

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INORGÂNICA**

**SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE  
NUTRACÊUTICOS- LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE MANGIFERINA A  
PARTIR DE MICROESFERAS DE PECTINA/QUITOSANA**

**José Roberto Rodrigues de Souza**

FORTALEZA

2008

JOSÉ ROBERTO RODRIGUES DE SOUZA

**SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE  
NUTRACÊUTICOS- LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE MANGIFERINA A  
PARTIR DE MICROESFERAS DE PECTINA/QUITOSANA**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química Inorgânica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química Inorgânica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Judith P. de A. Feitosa  
Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Nágila Maria P. S. Ricardo

FORTALEZA

2008

S715s Souza, José Roberto Rodrigues de  
Sistemas de liberação controlada de nutracêuticos – liberação in vitro de mangiferina a partir de microesferas de pectina / quitosana / José Roberto Rodrigues de Souza, 2008.  
81 f. ; il. color. enc.  
Possui artigo científico em anexo

Orientadora: Profa. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa  
Co-Orientadora ; Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo  
Área de concentração: Química Inorgânica  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências. Depto. de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza, 2006.

1. Polissacarídeo 2. Encapsulamento 3. Antioxidante I. Feitosa. Judith Pessoa de Andrade (orient.) II. Ricardo, Nágila Maria Pontes Silva (co-orient.) III. Universidade Federal do Ceará – Curso de Mestrado em Química Inorgânica IV. Título

CDD 546

## AGRADECIMENTOS

A Deus, amor universal, pela dádiva da vida.

Aos meus queridos pais, José Aderson de Souza e Antônia Rodrigues de Souza por toda a dedicação e amor.

Ao meu querido irmão, Carlos, pela amizade, companheirismo, e que mesmo diante de tantas dificuldades está sempre torcendo por mim.

Aos queridos amigos Wagner Coelho e Flávio Araújo pela amizade, companheirismo e irmandade ao longo desses últimos anos.

Às professoras Judith Feitosa e Nágila Ricardo, por todos os anos de orientação e amizade durante esse tão importante aprendizado de minha vida.

À professora Teresa Trevisan pela colaboração e orientação ao longo deste trabalho.

À professora Sandra Soares pela amizade.

À professora Regina pelas ajudas com RMN.

A todos os queridos amigos do Laboratório de Polímeros por toda amizade e companheirismo.

A todos os colegas do curso de graduação e pós-graduação pela amizade ao longo desses anos.

À funcionária Tereza, pelas análises termogravimétricas e ao funcionário Orlando, pelas orientações e compreensão, ambos sempre dispostos a ajudar.

Ao CENAUREM pelas análises de ressonância magnética nuclear.

Ao CNPQ, pela bolsa de Mestrado que possibilitou a realização deste trabalho.

## RESUMO

### SISTEMAS PÉCTICOS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE NUTRACÊUTICOS - LIBERAÇÃO IN VITRO DE MANGIFERINA

A incorporação de compostos nutracêuticos como vitaminas, probióticos, peptídeos bioativos e antioxidantes em sistemas alimentícios proporciona uma maneira simples de desenvolver novos alimentos funcionais que podem ter benefícios fisiológicos ou reduzir os riscos de doenças. Pectinas têm sido investigadas por sua capacidade de produzir esferas de géis de pectinato de cálcio contendo bioativos. Quitosana também tem sido muito utilizada na preparação de esferas por suas propriedades mucoadesivas. Neste estudo, três tipos de esferas de pectina/cálcio/quitosana com diferentes graus de reacetilação foram produzidas no intuito de encapsular um potente antioxidante natural extraído da manga, a mangiferina. Inicialmente, duas amostras de pectina cítrica foram caracterizadas por FTIR, <sup>1</sup>H RMN, Reologia e GPC. A pectina cítrica com menor grau de metoxilação foi escolhida para a preparação das esferas por apresentar melhores propriedades geleificantes. As esferas produzidas foram caracterizadas por FTIR, MEV e intumescimento. A formação do complexo pectina/cálcio/quitosana reacetilada foi observada por FTIR e MEV. Foi realizado um estudo de liberação controlada de mangiferina a partir de três tipos de esferas obtidas por duas metodologias diferentes. Os valores de percentual de liberação foram bastante significativos, chegando até 75%. O comportamento dos mecanismos de liberação de mangiferina das esferas de pectina/cálcio/quitosana mostrou que o bioativo foi liberado a partir da matriz principalmente por meio de relaxação das cadeias poliméricas.

## **ABSTRACT**

### **PECTINS BASED MATERIAL AS NUTRACEUTICAL DELIVERY SYSTEMS – *IN VITRO* RELEASE OF MANGIFERIN**

Incorporation of nutraceuticals compounds such as vitamins, probiotics, bioactive peptides and antioxidants in food systems provides a simple way to develop new functional foods that can have physiological benefits or reduce risks of disease. Pectins have been investigated for their ability to produce spheres of calcium pectinate gels containing bioactive. Chitosan has also been widely used in the preparation of beads due to its mucoadhesive properties. In this study, three types of spheres of pectin/calcium/chitosan with different degrees of reacylation were produced in order to encapsulate a powerful natural antioxidant extracted from mango, mangiferin. Initially, two samples of citrus pectin were characterized by FTIR, <sup>1</sup>H NMR, Rheology and GPC. The citrus pectin with the lowest degree of methoxylation was chosen for the preparation of beads due to its better gelling properties. The beads produced were characterized by FTIR, SEM and swelling. The formation of the reacylated complex pectin/calcium/chitosan was observed by FTIR and SEM. A study of controlled release of mangiferin was conducted from three types of beads obtained by two different methodologies. The values of percentage of release were quite significant, reaching up to 75%. The mechanisms behaviour for the release of mangiferin from spheres of pectin/calcium/chitosan showed that the bioactive was released from the matrix mainly through relaxation of the polymer chains.

