
FIGURA 24 -ELUIÇÃO DO AA, DHA, ÁCIDO OXÁLICO, DTT E DHA REDUZIDO POR SOLUÇÃO DE DTT .....	66

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO DOS HIDROGÉIS BINÁRIOS DESENVOLVIDOS USANDO GALACTOMANANAS COMERCIAL E NATIVA .....	35
TABELA 2 - RENDIMENTO, AÇÚCAR TOTAL, CONTEÚDO PROTÉICO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS GALACTOMANANAS DE BRACATINGA E GUAR.....	42
TABELA 3 - RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS HIDROGÉIS X:GGAA E X:GBAA.....	59

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AA	Ácido Ascórbico
AF	Ascorbil fosfato de sódio
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AscH <sup>-</sup>	nion ascorbila
Asc <sup>•</sup>	Radical ascorbila
DHA	Ácido Deidroascrbico
DTT	Ditiotreitol
EMEC	Técnica Eletroforética Capilar Eletrocnica Micelar
EPR	Ressonância Eletroparamagntica
FDA	Food and Drug Administration
G'	Módulo de Cisalhamento Dinâmico ou de Armazenamento
G''	Módulo de Perda ou de Viscosidade
G*	Módulo de Cisalhamento Complexo
GLC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
GLC	Cromatografia líquido-gasosa
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPSEC	Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Performance
KP	Tampão Fosfato de Potássio
MALLS	Espalhamento de luz laser em multiângulos
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
Man:Gal	Relação Manose : Galactose
NAD <sup>+</sup> /NADH	Relação Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Oxidado/Reduzido
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	nion superóxido
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
pH	Potencial hidrogeniônico

PLLA	Poli L-ácido láctico
RI	Índice de refração
SDA	Semideidroascorbato
SI	Sistema Internacional
TBAH	Hidróxido de Tetrabutylamônio
THF	Tetrahidrofuran
USP	Farmacopéia dos Estados Unidos
UV	Raios Ultravioleta
UVB	Raios Ultravioleta B
XGC	Xiloglucana da semente de copaíba
X:G	Matriz Binária Xantana:Galactomanana
X:GG	Matriz Binária Xantana:Galactomanana de Guar
X:GGAA	Matriz Binária Xantana:Galactomanana de Guar com Ácido Ascórbico
X:GB	Matriz Binária Xantana:Galactomanana de Bracatinga
X:GBAA	Matriz Binária Xantana:Galactomanana de Bracatinga com Ácido Ascórbico
$\lambda$	Comprimento de onda
$\sigma$	Tensão de cisalhamento
$\eta$	Viscosidade
$ \eta^* $	Viscosidade Dinâmica Complexa
$\Gamma$	Taxa de cisalhamento

## RESUMO

As galactomananas apresentam soluções viscosas em baixas concentrações e são empregadas como espessantes, formadoras de gel quando em sinergia com outros biopolímeros, emulsificantes, estabilizantes, flocculantes e ligantes. Entre as galactomananas utilizadas comercialmente destaca-se o guar, obtido de sementes de *Cyamopsis tetragonolobus*. Apresenta relação Manose:Galactose (M:G) de 1,5:1, com cadeias laterais de galactose distribuídas de forma randômica, capaz de formar interações inter e intramoleculares com outras gomas. O laboratório de Química de Carboidratos Vegetais do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR caracterizou a estrutura de galactomananas de sementes de mais de 30 espécies nativas, entre elas *Mimosa scabrella* (bracatinga) que foi usada no presente trabalho.

Estas foram obtidas através da dispersão das sementes em sistema aquoso e sua composição monossacarídica foi caracterizada, confirmando a relação M:G - 1,1:1. Baseado em estudos de interação das galactomananas de *M. scabrella* com a xantana, (polissacarídeo obtido de fonte microbiana *Xantomonas campestris*), foi demonstrado uma forte interação entre eles, com acréscimo de 32% na viscosidade sobre o valor calculado, apesar do elevado conteúdo de galactose da galactomanana.

O presente trabalho utiliza o sistema xantana - galactomanana como matriz para liberação de ácido ascórbico (vitamina C).

O ácido ascórbico (AA) é co-fator da hidroxilação das unidades de prolina e lisina do pró-colágeno, promovendo a conformação de tripla hélice das fibras de colágeno maduras e previne a formação de radicais livres, ação intimamente relacionada às propriedades antioxidantes deste composto, atuando como doador de elétrons e reagindo com radicais oxidativos. Porém há uma grande desvantagem no seu uso pelo fato de ser muito instável. Vários fatores podem influenciar a degradação do AA, tal como altas temperaturas de estocagem, luz, altos valores de pH, presença de oxigênio dissolvido e de íon metálicos, particularmente íons cúpricos e férricos.

Foram preparados géis binários de xantana - galactomanana de guar (X:GG) e de bracatinga (X:GB). Os polissacarídeos foram dissolvidos isoladamente em tampão fosfato de potássio (KP) 0,3M pH8 (12,5 g/L) e misturados entre si para obtenção do gel. Foram adicionados ao sistema propilenoglicol e conservantes. A este sistema foi adicionado o AA. A estabilidade do sistema foi avaliada por análises do teor de AA em HPLC, pH, coloração e análises reológicas durante 12 semanas em temperatura ambiente e 45°C.

A recuperação do ácido ascórbico para os ensaios a temperatura ambiente e 45°C apresentaram resultados satisfatórios com pH do gel estável. As análises reológicas em sistema dinâmico demonstraram a manutenção do gel após 12 semanas.

A liberação do AA foi avaliada através de células de difusão de Franz a temperatura de 20°C e 32°C por um período de 24 h. Estes resultados demonstram um hidrogel estável e tornam o experimento aplicável na indústria cosmética devido indicar permeação de AA.

## ABSTRACT

Galactomannans are widely utilized as emulsifiers, stabilizers, flocculants or as binders in cosmetic industry as well as synergistic gel thickeners in biopolymers since they form viscous aqueous solutions even in low concentrations. The most common commercially utilized galactomannan is from the guar gum of *Cyamopsis tetragonolobus* seeds. It contains Mannose and Galactose (Man: GAL) in the ratio of 1.5:1.0 with galactose forming the branched side chains capable of forming inter or intramolecular interactions with other gums. The galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella* (bracatinga) was selected for the present study from about 30 native species of seed galactomannans isolated and characterized in our laboratory.

The aqueous extract of the bracatinga seeds was analysed for the chemical composition and obtained a Man:Gal ratio of 1.1:1.0. Viscosity studies of the blends of this galactomannan with Xanthan showed a considerable increase (32%) in viscosity compared to galactomannans from bracatinga alone in solution in spite of the higher content of galactose.

Xanthan-galactomannan binary system was used as a matrix for the first time to study the controlled release of ascorbic acid (Vitamin C).

Ascorbic acid is essential for the hydroxylation of proline and lysine of the pro-collagen in promoting the formation of the triple helix conformation of the collagen. It prevents the formation of free radicals by a mechanism closely related to the antirust properties, acting as electron donor to combine with oxidative radicals. However it has a great disadvantage, being unstable at high temperature, pH >7, dissolved oxygen and in presence of light and Cu<sup>++</sup> and Fe<sup>++</sup>.

The binary hydrogels of galactomannan of guar (X:GG) or bracatinga (X:GB) with xanthan were prepared by mixing the polysaccharide solutions, which had been prepared separately by dissolving the polysaccharides in phosphate buffer solutions (0.3M) of pH 8, at a concentration of 12.5 g/L. Standard preservatives and Propyleneglycol were also added to the system with ascorbic acid. The stability of both the systems was studied by following the rheological characteristics with time for a period of 12 weeks at ambient temperature and 45°C.

The stability of ascorbic acid was evaluated by HPLC analysis during this period. For both systems an amount of 64% and 25% of ascorbic acid were recovered at ambient temperature and 45°C respectively for a period of 12 weeks indicating the better stability of the hydrogel. The hydrogels registered a steady pH of 4.5 during this period. The dynamic rheological analysis further confirmed the stability of the binary hydrogel system even after 12 weeks.

The release of ascorbic acid was also evaluated at a temperature of 20°C and 32°C for a period of 24h using Franz diffusion cell. The results demonstrated little permeation of ascorbic acid, showing prospects for possible applications in cosmetic industry as a stable hydrogel.

## **PROBLEMÁTICA**

As pessoas, vaidosas por natureza, preocupam-se desde a juventude com sua aparência, e, de diversas formas tentam mascarar os sinais deixados pelo seu estilo de vida, pelo stress ambiental e pelos processos naturais. A vitamina C ou ácido ascórbico oferece um alento para os sinais que o tempo exerce sobre a pele, pois exerce um efeito fisiológico na melanogênese, promove a biossíntese do colágeno e previne a formação de radicais livres, todos intimamente relacionados às propriedades antioxidantes deste composto. Portanto o ácido ascórbico tem uma função importante no processo de envelhecimento dérmico e pode ser considerado um ingrediente interessante em produtos de cuidados para a pele.

Pretende-se, portanto avaliar o sistema de géis binários de polissacarídeos, investigados previamente quanto a sua análise estrutural e físico-química e seus mecanismos de interação, como matriz de liberação de ativos como o ácido ascórbico e seu derivado ascorbil fosfato de sódio.

## **1-INTRODUÇÃO**

## 1.1. ÁCIDO ASCÓRBICO E SEUS DERIVADOS

Os principais fatores que desencadeiam o envelhecimento da pele são: a idade, o estilo de vida (por ex. fumo, falta de sono, consumo exagerado de álcool) e estresse ambiental (radiação ultravioleta, poluentes químicos). O desdobramento destes processos são alterações anatômicas da pele como o afinamento da epiderme, espessamento do estrato córneo, perda de colágeno, pigmentação, linhas de expressão e rugas, assim como redução da irrigação sanguínea na pele.

A indústria cosmética vem utilizando diferentes formulações para diminuir os efeitos de envelhecimento entre elas destaca-se a adição de ácido ascórbico (AA) e seus derivados. O ácido ascórbico é um antioxidante hidrossolúvel e co-fator da enzima responsável pela hidroxilação das unidades de prolina e lisina do pró-colágeno, que promovem a conformação de tripla hélice das fibras de colágeno maduras (LEVENE; BATES, 1975). Além disso, foi demonstrado que o ácido ascórbico aumenta a transcrição dos genes de pró-colágeno tipo I e tipo III e a estabilidade do mRNA do pró-colágeno (TAJIMA; PINNELL, 1982) e exerce um efeito fisiológico na melanogênese, pois na presença de ácido ascórbico há a inativação da tirosinase nos melanossomas, a dopaquinona é reduzida pelo ácido ascórbico a dopa prevenindo a formação da melanina (TOMITA *et al.*, 1980; QUEVEDO *et al.*, 2000).

Há uma grande desvantagem no uso do ácido ascórbico em produtos industrializados pelo fato de ser muito instável, pois possui dois grupos  $-OH$  ionizáveis com  $pK_{a1}$  4,25 e  $pK_{a2}$  11,8 e no pH fisiológico a forma favorecida é de mono-ânion onde a doação de um elétron pelo ascorbato origina o semideidroascorbato (SDA) ou radical ascorbila, que possui um tempo de meia-vida longo podendo ser detectado facilmente por Ressonância de Elétron Spin / Ressonância Eletroparamagnética (“doublet” a  $g= 2,0054$ ,  $aH= 0,188$ ). O radical ascorbila pode ser oxidado originando o deidroascorbato (DHA). Esta espécie de radical livre indica ser a principal causa do efeito pró-oxidante dos sistemas que

contêm AA/DHA (VERGELY *et al.*, 1998).

Além disso, a baixa reatividade do radical ascorbila é a essência do potencial redutor de espécies oxidativas, tais como  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e radical urato. Estes radicais reativos reagem com o ascorbato e um radical menos reativo que o radical ascorbila é formado e não parece reduzir com alta eficiência o oxigênio ( $\text{O}_2$ ) para ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ). Esta espécie de radical livre indica ser a principal causa do efeito pró-oxidante dos sistemas que contêm AA/DHA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

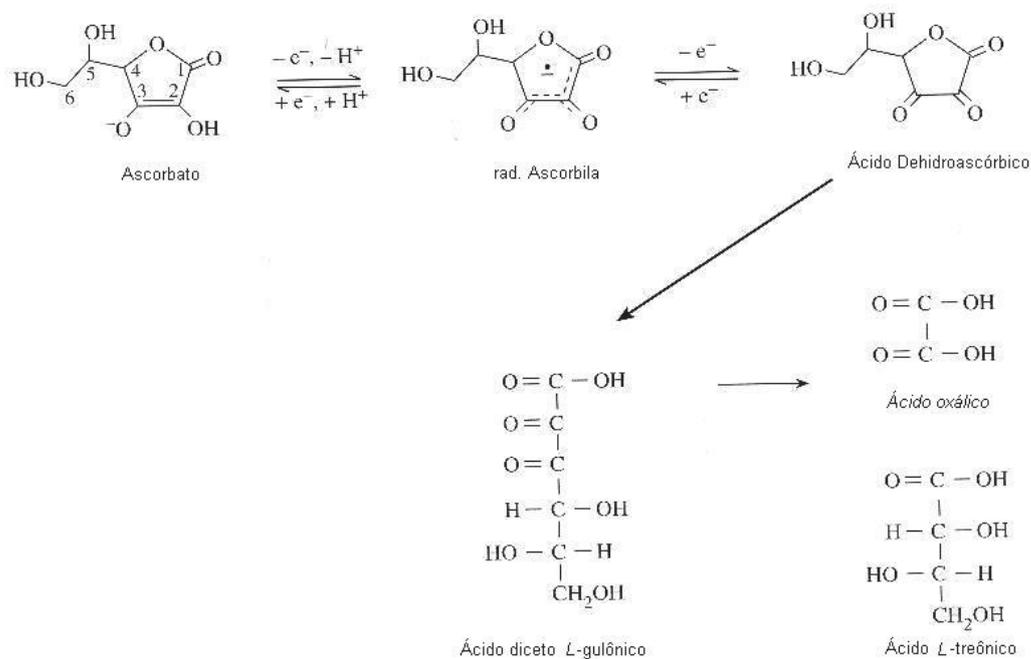
Duas moléculas de radical ascorbila sofrem uma reação desproporcional, regenerando o ascorbato e formando o deidroascorbato (figura 1).



Ácido deidroascórbico é instável e degrada-se rapidamente numa via complexa, produzindo ácidos oxálico e L-treônico (figura 1) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Vários fatores podem influenciar na degradação do ácido ascórbico em solução (ROIG; RIVERA; KENNEDY, 1995; TSAO; YOUNG, 1996), tais como: altas temperaturas de estocagem, luz, altos valores de pH, presença de oxigênio dissolvido e de íons metálicos, particularmente íons cúpricos e férricos (NIKI, 1991; BUETTNER; JURKIEWICZ, 1996). Chang e Chang (2003) avaliaram a estabilidade do ácido ascórbico numa variedade de condições químicas tais como: soluções em atmosfera de  $\text{N}_2$  ou não, diferentes valores de pH (2,0 e 6,9) e temperaturas de 10 e 25°C. Os resultados demonstraram uma forte correlação entre estabilidade e a atmosfera de  $\text{N}_2$ . O tempo para a degradação de 10% do ácido ascórbico foi de 10h em soluções ácidas sem atmosfera de  $\text{N}_2$  e 48h em soluções ácidas com atmosfera de  $\text{N}_2$ , provavelmente devido ao fato que há menos  $\text{O}_2$  disponível para oxidação. Observou-se que em soluções aquosas ácidas, na atmosfera de  $\text{N}_2$ , a estabilidade do ácido ascórbico não foi afetada pela temperatura.

FIGURA 1 - ESTRUTURA DO ÁCIDO ASCÓRBICO, VIAS DE OXIDAÇÃO E DEGRADAÇÃO



FONTE: HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Antioxidant protection by low-molecular-mass agents: compounds derived from the diet. In: HALLIWELL, B. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3. ed. New York: Oxford University Press Inc. p. 201.1999.

Vários métodos têm sido empregados para análise do ácido ascórbico entre eles destaca-se: titulação, separação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por ultravioleta e eletroquímico (LYKKESFELDT; LOFT; POULSEN, 1995) análises espectrocópicas no ultravioleta e fluorimetria (ZENG; MARTINUZZI; MCGREGOR, 2005).

A titulação do ácido ascórbico é baseada no seu poder redutor e através de indicadores que na forma oxidada possuem coloração diferente que na forma reduzida (por ex. 2,6 dicloroindofenol, cor rósea em meio ácido e incolor em meio ácido) indicando o ponto final onde todo o ácido presente na amostra foi reduzido. É um método que consome muito tempo e os erros experimentais decorrentes de interpretações diferentes das leituras do ponto final da titulação de cada operador dificultam a sua padronização.

Os métodos de detecção por HPLC e fluorimetria apresentam maior sensibilidade e especificidade, porém sua implementação requer equipamentos especializados e padronização de técnica (ZENG; MARTINUZZI; MCGREGOR, 2005).

O ácido ascórbico, o radical ascorbila e o ácido deidroascórbico (figura 1) estão em equilíbrio entre si, de forma que, para analisar com segurança e reprodutibilidade, o método analítico deve provocar o menor distúrbio possível neste equilíbrio. Esta situação é agravada pelo fato do ácido deidroascórbico ser relativamente instável (meia-vida de 6 min a pH 7,0 e 37°C) e é rapidamente convertido de forma irreversível em ácido 2,3-dicetogulônico (SCHELL; BODE, 1993). O ácido deidroascórbico pode ser medido de três formas: diretamente, seguido de derivatização e após oxidação do ácido ascórbico (WASHKO; LEVINE, 1992).

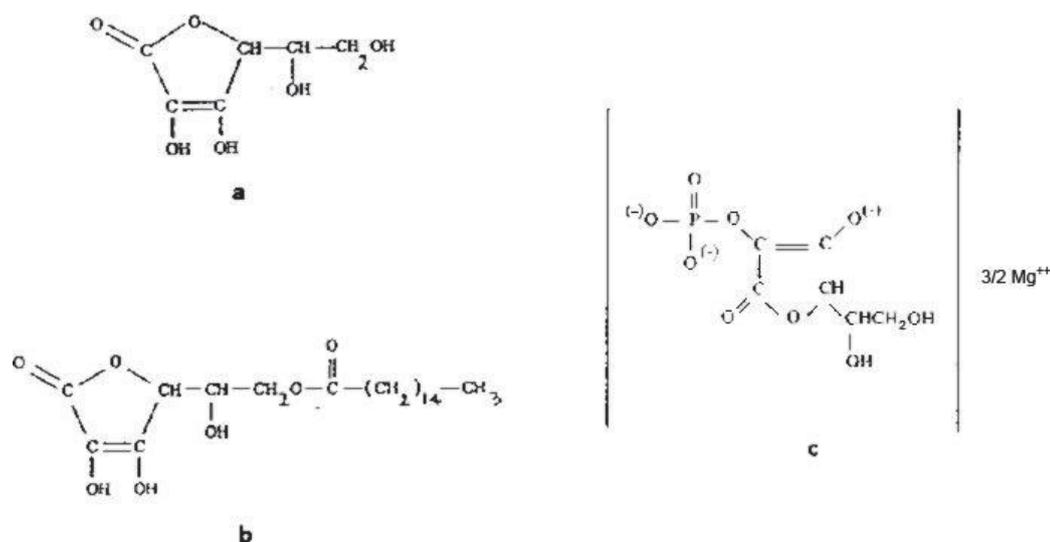
A determinação do ácido ascórbico pode ser feita através de sistemas de detecção eletroquímicos ao perceber um sinal de corrente ou mudança de voltagem devido a sua oxidação (sistemas coulométricos ou amperométricos). A reação na qual o ácido ascórbico é convertido em ácido deidroascórbico é um processo de duas etapas que geram radicais livres, de forma que a conversão do ácido ascórbico em ácido deidroascórbico pode promover potencialmente a redução quanto, paradoxalmente, a oxidação de outras substâncias num sistema. O ácido deidroascórbico pode ser reduzido por vários agentes e leva a um aumento da quantidade de ácido ascórbico, a dosagem de ácido ascórbico antes e depois da redução é um método comum para determinar indiretamente o ácido deidroascórbico na amostra (DEUTSCH, 2000).

O radical ascorbila tem sido medido diretamente usando métodos espectrofotométricos com absorção de comprimento de onda de 360 nm ou indiretamente usando semideidroascorbato redutase e monitorando mudanças na proporção de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  a 340nm (WASHKO; LEVINE, 1992).

Esforços substanciais vêm sendo realizados na indústria cosmética para aumentar a estabilidade do ácido ascórbico como a derivatização do ácido ascórbico (ZHANG *et al.* 1999).

Áustria, Semenzato e Bettero (1997) sugerem que as soluções de ésteres de ácido ascórbico são mais estáveis que ácido ascórbico em solução. A esterificação com ácido palmítico na posição 6 (figura 2) reduziu a hidrólise do ácido ascórbico mas não garantiu níveis de estabilidade satisfatória em produtos acabados, mesmo quando empregado em emulsões geleificadas com propriedades viscoelásticas que aumentam a estabilidade química. A introdução do grupo fosfórico na posição 2 protegeu a molécula da quebra do sistema enediol, estabilizando a molécula o que tem viabilizado o uso deste.

FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO ASCÓRBICO(a), PALMITATO DE ASCORBILA(b) E ASCORBIL FOSFATO DE MAGNÉSIO(c)



FONTE: AUSTRIA, R.; SEMENZATO, A.; BETTERO, A. Stability of vitamin C derivatives in solution and topical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.15, p.795-801, 1997.

O L-ascorbil-2-fosfato de magnésio, derivado do ácido ascórbico presente nas formulações cosméticas, apresenta atividade antioxidante. Kobayashi, Takehana e Itoh (1996) demonstraram através de experimentos em ratos sem pelos que o derivado protege contra a lipoperoxidação induzida por radiação UVB. Ensaio *in vitro* mostraram evidências que este derivado atravessa a epiderme e é convertido em ácido

ascórbico (KOBAYASHI; TAKEHANA; ITOH, 1996). Em estudos *in vitro* de cultura em monocamada de fibroblastos humanos observou-se a equivalência deste derivado com o ácido ascórbico ao estimular a síntese de colágeno e sendo estável em pH neutro (GEESIN; GORDON; BERG, 1993). Os estudos *in vivo* com creme contendo 10% deste derivado, usando pele humana, demonstraram-se uma melhora clínica em melasmas e manchas senis (KAMEYAMA; SAKAI; KONDOH, 1994). Neste mesmo sistema Yamamoto, Muto e Murakami (1992) demonstraram aumento na síntese de colágeno e crescimento celular com 2-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-L-ácido ascórbico.

A estabilidade do grupo fosfórico no derivado ascorbil fosfato de magnésio frente a hidrólise foi investigada em solução de ácido clorídrico (HCl) e com solução de tampão fosfato (KP 0,3M), ambas em pH 4: O conteúdo de ascorbil fosfato de magnésio em solução tampão foi próximo a 99% após cinco meses de estocagem a temperatura ambiente no escuro, porém observou-se uma significativa perda em solução clorídrica (27%). Portanto, a molécula é protegida da hidrólise na presença de íons fosfóricos em solução, devido ao efeito do íon-par, deslocando o equilíbrio da reação para a forma fosforilada (AUSTRIA; SEMENZATO; BETTERO, 1997).

Chang e Chang (2003) utilizaram a técnica de HPLC para analisar o ácido ascórbico, o derivado ascorbil fosfato de magnésio, o ácido glicólico e o 4-hidroxifenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (Arbutin), todos agentes clareadores da pele em produtos cosméticos comerciais. Definiram como sendo ideais as seguintes condições de análises cromatográficas: análise em sistema isocrático, com coluna de fase reversa RP-18, como fase móvel a solução tampão de diidrofosfato de potássio 5mM pH 2,5 contendo 10mM hidróxido de tetrabutilamônio (TBAH), 10% metanol e a detecção efetuada por leitura em comprimento de onda de 220nm. O borbulhamento de N<sub>2</sub>, realizado com a finalidade de retirar o O<sub>2</sub> disponível, foi um procedimento importante para estabilizar o ácido ascórbico.