# SUMÁRIO

<b><u>INTRODUÇÃO</u></b>	<b>1</b>
<b><u>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u></b>	
<b><u>Microesferas como sistemas de liberação controlada de fármacos</u></b>	<b>4</b>
<b><u>Nanopartículas</u></b>	<b>7</b>
<b><u>Considerações gerais sobre pectina</u></b>	<b>9</b>
<b><u>Consideração gerais sobre quitosana</u></b>	<b>13</b>
<b><u>Preparação das microesferas por geleificação ionotrópica</u></b>	<b>15</b>
<b><u>Considerações gerais sobre mangiferina</u></b>	<b>15</b>
<b><u>OBJETIVOS</u></b>	<b>18</b>
<b><u>METODOLOGIA</u></b>	
<b><u>Materiais</u></b>	<b>19</b>
<b><u>Métodos de preparação das esferas e caracterização</u></b>	<b>19</b>
<u>Preparação das esferas</u>	19
<u>Incorporação do princípio ativo mangiferina</u>	20
<u>Determinação do teor de íons cálcio por ICP-OES</u>	21
<u>Determinação da quantidade de bioativo incorporado</u>	21
<u>Ensaio de liberação do bioativo</u>	22
<u>Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)</u>	22
<u>Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C</u>	22
<u>Propriedades Reológicas</u>	23
<u>Medidas de Intumescimento</u>	23
<u>Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV</u>	23
<u>Cromatografia de permeação em gel (GPC)</u>	23

<b><u>Ensaio de preparação de nanocomplexos pectina/quitosana</u></b>	<b>24</b>
<u>Preparação das soluções polieletrólíticas</u>	24
<u>Nanopartículas de PEC/QT</u>	24
<u>Tamanho de partícula</u>	24

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Parte I – Estudo e Caracterização das pectinas**

<u>Espectroscopia de Infravermelho – Análise do grau de metilação</u>	25
<u>Determinação do Grau de Metilação das pectinas por RMN <sup>1</sup>H</u>	26
<u>Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)</u>	28
<u>Propriedades reológicas</u>	
<u>Comportamento de fluxo - Efeito da concentração</u>	30
<u>Comportamento viscoelástico - Efeito da concentração</u>	32
<u>Comportamento de fluxo - Efeito da concentração de pectina e de íons Ca<sup>2+</sup></u>	34
<u>Comportamento Viscoelástico - Efeito da concentração de pectina e de íons Ca<sup>2+</sup></u>	36

### **Parte II – Preparação e Caracterização das microesferas**

<u>Espectroscopia de Infravermelho</u>	37
<u>Microscopia eletrônica de varredura</u>	41
<u>Determinação do teor de íons cálcio por espectrometria de emissão atômica por plasma induzido (ICP-OES)</u>	42
<u>Medidas de Intumescimento – esferas não-reacetiladas</u>	43
<u>Medidas de Intumescimento – esferas reacetiladas</u>	45

<b><u>Ensaio de preparação de nanocomplexos pectina/quitosana</u></b>	<b>47</b>
<b><u>Parte III – Liberação controlada de mangiferina <i>in vitro</i> – Ensaio preliminar</u></b>	
<u>Ensaio de liberação de mangiferina <i>in vitro</i></u>	49
<u>Rendimento das partículas contendo mangiferina</u>	49
<u>Mecanismo de liberação do bioativo a partir das esferas</u>	51
<b><u>CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS</u></b>	<b>54</b>
<b><u>REFERÊNCIAS</u></b>	<b>55</b>
<b><u>ANEXO</u></b>	<b>64</b>

## **INTRODUÇÃO**

O surgimento de compostos dietéticos com benefícios à saúde oferece uma oportunidade excelente de melhorar a saúde pública. Conhecidos como nutracêuticos, esta categoria de compostos tem recebido muita atenção da comunidade científica, dos consumidores, e dos fabricantes de alimento nos últimos anos. A lista de compostos nutracêuticos (vitaminas, probióticos, peptídeos bioativos, antioxidantes etc) é muito vasta, e a evidência científica que apoia o conceito de ingredientes alimentícios promotores de saúde está crescendo firmemente (Wildman, 2001).

Muito embora a natureza da participação das substâncias nutracêuticas em funções fisiológicas não seja inteiramente compreendida, já é bem reconhecido que sua adição às matrizes alimentícias como meio simples de diminuir riscos de doença é bastante promissora no benefício à sociedade. Elas servem, também, para que a comunidade científica possa desenvolver alimentos funcionais inovadores com o potencial de produzir benefícios fisiológicos ou reduzir o risco de desenvolver doenças de longo prazo (Elliott & Ong, 2002). Por exemplo, não se pode enfatizar demasiadamente que apesar da pesquisa intensa e do progresso significativo no tratamento de diversas formas de câncer nas últimas duas décadas, a maioria dos tipos de câncer são ainda difíceis de curar e a prevenção a longo prazo continua sendo essencial, especialmente considerando que o tempo entre a degeneração celular inicial e a detecção clínica de um tumor maligno é de aproximadamente 10-15 anos.

A eficácia de produtos nutracêuticos em impedir doenças depende da preservação da biodisponibilidade dos ingredientes ativos. Isto representa um desafio, dado que somente uma proporção pequena das moléculas permanece disponível depois da administração oral, devido ao tempo de residência gástrica ser insuficiente, à baixa permeabilidade e/ou a solubilidade dentro do intestino, assim como à instabilidade sob as circunstâncias encontradas no processamento do alimento (temperatura, oxigênio, luz) ou no trato gastrointestinal (GI) (pH, enzimas, presença de outros nutrientes), tudo que

limita os benefícios de saúde da atividade e do potencial de moléculas nutracêuticas (Bell, 2001).

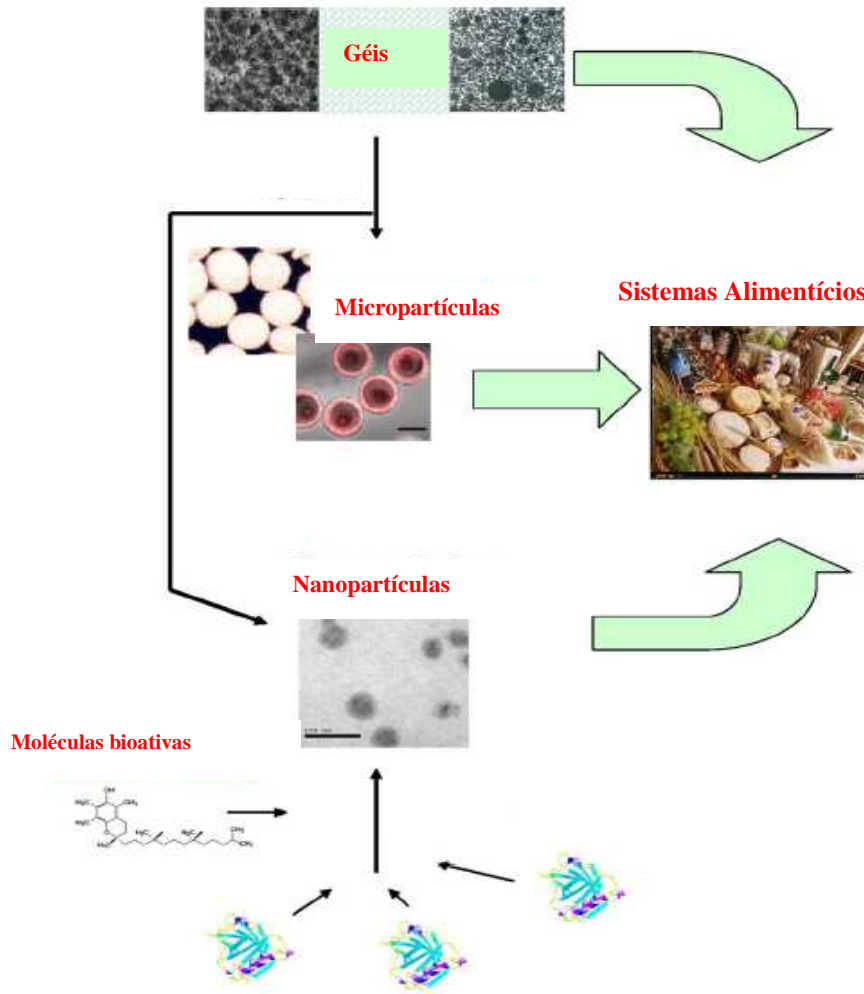
A liberação destas moléculas requererá conseqüentemente, formuladores e fabricantes de alimento para fornecer os mecanismos de proteção que: (1) mantenha a forma molecular ativa até o tempo de consumo e (2) libere esta fórmula ao alvo fisiológico dentro do organismo. Sistemas de liberação baseados em polímeros que prendem substâncias de interesse em suas redes moleculares foram desenvolvidos extensivamente para os setores biomédicos e farmacêuticos, com o objetivo de proteger e transportar compostos bioativos para as funções almejadas (Langer & Peppas, 2003; Peppas e col., 2000).

Apesar da elaboração bem sucedida de muitos polímeros sintéticos como sistemas de liberação, estes não podem ser usados em aplicações de alimento que requeiram compostos geralmente reconhecidos como seguros (GRAS - Generally Recognized as Safe).

Várias estratégias foram desenvolvidas para proteger e liberar moléculas bioativas. Uma que foi o assunto de numerosos estudos (Brannon-Peppas, 1993; Kamath & Park, 1993; Park & Park, 1996; Peppas, 1997) consiste em aprisionar moléculas de interesse em hidrogéis (Figura 1). Um hidrogel é uma rede infinita de polímeros hidrofílicos intumescida em água que pode inchar e armazenar uma grande quantidade de água, mantendo uma estrutura de rede (Qui & Park, 2001). Uma rede tridimensional é formada pela reticulação das cadeias poliméricas através de ligações covalentes, ligações de hidrogênio, interações de van der Waals, ou enredamentos físicos (Kamath & Park, 1993).

Durante a última década, os hidrogéis têm sido extensivamente estudados em aplicações biomédicas e farmacêuticas, devido principalmente à habilidade de proteger bioativos de ambientes hostis e os liberar como resposta a estímulos do ambiente como pH e temperatura (Qui & Park, 2001). Novos métodos sintéticos foram usados para preparar hidrogéis para uma gama extensa de aplicações em sistemas de liberação de fármacos (Park & Park 1996; Philipon, 1997; Qui & Park, 2001). Uma vantagem fundamental deste enfoque é que géis carreadores de nutracêuticos podem estabilizar a textura do

alimento, o que é uma característica altamente desejável no processamento de produtos alimentícios. Além disso, a presença de grupos ácidos (ex. carboxílico) e básicos (ex. amônio) em cadeias poliméricas que aceitem ou liberem prótons como resposta a mudanças no pH do meio (ácido no estômago e neutro no intestino), permite que a taxa de liberação de moléculas no gel possa ser modulada através de variações de pH (Chen e col., 2006).



**Figura 1** - Representação esquemática de materiais baseados em alimentos como sistemas de entrega de nutraceuticos (Chen e col., 2006).

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **Microesferas como sistema de liberação controlada de fármacos**

Nos últimos anos houve um interesse crescente no uso de sistemas poliméricos como carreadores de fármacos. Estes sistemas podem ser usados na forma de polímeros solúveis (no qual o fármaco pode ser ligado de alguma forma ao polímero) ou microesferas biodegradáveis (no qual o fármaco é incorporado) (Illum & Davis, 1988).

As vantagens potenciais de utilizar sistemas de liberação incluem: (1) manutenção contínua dos níveis do fármaco no sangue na faixa terapêutica desejada; (2) redução de efeitos colaterais prejudiciais devido à liberação vetorizada a algum tecido ou tipo de célula; (3) potencial de diminuir a quantidade de fármaco necessário; (4) diminuição do número de administrações do medicamento, levando a um maior comprometimento do paciente ao tratamento; e (5) facilidade na administração de fármacos com meia-vida biológica curta, por exemplo, proteínas e peptídeos (Langer, 1998). Por outro lado, ao desenvolvimento de cada sistema de liberação estão também associados outros aspectos como a toxicidade dos polímeros e seus produtos de degradação, o desconforto causado pelo sistema ou meio de inserção e o custo do sistema devido aos materiais de encapsulação ou técnicas de preparação (Langer, 1998).