Zeng, Martinuzzi e Mcgregor (2005) avaliaram diferentes parâmetros frente à estabilidade do ácido ascórbico através da técnica de espectrofotometria de UV, num comprimento de onda de 245 nm. Os parâmetros avaliados foram o efeito de

concentrações de cobre (II) e a frequência na oxidação do ácido ascórbico em metanol, tampão fosfato USP (pH 2,5) e água deionizada. Os autores observaram que cobre (II) pode acelerar a oxidação do ácido ascórbico em solução aquosa. A porcentagem do ácido ascórbico oxidado em solução aquosa com concentrações crescentes de  $\text{Cu}^{2+}$  em 30 minutos, a temperatura de 22°C foi de 24,7 a 96,8%. O ácido ascórbico solubilizado em metanol a temperatura de 22°C foi o mais estável com apenas 0,7% de oxidação em 1h, comparado com 1,3% de oxidação em tampão fosfato USP (pH 2,5) e 14,9% de oxidação quando solubilizado em água deionizada. A solubilidade do ácido ascórbico em metanol a 22°C foi de 81,0 mg/mL. Os teores de ácido ascórbico obtidos pelo método de UV estão de acordo com os valores obtidos pelos métodos de titulação, portanto os autores sugerem o método de UV como método de rotina na quantificação do ácido ascórbico em comprimidos multivitamínicos (ZENG; MARTINUZZI; MCGREGOR, 2005).

Para estimar a qualidade de produtos cosméticos contendo vitamina C e/ou derivados, Wang e Wu (2006) estabeleceram uma técnica Eletrocromatografia Capilar Micelar para analisar o ácido ascórbico, ascorbil fosfato de magnésio e palmitato de ascorbila simultaneamente. As condições de separação envolvem o uso de eletrólitos contendo níveis relativamente altos de surfactantes, tal como dodecilsulfato de sódio. Acima de uma determinada concentração, denominada de concentração micelar crítica, as moléculas de surfactante começam a agregar-se, formando micelas. A separação é baseada na partição das moléculas entre a fase micelar (pseudo-fase estacionária) e o tampão aquoso, o fluxo eletro osmótico é suficientemente forte para forçar as micelas passarem pelo detector. Através deste método as análises dos resultados de três experimentos por dia, durante cinco dias indicaram alta linearidade ( $r > 0,9976$ ). A separação é rápida, obtida em 12 min, e, portanto viável para o controle de produtos cosméticos.

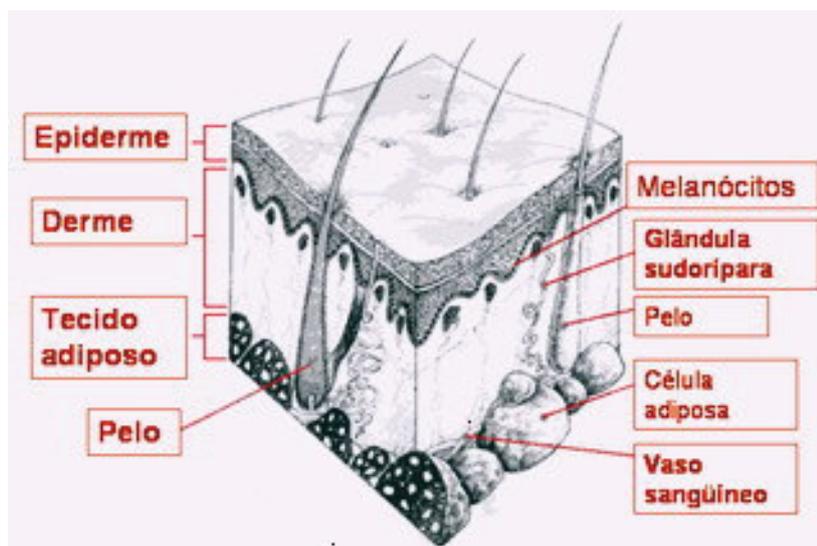
## 1.2. ESTRUTURA DA EPIDERME

A maior limitação à permeação transdérmica de ativos é a própria pele. Por ser a camada mais externa do corpo humano, separando o ambiente interno do externo, a pele atua como uma barreira dupla, prevenindo a entrada de moléculas estranhas e a saída de substâncias endógenas. A pele é composta essencialmente por duas camadas principais (figura 3): uma camada epitelial externa sem vascularização, a epiderme, e uma camada interna, que é a derme. Esta contém uma rica vascularização, nervos, glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas e folículos pilosos, e é suportada pelo tecido conjuntivo. A epiderme pode ser dividida em várias camadas anatômicas as quais representam diferentes estágios de diferenciação celular, desde que são formadas na membrana basal na interface da epiderme e migram para a superfície da pele (MAJURKKA SUHONEN; BOUWSTRA; URTTI, 1999).

O estrato córneo, camada superficial da epiderme e o estágio final de diferenciação, é formado por várias camadas de células mortas embebidas numa matriz lipídica. O seu peso seco é composto por 75-80% de proteínas, grande parte sendo  $\alpha$ -queratina fibrosa intercorneócita e uma pequena fração de  $\beta$ -queratina amorfa (FLYNN, 1990). Juntos estes compostos tornam os corneócitos densos e praticamente impermeáveis para solutos. Aproximadamente 10-15% da fração protéica é hidrossolúvel (MAJURKKA SUHONEN; BOUWSTRA; URTTI, 1999). Ceramidas, colesterol e ácidos graxos de cadeia longa são os principais constituintes da matriz lipídica. Foram identificadas oito subclasses de ceramidas no estrato córneo (STEWART; DOWNING, 1999), as ceramidas incluem espécies na qual uma base esfingo esfingosina, fitoesfingosina ou 6-hidroxiesfingosina é ligada através do grupamento amida a um ácido graxo ou  $\alpha$ -hidroxi-ácido graxo (PONEC *et al.*, 2002).

A permeabilidade à água do estrato córneo é 1000 vezes menor que a maioria das outras membranas biológicas, e é conhecida por representar a maior barreira de permeabilidade da pele.

FIGURA 3 – ESQUEMA DA PELE



Fonte: Estrutura da pele: Biologia Interativa, [www.arquivos para estudo.com](http://www.arquivos para estudo.com) Acesso em: 31 jul.2006

Na tentativa de controlar a liberação de ativos na pele e através da pele são usadas uma das três estratégias seguintes:

1. Reduzir a resistência da pele como barreira de penetração ao romper a bicamada lipídica na qual o estrato córneo está firmemente envolto.
2. Provocar a liberação do fármaco a partir do veículo para a pele.
3. Acrescentar um solvente adicional à pele, o qual ofereça um transporte paralelo ao transporte convencional das moléculas ou que melhore a solubilidade do fármaco no interior da pele (WAGNER *et al.*, 2004).

### 1.2.1. Vias de permeação dos fármacos

Acredita-se que a absorção de fármacos pela pele seja passiva. A permeação transdermal pode envolver a passagem de moléculas através da epiderme intacta ou através de uma via alternativa, pelos folículos pilosos e glândulas exócrinas. Porém estes apêndices ocupam apenas 0,1% do total da superfície da pele humana, e, portanto, acredita-se que a via transepidermal de difusão passiva é a principal via associada a permeação de fármacos pela pele, porém dependendo do tamanho da

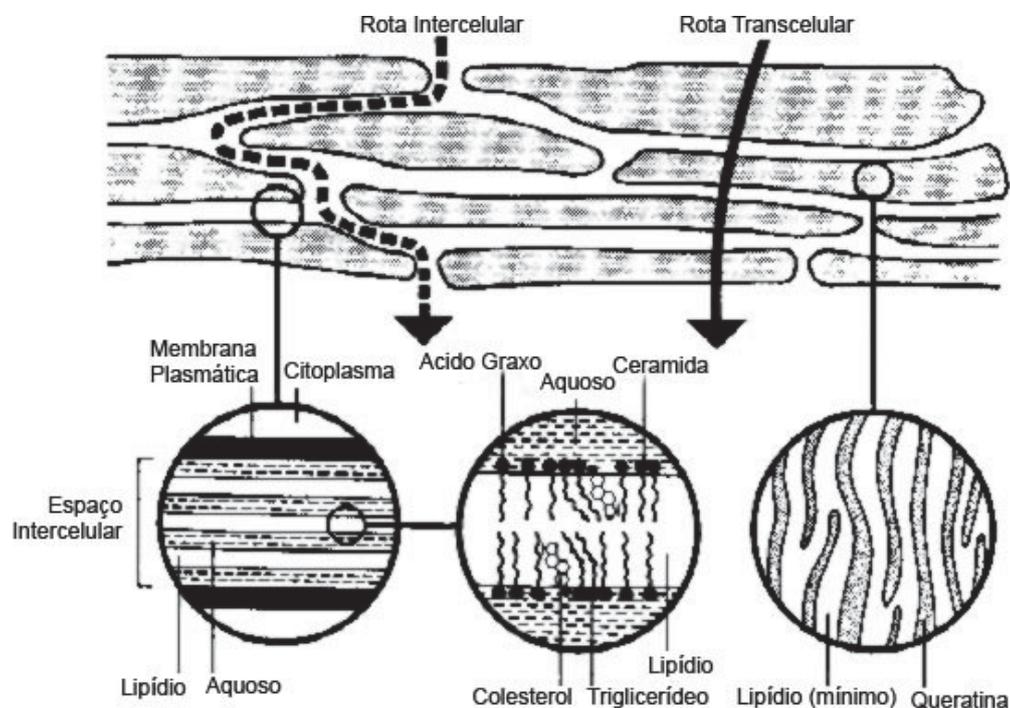
molécula a via alternativa pode ser significativa (HUEBER; SCHAEFER; WEPIERRE, 1994).

O estrato córneo é caracterizado muitas vezes por uma parede com estrutura semelhante a tijolos, que representam os corneócitos (proteína), e o lipídio intercelular representa o cimento. A fase protéica é descontínua enquanto que a fase lipídica é contínua. Em teoria existem duas vias em potencial para atravessar o estrato córneo; a transcelular (através dos corneócitos e da matriz lipídica) e a intercelular (via domínios lipídicos entre os corneócitos). Porém, para ambas as rotas a estrutura do estrato córneo obriga o permeante a difundir-se através das camadas lipídicas intercelulares. Acredita-se que a rota intercelular é a principal via de permeação da maioria dos fármacos. Estudos experimentais demonstraram que a permeação da maioria dos compostos através do estrato córneo é fortemente dependente da lipofilicidade e do tamanho da molécula (POTTS; GUY, 1992). Porém, tem sido sugerido que compostos muito hidrofílicos penetram através das regiões hidrofílicas dos corneócitos (presumidamente associado à água com queratina) e através da matriz lipídica (GOATES; KNUTSON, 1993; KNUTSON *et al.*, 1985) (figura 4).

A permeabilidade transdérmica de princípios ativos é principalmente influenciada por três fatores: a mobilidade do composto no veículo, a liberação do composto pelo veículo e a permeação do composto através da pele (PELTOLA *et al.*, 2003).

Pesquisas vêm sendo conduzidas de forma a obter formulações que aumentem a permeabilidade do composto sem alterar irreversivelmente a função de barreira da pele. Entre os mecanismos para avaliar a permeação do composto através da pele estão: ação diretamente sobre a pele e modificação da fórmula alterando a partição do composto, difusão ou solubilidade (WILLIAMS; BARRY, 2004).

FIGURA 4 - ESQUEMA DE VIAS DE PERMEAÇÃO DE FÁRMACOS NO ESTRATO CÓRNEO ATRAVÉS DOS CORNEÓCITOS (VIA TRANSCELULAR) E VIA MATRIZ LIPÍDICA ENTRE OS CORNEÓCITOS (VIA INTERCELULAR)



FONTE: MARJUKKA SUHONEN, T.; BOUWSTRA, J.A.; URTTI, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. **Journal of Controlled Release**, v.59, p.149, 1999.

Para o estudo de liberação de fármacos transdérmica e dérmica, são empregados sistemas de testes *in vitro*. Estes testes podem ser usados para desenvolver novas formas farmacêuticas, avaliação de novos produtos farmacêuticos e/ou cosméticos, mas também obter informações sobre os efeitos que excipientes exercem sobre a função de barreira da pele.

Estas informações seriam mais elucidativas através de experimentos *in vivo* em humanos, porém, estudos em voluntários dificilmente permitem a determinação de fármacos em camadas mais profundas, pois seriam necessárias técnicas invasivas. Assim, torna-se uma alternativa o uso de cortes de pele humana num sistema de testes *in vitro* (WAGNER *et al.*, 2004). O método utilizado é o de células de difusão de

Franz, o qual originalmente foi desenvolvido para estudar permeação transdérmica de fármacos (FRANZ, 1975; BRONAUGH, 1993).

### 1.3. PERMEAÇÃO *IN VITRO*

O parâmetro chave para qualquer princípio ativo é a sua eficácia. De forma que frequentemente testes *in vitro* são realizados para determinar a qualidade e se o desempenho do ativo é mantido ao longo do tempo. Uma variedade de testes físicos, químicos e de liberação *in vitro* tem sido recomendada. O último reflete o efeito combinado de vários parâmetros físicos e químicos, incluindo a solubilidade, tamanho de partículas do princípio ativo e propriedades reológicas do produto (SUPACC-SS, 1997).

O equipamento recomendado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) para análises de liberação é denominado de Células de Difusão de Franz composto usualmente de seis células, porém também são usados sistemas de três e apenas uma célula. As células de difusão de Franz consistem de duas partes, um compartimento doador e outro receptor que são separados por uma membrana.

O compartimento doador condiciona o produto a ser analisado. Este produto poderá ser avaliado de acordo com uma dosagem dita finita ou infinita (figura 5).

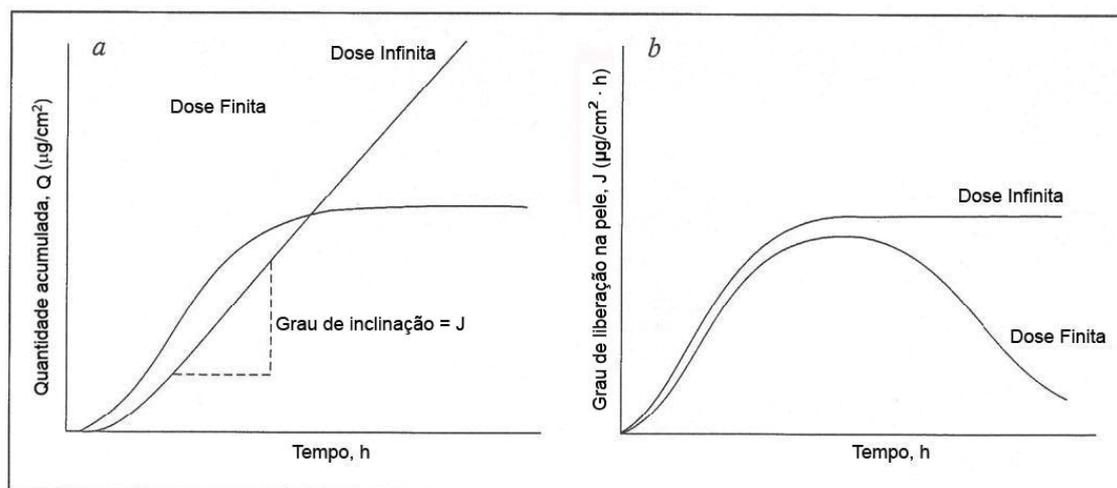
A dosagem infinita é definida como a quantidade de amostra aplicada sobre a pele de forma que a absorção máxima da substância (por unidade de área da pele) seja obtida e mantida e isto se sucede independentemente da concentração da substância aplicada (OECD, 2004a). Para tanto, o volume do fluido doador é suficiente para que a concentração da substância não seja esgotada, porém, esta situação não reflete a prática.

Sob as condições de dosagem finita a absorção máxima poderá ser atingida após transcorrido um determinado tempo, porém, não será mantida ou sequer será observada (OECD, 2004a). A concentração da substância em análise no fluido doador muda devido à absorção na pele e evaporação do fluido doador. Esta situação ocorre

quando as células *in vitro* não estão oclusas e, portanto reflete melhor as condições na prática. Estes conceitos estão demonstrados na figura 5.

No regime de dose finita o produto é aplicado num volume suficiente para cobrir a pele e normalmente permanece não-oclusa. No procedimento de dose infinita o produto é aplicado em excesso e é mantido ocluído durante todo o estudo (OECD, 2004b).

FIGURA 5 – CONCEITOS DE DOSAGEM EM EXPERIMENTOS DE PERMEACÃO



a) A dose cumulativa absorvida em função do tempo sob condições “infinitas” e “finitas”. b) O fluxo pela pele em função do tempo.

FONTE: SCHAEFER, H.; REDELMEIER, T.E. Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Basel, Schweiz, S.Karger AG 1-310, 1996.

No compartimento receptor são utilizados normalmente compostos hidrossolúveis contendo soluções tampão isotônicas (OECD, 2004a). A solução do meio receptor não deve atuar como barreira de absorção, em função de baixa solubilidade do composto em teste, e não deve afetar a integridade da membrana. Esta solução deve ser homogeneizada para assegurar a uniformidade de difusão e a concentração que também são dependentes da temperatura, de forma que o fluido deve ser mantido em temperaturas constantes durante o experimento. Ao longo do experimento as amostragens são tomadas em intervalos preestabelecidos e analisadas.

A permeação na membrana é expressa como a porcentagem da quantidade ou taxa absorvida por unidade de tempo, ou no caso de doses infinitas, como uma constante de permeabilidade.

As membranas utilizadas no sistema de célula de Franz podem ser biológicas ou artificiais. Estas devem permitir que o ingrediente ativo difunda prontamente ao meio receptor, assim como é liberado do produto, e não atue como fator limitante da permeação.

A escolha da membrana biológica depende do objetivo do experimento. Podem ser usadas amostras de pele de fonte humana e animal. Apesar das amostras de pele humana oferecerem dados mais aproximados das condições *in vivo* que nem sempre estão disponíveis, além de estarem sujeitas às normas de ética em experimentação (ECETOC, 1993).

Em testes cosméticos a pele de porco é usada com frequência, pois suas características de permeação são semelhantes à pele humana. É recomendado para experimentos cosméticos, de acordo, com a SCCNFP (*Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products*), o uso de pele humana retirada de seios ou abdômen ou pele de porco retirada de abdômen, peito, flancos e orelhas (SCCNFP, 2003).

Algumas membranas artificiais foram exploradas para melhor compreender os aspectos mecânicos de absorção através da pele, tais como: acetato de celulose, polidimetilsiloxane (Silastic®), poliuretano, polisulfona modificado (Supor®), silicatos de alumínio (Zeolite), sistemas multimembranas (acetato de celulose: Silastic®: acetato de celulose) e membranas de ultrafiltração (Diaflo) (BEHL *et al.*, 1990). Estas membranas sintéticas são sistemas simples de monocamadas homogêneas. Uma propriedade importante das membranas artificiais é a possibilidade de diferenciar propriedades termodinâmicas nos processos de permeação. Por exemplo, os efeitos termodinâmicos da solubilidade do fármaco, coeficiente de partição, pH, interação do excipiente-fármaco. Porém os fatores que afetam a pele e conseqüentemente alteram a sua permeabilidade ou a difusão do fármaco através dela não podem ser avaliados pelo uso de membranas artificiais (BEHL *et al.*, 1990).

A membrana de poli L-ácido láctico (PLLA) que pertence a um grupo de polímeros classificado como poliéster é originário de monômeros de ácido. O ácido láctico possui dois enantiômeros, D-ácido láctico e L-ácido láctico. O PLLA é a forma derivada do isômero do ácido L-láctico e é mais comumente usado, pois seu produto de degradação está presente no organismo e metabolizado à água e dióxido de carbono (WAGGONER, 2002).

As primeiras aplicações biomédicas de polímeros de PLLA foram como suturas e próteses (KULKARNI *et al.*, 1971) também usadas na liberação controlada de fármacos com função de proteção contra doenças contagiosas e liberação de contraceptivos (SALTZMAN, 2001).

Levando em conta as considerações sobre as características de estabilidade químicas do ácido ascórbico, estrutura da epiderme e processos de permeação, o uso de géis de polissacarídeos foi investigado como meio de avaliar a estabilidade do ácido ascórbico.

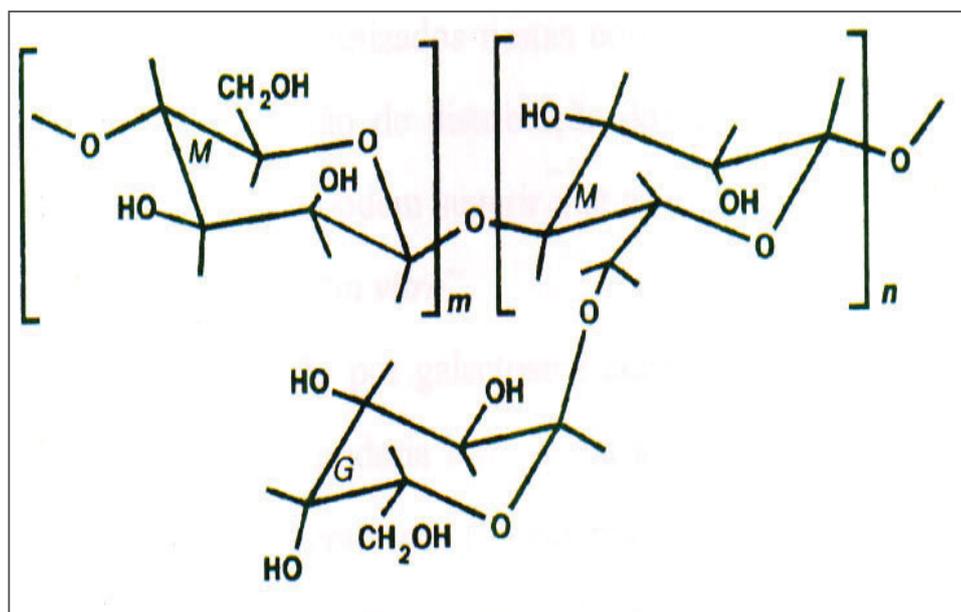
#### **1.4. GALACTOMANANAS : XANTANA**

As galactomananas de vegetais são macromoléculas que apresentam uma estrutura genérica com cadeia principal de unidades D-manopiranosil unidas entre si por ligações  $\beta(1\rightarrow4)$ , com substituições de unidades simples D-galactopiranosil ligadas  $\alpha(1\rightarrow6)$  (figura 6). Ocorrem como polissacarídeos de reserva de endosperma de sementes, particularmente em espécies das famílias Mimosaceae, Caesalpiniaceae e Fabaceae (DEA; MCKINNON; REES, 1972; DEA; MORRINSON, 1975). Apresentam altos rendimentos, que variam de 15 a 38% da massa seca da semente e sua quantidade armazenada depende do tamanho relativo do endosperma (ASPINALL; WHYTE, 1964).

Diferenças estruturais entre as galactomananas, como a relação manose:galactose (Man:Gal), por exemplo, afetam as propriedades funcionais destes biopolímeros. As galactomananas apresentam diferentes relações Man:Gal. Tais variações dependem da fonte biológica e do método de extração utilizado (WANG;

ELLIS; ROSS-MURPHY, 2000; CHAUBEY; KAPOOR, 2001; FISHER *et al.*, 2001).

FIGURA 6 – ESTRUTURA GENÉRICA DA GALACTOMANANA



FONTE: REICHER, F.; GANTER, J.L.M.S , Composição química e caracterização estrutural de galactomananas de espécies brasileiras. In: LAJOLO, F.M.; SAURO-CALIXTO, F.; PENNA, E.W.; MENEZES, E.W. **Fibra dietética en Iberoamérica: tecnología y salud: obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos.** Ed. Varela, p. 27, 2001.

A influência da distribuição das unidades de galactose (alternada, em blocos ou ao acaso) sobre as dimensões das cadeias foi analisada pelo grupo de Química de Carboidratos Vegetais da UFPR utilizando galactomananas com relações Man:Gal 2:1 e 3:1, e ambas mostraram padrões semelhantes. No entanto, o grau de flexibilidade aumentou na seguinte ordem: unidades alternadas > unidades distribuídas ao acaso > unidades em blocos (PETKOWICZ *et al.*, 1998).

As galactomananas mais utilizadas comercialmente são as obtidas de sementes de alfarroba (*Ceratonia siliqua*) e guar (*Cyamopsis tetragonolobus*). Apresentam relação Man:Gal de aproximadamente 3,5:1 e 1,5:1, respectivamente, com cadeias laterais de galactose distribuídas de forma randômica, capazes de formar interações inter e intramoleculares. A galactomanana de guar apresenta, pela maior

quantidade de unidades de galactose, maior solubilidade em água fria. As unidades de galactose são responsáveis pela solubilidade do polímero, ao passo que as unidades de manose pertencentes à cadeia principal estão relacionadas com a massa molar (WHISTLER; DANIEL, 1985).