O desenvolvimento de sistemas de liberação, em que a liberação do fármaco é de algum modo condicionado pelo sistema físico-químico onde está inserido, tem levado a um maior estudo dos mecanismos que ocorrem durante esse processo. Assim, enquanto a velocidade de dissolução é uma característica do fármaco, a velocidade de liberação é o resultado do sistema em que o fármaco está inserido (Costa & Lobo, 1999). Existem três mecanismos gerais pelos quais os fármacos são liberados a partir de sistemas poliméricos: (1) difusão do fármaco a partir do sistema de liberação; (2) uma reação química ou enzimática levando à degradação do sistema, ou clivagem do fármaco a partir do sistema; e (3) ativação do sistema de liberação através de osmose ou de intumescimento. Uma combinação destes mecanismos também é possível (Langer, 1998).

Por muitos anos a pesquisa na indústria farmacêutica esteve centrada na síntese de novas moléculas, mas, atualmente, cada vez mais tem aumentado o interesse na utilização de novos sistemas de administração de fármacos. Pode-se destacar a expectativa e os avanços da genética e da biotecnologia como uma potente ferramenta na descoberta de novos fármacos (Venter, 2001). Atentando-se ao fato de que estas moléculas têm uma fraca habilidade de atravessar a barreira gástrica, será necessário propor novas estratégias de administração (Jain e col., 1998).

O conceito de microencapsulação surgiu da idealização do modelo celular. Neste, a membrana que envolve e protege o citoplasma e os demais componentes exerce ao mesmo tempo outras funções, como controlar a entrada e saída de material na célula. Os primeiros relatos da utilização de microesferas datam da década de 30, porém a indústria farmacêutica só começou a aproveitar este sistema com maior intensidade a partir dos anos 60 (Burgess & Hickey, 1994).

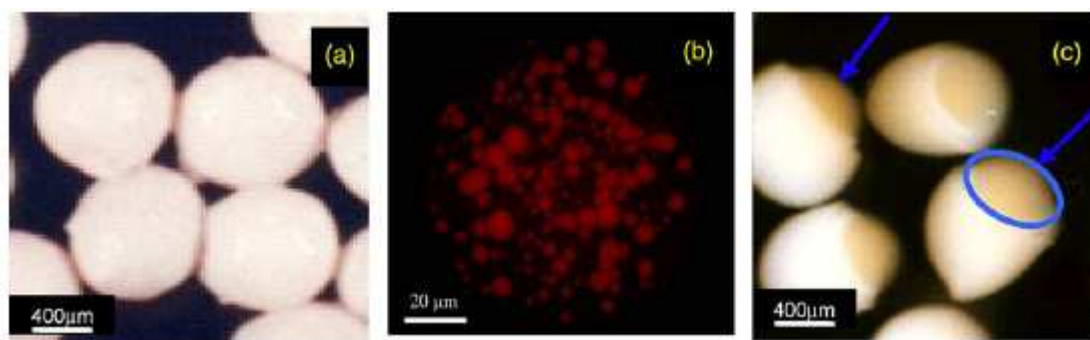
Para Benoit e col. (1996), este sistema pode ser definido como um sistema matricial micrométrico, composto de partículas aproximadamente esféricas em uma faixa de tamanho que vai de 1 a 1000  $\mu\text{m}$ , utilizando como principal matéria-prima polímeros biodegradáveis e biocompatíveis. A aplicação desta plataforma tecnológica para a área farmacêutica tem como principais interesses:

- proteção de fármacos contra agentes agressores externos (temperatura, oxidação, interação com outros excipientes, luz, umidade, calor, pH);
- vetorização de fármacos a sítios específicos de ação;
- possibilidade de modificação e controle da liberação de substâncias encapsuladas.

Existe uma variedade de polímeros biodegradáveis, podendo ser sintéticos ou naturais, embora poucos deles sejam biocompatíveis. Entre os polímeros sintéticos comumente usados no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, os polímeros e copolímeros dos ácidos láctico e glicólico são os mais utilizados devido a sua segurança e uso autorizado para aplicações em humanos (Amass e col., 1998).

Já entre os polímeros naturais utilizados na produção de microesferas pode-se citar a albumina (Kumar, 2000), gelatina (Ulubayram e col., 2002), colágeno (Rossler e col., 1995), pectina (Willats e col., 2006), quitosana (He e col., 1999), entre outros.

A Figura 2a mostra microesferas obtidas por um processo de emulsificação/geleificação a frio (Beaulieu e col., 2002). O princípio deste método está baseado em um passo emulsionante seguido por uma geleificação  $\text{Ca}^{2+}$ -induzida da proteína de soro pré-desnaturada. As esferas são formadas por um típico método 'top down' consistindo na extrusão de gotículas da suspensão em uma solução de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ).



**Figura 2** - Micrografias fluorescentes de micropartículas protéicas: (a) microesferas; (b) grânulos de proteína (10–20  $\mu\text{m}$ ); (c) esferas de proteína/alginato (Chen e col., 2006).

As condições de preparação influenciam a esfericidade e homogeneidade da microesfera, o que favorece uma forma mais regular. Na realidade, a alta concentração de  $\text{CaCl}_2$  resulta em glóbulos menores e uma rede mais homogênea. O aumento da concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  acelera a cinética de geleificação que conduz a um rápido aprisionamento e estabilização do bioativo pela rede protéica.

Partículas maiores geralmente liberam compostos encapsulados de forma mais lenta e em períodos de tempo mais longos, enquanto uma redução no tamanho de partícula introduz várias melhorias nos fatores de bio-adesão,

incluindo o aumento da força adesiva e o prolongamento do tempo de trânsito GI, levando a uma mais alta biodisponibilidade do bioativo (Chen e col., 2006).

## **Nanopartículas**

Da mesma forma que o prefixo "micro" entrou em uso difundido durante os anos oitenta, o prefixo "nano" foi co-optado para descrever a geração atual de tecnologias de dimensões reduzidas (The Royal Society, 2004).

Nanotecnologia refere-se ao desenvolvimento de materiais funcionais a uma escala de diâmetro menor que 100 nm (Lan e col., 2005; Vo-Dinh, 2005). Alguns autores definem nanopartículas poliméricas como partículas com menos de 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro que são preparadas a partir de polímeros naturais ou sintéticos (Hans & Lowman, 2002).

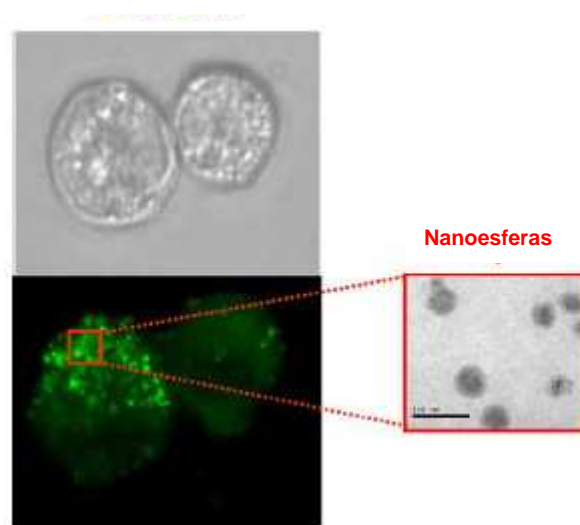
Embora as aplicações de partículas de dimensões nano em sistemas terapêuticos tenham sido bem documentadas e vários sistemas foram projetados para a entrega seletiva de bioativos de forma inteligente e modulada para áreas específicas no corpo no objetivo de maximizar a ação de bioativos e minimizar os efeitos colaterais, as nanotécnicas ainda são relativamente novas na indústria alimentícia. Devido ao seu tamanho subcelular, as nanopartículas oferecem meios promissores de melhorar a biodisponibilidade de compostos nutracêuticos, especialmente substâncias pouco solúveis como lipídios funcionais (por exemplo, carotenóides, fitoesteróis, ácidos graxos  $\omega$ -3), antioxidantes naturais, e outras numerosas combinações que são extensamente usadas como ingredientes ativos em vários produtos alimentícios. Eles podem prolongar bastante o tempo de residência do composto na área GI diminuindo a influência dos mecanismos de liberação intestinais e aumentando a superfície disponível para interagir com o meio biológico (Kawashim, 2001; Arbós e col., 2002).

Elas também podem penetrar profundamente em tecidos através dos vasos capilares, cruzarem as fenestrações do revestimento epitelial (por exemplo, no fígado) e são geralmente absorvidas eficientemente pelas células (Schäfer e col., 1992; Desai e col., 1997; Lamprecht e col., 2004), permitindo

então a entrega eficiente de compostos ativos para locais estratégicos no corpo.

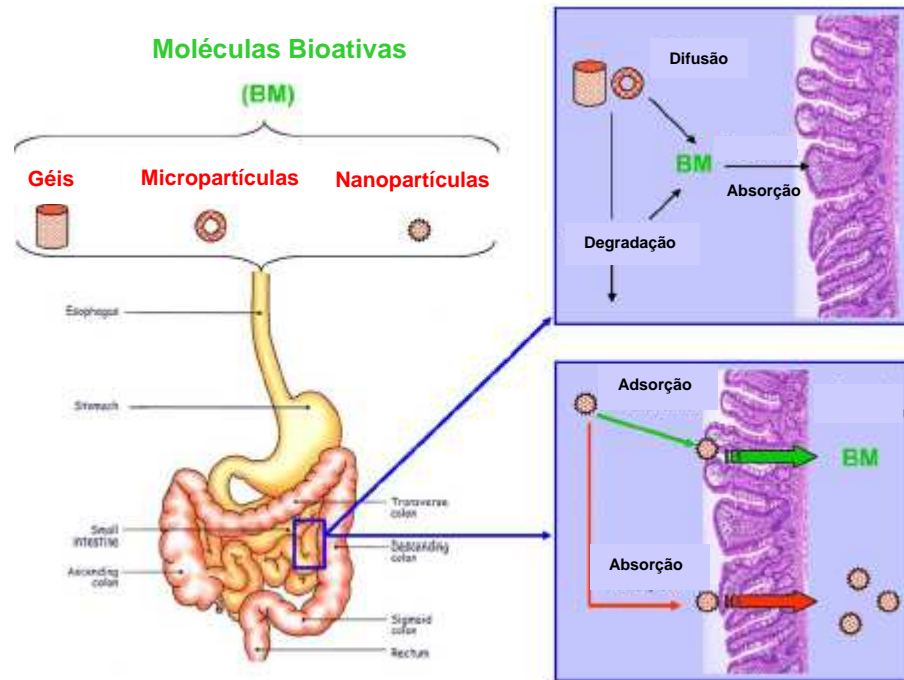
No intuito de melhorar a biodisponibilidade dos compostos nutracêuticos, a indústria alimentícia atualmente está tentando aumentar o tempo de circulação dos nanocarreadores convencionais na área GI.

O potencial dessas nanoesferas como carreadores para administração oral de agentes nutracêuticos foi estudado *in vitro* pelo monitoramento da interação entre nanoesferas (Figura 3) e células de origem intestinal (células Caco-2).



**Figura 3** - Imagens das células Caco-2 após incubação (acima) e na presença de nanoesferas (abaixo). A foto à direita mostra micrografias de transmissão eletrônica das nanopartículas (Chen e col., 2006).

As vantagens claras de matrizes alimentícias incluem seu alto valor nutricional; fontes renováveis abundantes e aceitabilidade como componentes alimentícios de ocorrência natural degradável através de enzimas digestivas. No caso de hidrogéis e micropartículas, os compostos nutracêuticos têm de ser liberados a partir da matriz para permitir a absorção pela parede intestinal, enquanto as nanopartículas podem melhorar a absorção do nutracêutico ou através da adsorção nas paredes GI e prolongando o tempo de residência ou pela entrada direta através do epitélio intestinal (Figura 4).