O grupo de Química de Carboidratos Vegetais do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná caracterizou a estrutura de galactomanana de sementes de mais de 30 espécies nativas. Entre os polissacarídeos estudados destaca-se a galactomanana de *Mimosa scabrella* (bracatinga), que apresenta relação Man:Gal 1,1:1 e viscosidade intrínseca,  $[\eta] = 890 \text{ mL/g}$  (GANTER, 1991; GANTER *et al.* 1992, 1993, 1995 e 1997).

Este mesmo grupo, em colaboração com uma empresa de cosméticos, avaliou a interação da galactomananas de bracatinga com surfactantes e proteínas em formulações de xampu. Observou-se que a adição de galactomanana bracatinga teve efeitos benéficos na formulação em comparação com produto comercial, o qual se utilizou goma guar. Os sistemas contendo galactomanana e surfactante lauril éter sulfato de sódio apresentaram viscosidade superior aos sistemas contendo agentes espessantes cloreto de sódio, cocoamilpropil betaina e dietanolamina de ácido graxo de coco. A avaliação do conteúdo de açúcar total em sistemas contendo galactomanana de bracatinga e queratina indicou a associação entre ambos após 5 minutos de exposição a 21°C. O mesmo comportamento foi observado com a galactomanana contendo menor teor de proteína não ligada covalentemente (5,6%), indicando que as proteínas agregadas à galactomanana bruta (14,6%) não interferem na associação com a queratina. As indicações de associações galactomanana-lauril sulfato de sódio e galactomanana-queratina justificam os efeitos benéficos observados na formulação básica de xampu acrescida com galactomanana (SUGUI, 1994).

As galactomananas quando combinadas com outros polissacarídeos, tais como carragenana, ágar e xantana apresentam a capacidade de formar géis. O sistema contendo galactomanana e xantana, um polieletrólito de origem microbiana, é um dos mais interessantes, uma vez que nenhum dos componentes isolados é capaz de formar gel (CHANDRASEKARAN; RADHA, 1997; LOPES *et al.*, 1992; TAKO, 1991).

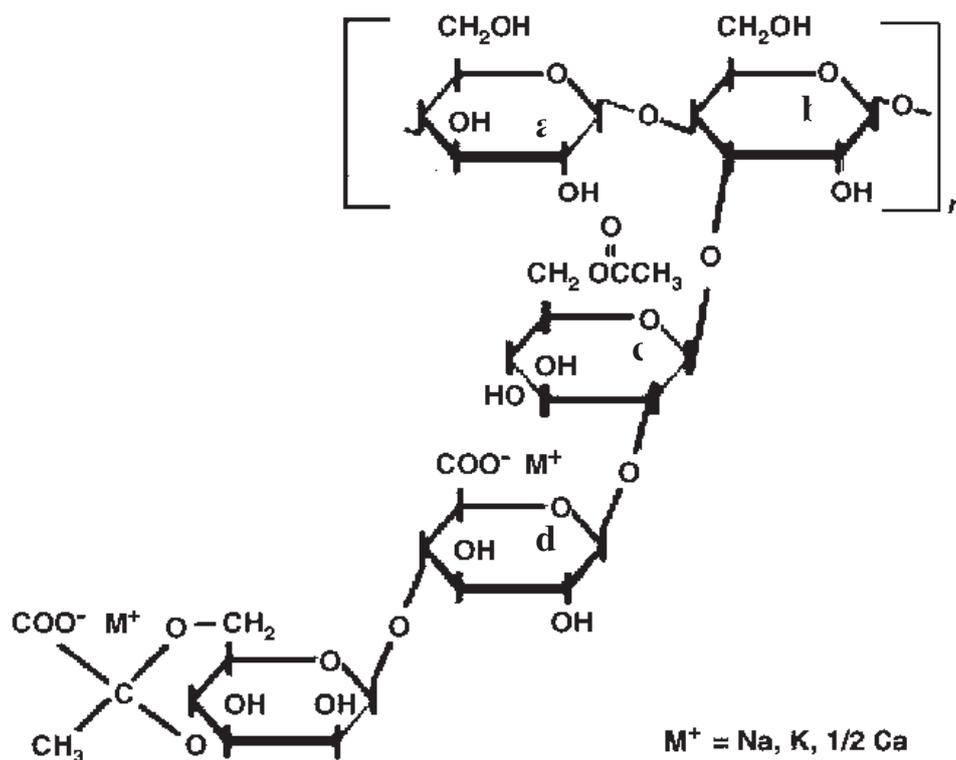
A interação sinérgica entre xantana e galactomananas foi apontada pela primeira vez por ROCKS (1971). Desde então diversas propostas sobre o mecanismo de tal associação tem sido discutidas na literatura, contribuindo para o seu entendimento, porém algumas questões permanecem em debate.

A estrutura primária da xantana, originária de microorganismos *Xanthomonas campestris* está demonstrada na figura 7. Consiste de uma cadeia celulósica principal de unidades D-glucopiranosil unidas por ligações  $\beta(1\rightarrow4)$  e substituída em O-3, a cada unidade alternada de glucose, por um cadeia lateral composta de um trissacarídeo. A cadeia lateral é formada por ácido glucurônico entre duas unidades D-manopiranosil. A unidade de manose terminal pode ser substituída em O-4 e O-6 por um grupamento piruvato. Um grupo O-acetil está frequentemente presente em O-6 da unidade de manose interna (STANKOWSKI; MUELLER; ZELLER, 1993).

Devido à presença de grupamentos carregados, o ácido glucurônico e o piruvato, a xantana apresenta-se como um polieletrólito. A estrutura secundária da goma xantana em solução aquosa apresenta uma temperatura de transição conformacional (“melting point temperature”-  $T_m$ ), onde as cadeias laterais dobram-se e associam-se à cadeia principal por meio de ligações não-covalentes, em baixas temperaturas, para uma estrutura desordenada, onde as cadeias laterais projetam-se para fora da cadeia principal. Esta transição é dependente da força iônica da solução, da natureza do eletrólito (MORRIS, 1977; NORTON *et al.*, 1984), do pH (MILAS; RINAUDO, 1981) e da massa molecular.

Hidrogel de xantana-galactomanana (X:G) de bracinga foi investigada pelo grupo de Química de Carboidratos Vegetais da UFPR (BRESOLIN *et al.*, 1997). A mistura aquosa X:G 3:1, 2 g/L apresentou um acréscimo de 32% na viscosidade quando comparado ao valor teórico considerando ausência de interação, apesar do elevado conteúdo de galactose da galactomanana. Os resultados mostraram também a formação de uma estrutura na forma de gel com a presença de histerese durante a variação da velocidade de cisalhamento sendo que a interação mais forte foi obtida em sistemas de menor força iônica.

FIGURA 7 – ESTRUTURA GENÉRICA DA XANTANA



Unidades de: glucose não-substituída (a), glucose substituída (b), manose interna com substituinte acetato (c), ácido glucurônico (d) e manose externa com substituição por grupo piruvato (e).

FONTE: ROSALAM, S.; ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006.

Estes hidrogéis também foram utilizados como matriz na liberação controlada de fármacos. A cinética de liberação do diclofenaco de sódio e teofilina em sistemas X:G na forma de comprimidos e cápsulas foram avaliados (UGHINI *et al.*, 2004; VENDRUSCOLLO *et al.*, 2005). Os resultados demonstraram que o mecanismo de liberação é na forma de difusão e relaxamento e que estes processos variam de acordo com a composição da matriz X:G.

Estudos utilizando fibras de ácido-L-poli-lactico (PLLA) (EBERHART *et al.* 2003; SU; EBERHART, 2003; NGUYEN *et al.* 2004) incorporadas com hidrogel X:G de bracinga, foram utilizados com a finalidade de avaliar a melhora da cinética de liberação de adenovirus recombinante, biologicamente ativo em adenocarcinoma pancreático, *in vitro* e *in vivo* (BECK *et al.*, 2004). A utilização de matriz xantana-

galactomanana permitiu uma maior eficiência na transfecção pelo aumento do tempo de exposição no tecido, bem como levando a um decréscimo na concentração viral local.

## 1.5. REOLOGIA

As propriedades geleificantes e viscosantes dos polissacarídeos solúveis em água são largamente aplicadas na indústria. Porém, para a otimização do seu emprego industrial tornou-se necessário desenvolver métodos que permitissem prever a relação entre a estrutura e a função destes polímeros através do conhecimento da conformação adotada pelos mesmos. Entre os métodos físico-químicos mais utilizados nesta avaliação estão as técnicas reológicas (KRUMEL; SARKAR, 1975).

Neste trabalho a reologia do sistema xantana-galactomanana foi analisado a fim de avaliar as possíveis interações entre os polissacarídeos e o ácido ascórbico.

Reologia é a ciência da deformação e comportamento de fluxo da matéria, e está relacionada com a tensão que age sobre um corpo e a resultante deformação causada.

Hoje se entende que tal resistência, chamada de fricção interna ou viscosidade é uma medida de resistência de um fluído ao fluxo. Dessa forma, o líquido seria a substância que muda continuamente de forma (flui), independente da magnitude da tensão aplicada (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989).

O postulado de Newton introduziu o conceito de viscosidade em que a tensão de cisalhamento ( $\sigma$ ) foi relacionada a taxa de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ), através da equação:

$$\sigma = \eta \cdot \dot{\gamma},$$

Então, a viscosidade ( $\eta$ ) é dada por:

$$\eta = \sigma / \dot{\gamma},$$

onde:

$\sigma$  = força aplicada sobre uma área =  $N/m^2$  ou Pa

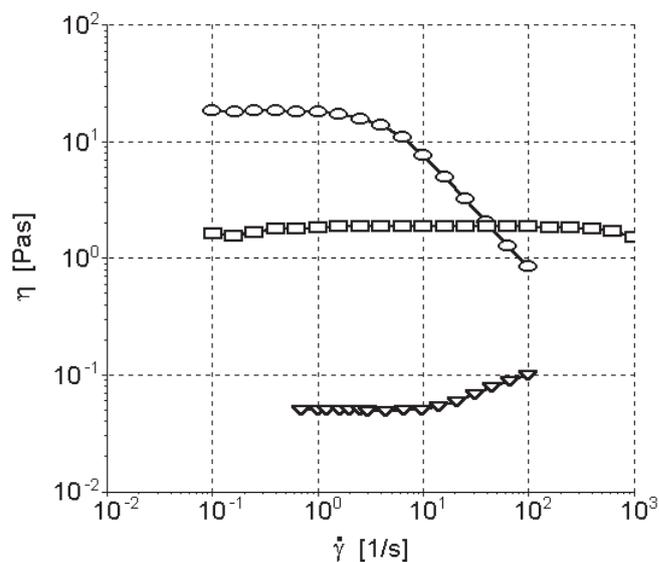
$\dot{\gamma}$  = velocidade relativa das camadas líquidas dividida pela distância entre elas =  $s^{-1}$

No sistema corrente (SI) a unidade utilizada de viscosidade é pascal.segundo, cujo símbolo é Pa.s, sendo anteriormente utilizado no sistema CGS o poise (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989).

O conceito de líquido ideal ou Newtoniano é relativamente pouco aplicado, uma vez que a vasta maioria das soluções apresenta comportamento não Newtoniano, onde a viscosidade não é apenas uma constante da relação tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento, mas é uma função das mesmas (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989).

Dentre os comportamentos líquidos não Newtonianos, podemos citar a pseudoplasticidade, a dilatância e o caráter plástico (Figura 8).

FIGURA 8 – PERFIL DE VISCOSIDADE DE FLUÍDOS



Perfil de viscosidade de fluídos com comportamento newtoniano (quadrados), pseudoplástico (círculos) e dilatante (triângulo).

FONTE: SCHRAMM, G. Medidas do comportamento elástico de fluidos viscoelásticos. In: Schramm, G. **Reologia e reometria - Fundamentos teóricos e práticos**, São Paulo. Artliber Ed. Artliber, p.115, 2006.

Pseudoplasticidade é o comportamento no qual, a partir de determinada taxa de

cisalhamento, ocorre uma diminuição abrupta da viscosidade, devido ao início da orientação molecular ao fluxo até que as moléculas apresentem um deslizamento entre si, gerando uma região de viscosidade constante. A região em que se tem diminuição da viscosidade com a tensão de cisalhamento aplicada é denominada de “lei de potências” e é definida pela equação:

$$\sigma = \eta \dot{\gamma}^n$$

Dilatância é o caráter em que pode ser observado, nos perfis de viscosidade, um aumento da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, sendo neste caso caracterizado como o inverso da pseudoplasticidade.

A determinação das propriedades elásticas de um fluido, sem negligenciar as propriedades viscosas, permite a diferenciação das interações moleculares deste fluido e direciona estudos para a modificação da estrutura adequando-as às exigências de uso. Para a maioria dos polímeros termoplásticos os átomos de carbono formam a cadeia principal com ligações que conferem à cadeia uma forma de ziguezague. Estas moléculas apresentam-se num estado de energia (entropia) mínima. Uma deformação alonga a molécula, ou pelo menos segmentos desta, na direção da força aplicada. O estiramento aumenta os ângulos de ligação e a energia de estado das moléculas. Quando a força de deformação é removida, essas tentam relaxar, isto é, retornar à conformação inicial e ao estado de menor energia (SCHRAMM, 2006).

Estas moléculas de cadeia longa não atuam sozinhas em um espaço vazio: o que ocorre na realidade é que milhões de moléculas similares se entrelaçam, produzindo uma ação intermolecular. Algumas junções não permanentes são formadas nos pontos de entrelaçamento, formando uma rede extensa de cadeias que possuem segmentos moleculares como conectores. Se o fluido for repentinamente submetido a altas forças de cisalhamento, demonstra inicialmente uma resistência, como a de um sólido, contrário à deformação. Na segunda fase, os segmentos conectores irão deformar-se elasticamente e finalmente as moléculas começarão a desembaraçar e a fluir de forma irreversível uma sobre as outras na direção da força cisalhante (SCHRAMM, 2006).

Este modelo de polímero líquido torna compreensível a sua resposta viscosa e elástica e também introduz o fator tempo, na qual inicialmente a resposta é mais dependente da elasticidade e posteriormente mais dependente da viscosidade. Um outro fenômeno também merece ser mencionado: se pequenas forças são aplicadas, as moléculas têm bastante tempo para se arrastar para fora do seu entrelaçamento e fluir lentamente. As moléculas e seus segmentos podem manter seus estados de energia mínima porque qualquer deformação de segmentos “mola” pode ser relaxada simultaneamente com o fluxo geral de massa. Em taxas de deformação lentas, os polímeros líquidos mostram um fluxo com comportamento predominantemente viscoso e, por isso, a elasticidade normalmente não se torna aparente. Em altas taxas de deformação, uma grande parte de energia de deformação é absorvida por uma deformação elástica intramolecular e intermolecular, enquanto que a massa não tem tempo suficiente para fluir como fluido viscoso. Juntamente com a deformação elástica, parte da energia de deformação é armazenada e, durante a fase de relaxação, ela é recuperada. Isso retrai parcialmente as moléculas e conduz à ocorrência de um microfluxo na direção oposta ao fluxo original (SCHRAMM, 2006).

Dentro dos marcos históricos dos compostos sólidos, tem-se que em 1678, Robert Hooke desenvolveu a “Verdadeira Teoria da Elasticidade”, onde propôs que para um sólido perfeitamente elástico, a tensão e deformação são diretamente proporcionais, ou seja, se aplicarmos uma tensão em uma mola, ela será estendida em um determinado valor  $x$ . Se aplicarmos o dobro da tensão a sua extensão será  $2x$ , sendo essa a premissa básica da teoria da elasticidade clássica (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989).

Sabe-se que a vasta maioria das substâncias apresenta um comportamento intermediário entre as respostas de um sólido Hookeano e o comportamento de um líquido Newtoniano. Para um sólido Hookeano a tensão aplicada a uma superfície resulta em uma deformação instantânea. Não há movimento durante a deformação, mas a deformação persiste enquanto lhe for aplicada a tensão e, por definição, um sólido não sofre modificações contínuas na sua forma para uma mesma tensão aplicada (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989; LAPASIN; PRICL, 1995). Estes

sólidos apresentam uma deformação máxima, quando a tensão for máxima, ou seja, tensão e deformação estão em fase (diferença de ângulo entre tensão e deformação de  $0^\circ$ ) (REES, 1969).

Para um líquido Newtoniano a tensão não é proporcional a deformação (fora de fase  $90^\circ$ ), e sim proporcional à velocidade de cisalhamento. Desta forma, tensão e deformação estão fora de fase para um líquido perfeito, mas a tensão está em fase com a velocidade de cisalhamento (REES, 1969).

Para sistemas que apresentam um comportamento intermediário entre sólido e líquido, a medida do ângulo de fase entre tensão e deformação fornecem uma estimativa do grau do comportamento sólido e líquido, quantificados através do módulo de cisalhamento dinâmico elástico ou de armazenamento  $G'$  e módulo de perda ou de viscosidade  $G''$  (REES, 1969; RAO, 1992).

#### 1.5.1. Medição da Viscoelasticidade

Considerando as técnicas reológicas pode ser realizado o teste de Fluência (creep) e Recuperação (recovery) e a análise em sistemas viscoelásticos lineares, em que uma tensão oscilatória é aplicada à amostra e a resistência à deformação é medida, e mostra-se independente da mesma.

O teste de Fluência (creep) e Recuperação (recovery) é um teste de viscoelasticidade que permite diferenciar, de forma bastante satisfatória, as respostas elásticas das respostas viscosas. De forma diferente das medições de força normal, que mostram a dependência entre a taxa de cisalhamento e a viscosidade ou a elasticidade, o ensaio de fluência e recuperação introduz um parâmetro adicional de tempo de resposta (dependente da tensão) para o comportamento elástico e viscoso de sólidos e de fluidos (SCHRAMM, 2006).

Em sistemas de tensão oscilatória pode-se observar uma independência do módulo de cisalhamento complexo ( $G^*$ ), que representa a resistência total à deformação do sistema em análise, da tensão aplicada ou da deformação. Geralmente assumem-se como ideais deformações abaixo de 10% (NAÉ, 1993).

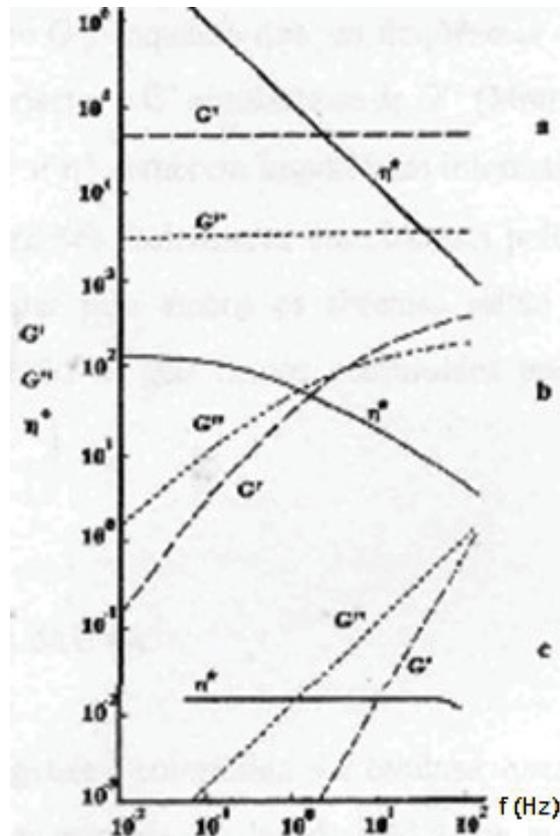
Na Varredura de Freqüência o estudo mais apurado dos diferentes sistemas é

baseado na dependência do  $G'$  e  $G''$  em função da frequência. Para géis verdadeiros o  $G'$  é muito maior que o  $G''$  e ambos mostram pequena dependência da frequência (REES, 1969; KAVANAGH; ROSS-MURPHY, 1998).

Em altas frequências de oscilação, soluções concentradas de polímeros desordenados apresentam comportamento semelhante ao de géis, entretanto, em baixas frequências o  $G''$  torna-se predominante, isso ocorre devido ao emaranhamento das cadeias gerando uma rede estrutural transiente. A principal resposta quando deformações são lentamente aplicadas, é uma reorganização da rede. Quando a escala de deformação é relativamente alta (altas frequências) em relação a reorganização molecular, o efeito predominante é a distorção da rede, com recuperação substancial da estrutura original perdida. Assim, em altas frequências, o principal efeito é a distorção de cadeias individuais, e o  $G'$  e  $G''$  tornam-se praticamente iguais, conforme pode ser observado na Figura 8 (LAPASIN; PRICL, 1995, KAVANAGH; ROSS-MURPHY, 1998).

Para soluções poliméricas o  $G'$  e  $G''$  tendem a zero quando a velocidade angular ( $\omega$ ) ou a frequência ( $f$ ) tendem a zero. Por outro lado, sistemas estruturais fracos apresentam dependência da velocidade angular ou frequência, com tendência à formação de um platô em baixas frequências e apresentam grande dependência da frequência. Já em géis fortes o  $G'$  e  $G''$  são independentes da frequência, ou seja, consistem de duas linhas horizontais, onde o  $G'$  é tipicamente de 1 a 2 vezes maior que o  $G''$ , e com discreto aumento em altas frequências, entretanto o coeficiente angular para o  $G'$  é igual a zero (perfis estão demonstrados na figura 9) (LAPASIN; PRICL, 1995)

FIGURA 9 – FREQUÊNCIA DE OSCILAÇÃO EM FUNÇÃO DE MÓDULO ELÁSTICO ( $G'$ ) E MÓDULO VISCOZO ( $G''$ )



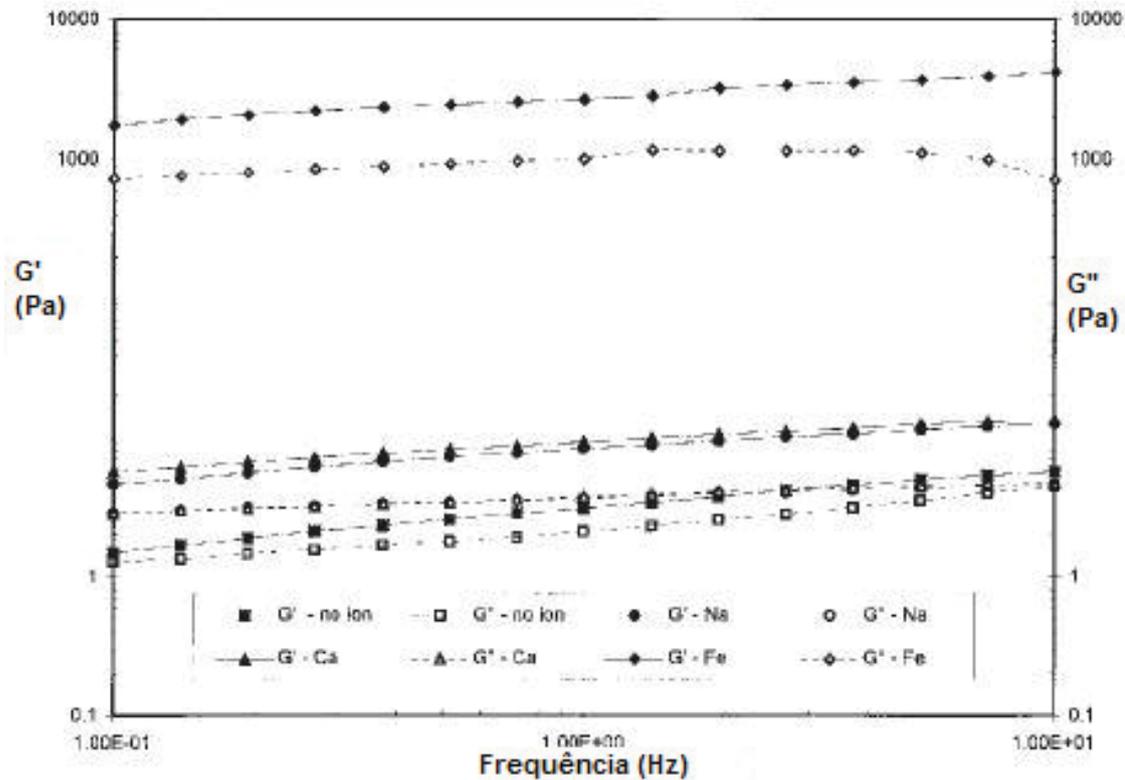
Frequência de oscilação em função de  $G'$  (traçado largo),  $G''$  (pontilhado) e  $\eta^*$  (traço) para: (a) gel forte; (b) gel fraco; (c) solução viscosa.

FONTE: MORRIS, E.R. Rheology of hydrocolloids. In: G. O. PHILLIPS; D.J. WEDLOCK; P.A.WILLIAMS. **Gums and Stabilizers for the Food Industry**, v.2, Oxford: Pergamon Press, p.57, 1984.