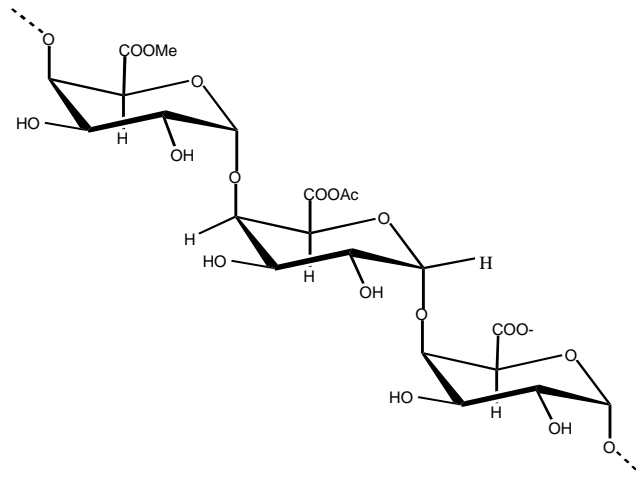


**Figura 4** - Representação esquemática de diferentes mecanismos de absorção de moléculas bioativas (Chen e col., 2006).

### Considerações gerais sobre pectina

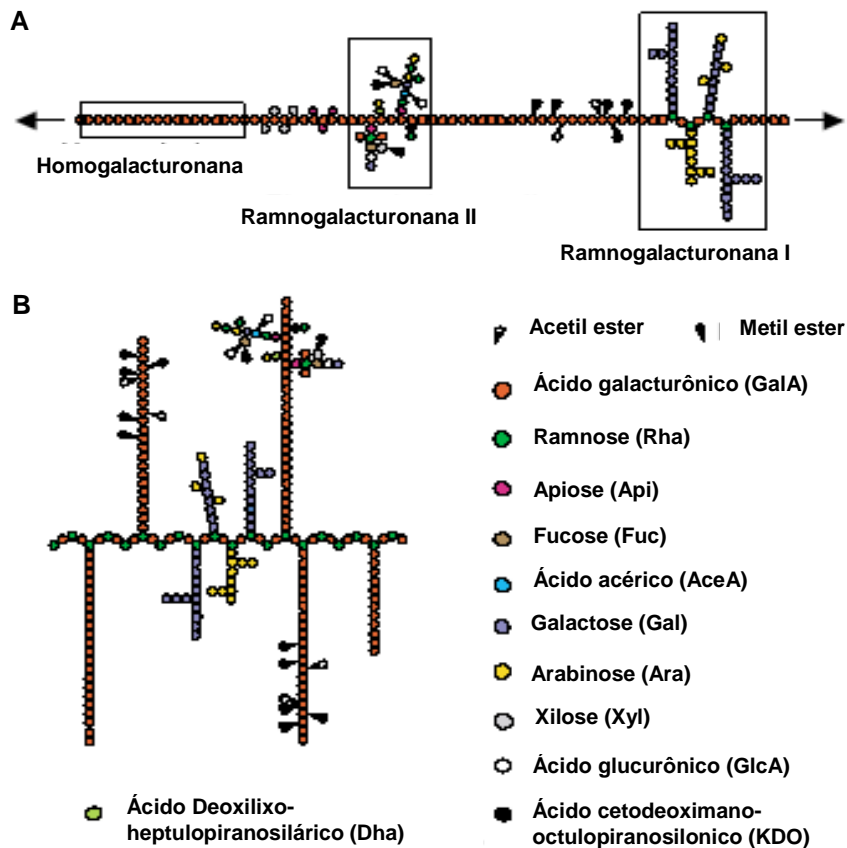
O termo 'pectina' descreve uma família de oligossacarídeos e polissacarídeos que possuem características comuns, mas são extremamente diversos em suas estruturas finas (Ridley e col., 2001). Porém, todas as pectinas são ricas em ácido galacturônico (GalA), e o FAO (site Food and Agriculture Organization of the United Nations) estipula que a pectina tem que consistir em pelo menos 65% de unidades GalA.

São reconhecidos três polissacarídeos pécticos principais, todos contendo GalA em uma maior ou menor extensão. A homogalacturonana (HG) é um polímero linear que consiste de 1,4- $\alpha$ -D-GalA (Figura 5), enquanto a ramnogalacturonana I (RGI) consiste de dissacarídeos repetidos de  $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalA - (1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow ]$  aos quais uma variedade de diferentes cadeias glicanas (principalmente arabinana e galactana) estão ligadas.



**Figura 5** – Estrutura de um fragmento de pectina (HG).

A chamada ramnogalacturonana II (RGII) tem uma cadeia principal de HG ao invés de RG, com cadeias laterais complexas ligadas aos resíduos de GalA (Ridley e col., 2001; Willats e col., 2001). Até pouco tempo era aceito que os domínios da ramnogalacturonana e da homogalacturonana constituíam a cadeia principal dos polímeros pécnicos como mostrado na Figura 6 (A). Porém, uma estrutura alternativa foi proposta há alguns anos, na qual HG é uma longa cadeia lateral de RGI (Figura 6B).



**Figura 6** - Estrutura básica da pectina. Representação esquemática das estruturas convencional (A) e de uma estrutura alternativa recentemente proposta (B) da pectina (Vincken e col., 2003).

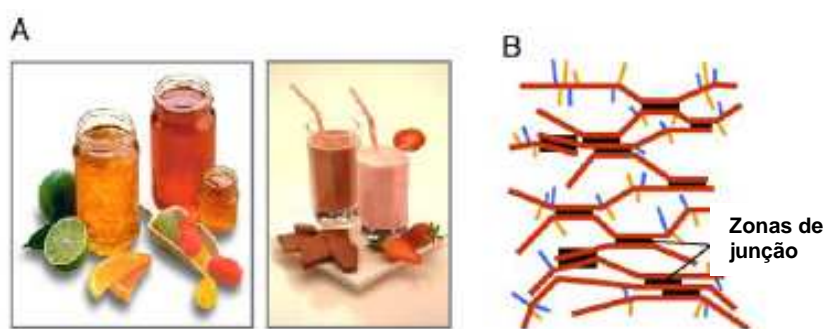
É importante notar que os polímeros mostrados aqui são apenas uma ilustração de alguns dos maiores domínios encontrados na maioria das pectinas.