Na figura 10 está demonstrada uma varredura de frequência de géis de xantana 0,5% que revelam diferenças viscoelásticas com adição de diferentes cátions. Ao analisar as propriedades físicas das soluções de xantana em baixas amplitudes oscilatórias, o módulo elástico ( $G'$ ) é predominante em relação ao módulo viscoso ( $G''$ ) e ambos apresentam pequena dependência da frequência, sendo este comportamento característico de gel. Portanto as soluções de xantana possuem uma estrutura semelhante a gel e com adição de íons sódio, cálcio e férricos a força do gel e a rigidez são aumentados conforme demonstrado pelos módulos elásticos (MA;

BARBOSA-CÁNOVAS, 1997).

FIGURA 10 – VARREDURA DE FREQUÊNCIA DE GÉIS DE XANTANA COM ADIÇÃO DE CÁTIONS



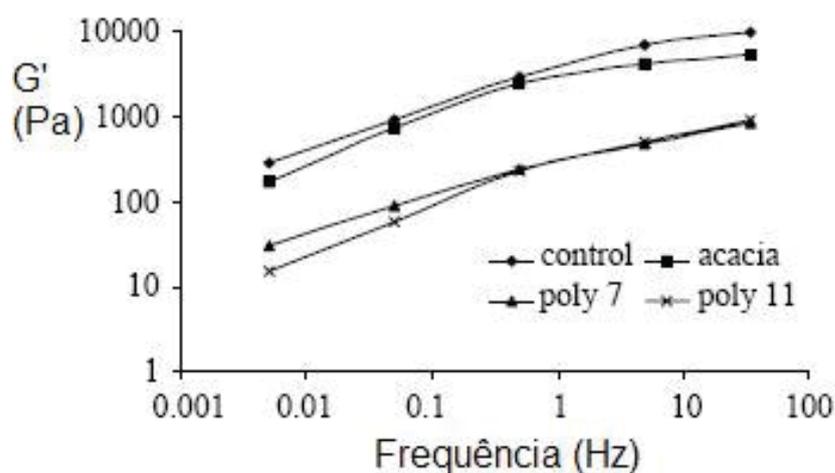
Efeitos da adição de cátions nas varreduras de frequência de goma xantana 0,5%.  $\blacklozenge$  =  $G'$  - Fe: módulo elástico de gel de xantana na presença de íons férricos.  $\blacktriangle$  =  $G'$  - Ca: módulo elástico de gel de xantana na presença de íons cálcio.  $\bullet$  =  $G'$  - Na: módulo elástico de gel de xantana na presença de íons sódio.  $\blacksquare$  =  $G'$  - sem íons: módulo elástico de gel de xantana sem adição de íons. Figuras abertas representam o módulo viscoso dos respectivos géis.

FONTE: MA, L.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Viscoelastic properties of xanthan gels interacting with cations. **Journal of Food Science**, v.62, p. 1124, 1997.

Foi investigada a influência de três diferentes géis poliméricos, poli quaternário-7, poli quaternário-11 e goma acacia, na microestrutura de emulsões preparadas com surfactante não-iônico, álcool ceto-estearílico com 12 moles de etoxilação juntamente com álcool cetílico, usando técnicas reológicas oscilatórias. Estas análises demonstraram que as emulsões contendo polímeros catiônicos quaternários apresentam uma estrutura mais frágil que a emulsão controle (figura 11), em contraste, a emulsão contendo goma acacia permaneceu semi-sólida apresentando

propriedades elásticas similares à emulsão controle, contudo em espectros calorimétricos foi observado que há interações com excipientes da emulsão e em análises reológicas de rampa de tensão a estrutura desta emulsão demonstrou maior força e ruptura da emulsão em valores de tensão mais altos, comparando com a emulsão controle e as emulsões obtidas com a adição de poli quaternários (RIBEIRO, H.M.; MORAIS, J.A.; ECCLESTON, G.M.; 2004).

FIGURA 11 – VARREDURA DE FREQUÊNCIA DE EMULSÕES POLIMÉRICAS CONTENDO GOMA ACÁCIA E POLIQUATERNÁRIOS



Varredura de frequência de emulsões contendo gel de polímeros (10%). ■ = G' – emulsão contendo gel de goma acácia. ▲ = G' – emulsão contendo gel de poli quaternário 7. x = G' – emulsão contendo gel de poli quaternário 11. ◆ = G' – emulsão controle onde o gel de polímeros foi substituído por água deionizada.

FONTE: RIBEIRO, H.M.; MORAIS, J.A.; ECCLESTON, G.M. Structure and rheology of semisolid o/w creams containing cetyl alcohol/non-ionic surfactant mixed emulsifier and different polymers. *International Journal of Cosmetic Science*, v.26, p.47, 2004.

## **2. OBJETIVOS**

## **2.1. OBJETIVO GERAL**

Investigar o comportamento de géis constituídos por misturas binárias de polissacarídeos visando a estabilização da vitamina C.

## **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

2.2.1 - Obter e purificar galactomananas.

2.2.2 - Desenvolver método analítico de quantificação do ácido ascórbico nas formulações.

2.2.3 - Desenvolver géis binários (galactomananas: xantana) contendo ascorbil fosfato de sódio e ácido ascórbico.

2.2.4 – Analisar propriedades reológicas dos géis binários sem e com adição de ácido ascórbico ou seu derivado.

2.2.5 - Avaliar a estabilidade do ácido ascórbico nos hidrogéis.

2.2.6 - Analisar a permeação do ácido ascórbico a partir dos hidrogéis binários *in vitro*.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1. MATERIAL

As sementes de *Mimosa scabrella* (Bracatinga) foram fornecidas pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP), provenientes de povoamentos naturais da região de Bocaiúva do Sul, tendo sido colhidas em dezembro de 1997.

A amostra de galactomanana guar G4129 foi obtida comercialmente da Sigma-Aldrich. As amostras de goma xantana FFA - Merck , ácido ascórbico - Sigma-Aldrich, ascorbil fosfato de sódio - Sigma-Aldrich, Sensiva, álcool benzílico e propilenoglicol foram adquiridas através do convênio: FUNPAR-UFPR/O Boticário Franchising S.A. 255-06.

### 3.2. OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *Mimosa scabrella*

As sementes de *Mimosa scabrella* foram moídas em moinho Wiley utilizando-se peneiras de 2 e 1mm sucessivamente. Ao material moído (70g) foi adicionado 400mL de água destilada fervente para inativação enzimática do material e mantido por 10min sob agitação exaustiva. A dispersão foi resfriada a 25°C com adição de 600mL água destilada gelada. A extração aquosa da galactomanana foi misturada por 1h sob agitação mecânica constante, em seguida o material foi centrifugado a 12.000rpm por 30 min, o processo foi repetido mais duas vezes a 10.000rpm, para a retirada dos resíduos da semente. O sobrenadante foi filtrado sob pressão (2kgf/cm<sup>2</sup>) por membranas de nitrato de celulose de porosidade de 8 e 3µm. O filtrado foi submetido à precipitação com um volume de etanol 96% sob agitação constante e o precipitado resultante foi separado da mistura etanólica por centrifugação e lavado com concentrações crescentes de etanol (70-98% v/v) sob agitação constante por 10min, centrifugado a 10.000rpm por 30 min em seguida o polissacarídeo foi seco em estufa a vácuo, a 25°C por 24h.

### 3.3. ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS

#### 3.3.1. Determinação de Açúcar Total

O conteúdo de carboidrato das amostras de galactomananas (nativas e comerciais) foi determinado pelo método de DUBOIS *et al.*(1956), utilizando-se uma mistura de padrões de D-manose e D-galactose(Sigma) na mesma proporção da relação Man:Gal da galactomanana em estudo. A curva-padrão foi construída com cinco concentrações (20-100µg/mL) e os valores de absorbância foram lidos em espectrofotômetro Spectronic 20 Genesys, no comprimento de onda de 490nm.

#### 3.3.2. Determinação de Proteínas

A quantificação de proteínas presente nas amostras de polissacarídeos foi determinada através do método de Bradford modificado (KRESZE, 1983), usando soro albumina bovina (Sigma) como padrão de referência e sensibilidade do método (10-100µg/mL). A leitura foi realizada a 650nm em espectrofotômetro Spectronic 20 Genesys. As amostras e a curva-padrão foram medidas em triplicata.

#### 3.3.3. Determinação da Composição Monossacarídica

As galactomananas foram hidrolisadas com ácido trifluoracético 1M por 4h, em estufa, em tubos hermeticamente fechados (ADAMS, 1965; BIERMAN, 1989). O hidrolisado foi evaporado em vidro de relógio, na capela. Os produtos resultantes foram ressuspensos em água e reduzidos com boroidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) (WOLFROM; THOMPSON, 1963), em temperatura ambiente, por 6h. O excesso do agente redutor foi decomposto e os cátions Na<sup>+</sup> foram removidos pela adição de resina catiônica Lewatit S-100 (resina trocadora de cátions na forma ácida que forma H<sup>+</sup>) seguida por filtração e secagem em evaporador rotatório. Em seguida, o ácido bórico formado foi removido pela adição de metanol formando borato de tetrametila, que é destilado com o excesso de metanol. Os alditóis resultantes foram acetilados (WOLFROM; THOMPSON, 1963) pela adição de uma mistura de piridina:anidrido acético (1:1 v/v), por 16h. O processo de esterificação foi interrompido pela adição de

gelo moído e a piridina residual retirada pela adição de sulfato de cobre e os acetatos de alditóis extraídos com clorofórmio.

Os produtos foram analisados por cromatografia líquida-gasosa (GLC), num cromatógrafo Hewlett Packard 5890 Series II, com detector de ionização de chama (FID), utilizando-se nitrogênio como gás de arraste, com fluxo de 2,0mL/min, coluna capilar (0,25mm x 30m), modelo DB-225, com espessura de filme de 0,25 $\mu$ m a 220°C, com detector e injetor a 250°C.

#### 3.3.4. Determinação da Homogeneidade por Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Performance (HPSEC)

As amostras foram solubilizadas numa concentração de 1mg/mL em solução de NaNO<sub>2</sub> 0,1M contendo 0,02% NaN<sub>3</sub> e filtradas através de membranas de acetato de celulose de 0,2 $\mu$ m. As análises foram efetuadas em um cromatógrafo de exclusão estérica de alta performance (HPSEC), contendo quatro colunas Ultrahydrogel em série, com limites de exclusão de 7.10<sup>6</sup>, 4.10<sup>5</sup>, 8.10<sup>4</sup> e 5.10<sup>3</sup>, equipado com detector de índice de refração diferencial WATERS modelo 2410 e detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) modelo DAWN DSP-WYATT TECHNOLOGY com 18 canais. O eluente utilizado foi uma solução de NaNO<sub>2</sub> 0,1M contendo 0,02% NaN<sub>3</sub>, com fluxo de 0,6mL/min, a 25°C, monitorado através de bomba peristáltica WATERS 515.

### **3.4. PREPARO DOS HIDROGÉIS BINÁRIOS GALACTOMANANAS : XANTANA**

Foram preparados sistemas de goma xantana e galactomanana dispersos em água destilada. As soluções de polissacarídeos foram preparadas na concentração de 12g/L, na proporção de 1:1. A solubilização foi feita por 14 horas à temperatura ambiente sob agitação magnética, estas soluções foram misturadas entre si à temperatura ambiente, de forma que a dispersão resultante permaneceu com 12g/L de polissacarídeo, sendo 6g/L de xantana e 6g/L de galactomanana.

A inclusão de 10% do ascorbil fosfato de sódio (AF) (m/m) foi feita manualmente seguida de homogeneização por agitação magnética por 15 min, de forma que a concentração final de polissacarídeos foi de 11g/L em 100g de gel. Os géis obtidos foram:

- Xantana:Galactomanana de guar (X:GG/H<sub>2</sub>O) e com adição de AF (X:GG/ H<sub>2</sub>O+AF).

Os hidrogéis binários dos polissacarídeos de goma xantana e galactomanana de bracinga foram preparados conforme o protocolo descrito para os hidrogéis comerciais:

- Xantana:Galactomanana de bracinga (X:GB/H<sub>2</sub>O) e com adição de AF (X:GB/H<sub>2</sub>O +AF).

Para evitar que a inclusão de ácido ascórbico (AA) nos hidrogéis resulta-se em queda de pH, foram investigados tampões com uma ampla faixa de tamponamento, tal como o tampão citrato-fosfato e tampão Soerensen.

Os hidrogéis foram obtidos usando tampão Soerensen de potássio (KP) 0,3M pH 8,0 onde os polissacarídeos foram dissolvidos numa concentração 16,6g/L, na proporção de 1:1. O preparo destes hidrogéis seguiu o mesmo protocolo adotado no preparo do sistema em água acrescido de 25% de propilenoglicol (v/v), 0,5% de álcool benzílico e 0,6% de sensiva (etilhexil-glicerina) (m/m), de forma que a concentração final de polissacarídeos foi de 11,5g/L em 100g de gel.

- Xantana:Galactomanana de guar (X:GG);
- Xantana:Galactomanana de bracinga (X:GB).

A inclusão de 5% do ácido ascórbico (m/m) foi feita manualmente seguida de homogeneização por agitação magnética por 15min. Os hidrogéis obtidos foram:

- Xantana:Galactomanana de guar com adição de ácido ascórbico (X:GG+AA);
- Xantana:Galactomanana de bracinga com adição de ácido ascórbico (X:GB+AA).

A composição destes géis está resumida na tabela 1:

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DOS HIDROGÉIS BINÁRIOS DESENVOLVIDOS USANDO GALACTOMANANAS COMERCIAL E NATIVA

	H <sub>2</sub> O <sup>a</sup> (g polissacarídeos)	AF (g)	KP 0,3M pH8 <sup>b</sup> (g polissacarídeos)	Propilenoglicol (mL)	Conservantes (g)	AA (g)
X:GG <sub>H2O</sub>	0,6 xantana 0,6 guar	-	-	-	-	-
X:GG <sub>H2O</sub> +AF	0,6 xantana 0,6 guar	10,0	-	-	-	-
X:GB <sub>H2O</sub>	0,6 xantana 0,6 bracinga	-	-	-	-	-
X:GB <sub>H2O</sub> +AF	0,6 xantana 0,6 bracinga	10,0	-	-	-	-
X:GG	-	-	0,6 xantana 0,6 guar	25,0	1,1	-
X:GG+AA	-	-	0,6 xantana 0,6 guar	25,0	1,1	5,0
X:GB	-	-	0,6 xantana 0,6 bracinga	25,0	1,1	-
X:GB+AA	-	-	0,6 xantana 0,6 bracinga	25,0	1,1	5,0

<sup>a</sup> os polissacarídeos são dissolvidos em 90mL de H<sub>2</sub>O deionizada;

<sup>b</sup> os polissacarídeos são dissolvidos em q.s.p. 75mL de Tampão fosfato de potássio 0,3M pH 8 .

### 3.5. MÉTODOS REOLÓGICOS

As análises reológicas foram realizadas em reômetro oscilatório HAAKE RS75 Rheostress acoplado a um banho termostatizado HAAKE K15 e termocirculador de água DC5B3, utilizando sistema Peltier como controle de temperatura a 20°C, o sensor utilizado foi cone-placa (C60/2° Ti). Antecedendo as análises reológicas foi efetuada uma determinação da inércia do aparelho com o sensor a ser utilizado em posição, a fim de descontar os valores das forças centrífuga e centrípeta geradas durante os experimentos. A tensão utilizada nas varreduras de frequência (0,01 – 10Hz) é referente à região viscoelástica linear, sendo a deformação medida de 1 a 2%. As análises foram realizadas em triplicata.

### 3.6. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO NOS GÉIS

As condições de estabilidade química e de análise do AA foram realizadas através de varredura de absorção numa faixa de  $\lambda$  190 a 390nm em espectrofotômetro de UV. Foram preparadas soluções de: 30 $\mu$ g/mL AA, solubilizada em tampão KP 2mM pH 3,5; 30 $\mu$ g/mL AA solubilizada em meio não tamponado e adição de 200 $\mu$ L de solução 500ppm Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e solução de ácido oxálico solubilizada em água.

As soluções dos hidrogéis binários X:GG e X:GB, de propilenoglicol, de álcool benzílico e etilhexil-glicerina em tampão KP 2mM pH 3,5, na concentração em que se encontram no produto final, também foram submetidas a uma varredura de absorção em UV.

Os experimentos de quantificação do AA foram realizados em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) SHIMADZU, sendo utilizada coluna analítica de fase reversa Supelcosil TM LC-18 5-8298 25cm x 4,6mm, 5 $\mu$ m, o fluxo de 1,0mL/min foi controlado por bomba peristáltica LC-10AD e a eluição foi monitorada por detector de UV SPD-10A a 220 e 255nm, numa temperatura de 20°C (CHANG; CHANG, 2003). Também foram realizadas eluições monitoradas por um detector eletroquímico coulochem III-ESA, equipado por uma célula guarda 5020 e uma célula analítica, modelo 5011-A, operando em -200mV e 300mV, numa temperatura de 30°C (LYKKESFELDT; LOFT; POULSEN, 1995).

A solução de AA foi avaliada quantitativamente, solubilizando em tampão KP 2mM pH 3,5 e a solução submetida a borbulhamento de N<sub>2</sub> por 3 min. A quantificação do AA foi efetuada após a obtenção de gráficos de calibração, com R<sup>2</sup> = 0,9999 numa faixa de sensibilidade de 1– 50 $\mu$ g/mL e a equação da reta  $y = 133316.x$ .

Para a análise do AA presente no hidrogel binário foi extraído por meio de diluições de 0,5g hidrogel contendo AA em 100mL tampão KP 2mM pH 3,5, após homogeneização nova diluição na proporção de 0,2mL solução em 1,0mL tampão KP 2mM pH 3,5 e filtrado por membrana de nitrato de celulose de 0,22 $\mu$ m. As soluções foram injetadas diretamente no sistema cromatográfico usando como eluente

metanol:tampão KP 2mM pH 3,5 (70:30) v/v (AUSTRIA; SEMENZATO; BETTERO, 1997). As diluições de cada hidrogel foram realizadas em triplicata.

### 3.7. TESTE DE ESTABILIDADE

Os hidrogéis binários de xantana:galactomanana de guar e bracinga, acrescidos de 25% de propilenoglicol, 0,5% álcool benzílico e 0,6% etilhexil-glicerina, foram submetidos a avaliação da estabilidade do AA e do comportamento reológico do gel. Foram acondicionados em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca bem vedada durante 12 semanas, mantidas a temperatura ambiente e a 45°C.

Os frascos foram dispostos em estufa bacteriológica com temperatura regulada em 45°C e sobre prateleiras no laboratório à luz ambiente e temperatura ambiente, sendo as temperaturas máximas e mínimas registradas no período. A cada semana foi analisado o pH e avaliada a estabilidade do AA pela sua quantificação por HPLC.

O pH dos géis binários foi monitorado em pHmetro Quimis Q-400A e suas características organolépticas foram observadas.

O comportamento reológico foi avaliado quinzenalmente. Este protocolo foi realizado para o gel de X:GB sem e com adição de 5% AA e X:GG sem e com adição de 5% AA.

No tempo zero a estabilidade do AA foi analisada por HPLC extraindo o AA do hidrogel binário por meio de diluições de 0,5g hidrogel contendo AA em 100mL tampão KP 2mM pH 3,5 com 10% de Tetrahidrofurano (THF), após homogeneização nova diluição na proporção de 0,2mL solução em 1,0mL tampão KP 2mM pH 3,5 e filtrado por membrana de nitrato de celulose de 0,22µm. As soluções foram injetadas diretamente no sistema cromatográfico usando como fase móvel metanol:tampão KP 2mM pH 3,5 (70:30) v/v. As diluições de cada hidrogel foram realizadas em triplicata.

### 3.8. ANÁLISE DE PERMEACÃO IN VITRO

Os testes de liberação *in vitro* de AA foram realizados utilizando células de difusão de Franz disponibilizado pela empresa 'O Boticário'. O equipamento possui seis células que consistem de dois compartimentos, um doador e outro receptor (volume de 6,5mL), os quais foram separados por uma membrana sendo que foi usada uma membrana de poli L-ácido láctico (PLLA). O experimento foi realizado com oclusão do sistema por meio de um disco de vidro colocado sobre o hidrogel.

O compartimento doador contém o hidrogel X:G e o compartimento receptor foi preenchido pela solução tampão fosfato de potássio 2mM com ajuste do pH de acordo com o objetivo do experimento, pH 3,5 (objetivando a estabilidade do AA) ou pH 7,4 (mimetizando condições fisiológicas da pele). A solução do meio receptor foi homogeneizada para assegurar a uniformidade de difusão e a concentração por meio de agitação magnética, a temperatura foi controlada durante o experimento por um banho termostatizado a 20 ou 32°C de acordo com o objetivo do experimento.

As amostragens foram feitas em tempos pré-determinados: 0, 1, 2, 3, 4, 7 e 24 horas, onde uma alíquota de 1,5mL foi coletada em vials recobertos por papel alumínio e logo após a amostragem foram gaseificadas com N<sub>2</sub>. Estas alíquotas foram analisadas por HPLC nas mesmas condições de fluxo e fase móvel citados no tópico 3.6. As alíquotas retiradas pelo sistema são automaticamente repostas no compartimento receptor.

#### 3.8.1. Membranas de Poli L-Ácido Láctico

Uma solução a 1% de Poli L-ácido láctico (PLLA) foi preparada dissolvendo resina de PLLA em clorofórmio em frasco bem vedado sob agitação. Esta solução foi usada para obterem-se membranas de PLLA em placas de Petri, após a evaporação do solvente foram obtidos filmes de PLLA de espessura de no máximo 0,01mm (NGUYEN *et al.*, 2004).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O estudo da composição e estrutura química de carboidratos de espécies vegetais nativas vem sendo desenvolvido no Laboratório de Química de Carboidratos Vegetais da Universidade Federal do Paraná há mais de trinta anos. Dentre os polissacarídeos estudados destacam-se as galactomananas, que estão presentes no endosperma das sementes com função estrutural e de reserva.

As galactomananas obtidas através de sementes de *Mimosa scabrella* (bracatinga) já foram estudadas previamente quanto a sua estrutura química, aplicação e propriedades reológicas (GANTER, 1988; GANTER, 1991, GANTER *et al.*, 1992, 1993, 1995, 1997; GANTER; REICHER, 1999; LUCYSZYN, 1994; SUGUI, 1994; CARDOSO, 1995; BRESOLIN *et al.*, 1996, 1997 e 1998).

Estes polissacarídeos apresentam rendimentos de aproximadamente 30% (p/p), comparáveis aos das galactomananas produzidas comercialmente, e podem servir como fontes alternativas para a substituição de galactomananas comerciais, que são importadas. O sistema galactomanana-xantana é um dos mais interessantes, uma vez que nenhum dos componentes isolados é capaz de formar gel. A importância industrial destas interações leva ao fato que galactomananas apresentam menor custo comparado a outros polissacarídeos tais como carragenana, ágar, xantana, etc, resultam géis com propriedades específicas e podem ser preparados com uma mistura de galactomanana e menor quantidade de outros polissacarídeos com vantagens para aplicações específicas (DEA; MORRISON, 1975).

Pelo fato do ácido ascórbico ser um componente importante para muitas funções fisiológicas também na pele, como na promoção da biossíntese do colágeno (LUPO, 2001), sistema de géis binários compostos pela galactomanana de bracatinga e a xantana foram utilizados como matriz, com a finalidade de analisar a estabilidade do ácido ascórbico.

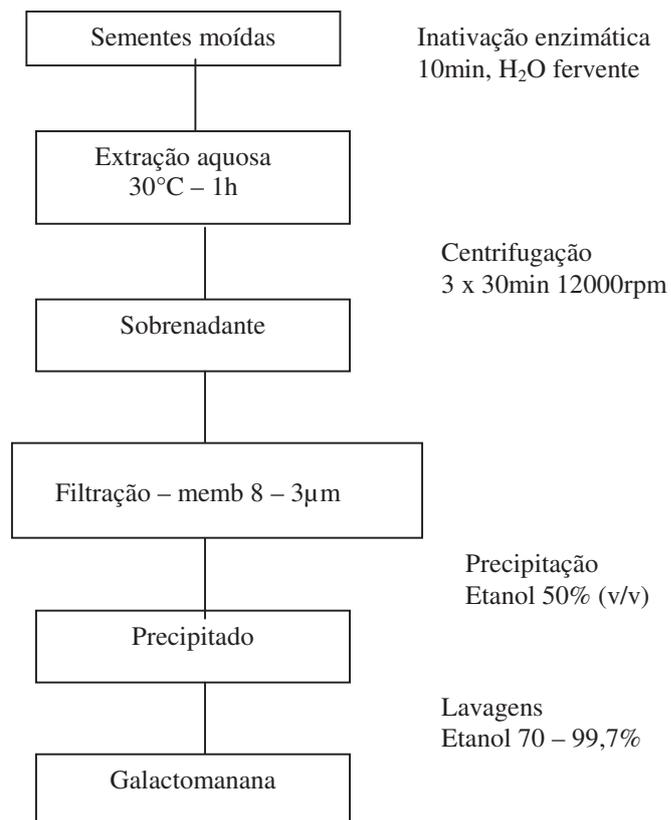
## **4.1.OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS**

### **4.1.1. Obtenção e purificação da galactomanana de bracatinga**

A galactomanana de bracatinga foi extraída, separada e purificada conforme o

fluxograma abaixo (Figura 12):

FIGURA 12 – FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DE GALACTOMANANA DE BRACATINGA



Na obtenção de polissacarídeos a partir de fontes vegetais é necessária a adoção de certas precauções no sentido de preservar sua estrutura primária e secundária. A detecção de agregados (segmentos emaranhados) em biopolímeros tem sido publicada (LIN; LEE; SCHURR, 1978; NISHINARI; TAKAHASHI, 2003; FREITAS, 2003; LI *et al.*, 2006). Tais estruturas influenciam nas propriedades reológicas dos polímeros com implicações importantes em suas aplicações biotecnológicas (AKIYOSHI *et al.*, 1993; BONACUCINA *et al.*, 2006).

Com o objetivo de obter galactomanana que apresente qualidade adequada sob o ponto de vista físico-químico, como dissolução em solventes aquosos e minimizar a

presença de estruturas agregadas, realizou-se um processo de filtração e solubilização do polissacarídeo antes de proceder sua separação do meio pela adição de etanol. A proporção de etanol utilizado também foi importante. Utilizou-se a proporção de álcool em água 1:1 a fim de evitar a coprecipitação de proteínas ou pequenas moléculas.

A secagem dos polissacarídeos foi monitorada, pois este procedimento influencia nas características dos mesmos. A eliminação completa da água da matriz polimérica, que acontece nos processos de liofilização, pode conduzir à formação de agregados irreversíveis. Logo se optou por secagem em estufa a vácuo com posterior moagem do material até obtenção de pó, minimizando assim os efeitos de agregados (RINAUDO, 1993).

#### 4.1.2. Análise química das galactomananas

O conteúdo de carboidrato das amostras foi determinado pelo método de DUBOIS *et al.*(1956) e a quantificação de proteínas presente nas amostras foi determinada através do método de Bradford modificado (KRESZE, 1983) e os resultados estão apresentados na tabela 2.

TABELA 2 - RENDIMENTO, AÇÚCAR TOTAL, CONTEÚDO PROTÉICO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS GALACTOMANANAS DE BRACATINGA E GUAR

Galactomanana	Rendimento (%)	Análises Químicas		Monossacarídeos <sup>c</sup>		
		Açúcar Total (%) <sup>a</sup>	Proteínas (%) <sup>b</sup>	Gal (%)	Man (%)	Relação Man:Gal <sup>d</sup>
Bracatinga	23,0	89,0	6,8	45,0	55,0	1,1:1,0
Guar	-	79,9	2,6	39,0	61,0	1,5:1,0

<sup>a</sup> Método de Dubois (DUBOIS *et al.*,1956); <sup>b</sup> Método de Hartree (HARTREE, 1972); <sup>c</sup> Alditóis acetatos de galactose e manose analisado por GLC; <sup>d</sup> Relação de manose:galactose.

A quantidade de proteínas encontrada nas amostras de galactomanana de bracinga foi de 6,8% e na amostra de guar 2,6%, a presença de componente protéico em galactomananas vegetais tem sido observada em trabalhos anteriores e um residual protéico permanece nas amostras, mesmo após tratamento de diferentes naturezas, como extração com solventes orgânicos (STAUB, 1982): 2,5% (GANTER, 1988), 3% (RECCHIA, 1992), 2% (PETKOWICZ, 1993), 3,8% (ZAWADSKI-BAGGIO, 1994); complexação com cobre (FURNISS *et al.*, 1989): 2,4-5,5% (SUGUI, 1994); dissolução em elevada força iônica e hidrólise enzimática: 2,3 e 0,8%, respectivamente (BRESOLIN *et al.*, 1996).

Com a finalidade de obter a relação Man:Gal as galactomananas foram sucessivamente hidrolisadas, reduzidas e acetiladas. Os acetatos alditóis foram identificados por cromatografia líquido-gasosa e obteve-se uma relação de 1,1:1 para bracinga e 1,5:1 para o guar e apresentaram características estruturais semelhantes àquelas já analisadas previamente (GANTER, 1988; BRESOLIN, 1998; PERISSUTTI, 2002).

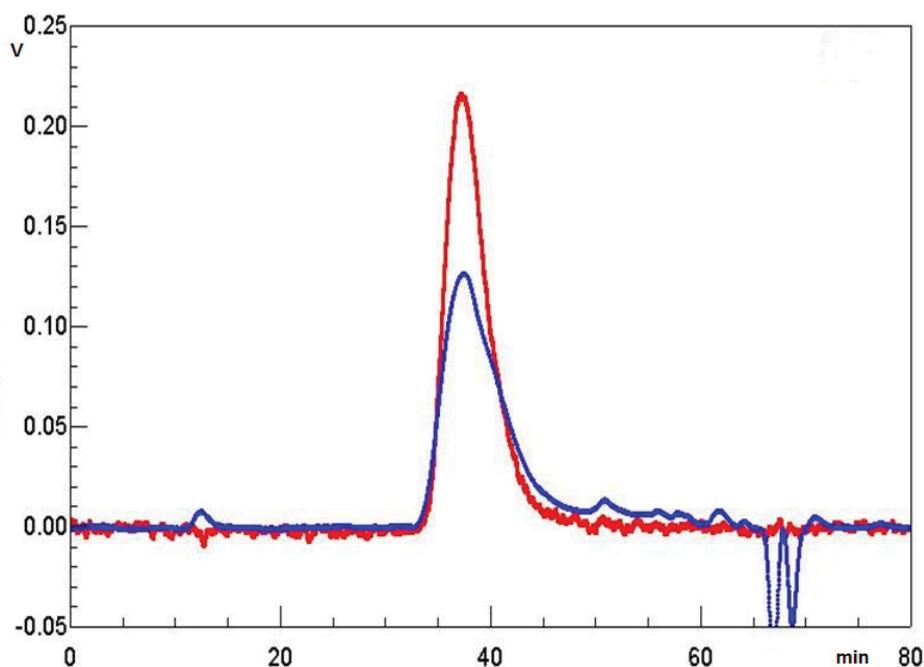
#### 4.1.3. Análise por Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Performance (HPSEC)

A única técnica que permite a caracterização de polissacarídeos em ampla faixa de massas molares e a conseqüente análise da estéreo-regularidade é a cromatografia de exclusão estérica acoplada a espalhamento de luz em multiângulos (HPSEC-MALLS) e detector de índice de refração.

Esta análise foi realizada para determinar a homogeneidade da amostra de galactomanana de bracinga obtendo-se o cromatograma da figura 13. Através desta figura observa-se que a galactomanana apresenta um pico coincidente aos dois detectores (índice de refração e espalhamento de luz), sendo considerada unimodal ou homogênea e polidispersa. Os picos que eluem nos tempos de retenção entre 60 e 80 min, detectados por RI são possivelmente decorrentes da presença de arabinose e xilose, prováveis contaminantes de baixa massa molar provenientes da casca da semente (GANTER *et al.*, 1993).

A análise de homogeneidade da amostra está de acordo com análises prévias (BRESOLIN *et al.*, 1997; PETKOWICZ *et al.*, 1999; PERISSUTTI, 2002).

FIGURA 13 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS DA GALACTOMANANA EXTRAÍDA DA BRACATINGA



Perfil de eluição da galactomanana extraída da bracatinga (1mg/mL) por cromatografia de exclusão estérica (HPSEC-MALLS) acoplada a detectores de espalhamento estático de luz laser em multiângulos em ângulo de 90° (vermelho) e índice de refração (azul). Eluente: solução de NaNO<sub>2</sub> 0,1M contendo 0,02 % de NaN<sub>3</sub>, fluxo de 0,6 mL/min, a 25°C. Colunas Ultrahydrogel com limites de exclusão de 7.10<sup>6</sup>, 4.10<sup>5</sup>, 8.10<sup>4</sup> e 5.10<sup>3</sup>.

#### 4.2. DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO PARA DETECÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO

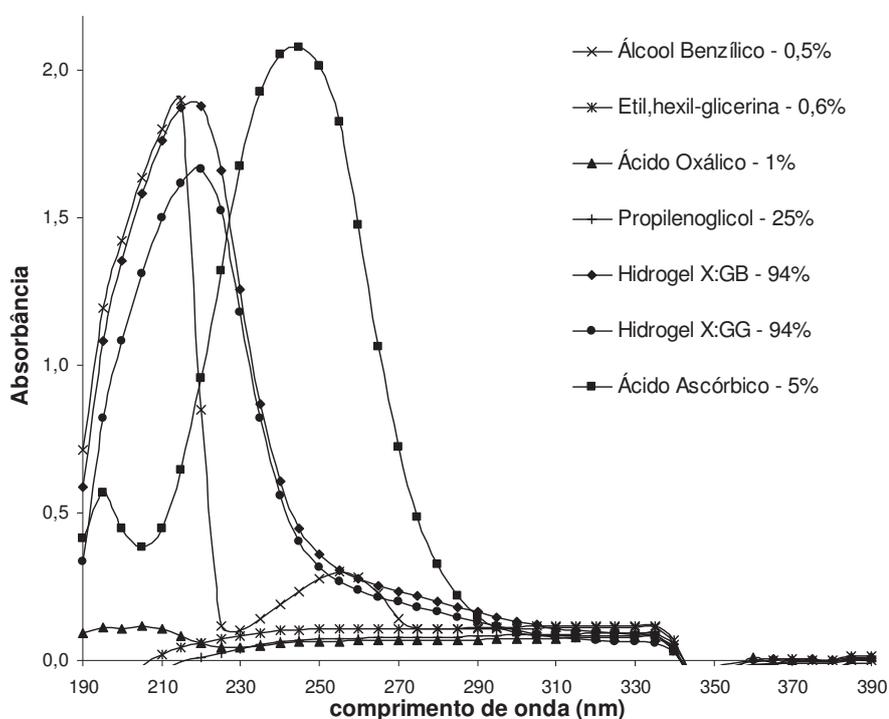
A dissolução do AA para análise quantitativa foi inicialmente realizada em tampão fosfato USP de acordo com os experimentos de Zeng, Martinuzzi, Mcgregor, 2005, porém observou-se um alargamento do pico de eluição do AA nas análises em HPLC, quando o sistema de hidrogel foi obtido pela dissolução dos polissacarídeos neste tampão. A fim de melhorar a resolução dos cromatogramas optou-se por

substituir os sais de sódio por potássio, utilizando-se tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , tanto para o preparo do sistema de hidrogel quanto para o preparo da fase móvel. Foram variadas também as concentrações deste tampão optando-se por 2mM, em pH 3,5. A quantificação do AA por HPLC foi realizada numa faixa de sensibilidade de 1–50 $\mu\text{g/mL}$ , resultante de  $R^2 = 0,9999$  e a equação da reta  $y = 133316.x$ .

A partir dos parâmetros estabelecidos acima os compostos adicionados ao sistema binário X:G, bem como o AA foram monitorados através de varredura de absorção UV e HPLC.

A figura 14 mostra a varredura de absorção em UV do AA, ácido oxálico (produto de degradação do AA, ver figura 1, p. 3), propilenoglicol (umectante), álcool benzílico e etilhexil-glicerina (conservantes) e os hidrogéis binários X:GG e X:GB solubilizados em tampão KP 2mM pH 3,5.

FIGURA 14 - VARREDURA DE ABSORÇÃO EM ESPECTROFOTÔMETRO DE ULTRAVIOLETA DOS COMPONENTES DO GEL BINÁRIO DE POLISSACARÍDEOS E ÁCIDO OXÁLICO.



Curvas de varredura de absorção em  $\lambda$  190 a 390 nm de soluções de hidrogel binário X:GG e , ácido ascórbico, propilenoglicol, ácido oxálico, álcool benzílico e etilhexil-glicerina solubilizadas em tampão KP 2mM pH 3,5.

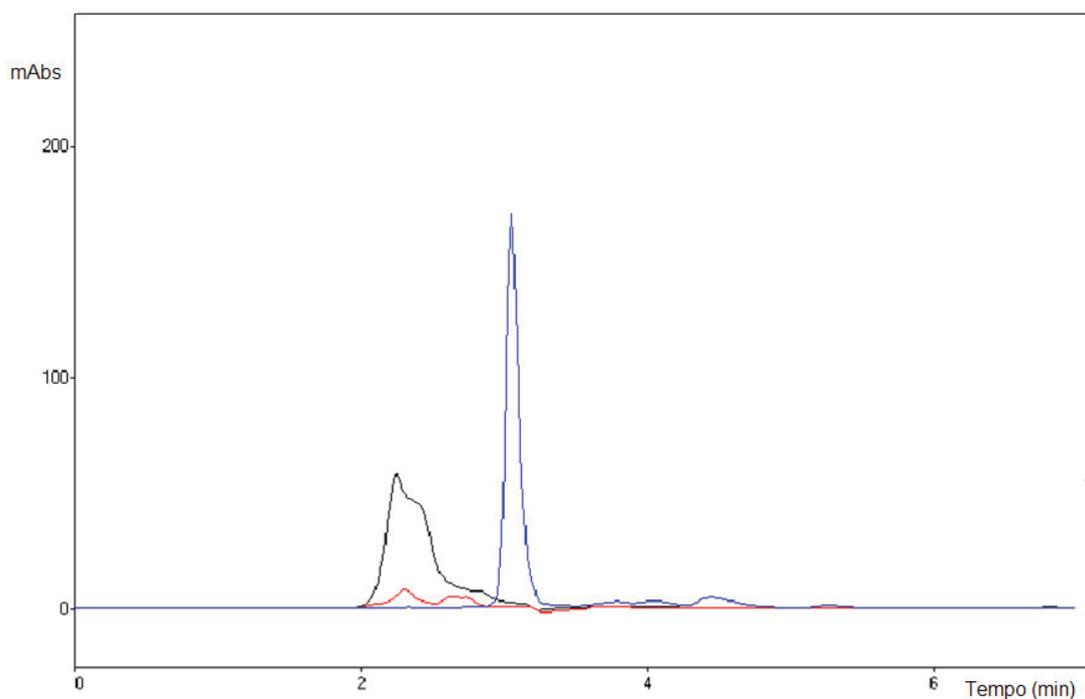
Através da varredura de absorção em espectrofotômetro de UV dos hidrogéis binários, propilenoglicol e conservantes os resultados demonstraram que a absorção máxima do AA foi em  $\lambda$  245nm e o ácido oxálico na faixa entre  $\lambda$  195 a 205nm. Os hidrogéis X:GG e X:GB e o álcool benzílico, apresentaram um pico de absorção máxima em  $\lambda$  220nm e  $\lambda$  215nm, respectivamente, absorção esta de prováveis interferências da presença de proteínas e ou grupos fenólicos. O etilhexil-glicerina e o propilenoglicol apresentaram baixa absorção numa faixa de  $\lambda$  240nm a 335nm. A partir destes resultados observa-se que os componentes do hidrogel binário têm absorção dos picos máximos em comprimentos de onda diferentes do AA.

Paralelamente às análises de varredura em espectrofotômetro de UV as soluções foram analisadas por HPLC com detecção em UV a 255nm.

A degradação aeróbica do AA foi examinada a fim de estimar de que forma o AA dissolvido em diferentes sistemas pode influenciar na estabilidade frente à oxidação e para tanto se analisou a estabilidade do AA em solução tampão KP 2mM pH 3,5, frasco âmbar e fechado com atmosfera de N<sub>2</sub> e em situação de estresse, solubilizado em meio não tamponado, na presença de íons de cobre, à temperatura ambiente e presença de luz (ZENG; MARTINUZZI; MCGREGOR, 2005).

A figura 15 demonstra a eluição do AA em condições favoráveis de estabilidade obtendo-se um pico único em 3,0min. O perfil de ácido oxálico apresentou um pico com predominância em 2,2min e outro sinal em 2,3min. Na eluição do ácido ascórbico oxidado obtiveram-se sinais que correspondem ao mesmo tempo de retenção do ácido oxálico.

FIGURA 15 – ELUIÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO, ÁCIDO ASCÓRBICO OXIDADO E ÁCIDO OXÁLICO

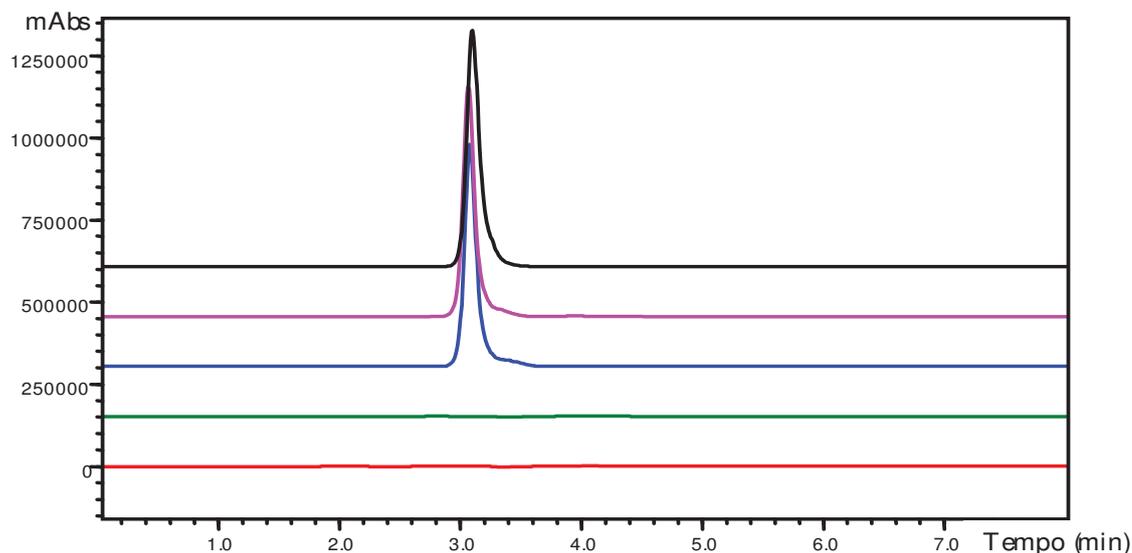


Curva de eluição do ácido ascórbico solubilizado em tampão KP 2mM pH 3,5, em frasco âmbar fechado e atmosfera de N<sub>2</sub> - 50µg/mL (azul), ácido ascórbico oxidado solubilizado em meio não tamponado - 50µg/mL (vermelho) e ácido oxálico solubilizado em meio não tamponado - 40µg/mL (preto). Eluente: solução tampão KP 2mM pH 3,5: Metanol (30:70), fluxo de 1,0mL/min, a 20°C. Coluna LC-18 5-8298, detector de UV em 255nm.

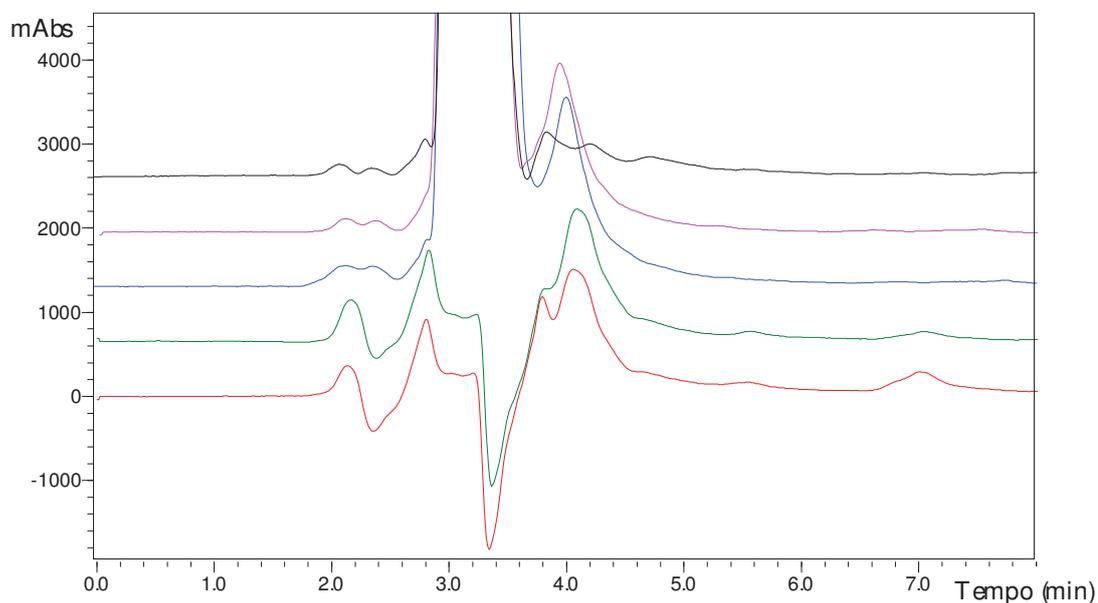
Com a finalidade de avaliar se por análise em HPLC a composição de hidrogel iria apresentar interferência na faixa de absorção do AA, visto que para os componentes do sistema de hidrogel foi observado por análise em UV baixa absorção na faixa entre  $\lambda$  240nm a 335nm. Para tanto os hidrogéis X:GG e X:GB, bem como o AA extraído destes hidrogéis, foram analisados por HPLC e comparados com a curva de eluição do AA em condições de estabilidade favorável (figura 16a). É possível observar que há um pico único, bem definido no tempo de retenção de 3,0min para AA extraído do sistema. Na figura 16b esta afirmação é comprovada, pois o tempo de retenção do ácido ascórbico (preto) não coincide com outros picos dos componentes do sistema binário.

FIGURA 16 – ELUIÇÃO DOS GÉIS X:GBAA E X:GGAA COM ADIÇÃO DE PROPILENOGLICOL, ÁLCOOL BENZÍLICO E ETILHEXIL-GLICERINA, GEL X:GB E GEL X:GG COMPARADOS COM A ELUIÇÃO DO AA

a)



b)



Curva de eluição do AA na mesma concentração existente nos géis (preto) comparado com as curvas de eluição do hidrogel X:GBAA com adição de propilenoglicol, álcool benzílico e etilhexil-glicerina (rosa), hidrogel X:GGAA com adição de propilenoglicol, álcool benzílico e etilhexil-glicerina (azul), hidrogel X:GB (verde), hidrogel X:GG (vermelho) sendo que todos foram dissolvidos em tampão KP 2mM pH 3,5. Eluente: tampão KP 2mM pH 3,5; Metanol (30:70), fluxo de 1,0mL/min, a 20°C. Coluna LC-18 5-8298, detector de UV em 255nm.

### **4.3. DESENVOLVIMENTO DOS HIDROGÉIS BINÁRIOS X:G COM ÁCIDO ASCÓRBICO E ASCORBIL FOSFATO DE SÓDIO**

O ajuste de pH do hidrogel de polissacarídeos devido inclusão de AA é um fator importante tendo em vista a aplicação potencial deste sistema para fins cosméticos em produtos para ação sobre a pele. Com este intuito foram testados tampões com uma ampla faixa de tamponamento, tal como o tampão citrato-fosfato e tampão Soerensen. Para a inclusão de 5% AA aos hidrogéis binários X:GG e X:GB foi testado tampão citrato-fosfato (ácido cítrico 0,1M e fosfato de sódio dibásico 0,2M, faixa de tamponamento variando entre pH 2,6 a 7,0) atingindo pH 4,6 .

Com o tampão Soerensen (fosfato de sódio monobásico 0,2M e de fosfato de sódio dibásico 0,2M; faixa de tamponamento de pH 5,7 a 8,0) obteve-se pH 5,1 após a adição de 5% AA ao hidrogel.

Porém as análises por HPLC resultaram absorção de UV do tampão Soerensen num tempo de retenção próximo ao tempo de retenção do AA (~ 2,7 min). Para melhorar a resolução dos cromatogramas os sais de sódio que compõem este tampão foram substituídos por sais de potássio.