Um fato que não se discute é que as pectinas são polímeros extremamente complexos e estruturalmente bem diversos. As estruturas finas das pectinas podem ser extremamente heterogêneas nas plantas, entre os tecidos, e até mesmo dentro de uma única parede celular. O comprimento de cadeia dos vários domínios pode variar consideravelmente, e a composição de açúcar da RGI também pode ser altamente heterogênea. Em contraste, pensa-se que a RGII tem uma estrutura altamente conservada.

Além disso, o GalA na HG pode estar metil-esterificado e acetilado. O grau de metilesterificação (GM) e o grau de acetilação (GA) têm um impacto

profundo nas propriedades funcionais. Por esta razão as pectinas são classificadas tradicionalmente como de alto ou baixo grau de metilesterificação com GM > 50% ou < 50% respectivamente (Rinaldo, 1996; Voragen e col, 1995).

Um gel de pectina é formado quando porções de HG são reticuladas para formar uma rede cristalina tridimensional na qual água e solutos são aprisionados (Figura 7B). Vários fatores determinam as propriedades geleificantes, dentre elas estão: a temperatura, o tipo de pectina, o GM, o GA, o pH, presença de açúcar, cálcio e outros solutos. Em pectinas de alta-esterificação, as zonas de junção são formadas pela reticulação da HG através de ligações de hidrogênio e forças hidrofóbicas entre os grupos metoxila, ambas promovidas pela alta concentração de açúcar e baixo pH. Em pectinas de baixo grau de esterificação as zonas de junção são formadas pela reticulação do cálcio entre os grupos carboxila livres.



**Figura 7** - Relações de função estrutural de géis de pectina. (A) Alguns dos produtos comerciais; (B) Zonas de junção da pectina (Vincken e col., 2003).

As frutas cítricas são uma das fontes mais importantes de pectina comercial, e estão mostrados aqui alguns dos produtos comerciais: marmeladas, gélias, gomas de fruta e bebidas de leite acidificadas fabricados por Danisco A/S pectina cítrica (Figura 7A). Os géis de pectina são formados quando os domínios de HG são unidos nas zonas de junção, formando uma rede cristalina que captura água e outras moléculas, como pode ser visto na Figura 7B.

## *A Pectina e a Saúde*

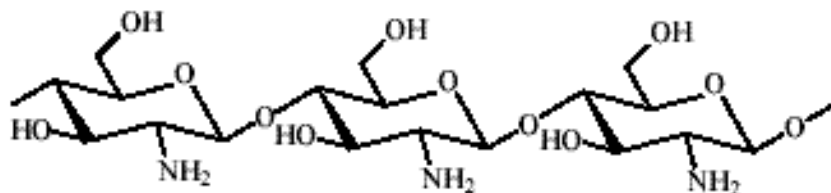
O efeito da pectina na saúde está recebendo interesse crescente. É geralmente aceito que uma dieta rica em fibras é benéfica à saúde e a pectina é um componente de fibra solúvel importante das frutas e legumes. Há uma clara evidência de que a pectina pode abaixar o nível de colesterol, glicose e também pode ter atividades anti-câncer (Yamada, 1996; Behall & Reiser, 1986). A pectina e oligossacarídeos pécticos induzem a apoptose em células humanas colônicas do tipo adenocarcinoma (Olano-Martin e col., 2003).

A maioria dos estudos envolve preparações de pectina relativamente bruta que contêm um grande número de domínios estruturais diferentes. Dessa forma tem sido impossível relacionar atividades específicas com estruturas moleculares definidas. Porém, é provável que novas técnicas para análises de pectina façam com que isso seja rapidamente possível. É bem importante que, os avanços em técnicas de separação cromatográfica e a química sintética permitam gerar domínios pécticos de alta pureza para uso em estudos com animais e em culturas de células *in vitro*. Bastante progresso está sendo obtido e a maioria das evidências indicam que as cadeias laterais complexas da pectina são importantes com respeito às atividades anti-câncer e outras propriedades bioativas (Yamada e col., 2003).

## **Considerações gerais sobre quitosana**

A história da quitosana data do penúltimo século, quando Rouget discute a forma desacetilada da quitosana em 1859 (Dodane & Vilivalam, 1998). A obtenção deste polissacarídeo linear é por desacetilação alcalina da quitina. Devido a uma solubilidade limitada da quitina em soluções aquosas, a quitosana é mais apropriada para aplicações industriais. Quitina é o principal componente de cutículas protetoras de crustáceos tais como caranguejos, camarões, lagostas e paredes de células de alguns fungos como *aspergillus* e *mucor* (Roberts, 1992). A quitina é um homopolímero linear composto de unidades N-acetil-glicosamina com ligações  $\beta$ -(1,4), enquanto que a quitosana compreende copolímeros de glicosamina e N-acetil-glicosamina (Torres e col.,

2005). A quitosana tem um grupo amino primário e dois grupos hidroxilas livres para cada unidade de monossacarídeo (Figura 8).



**Figura 8** - Estrutura química da quitosana totalmente desacetilada.

Devido a fácil disponibilidade de grupos amino livres na quitosana, este polímero é positivamente carregado em meios ácidos ( $\text{pH} < 6,5$ ) e desta forma reage com muitas superfícies/polímeros negativamente carregados e também faz quelação com íons metálicos (Fukuda, 1980). Quitosana é uma base fraca, sendo insolúvel em água e solventes orgânicos. No entanto, é solúvel em soluções aquosas ácidas diluídas ( $\text{pH} < 6,5$ ), a qual pode converter a unidade glicosamina na forma solúvel  $\text{R-NH}_3^+$  (Chandy & Sharma, 1990).

Precipita em soluções alcalinas ou com poliânions e forma um gel em pH baixo. Tem massa molar variando entre 3.800 e 2.000.000 g/mol e desacetilação de 66 a 95% (Kas, 1997). Entre as características importantes da quitosana que influenciam as propriedades de formulações estão tamanho de partícula, densidade, viscosidade, grau de desacetilação e massa molar (Sinha e col., 2004). Propriedades tais como: biodegradabilidade, baixa toxicidade e boa biocompatibilidade fazem este polímero favorável para uso em formulações farmacêuticas e bioprodutos (Illum e col., 2001), sendo extensivamente investigado para a preparação de microesferas como sistemas de liberação controlada. Maciel e col. (2006) sintetizaram géis de Quitosana e quitosana/goma do cajueiro reacetilados.