Após diferentes formulações variando as concentrações dos reagentes dos tampões e faixas de pH, os hidrogéis mais adequados foram obtidos partindo de uma solução de tampão Soerensen de potássio (KP) 0,3M pH 8,0. O pH resultante para os hidrogéis binários X:GGAA e X:GBAA foi de 4,6 e 4,5 após a adição de AA, respectivamente.

A este sistema foram acrescentados 25% de propilenoglicol, 0,6% de álcool benzílico e 0,5% de etilhexil-glicerina. Foi escolhido como sistema de conservação na formulação do hidrogel devido o álcool benzílico e etilhexil-glicerina possuírem ação bacteriostática e fungicida contra uma diversidade de organismos e agirem de forma sinérgica no produto.

O propilenoglicol foi acrescentado à formulação para diminuir a quantidade de água presente e, conseqüentemente diminuir a quantidade de O<sub>2</sub> livre no meio,

propiciando condições favoráveis para a estabilização do AA além de atuar como umectante sobre a pele.

#### 4.4 ANÁLISES REOLÓGICAS

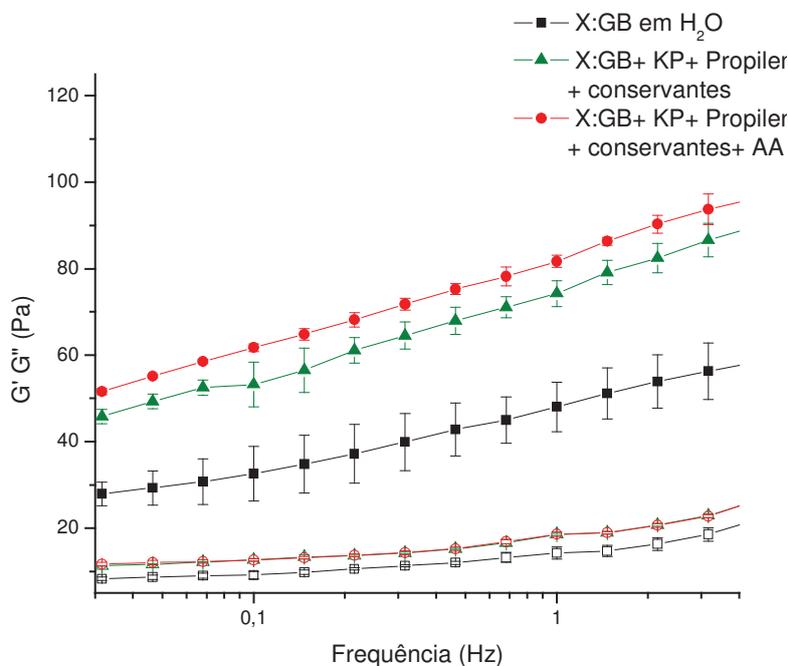
Considerando-se o comportamento pseudoplástico da galactomanana de bracinga em solução aquosa em concentrações acima de 3,6g/L (GANTER, 1991; PERISSUTTI, 2002; PERISSUTTI *et al.*, 2002) e os estudos com o sistema binário X:G de bracinga que demonstraram a melhor sinergia na proporção de 1:1, comparado com as proporções de 4:1 a 1:3 (BRESOLIN *et al.*, 1998; BRESOLIN *et al.* 1999), foi escolhido para este trabalho a concentração do sistema binário 12g/L e a proporção 1:1 de X:G. Esta mesma concentração e proporção foi utilizada previamente em sistema de liberação de adenovírus com resultados bastante promissores (BECK *et al.*, 2004).

Antes da realização das análises reológicas em regime oscilatório foi realizada a determinação da região de comportamento linear das amostras na frequência de 1Hz. A região de deformação onde os valores de  $G'$  e  $G''$  permaneceram constantes apesar do aumento da tensão de cisalhamento encontrou-se entre 1 e 2%.

Uma vez selecionada a tensão de cisalhamento foram realizadas as análises de variação de frequência (na faixa de 0,01 a 10Hz) para os hidrogéis de X:GG e X:GB.

Com a finalidade de avaliar a influência da adição de AA, conservantes e umectante em meio tamponado ou não, à matriz de hidrogel X:G foram realizadas análises reológicas em sistema dinâmico oscilatório conforme demonstrado na figura 17. O hidrogel obtido pela dissolução xantana e galactomanana de bracinga em tampão KP com adição do propilenoglicol e conservantes demonstrou um aumento no módulo elástico, em toda a faixa de frequência analisada (a 1Hz - 74Pa), em comparação ao hidrogel obtido pela dissolução em água deionizada (a 1Hz - 48Pa). Nesta mesma figura observa-se que a adição de 5% de AA ao sistema causou um acréscimo ainda maior ao caráter elástico (a 1Hz - 82Pa). Um perfil semelhante foi obtido para o gel binário contendo galactomanana de guar.

FIGURA 17 – VARREDURA DE FREQUÊNCIA DO HIDROGEL X:GBAA DISSOLVIDO EM H<sub>2</sub>O OU TAMPÃO KP COM PROPILENOGLICOL E CONSERVANTES, SEM E COM AA

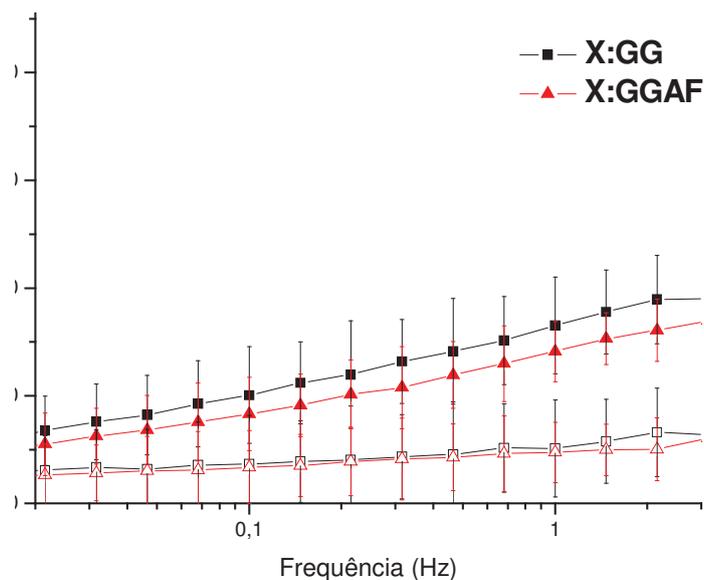


Varredura de Frequência na faixa de 0,01 a 10 Hz do hidrogel obtido pela solubilização dos polissacarídeos em H<sub>2</sub>O e do hidrogel obtido pela solubilização dos polissacarídeos em tampão KP 0,3M pH8 com adição de propilenoglicol e conservantes, sem e com adição de 5% AA. Figuras fechadas representam G' e figuras abertas representam G''. Temperatura de análise: 20°C, análises feitas em triplicata.

A figura 18 demonstra o comportamento reológico dos sistemas de hidrogel xantana: galactomanana de guar (X:GG) em sistema aquoso com e sem adição do AF. Os resultados indicam perfis típicos de géis fracos, onde  $G' > G''$  e a diferença entre G' e G'' é pequena (16Pa para 5Pa no hidrogel X:GG e 14Pa para 5Pa no hidrogel X:GGAF, na frequência de 1Hz), além disso G' não é independente da frequência. A incorporação de AF no mesmo sistema resultou em diminuição da força do gel, conforme demonstrado no perfil de G' em toda faixa de frequência. Os resultados obtidos com o sistema xantana:galactomanana de bracinga com e sem adição do AF apresentaram resultados semelhantes.

As características reológicas do sistema X:GG estão de acordo com resultados da literatura para sistemas binários X:G (AMARAL, 1998; GOYCOOLEA; MILAS; RINAUDO, 2001).

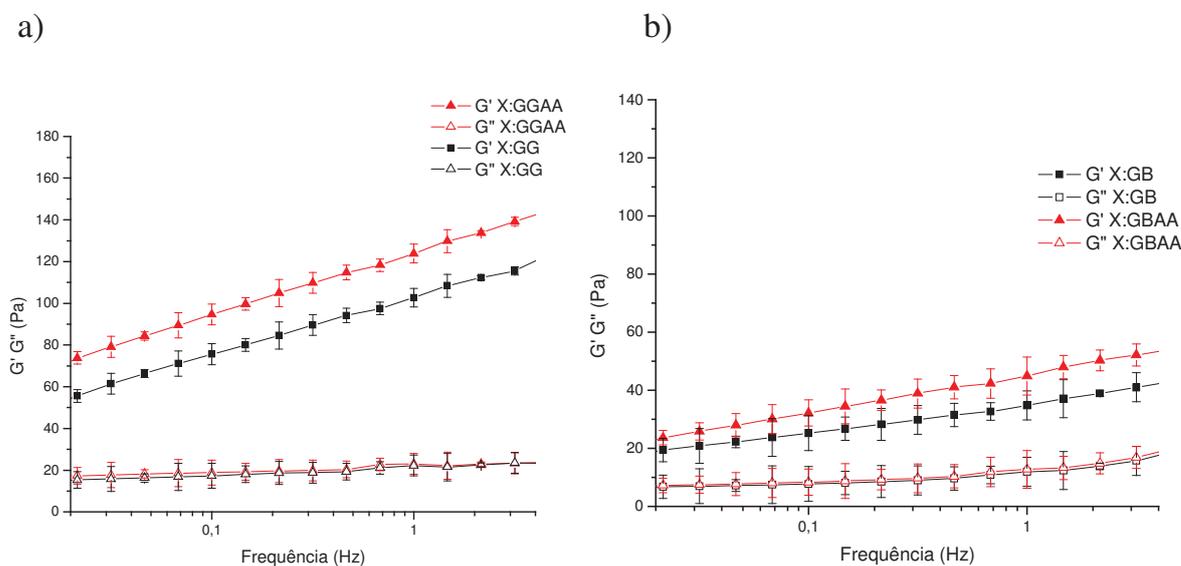
FIGURA 18 – VARREDURA DE FREQUÊNCIA DO HIDROGEL DE X:GG COM E SEM ADIÇÃO DE 10% DE AF



Varredura de Frequência nos extremos de 0,01 a 10 Hz do hidrogel X:GG obtido pela solubilização dos polissacarídeos em  $H_2O$  sem e com adição de 10% AF. Figuras fechadas representam  $G'$  e figuras abertas representam  $G''$ . Temperatura de análise:  $20^\circ C$ , análises feitas em triplicata.

Na figura 19 pode-se observar o efeito da adição de AA no comportamento viscoelástico dos sistemas de géis binários, contendo propilenoglicol, álcool benzílico e etilhexil-glicerina, comparando as galactomananas de guar (X:GG- figura 19a) e bracinga (X:GB- figura 19b). A incorporação de AA ao gel binário para ambas as formulações resultou em um aumento do caráter elástico do gel, em contraste com o comportamento obtido quando da adição de AF (figura 18).

FIGURA 19 – VARREDURAS DE FREQUÊNCIA DOS HIDROGÉIS X:GG E X:GB COM E SEM ADIÇÃO DE 5% DE AA



Varredura de Frequência nos extremos de 0,01 a 10 Hz dos hidrogéis X:GG e XGB obtidos pela solubilização dos polissacarídeos em tampão KP 0,3M pH8 com adição de propilenoglicol e conservantes, sem e com adição de 5% AA. Figuras fechadas representam  $G'$  e figuras abertas representam  $G''$ . Temperatura de análise: 20°C, análises feitas em triplicata.

Comparando-se os hidrogéis binários X:GB e X:GG percebe-se um valor maior para o  $G'$  e  $G''$  nos hidrogéis contendo galactomanana de guar, muito provavelmente devido a uma relação Man:Gal um pouco maior que a galactomanana de bracinga, Man:Gal = 1,1:1 para Man:Gal = 1,5:1 na galactomanana de guar, e portanto uma interação maior com a molécula da xantana. Como já descrito na literatura a xantana e galactomanana interagem entre si formando géis (BRESOLIN *et al.*, 1997). Entretanto, quando se considera uma aplicação destes géis, ambos são interessantes pois podem resultar em produtos com diferentes texturas e finalidades.

#### 4.5. TESTE DE ESTABILIDADE

Segundo monografia da *International Federation of Societies of Cosmetic Chemists-IFSCC* o teste de estabilidade é considerado um procedimento preditivo, baseado em dados obtidos de produtos armazenados em condições que visam a acelerar alterações passíveis de ocorrer nas condições de mercado. Como em todo

procedimento preditivo os resultados não são absolutos, mas têm probabilidade de sucesso.

Os limites de temperatura mais frequentemente praticados, durante o desenvolvimento de produtos, são 37°C, 40°C, 45°C e 55°C. Neste trabalho foi adotada a temperatura ambiente e 45°C. Para temperatura de 45°C a ocorrência de alterações físico-químicas é frequente e até mesmo esperada, ocasionando alterações na atividade dos componentes, viscosidade, aspecto, cor e odor do produto (ANVISA, 2004).

Os hidrogéis binários de xantana:galactomanana de guar (X:GG) e bracinga (X:GB) foram submetidos a avaliação da estabilidade no teor de AA, da variação de pH, aspecto, cor, odor e do comportamento reológico do gel.

#### 4.5.1. Análise do pH dos Hidrogéis

O pH inicial dos hidrogéis binários X:GG e X:GB obtido com solução tampão KP 0,3M pH8 foi 8,2. Após a inclusão de AA (5%) o pH obtido foi de 4,6 para o X:GGAA e 4,5 para o X:GBAA. Após 12 semanas houve um acréscimo para pH 4,7 no sistema contendo guar para ambos as temperaturas de acondicionamento (X:GGAA 25°C e X:GGAA 45°C). Esta variação foi menos pronunciada no sistema contendo bracinga em ambiente 25°C (X:GBAA 25°C) com pH resultante de 4,6. Já no ambiente a 45°C o sistema contendo bracinga (X:GBAA 45°C) o pH variou de 4,5 para 5,0. Isto demonstra que a estabilidade para o sistema contendo bracinga é mais estável a 25°C, perdendo esta estabilidade em condições mais severas (Tabela 3).

#### 4.5.2. Avaliação Organoléptica dos Hidrogéis

Na observação da cor do hidrogel notou-se um escurecimento gradual dos géis, principalmente nos hidrogéis submetidos a 45°C. Inicialmente o hidrogel apresentava-se transparente e foi amarelado chegando a uma coloração amarelo ouro nos hidrogéis que estavam à temperatura ambiente e uma coloração ocre nos hidrogéis submetidos a 45°C. Esta avaliação foi monitorada por espectrofotômetro procedendo a varredura prévia de absorção de onda na faixa do visível onde teve uma absorção

máxima em 400nm. O hidrogel foi diluído em tampão KP 2mM pH 3,5 e as leituras no tempo zero foram de 0,153 para X:GGAA e 0,124 para X:GBAA. Após 12 semanas observou-se uma absorvância de 1,066 no X:GGAA 25°C e 1,509 no X:GGAA 45°C, e absorvância de 0,588 no X:GBAA 25°C e 1,332 no X:GBAA 45°C, portanto um acréscimo de 67% em relação a absorvância do X:GGAA 25°C no tempo 0 e 38% em relação a absorvância do X:GBAA 25°C também no tempo zero. Estes dados estão resumidos na tabela 3. Esta variação de coloração em sistemas comerciais contendo AA é minimizada com adição de quelantes e ou corantes (WILMOTT; ZNAIDEN, 1991; SCHONROCK; KRUSE, 2004).

#### 4.5.3. Análises Reológicas

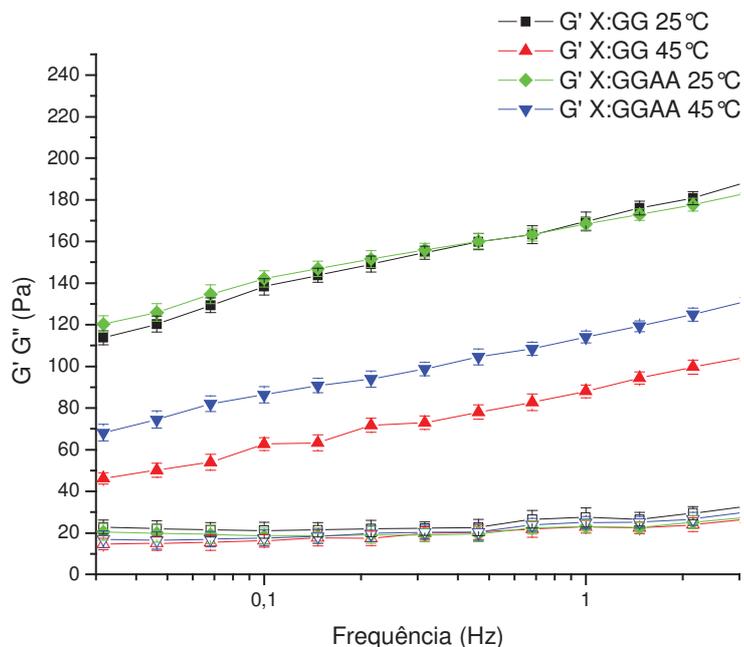
Para verificar se o comportamento reológico era mantido ao longo do tempo foi realizado o monitoramento das propriedades mecânicas nos sistemas X:GG e X:GB contendo 5% de AA por um período de 12 semanas, a temperatura ambiente e a 45°C (resultados estão apresentados resumidamente na tabela 3).

Na figura 20 pode-se observar os gráficos obtidos em análise dinâmica oscilatória para os hidrogéis X:GG e X:GB após 12 semanas a temperatura ambiente e 45°C. Estes sistemas (X:GG e X:GB) mantêm a característica de géis, isto é,  $G' > G''$ . Para o sistema contendo guar foi verificado na figura 20a um aumento nos módulos elástico e viscoso para hidrogel X:GG (168Pa a 1Hz) mantido a temperatura ambiente em relação ao tempo zero (102Pa a 1Hz) (figura 20a). O hidrogel X:GG exposto a 45°C após 12 semanas (88Pa a 1Hz) apresentou um decréscimo no módulo elástico, porém sem apresentar sinerese.

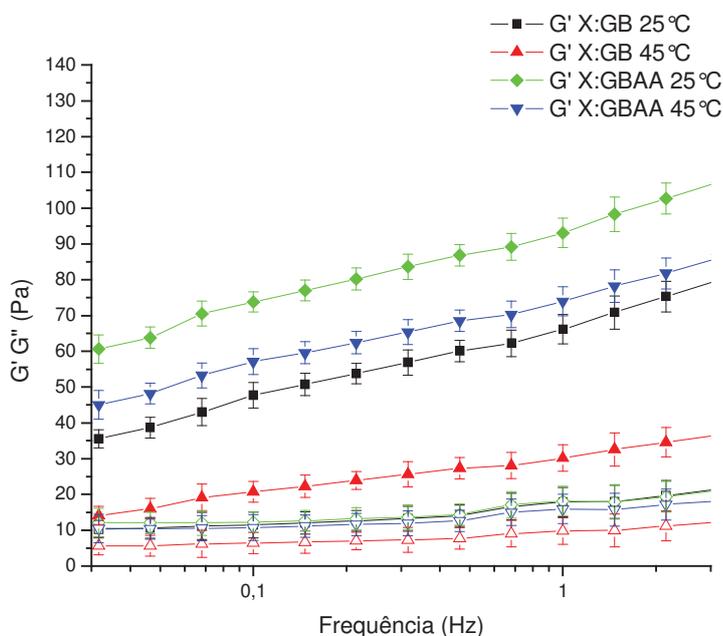
Já no sistema contendo 5% de AA (X:GGAA) após 12 semanas houve um acréscimo de  $G'$  para 170Pa (1Hz) nas condições ambiente e um decréscimo deste quando submetido a altas temperaturas por 12 semanas (114Pa a 1Hz) quando comparado ao tempo zero (124Pa a 1Hz).

FIGURA 20 – VARREDURAS DE FREQUÊNCIA DOS HIDROGEIS BINÁRIOS, COM E SEM ADIÇÃO DE 5% DE AA, APÓS ANÁLISE DE ESTABILIDADE POR 12 SEMANAS DE EXPOSIÇÃO À TEMPERATURA AMBIENTE E 45°C

a)



b)



Varredura de frequência nos extremos de 0,01 a 10 Hz dos hidrogéis de X:GG (a) e X:GB (b), com e sem adição de 5% de AA, após análise de estabilidade por 12 semanas de exposição a temperatura ambiente e 45°C.  $G'$  é representado pelas figuras fechadas e  $G''$  é representado pelas figuras abertas. Temperatura de análise: 20°C, análises feitas em triplicata.

Para o sistema contendo galactomanana de bracinga foi verificado na figura 20b um aumento nos módulos elástico e viscoso para hidrogel X:GB (66Pa a 1Hz) mantido a temperatura ambiente em relação ao tempo zero (35Pa a 1Hz). O hidrogel X:GB exposto a 45°C após 12 semanas (30Pa a 1Hz) apresentou um decréscimo no módulo elástico, porém também não apresentou sinerese.

Após adição de 5%AA (X:GBAA) foi observado um aumento de  $G'$  no gel exposto por 12 semanas a 45°C (74Pa a 1Hz) e a temperatura ambiente (93Pa a 1Hz), quando comparado ao tempo zero (45Pa a 1Hz), indicando uma maior estabilidade do hidrogel composto pelo sistema binário xantana:galactomanana de bracinga.

Os valores de  $G'$  de X:GBAA são comparativamente menores que X:GGAA, confirmando haver uma menor interação entre as cadeias poliméricas da xantana e galactomanana de bracinga (ver item 4.4, p. 56).

Os hidrogéis, com exceção de X:GBAA, apresentaram uma diminuição de  $G'$  após serem submetidos a 45°C por 12 semanas, provavelmente devido a ação da temperatura sobre a rede do gel.

#### 4.5.4. Análise do Teor de AA nos Hidrogéis

A estabilidade no teor de AA foi avaliada por HPLC e os resultados podem ser observados na figura 21. Após 12 semanas o teor permaneceu em 64 % e 63 % do AA no hidrogel binário de X:GBAA e X:GGAA a 25°C, respectivamente e, a 45°C o teor de AA, após 12 semanas foi de 18% e 25 % do AA no hidrogel binário de X:GB e X:GG, respectivamente. O gel obtido com a galactomanana de guar promove maior estabilidade química.

GALLARATE *et al.* (1999) avaliaram a estabilidade de AA em emulsões múltiplas água/óleo/água contendo 0,1% AA na fase aquosa interior em pH 3,0 e em sistemas de soluções aquosas com pH 3,0 a 5,0 durante 20 dias a 45°C  $\pm$ 0,1°C e observaram a presença de 20% de AA nas emulsões e nenhum AA nas soluções aquosas. No experimento a 20°C  $\pm$  0,1°C houve degradação total de AA nas soluções aquosas com pH 4,0 e 5,0 e 17% AA restante na solução pH 3,0 e na emulsão havia 96,7% do AA.

Comparando a matriz de hidrogel de polissacarídeos X:G à emulsão (20 dias, 20°C) obtida por GALLARATE *et al.* (1999), em relação a manutenção do teor de AA, observa-se que o hidrogel de polissacarídeos teve uma estabilização equivalente a 85,6 e 83,7%, X:GGAA e X:GBAA, respectivamente, comparado ao demonstrado por estes autores (96,7%). Porém foi possível a incorporação de 5% de AA ao sistema de hidrogel de polissacarídeos em comparação a 0,1 % obtida por Gallarate *et al.* (1999), o que favorece a aplicabilidade do sistema de hidrogel.

FIGURA 21 – ANÁLISE DA ESTABILIDADE POR HPLC DOS HIDROGÉIS BINÁRIOS X:GBAA E X:GGAA

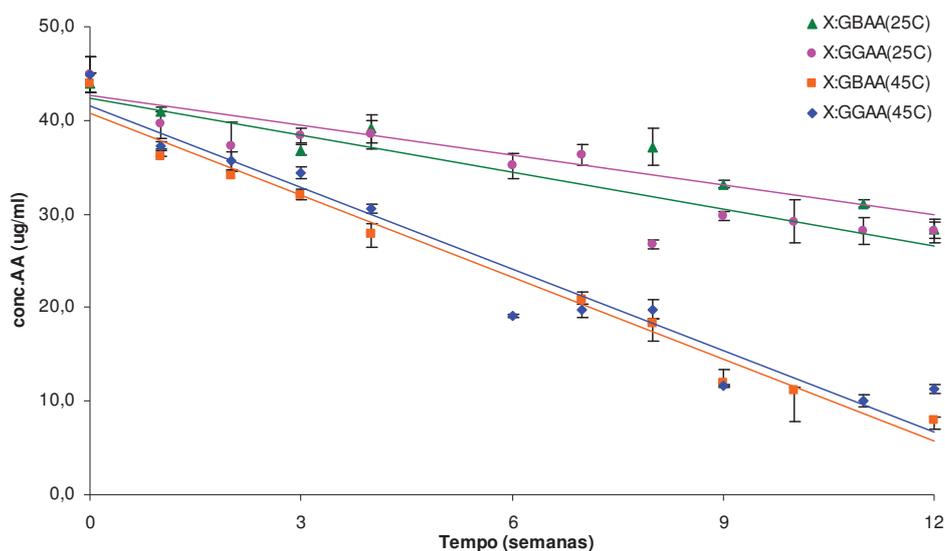


TABELA 3 – RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS HIDROGÉIS X:GGAA E X:GBAA

		X:GGAA		X:GBAA	
		Temp. amb.		Temp. amb.	
Tempo zero	% AA	100 (93)		100 (88)	
	Abs (400nm)	0,153		0,124	
	pH	4,6		4,5	
	Aparência	transparente		transparente	
	G' a 1Hz(Pa)	124		45	
		Temp. amb.	45°C	Temp. amb.	45°C
Após 12 semanas	% AA	64	25	63	18
	pH	4,7	4,7	4,6	5,0
	Abs (400nm)	1,066	1,509	0,588	1,332
	Aparência	amarelo	ocre	amarelo	ocre
	G' a 1Hz(Pa)	168	88	93	74

#### 4.7. TESTE DE PERMEACÃO *IN VITRO*

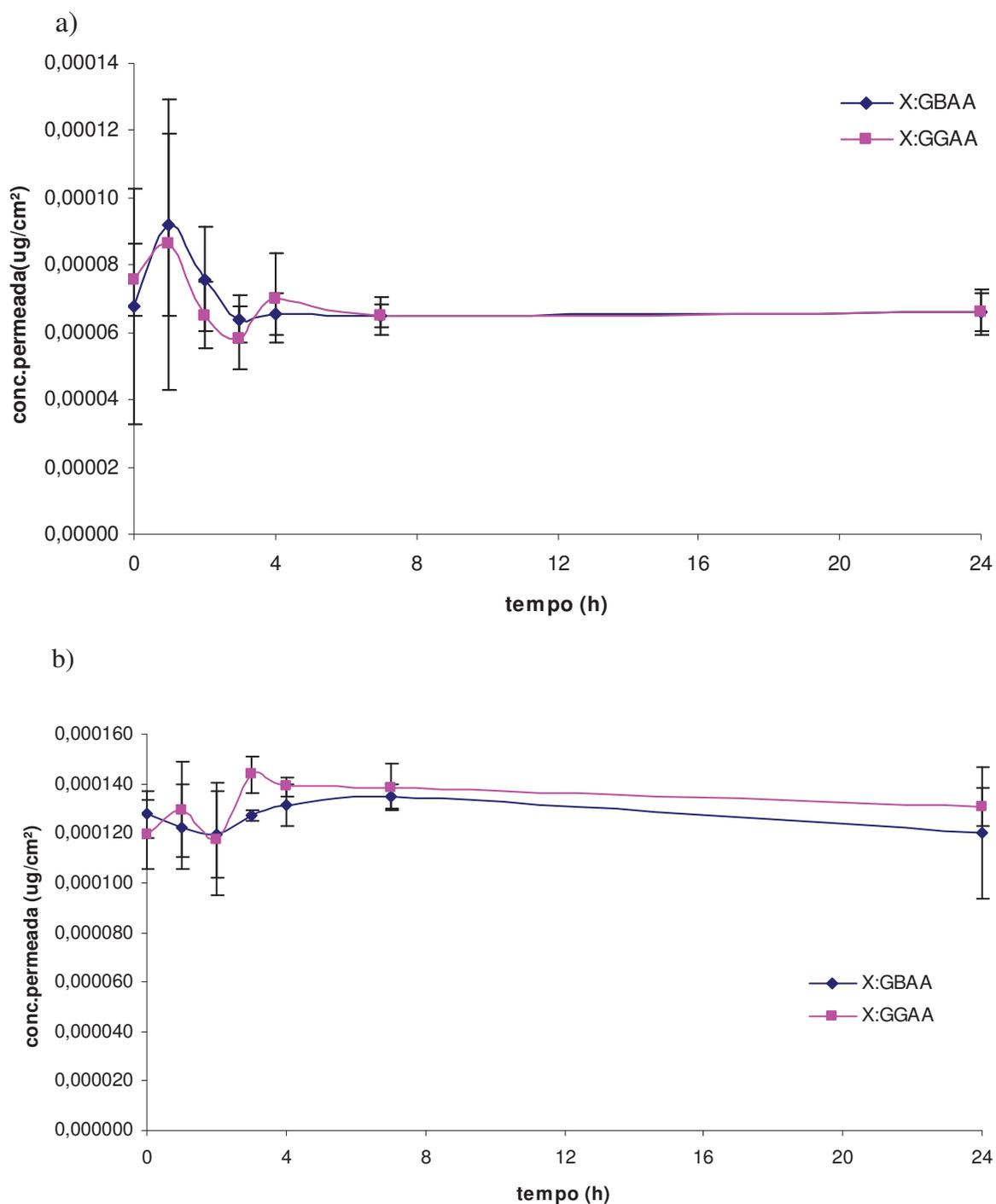
Foram realizados dois experimentos, primeiramente um teste de permeação onde se objetivou a manutenção da estabilidade do AA através do meio receptor com pH 3,5 e temperatura de 20°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), e um segundo teste onde o meio receptor mimetizou condições fisiológicas da pele, pH 7,4 e temperatura de 32°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). Estes testes foram realizados apenas com o intuito de verificar se o AA é liberado do sistema binário para um outro meio a fim de demonstrar que se trata de um sistema viável para o uso cosmético.

Neste experimento foi utilizado um filme de PLLA que é uma resina inerte que substitui a pele de porco, membrana permeante comumente usada, pois a pele de porco apresenta limitações na detecção do AA devido a variações no processo de extração.

Devido às condições de realização dos testes de permeação, como o tempo e temperatura entre as coletas das amostras e análise das mesmas por HPLC, houve comprometimento da estabilidade do AA, conduzindo o mesmo a processos de degradação parcial e ou oxidação. Foi observada uma recuperação do AA no experimento realizado a pH 3,5 e 20°C e a pH 7,4 a 32°C de 10% e 5%, respectivamente (tabelas de quantificação em anexo, p.82). Este valor incluiu a quantidade de ativo que permeou a membrana, o que permaneceu na membrana e a quantidade retida nos componentes e na tubulação da célula. Um experimento de permeação é considerado válido apenas quando apresenta uma recuperação igual ou maior que 85% do composto analisado, contudo o experimento demonstrou que o sistema binário de hidrogel libera o AA na célula de Franz e torna-se necessário um novo teste onde as alíquotas deveriam ser tomadas em intervalos de tempo maiores e assim que coletadas deveriam ser congeladas até a sua análise por HPLC e analisadas por detector de UV e detector eletroquímico com redução por DTT de todas as alíquotas.

A figura 22a mostra o perfil de permeação de AA dos géis X:GGAA e X:GBAA no período de 0 a 24 horas usando tampão KP 2mM pH 3,5 a 20°C no compartimento receptor e a figura 22b mostra o perfil de permeação de AA dos géis X:GGAA e X:GBAA no período de 0 a 24 horas usando tampão KP 2mM pH 7,4 a 32°C no compartimento receptor.

FIGURA 22 – PERMEAÇÃO DO AA NO EXPERIMENTO EM CONDIÇÕES ÁCIDAS E EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS

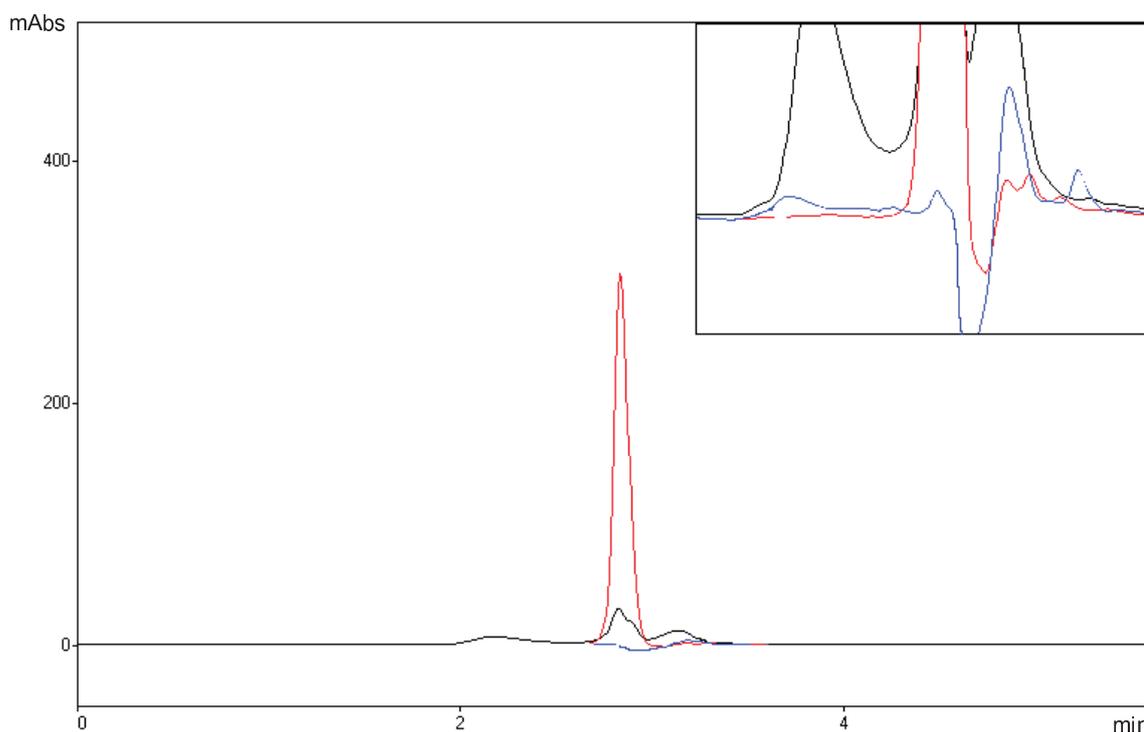


Recuperação do AA no experimento realizado em pH 3,5 e 20°C (a) e realizado em pH 7,4 e 32°C (b), inclui a quantidade de ativo que permeou a membrana coletada nas tomadas de amostra de 0 a 24 horas.

Os efeitos dos processos de degradação parcial e ou oxidação foram observados nas análises quantitativas por HPLC das amostras obtidas do compartimento receptor. A figura 23 demonstra a eluição de três picos em tempos de retenção próximos ao tempo de retenção do AA (2,8min).

Para auxiliar na elucidação destes três picos foram injetadas soluções contendo DHA (composto presente em equilíbrio com AA, figura 1, p. 3) e AA, ambos solubilizados em tampão KP 2mM pH 3,5. Pode-se observar um pico com tempo de retenção 2,8 min para o AA e um pico em tempo de retenção 3,0 min para o DHA coincidente com o pico de eluição da alíquota obtida do teste de permeação do gel (tempo 24-plataforma B), sugerindo a presença de DHA nesta amostra (figura 23).

FIGURA 23 – ELUIÇÃO DO AA, DHA E ALÍQUOTA REFERENTE A ANÁLISE DE PERMEÇÃO DO HIDROGEL X:GBAA A 32°C E pH7,4



Curva de eluição do AA solubilizado em KP 2mM pH3,5 (vermelho), DHA solubilizado em tampão KP 2mM pH 3,5 (preto) e alíquota referente a análise de permeação do gel X:GBAA a 32°C e pH7,4 (azul). Eluente: tampão KP 2mM pH 3,5: Metanol (30:70), fluxo de 1,0mL/min, a 20°C. Coluna LC-18 5-8298, detector de UV em 255nm.

Para obter-se uma leitura mais acurada do DHA adotaram-se os seguintes procedimentos: redução do DHA presumível presente na amostra, por ditiotreitól (DTT) em solução 10mM em tampão KP 0,3M pH8 (LYKKESFELDT; LOFT; POULSEN, 1995), detector eletroquímico, temperatura 30°C e fase móvel tampão KP 2mM pH 3,5 + 1mM EDTA:Metanol (50:50).

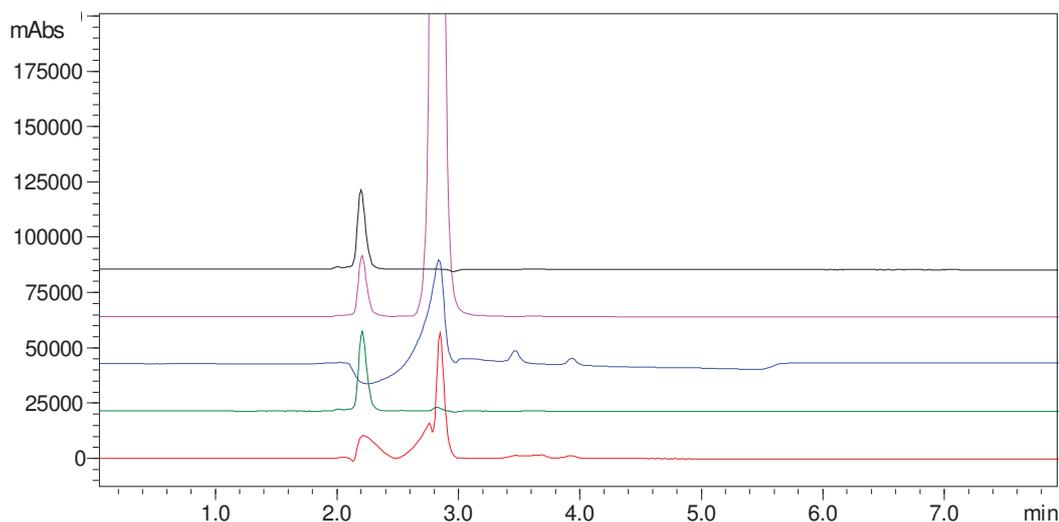
O DTT foi adicionado à amostra em análise (tempo 24-plataforma B) e após 20min de reação o meio foi acidificado e procedeu-se a eluição por HPLC.

As figuras 24 a e b mostram a eluição de Ácido Oxálico solubilizado em H<sub>2</sub>O, AA solubilizado em KP 2mM pH3,5, DTT solubilizado em tampão KP 0,3M pH 8, DHA solubilizado em tampão KP 2mM pH 3,5 e alíquota DHA reduzido com DTT.

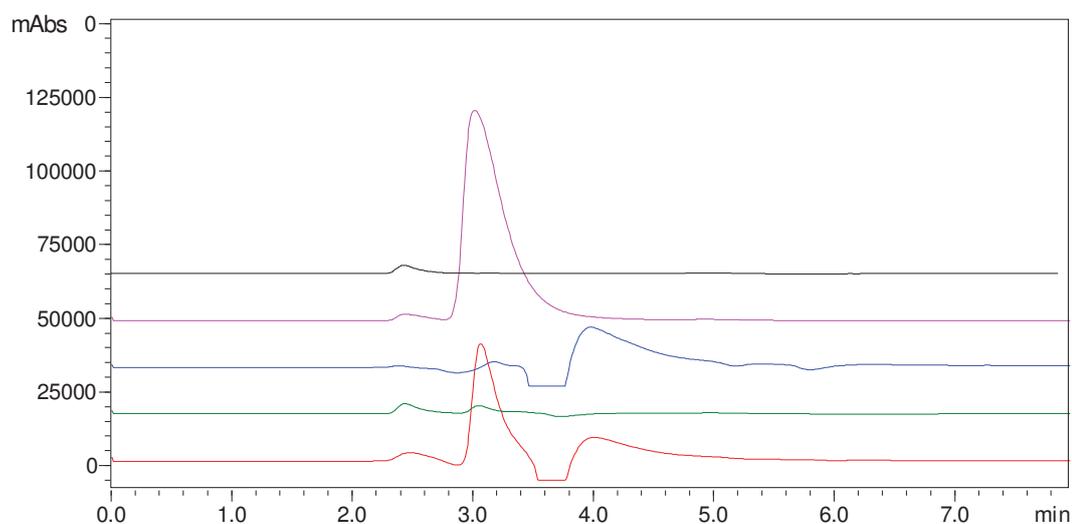
O pico a tempo de retenção 3,0 min, tanto na detecção pelo detector UV como no detector eletroquímico, confirma o aumento da quantidade de AA após a redução do DHA por DTT, o que permitiu a quantificação do AA recuperado no sistema de permeação da célula de Franz.

FIGURA 24 – ELUIÇÃO DO AA, DHA, ÁCIDO OXÁLICO, DTT E DHA REDUZIDO POR SOLUÇÃO DE DTT

a)



b)



Curva de eluição do Ácido Oxálico solubilizado em H<sub>2</sub>O (preto), AA solubilizado em KP 2mM pH3,5 (rosa), DTT solubilizado em tampão KP 0,3M pH 8 (azul), DHA solubilizado em tampão KP 2mM pH 3,5 (verde) e alíquota DHA reduzido com DTT (vermelho). Gráfico (a) obtido por detector de UV e gráfico (b) obtido por detector eletroquímico. Eluente: tampão KP 2mM pH 3,5+1mM EDTA: Metanol (50:50), fluxo de 1,0mL/min, a 30°C. Coluna LC-18 5-8298, detector de UV em 255nm e detector eletroquímico equipado por célula guarda 5020 e célula analítica 5011-A, operando em -200mV e 300mV, sendo que o cromatograma b se refere ao eletrodo 2.

## **5. CONCLUSÃO**

A galactomanana de *Mimosa scabrella* (bracatinga) foi obtida e apresenta características similares às anteriormente obtidas pelo Grupo de Química de Carboidratos Vegetais da UFPR.

Foram obtidos hidrogéis binários de galactomananas (guar e bracatinga) e xantana e utilizados como matriz de inclusão de ácido ascórbico.

Foram definidas condições para estabilidade química e análise do ácido ascórbico em hidrogel binário: tampão  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  0,3M, pH 4,5 e inclusão de 5% ácido ascórbico.

A análise reológica dos hidrogéis binários com inclusão do propilenoglicol, álcool benzílico e etilhexil-glicerina demonstraram  $G' > G''$ , indicando aumento do caráter elástico na presença dos mesmos.

A análise reológica dos hidrogéis binários com inclusão de ácido ascórbico demonstraram  $G' > G''$ , indicando aumento do caráter elástico na presença do mesmo.

Análises de estabilidade por 12 semanas do sistema de hidrogel xantana: galactomanana contendo ácido ascórbico demonstraram uma estabilização de 64% a temperatura de 25°C e 18% a temperatura de 45°C para o sistema contendo a galactomanana nativa – bracatinga e estabilização de 63% a temperatura de 25°C e 25% a temperatura de 45°C para o sistema contendo a galactomanana comercial – guar.

Visto que o objetivo do estudo foi de apenas observar se há a liberação do AA do sistema binário de hidrogel, foram observados, através de análises de permeação *in vitro* por células de difusão de Franz, picos de eluição por HPLC qualificando o ácido ascórbico e sugerindo que houve permeação do ácido ascórbico no sistema através de membrana de PLLA.

## **6. REFERÊNCIAS**

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. 1 ed. Brasília: ANVISA, 2004.

ADAMS, G.A. Complete acid hydrolysis. *Methods carbohydrates Chemistry*, New York, v.5, p. 269, 1965.

AKYIOSHI, K., DEGUCHI, S., MORIGUCHI, N., YAMAGUCHI, S.; SUNAMOTO, J. Self-aggregates of hydrophobized polysaccharides in water. Formation and characteristics of nanoparticles. **Macromolecules**, v. 26, p.3062, 1993.

AMARAL, J. **Estudo Reológico da Galactomanana de Sementes de *Cassia fastuosa***. Curitiba, 1998. Dissertação de Mestrado, Departamento de Bioquímica, UFPR.

ASPINALL, G.O.; WHYTE, J.N.C., Polysaccharides of soy-beans. Part I: Galactomannans from the hulls. **J. Chem. Soc.**, p.5058, 1964.

AUSTRIA, R.; SEMENZATO, A.; BETTERO, A. Stability of vitamin C derivatives in solution and topical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.15, p.795-801, 1997.

BARNES, A.; HUTTON, J.F.; WALTERS, K. **An Introduction to Rheology**. Netherlands: Elsevier, p.199, 1989.

BECK, A.W.; HOLLOWAY, S.E.; GANTER, J.L.M.S.; EBERHART, R.C.; NELSON, K.D.; FLEMING, J.B.; Ultrasound-guided placement of bioresorbable fibers into pancreatic adenocarcinoma tumors achieves prolonged adenoviral gene transfer. **Journal of Surgical Research**. v.121(2), p.330, 2004.

BEHL, C.R.; KUMAR, S.; MALICK, W.; PATEL, S.B.; CHAR, H.; PIEMONTESE, D. Choice of membranes for *in vitro* skin uptake studies and general experimental technics. In: KEMPPAINEN, B.W.; REIFENRATH, W.G. **Methods for Skin Absorption**. Florida: CRC Press, p.3, 1990.

BIERMAN, C.J. Hydrolysis and other cleavage of glycosidic linkages. In: BIERMAN, C.J.; MCGINNIS, G.D. **Analysis of carbohydrates by GLC and MS**. Florida: CRC Press, p.27, 1989.

- BONACUCINA, G.; CESPI, M.; MISICI-FALZI, M.; PALMIERI, G.F. Rheological, adhesive and release characterization of semisolid Carbopol/tetraglycol systems. **International Journal of Pharmaceutics**. v.307, p.129, 2006.
- BRESOLIN, T.M.B.; BELTRAMINI, L.M.; SANDER, P.C.; REICHER, F.; GANTER, J.L.M.S.; Physicochemical aspects of intermolecular interaction of the galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella* Benth. **Latin American Applied Research**, v.26, p.5, 1996.
- BRESOLIN, T.M.B.; SANDER, P.C.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R.; RINAUDO, M.; GANTER, J.L.M.S. Viscometric studies on xanthan and galactomannan systems. **Carbohydr.Polym.** v.33, p.131, 1997.
- BRESOLIN, T.M.B.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; GANTER, J.L.M.S. Xanthan-galactomannan interactions as related to xanthan conformations. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.23, p. 263, 1998.
- BRESOLIN, T.M.B.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; REICHER, F.; GANTER, J.L.M.S. Role of galactomannan composition on the binary gel formation with xanthan. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.26, p.225, 1999.
- BRONAUGH, R.L. Diffusion cell design. In: SHAH, V.P.; MAIBACH, H.I. **Topical drug bioavailability, bioequivalence and penetration**, Plenum Press, New York/London, p.117, 1993.
- BUETTNER, G.R.; JURKIEWICZ, B.A. Chemistry and biochemistry of ascorbic acid. In: CADENAS, E.; PAKER, L. **Handbook of Antioxidants**. (Eds.) Marcel Dekker, New York, p.91, 1996.
- CARDOSO, A.T.M. **Desenvolvimento do processo de obtenção de galactomanana em escala piloto a partir de sementes de bracinga**. Curitiba, 1995. Dissertação de Mestrado, Departamento de Tecnologia Química-UFPR.
- CHANDRESAKARAN, R.; RADHA, A. Molecular modeling of xanthan: galactomannan interaction. **Carbohydr. Polym.**, v.32, p.201, 1997.
- CHANG, M.L.; CHANG, C.M. Simultaneous HPLC determination of hydrophilic whitening agents in cosmetic products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.33, p.617, 2003.

CHAUBEY, M.; KAPOOR, V.P. Structure of a galactomannan from the seeds of *Cassia angustifolia* Vahl. **Carbohydrate Research**, v.332(4), p.439, 2001.

DEA, I.C.; MCKINNON, A.A.; REES, D. A. Tertiary and quaternary structure in aqueous polysaccharide systems which cell wall cohesion: reversible changes in conformation and association of agarose, carrageenan and galactomannans. **Journal of Molecular Biology**, v.14(68), p.153, 1972.

DEA, I.C.M.; MORRISON, A. Chemistry and interactions of sea galactomannans. **Advanced Carbohydrates Chemical Biochemistry** v.31, p.241, 1975.

DEUTSCH, J.C. Review of Dehydroascorbic acid. **Journal of Chromatography A**, v.881, p. 299, 2000.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K., REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v.28, p.350, 1956.

EBERHART, R.C.; SU, S.; NGUYEN, K.T.; ZILBERMAN, M.; TANG, L.; NELSON, K.D.; FRENKEL, P. Bioresorbable polymeric stents: current status and future promise. **J. Biomater. Sci:Polymer Ed.** v. 14, p. 299, 2003.

ECETOC, In: Percutaneous absorption. **European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals**, Brussels, Monograph, n.20, p.1, 1993.

FLYNN, G.L. Topical drug absorption and topical pharmaceutical systems, In: G.S. BANKER, C.T.RHODES (Eds.), **Modern Pharmaceutics**, Marcel Dekker, New York, p.263, 1990.

FISCHER, M.; REIMANN, S.; TROVATO, V.; REDGWELL, R.J. Polysaccharides of green arabica and robusta coffee beans. **Carbohydrates research**, v.330, p.93, 2001.

FRANZ, T.J. Percutaneous absorption—on the relevance of in vitro data. **J. Invest. Dermatol.** v.64, p.190, 1975.

FREITAS, R.A. **Estrutura e Interações entre Galactoxiloglucanas e Amidos**. Curitiba, 2003. Tese de Doutorado em Bioquímica-Departamento de Bioquímica, UFPR.

FURNISS, B.S.; HANNAFORD, A.J.; SMITH, P.W.G.; TATCHELL, A.R. Investigations and characterisation of organic compounds. In: VOGEL, A.I. **Vogel's: textbook of practical organic chemistry**: 5. Ed. London: Longman Scientific&Technical, p. 1225, 1989.

GALLARATE, M.; CARLOTTI, M.E.; TROTTA, M.; BOVO, S. On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use. **International Journal of Pharmaceutics** v.188, p.233, 1999.

GANTER, J.L.M.S. **Galactomanana de semenstes de *Mimosa Scabrella* (Bracatinga)**. Curitiba, 1988. Dissertação de Mestrado em Bioquímica-Departamento de Bioquímica, UFPR.

GANTER, J.L.M.S. **Estudo dos Carboidratos de Sementes de *Mimosa Scabrella* (Bracatinga). Análise dos Oligossacarídeos e Propriedades Reológicas da Galactomanana**. Curitiba, 1991. Tese de Doutorado em Bioquímica-Departamento de Bioquímica, UFPR.

GANTER, J.L.M.S.; MILAS, M.; CORRÊA, J.B.C.; REICHER, F.; RINAUDO, M. Study of solutions properties of galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*. **Carbohydr. Pol.**, v.17, p.171, 1992.

GANTER, J.L.M.S.; ZAWADSKI-BAGGIO, S.F.; LEITNER, S.C.; SIERAKOWSKI, M.R.; REICHER, F. Structural studies on galactomannans from Brazilian seeds. **J. Carbohydrate Chemistry**, v. 12(6), p. 753, 1993.

GANTER, J.L.M.S.; HEYBRAUD, A.; PETKOWICZ, C.L.O.; RINAUDO, M.; REICHER, F. Galactomannans from Brazilian seeds: characterization of the oligosaccharides produced by mild acid hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 17, p. 13, 1995.

GANTER, J.L.M.S., CARDOSO, A.T.M., KAMINSKI, M.; REICHER, F. Galactomannan from seeds of *Mimosa scabrella*: a scale-up process. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.21, p. 137, 1997.

GANTER, J.L.M.S.; REICHER, F. Water-soluble galactomannans from seeds of *Mimosaceae spp.* **Bioresearch Technology**, v.68, p.55, 1999.

GEESIN, J.C.; GORDON, J.S.; BERG, R.A. Regulation of collagen synthesis in human dermal fibroblasts by the sodium and magnesium salts of ascorbyl-2-phosphate. **Skin Pharmacology**, v.6, p.65, 1993.

GOATES, C.Y.; KNUTSON, K. Enhanced permeation and stratum corneum structural alterations in the presence of dithiothreitol, **Biochim. Biophys. Acta** v.1153, p.289, 1993.

GOYCOOLEA, F.M.; MILAS, M.; RINAUDO, M. Associative phenomena in galactomannan-deacetylated xanthan systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.29, p.181, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Antioxidant protection by low-molecular-mass agents: compounds derived from the diet. In: HALLIWELL, B. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3. ed. New York: Oxford University Press Inc. p. 201.1999.

HARTREE, E. F. Determination of protein a modification as the Lowry method gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v.48, p.422, 1972.

HUEBER, F.; SCHAEFER, H.; WEPIERRE, J. Role of transepidermal and transfollicular routes in percutaneous absorption of steroids: in vitro studies on human skin, **Skin Pharmacology**. v.7, p.237, 1994.

KAMEYAMA, K.; SAKAI, C.; KONDOH, S. Inhibitory effect of magnesium-L-ascorbyl-2-phosphate (VC-PMG) on melanogenesis in vitro and in vivo. **J. Am. Acad. Pharmacol.**v.7, p.237, 1994.

KAVANAGH, G.M.; ROSS-MURPHY, S.B. Rheological characterization of polymer gels. **Prog. Polym Sci.**, v.312, p.139, 1998.

KNUTSON, K.; POTTS, R.O.; GUZEK, D.B.; GOLDEN, G.M.; McKIE, J.E.; LAMBERT, W.J.; HIGUCHI, W.I. Macro and molecular physical-chemical considerations in understanding drug transport in the stratum corneum. **Journal of Controlled Release**, v.2, p.67, 1985.

KOBAYASHI, S.; TAKEHANA, M.; ITOH, S. Protective effect of magnesium-L-ascorbyl-2-phosphate against skin damage induced by UVB irradiation. **Photochem. Photobiol**, v.64, p.224, 1996.

- KRESZE, G.B. Methods for protein determination. In: BERGMAYER, J.; GRASSL, M. **Methods of enzymatic analysis**. 3.ed., Weinheim: Verlag Chemie. v.III, p.92, 1983.
- KRUMEL, K.L.; SARKAR, N. Flow properties of gums useful to the food industry. **Food Technology**, v.29, p. 36, 1975.
- KULKARNI, R.K. Biodegradable poly(lactic acid) polymers. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.5, p.169, 1971.
- LAPASIN, R.; PRICL, S. Rheology of polysaccharide systems. In: **Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications**. London: Black Academic & Professional, p. 251, 1995.
- LEVENE, C.I.; BATES, C.J. Ascorbic acid and collagen synthesis, **Ann. New York Acad. Sci.** v.258, p.288, Suppl. 1975.
- LI, W.; WANG, Q.; CUI, S.W.; HUANG, X.; KAKUDA, Y. Elimination of aggregates of (1→3)(1→4)-β-D-Glucan in dilute solutions for light scattering and size exclusion chromatography study. **Food Hydrocolloids**. v.20, p.361, 2006.
- LIN, S.C.; LEE, W.I.; SCHURR, J.M. Brownian motion of highly charged poly(L-lysine): effects of salt and polyion concentrations. **Biopolymers**. v. 17, n.4, p.1041, 1978.
- LYKKESFELDT, J.; LOFT, S.; POULSEN, H .E. Determination of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with coulometric detection- Are They Reliable Biomarkers of Oxidative Stress. **Analytical Biochemistry**, v.229, p.329, 1995.
- LOPES, L.; ANDRADE, C.T.; MILAS, M.; RINAUDO, M. Role of conformation and acetylation of xanthan on xanthan-guar interaction. **Carbohydr, Polym.**, v.17, p.121, 1992.
- LUPO, M.P. Antioxidants and vitamins en cosmetics. **Clinics in Dermatology**, v.19, p.467, 2001.
- LUCYSZYN, N. **Galactomananas: Novas Fontes do Biopolímero e Aplicações na Indústria Alimentícia**. Curitiba, 1994. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Química - Departamento de Tecnologia Química, UFPR.

- MA, L.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Viscoelastic properties of xanthan gels interacting with cations. **Journal of Food Science**, v.62, p. 1124, 1997.
- MAJURKKA SUHONEN, T.; BOUWSTRA, J.A.; URTTI, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. **Journal of Controlled Release**, v.59, p.149, 1999.
- MILAS, M.; RINAUDO, M. Investigation on conformational properties of xanthan in aqueous solutions. **ACS Symposium Series**. P. 25, 1981.
- MORRIS, E. R. Molecular origin of xanthan solution properties. In: SANDFORD, P.A.; LASKIN, A. **Extracellular Microbial Polysaccharide**, Washington: ACS, p.81, 1977.
- MORRIS, E.R. Rheology of hydrocolloids. In: G. O. PHILLIPS; D.J. WEDLOCK; P.A.WILLIAMS. **Gums and Stabilizers for the Food Industry**, v.2, Oxford: Pergamon Press, p.57, 1984.
- NAÉ, H.N. Introduction of rheology. In: **Rheological properties of cosmetics and toiletries**. LABA, D. (Ed.), New York: Marcel Dekker, p.9, 1993.
- NGUYEN, K.T.; SHAIKH, N.; SHUKLA, K.P.; SU, S.H.; EBERHART, R.C.; TANG, L. Molecular responses of vascular smooth muscle cells and phagocytes to curcumin-eluting bioresorbable stent materials. **Biomaterials**, n.25, p.5333, 2004.
- NIKI, E. VitaminC as an antioxidant. **World Rev. Nutr. Diet**, v.64, p.1, 1991.
- NISHINARI, K.; TAKAHASHI, R. Interaction in polysaccharide solutions and gels. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v.8, p.396, 2003.
- NORTON, I. T.; GOODALL, D. M.; FRANGOU, S. A.; MORRIS, E. R.; REES, D. A. Mechanism and dynamics of conformational ordering in xanthan polysaccharide. **J. Mol. Biol.**, v.175, p.371, 1984.
- OECD – Guidance document for the conduct of skin absorption studies. **OECD Series on testing and assessment**, n.28 ENV/JM/MONO, 2004a.
- OECD – OECD guideline for the testing of chemicals. **Skin absorption: in vitro method**. 428. Adopted: 13 April 2004, p.1, 2004b.

PELTOLA, S.; SAARINEN-SAVOLAINEN, P.; KIESVAARA, J.; SUHONEN, T.M.; URTI, A. Microemulsions for topical delivery of estradiol. **International Journal of Pharmceutics**, v.254, p.99, 2003.

PERISSUTTI, G.E. **Galactomananas de *Mimosa scabrella* Bentham e proteínas do leite: Análise da interação entre os biopolímeros**. Curitiba, 2002. Tese de Doutorado em Bioquímica-Departamento de Bioquímica, UFPR.

PERISSUTTI, G.E.; BRESOLIN, T.M.B.; GANTER, J.L.M.S. Interaction between the galactomannan from *Mimosa scabrella* and milk proteins. **Food Hydrocolloids**.v.16, p.403, 2002.

PETKOWICZ, C.L.O. **Biopolímeros da semente de *Shizolobium amazonicum* (Pinho cuiabano): Galactomananas e Arabinanas**. Curitiba, 1993. Dissertação de Mestrado em Bioquímica-Departamento de Bioquímica, UFPR.

PETKOWICZ, C.L.O.; RINAUDO, M.; MILAS, M.; MAZEAU, K.; BRESOLIN, T.M.B.; REICHER, F.; GANTER, J.L.M.S. Conformation of galactomannan experimental and modelling approaches. **Macromolecules**, 1998.

PETKOWICZ, C.L.O.; MILAS, M.; MAZEAU, K.; BRESOLIN, T.M.B.; REICHER, F.; GANTER, J.L.M.S.; RINAUDO, M. Conformation of galactomannan: experimental and modelling approaches. **Food Hidrocol**. v.13, p.263, 1999.

PONEC, M.; WEERHEIM, A.; LANKHORST, P.; WERTZ, P. New Acylceramide in Native and Reconstructed Epidermis. *Journal of Invest Dermatology*, v. 120, p.581, 2003.

POTTS, R.O.; GUY, R.H. Predicting skin permeability. **Pharmaceutical Research**, v.9, p.663, 1992.

QUEVEDO, W.C.JR.; HOLSTEIN, T.J.; DYCKMAN, J.; MCDONALD, C.J.; ISAACSON, E.L. Inhibition of UVR-Induced Tanning and Immunosuppression by Topical Applications of Vitamins C and E to the Skin of Hairless (*hr/hr*) Mice. **Pigment Cell Research**. v.13, p.89, 2000.

RAO, M.A. **Measurement of Viscoelastic Properties of Fluid and Semisolid Food**. In: *Viscoelastic Properties of Foods*, RAO, M.A.; STEFFE, J.F. (Ed.) London: Elsevies, p. 207, 1992.

- RECCHIA, C.G.V. **Estudo de polissacarídeos de sementes de *Senna multijuga***. Curitiba, 1992. Dissertação de Mestrado em Bioquímica. Departamento de Bioquímica, UFPR.
- REES, D.A. Structure, conformation and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. **Adv. Carbohydr.Chem. Biochem.**, v.24, p.267, 1969.
- REICHER, F.; GANTER, J.L.M.S , Composição química e caracterização estrutural de galactomananas de espécies brasileiras. In: LAJOLO, F.M.; SAURO-CALIXTO, F.; PENNA, E.W.; MENEZES, E.W. **Fibra dietética en Iberoamérica: tecnología y salud: obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos**. Ed. Varela, p. 27, 2001.
- RIBEIRO, H.M.; MORAIS, J.A.; ECCLESTON, G.M. Structure and rheology of semisolid o/w creams containing cetyl alcohol/non-ionic surfactant mixed emulsifier and different polymers. **International Journal of Cosmetic Science**, v.26, p.47, 2004.
- RINAUDO, M. Polysaccharide characterization in relation with some original properties. **Journal of applied polymer science: applied polymer Symposium**. v.52, p.11, 1993.
- ROCKS, J.K. Xanthan gum. **Food Technology**, v.25, 1971.
- ROIG, M.G.; RIVERA, Z.S.; KENNEDY, J.F. A model study on rate of degradation of l-ascorbic acid during processing using home-produced juice concentrates. **Int.J.Food Sci.Nutr.** v.46, p.107, 1995.
- ROSALAM, S.; ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris sp.* **Enzyme and Microbial Technology**, 2006.
- SALTZMAN, W.M. **Drug Delivery – Engineering principles for Drug Therapy**, Oxford University Press, p. 336, 2001.
- SCCNFP Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients, updated October 2003, adopted by the SCCNFP during 35<sup>th</sup> plenary meeting of 20 october 2003. **The Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products intended for consumers**, SCCNFP/0750/03, p.1, 2003.

SCHAEFER, H.; REDELMEIER, T.E. Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Basel, Schweiz, S.Karger AG 1-310, 1996.

SCHELL, D.A.; BODE, A.M. Measurement of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in mammalian tissue utilizing HPLC and electrochemical detection. **Biomedical Chromatography**, v.7, p. 267, 1993.

SCHRAMM, G. Medidas do comportamento elástico de fluidos viscoelásticos. In: Schramm, G. **Reologia e reometria - Fundamentos teóricos e práticos**, São Paulo: Artliber Ed.Artliber, p.115, 2006.

SCHONROCK, U.; KRUSE, I., Use of flavones, flavanones and flavonoids for protecting ascorbic acid and/or ascorbyl compounds from oxidation, patente nº 20040109882, 2004.

STANKOWSKI, J.D.; MUELLER, B.E.; ZELLER, S.G. Location of a second *O*-acetyl group in xanthan gum by the reductive-cleavage method. **Carbohydr. Res.**, v.241, p.321, 1993.

STAUB, H.W.; ALI, R. Nutritional and physiological value of gums. In: GLICKSMAN, M. **Food Hydrocol.** Boca Raton: CRC Press, 1982, v.1, p.101.

STEWART, M.E.; DOWNING, D.T. A new 6-hydroxy-4-sphingenine-containing ceramide in human skin. **Journal Lipid Research**. v. 40, p.1434, 1999.

SU, S.; EBERHART, R.C. Expandable biodegradable polymeric stents for combined mechanical support and pharmacological or radiation therapy. US Patent application, published, Dec5, 2003.

SUGUI, J.A. **Aplicação de galactomanana de *Mimosa scabrella* (bracatinga): interação com surfactantes e proteínas.** Curitiba, 1994. Dissertação de Mestrado em Bioquímica. Departamento de Bioquímica, UFPR.

SUPACC-SS, FDA Guidance for Industry, Nonsterile Dosage Forms, SUPACC-SS, CMC7 3, p.19, 1997.

TAKO, M. Synergistic interaction between deacetylated xanthan and galactomannan. **Carbohydr. Polym.**, v. 10, p.619, 1991.

TAJIMA, S.; PINNELL, S.R. Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. Ascorbic acid increases type I procollagen mRNA, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 106, p. 632, 1982.

TOMITA, Y.; HARIU, C.; SEIJI, M. Inactivation of tyrosinase by dopa. **J. Invest Dermatol.**, v. 75, p.379, 1980.

TSAO, C.S.; YOUNG, M. A stabilised ascorbic acid solution. **Med Sci. Res.** v. 24, p. 473, 1996.

UGHINI, F.; ANDREAZZA, I.F.; GANTER, J.L.M.S.; BRESOLIN, T.M.B. Evaluation of xanthan and highly substituted galactomannan from *M. scabrella* as a sustained release matrix. **International Journal of Pharmaceutics** , v. 271, p.197, 2004.

VENDRUSCOLO, C.W.; ANDREAZZA, I.F.; GANTER, J.L.M.S.; FERRERO, C.; BRESOLIN, T.M.B. Xanthan and galactomannan (from *M.scabrella*) matrix tablets for oral controlled delivery of theophylline. **International Journal of Pharmaceutics**, v.296, p.1, 2005.

VERGELY, C.; MAUPOIL, V.; BENDERITTER, M.; ROCHETTE, L. Influence of the severity of myocardial ischemia on the intensity of ascorbyl free radical release and on postischemic recovery during reperfusion. **Free Radical Biol. Med.** v.24, p.470, 1998.

WAGGONER, P.J. Release Kinetics of protein loaded Biodegradable Polymer fibers. Master of Science in Biomedical Engineering, University of Texas, 2002.

WAGNER, H.; KOSTKA, K.H.; ADELHARDT, W.; SCHAEFER, U.F. Effects of various vehicles on the penetration of flufenamic acid into human skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.58, p.121, 2004.

WANG, Q.; ELLIS, P.R.; ROSS-MURPHY, S.B. The stability of guar gum in an aqueous system under acidic conditions. **Food Hydrocol.**, v.14, p.129, 2000.

WANG, C.C.; WU, S.M. Simultaneous determination of L-ascorbic acid, ascorbic acid-2-phosphate magnesium salt and ascorbic acid-6-palmitate in commercial cosmetics by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, in Press, 2006.

- WASHKO, P.; LEVINE, M. Inhibition of ascorbic acid transport in human neutrophils by glucose. **Journal of Biology Chemistry**, v.267, p.23568, 1992.
- WHISTLER, R. L.; DANIEL, J. R. Carbohydrates. In: O. R. FENNEMA (ed.) **Food Chemistry 2**, New York: Marcel Dekker, p.69, 1985.
- WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Review**, v.56, p.603, 2004.
- WILMOTT, J.M.; ZNAIDEN, A.P. Cosmetic preparation incorporating stabilized ascorbic acid, **Patente nº: 4.983.382**, 1991.
- WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Acetylation methods. **Methods Carbohydrates Chemistry**, v.2, p.211, 1963.
- YAMAMOTO, I.; MUTO, N.; MURAKAMI, K. Collagen synthesis in human skin fibroblasts is stimulated by a stable form of ascorbate, 2-O-alpha-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid. **J. Nutr.** v.122, p.871, 1992.
- ZAWADSKI-BAGGIO, S.F. **Arabinana e Galactomanana de Schizolobium parahybum; Estudo de Biossíntese de Galactomananas**. Curitiba, 1994. Tese de Doutorado em Bioquímica – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná.
- ZENG, W.; MARTINUZZI, F.; MCGREGOR, A. Development and application of a novel UV method for the analysis of ascorbic acid. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.36, p. 1107, 2005.
- ZHANG, L.; LERNER, S.; RUSTRUM, W.V.; HOFMANN, G.A. Electroporation-mediated topical delivery of vitamin C for cosmetic applications. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**. v.48, p.453, 1999.

## 7 – ANEXOS:

## 7.1. PERMEAÇÃO DO AA NO EXPERIMENTO EM CONDIÇÕES ÁCIDAS

X:GBAA

Célula	T0(µg/cm <sup>2</sup> )	T1(µg/cm <sup>2</sup> )	T2(µg/cm <sup>2</sup> )	T3(µg/cm <sup>2</sup> )	T4(µg/cm <sup>2</sup> )	T7 h (µg/cm <sup>2</sup> )	T 24 h (µg/cm <sup>2</sup> )	Membrana (µg/cm <sup>2</sup> )
A1	0,00006	0,00011	0,00008	0,00006	0,00007	0,00007	0,00006	0,00326
A4	0,00001	0,00009	0,00008	0,00006	0,00007	0,00007	0,00008	0,00314
A6	0,00009	0,00012	0,00010	0,00008	0,00007	0,00006	0,00006	0,00323
B2	0,00009	0,00006	0,00006	0,00006	0,00006	0,00006	0,00006	0,00234
B4	0,00008	0,00007	0,00006	0,00006	0,00007	0,00006	0,00007	0,00188
<b>Média</b>	0,00007	0,00009	0,00008	0,00006	0,00007	0,00006	0,00007	0,00277
<b>DP</b>	0,00004	0,00003	0,00002	0,00001	0,00001	0,00000	0,00001	0,00063

X:GGAA

Célula	T0(µg/cm <sup>2</sup> )	T1(µg/cm <sup>2</sup> )	T2(µg/cm <sup>2</sup> )	T3(µg/cm <sup>2</sup> )	T4(µg/cm <sup>2</sup> )	T7 h (µg/cm <sup>2</sup> )	T 24 h (µg/cm <sup>2</sup> )	Membrana (µg/cm <sup>2</sup> )
A2	0,00006	0,00016	0,00006	0,00006	0,00006	0,00006	0,00007	0,00298
A5	0,00008	0,00008	0,00008	0,00005	0,00009	0,00007	0,00007	0,00304
B1	0,00008	0,00006	0,00006	0,00007	0,00006	0,00007	0,00006	0,00255
B3	0,00009	0,00006	0,00006	0,00006	0,00006	0,00006	0,00006	0,00156
B5	0,00008	0,00006	0,00006	0,00005	0,00006	0,00006	0,00006	0,00260
<b>Média</b>	0,00008	0,00009	0,00007	0,00006	0,00007	0,00006	0,00007	0,00255
<b>DP</b>	0,00001	0,00004	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00059

## 7.2. PERMEAÇÃO DO AA NO EXPERIMENTO EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS

X:GBAA

célula	T0 (µg/cm <sup>2</sup> )	T1 (µg/cm <sup>2</sup> )	T2 (µg/cm <sup>2</sup> )	T3 (µg/cm <sup>2</sup> )	T4 (µg/cm <sup>2</sup> )	T7 (µg/cm <sup>2</sup> )	T 24 (µg/cm <sup>2</sup> )	Membrana (µg/cm <sup>2</sup> )
A2	0,000127	0,000124	0,000150	0,000126	0,000143	0,000139	0,000136	0,002900
A5	0,000116	0,000094	0,000112	0,000127	0,000136	0,000140	0,000132	0,002200
B1	0,000130	0,000130	0,000106	0,000124	0,000121	0,000129	0,000128	0,002600
B3	0,000125	0,000126	0,000111	0,000130	0,000129	0,000133	0,000133	0,002400
B5	0,000141	0,000139	0,000120	0,000129	0,000128	0,000131	0,000073	0,003200
<b>Média</b>	0,000128	0,000123	0,000120	0,000127	0,000131	0,000135	0,000120	0,002660
<b>DP</b>	0,000009	0,000017	0,000017	0,000002	0,000008	0,000005	0,000027	0,000397

## X:GGAA

célula	T0 (µg/cm <sup>2</sup> )	T1 (µg/cm <sup>2</sup> )	T2 (µg/cm <sup>2</sup> )	T3 (µg/cm <sup>2</sup> )	T4 (µg/cm <sup>2</sup> )	T7 (µg/cm <sup>2</sup> )	T 24 (µg/cm <sup>2</sup> )	Membrana (µg/cm <sup>2</sup> )
A1	0,000117	0,000124	0,000137	0,000147	0,000134	0,000133	0,000143	0,002700
A4	0,000124	0,000163	0,000126	0,000154	0,000140	0,000154	0,000131	0,002300
A6	0,000121	0,000126	0,000131	0,000140	0,000144	0,000140	0,000130	0,002300
B2	0,000137	0,000117	0,000114	0,000135	0,000139	0,000131	0,000125	0,002700
B4	0,000099	0,000117	0,000080	0,000143	0,000137	0,000135	0,000123	0,002100
<b>Média</b>	0,000119	0,000130	0,000118	0,000144	0,000139	0,000139	0,000131	0,002420
<b>DP</b>	0,000014	0,000019	0,000023	0,000007	0,000004	0,000009	0,000008	0,000268