## **Preparação das microesferas por geleificação ionotrópica**

A geleificação ionotrópica consiste na extrusão de uma solução de pectina através de uma agulha em uma solução aquosa de cloreto de cálcio sob agitação. As esferas são removidas da solução iônica por filtração, lavadas com água destilada e secas a temperatura ambiente.

Ko e col. (2002) prepararam microesferas de quitosana pela técnica de geleificação ionotrópica utilizando o tripolifosfato como agente físico de reticulação, encapsulando felodipina. A liberação do fármaco a partir das microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato diminuiu quando o tempo de reticulação foi aumentado. Como uma vantagem apresentada por este método, está a não utilização de agentes de reticulação que podem induzir a efeitos tóxicos e outros efeitos indesejáveis (Dumitriu & Chornet, 1998).

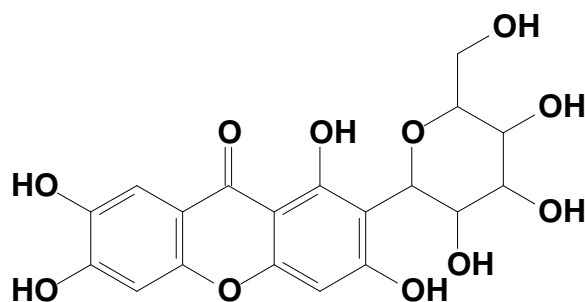
Kim e col. (2003) estudaram cápsulas de pectina geleificadas em cloreto de cálcio revestidas com quitosana para aumentar as propriedades mecânicas, a mucoadesividade e para controlar a liberação de albumina das cápsulas de pectina revestidas com quitosana para uso potencial como sistema de liberação de proteínas. Observaram também que fatores como concentração da solução de cloreto de cálcio, massa molar da quitosana, pH da solução de quitosana e meio de liberação possuem um efeito significativo no comportamento de liberação das cápsulas.

## **Considerações gerais sobre mangiferina**

*Mangifera indica* é uma espécie da família Anacardiaceae, do gênero *Mangifera*, conhecida popularmente como mangueira. Trata-se de uma árvore frutífera cujos frutos são conhecidos como mangas. É nativa do sul e do sudeste asiático desde o leste da Índia até as Filipinas e foi introduzida em países tropicais como Brasil, Angola e Moçambique. O nome da fruta vem da palavra *malayalam* manga e foi popularizada na Europa pelos portugueses que conseguiram a fruta através das trocas efetuadas por tempero na época das grandes navegações.

Uma manga fresca contém cerca de 15% de açúcar, até 1% de proteína e boas quantidades de vitaminas A, B e C, além de substâncias antioxidantes juntamente com alguns minerais. É atribuído à manga alto benefício no tratamento da anemia, devido à elevada quantidade de ferro que contém. Os altos teores de potássio, magnésio e antioxidantes indicam a manga como coadjuvante ao tratamento de problemas cardíacos, stress e imunostimulante.

A literatura relata a presença de vários constituintes químicos em *Mangifera indica* pertencentes às classes dos seguintes produtos naturais: terpenóides, flavonóides e xantonas. Mangiferina (1,3,6,7-tetrahidroxixantona-C2-D-glucosídeo) (Figura 9) é uma xantona glicosídica largamente distribuída em plantas de famílias como Anarcardiaceae (Roberts, 1992), Gentianaceae (Chun-Nan e col., 1982) e Guttiferae (Gerassim & Paraskev, 1998). Algumas delas têm sido recomendadas como plantas medicinais tradicionais (Quisumbing, 1978; Bhattacharya e col., 1972).



**Figura 9** - Estrutura da mangiferina (Pardo-Andreu e col., 2006)

Recentemente, as funções farmacológicas da mangiferina na alteração de mecanismos oxidativos têm recebido muita atenção (Sanchez e col., 2000). A mangiferina tem propriedades cardiotônicas (Srinivasan & Subramanian, 1981), diuréticas e forte atividade antioxidante no sistema biológico de peroxidação e sua capacidade pode ser o resultado de sua ação em limpar os radicais livres como, por exemplo,  $\text{OH}^-$  e  $\text{O}_2^-$  associado na iniciação da peroxidação de lipídio (Rastogi, 1968). Os antioxidantes interagem seguramente com radicais livres e terminam a reação de cadeia antes das moléculas vitais serem degradadas (Chitra & Pillai, 2002).

Na verdade, no presente, o impacto a respeito da mangiferina é devido aos seus efeitos farmacológicos como agente anti-câncer, anti-viral, e anti-diabético (Sanchez e col., 2000). As bioatividades observadas da mangiferina vêm sendo relacionadas a algumas funções antioxidantes e de captura de radicais livres (Andreu e col., 2005) visto que sua estrutura parece estar associada com certos sistemas flavonóides e suas atividades (Sato e col., 1992).

## **OBJETIVOS**

O objetivo geral deste trabalho é o estudo da produção de esferas de pectina/Ca<sup>2+</sup>/quitosana pelas técnicas de geleificação ionotrópica, com diferentes concentrações das soluções de pectina e de Ca<sup>2+</sup>; a avaliação das propriedades destas micropartículas e o estudo da liberação de mangiferina *in vitro* para uso nutracêutico em alimentos como iogurte, por exemplo.

Objetivos específicos:

- Estudo e caracterização de duas pectinas comerciais para descobrir qual seria a mais indicada para a preparação das esferas;
- Produção de esferas de pectina/Ca<sup>2+</sup> pela técnica de geleificação ionotrópica avaliando os efeitos da concentração da solução de cálcio e pectina sobre as esferas formadas;
- Revestimento das esferas de pectina/Ca<sup>2+</sup> produzidas, com solução de quitosana, avaliando o efeito da concentração da solução de quitosana e o tempo de reação sobre as características das partículas;
- Reacetilação do revestimento de quitosana das esferas de pectina/Ca<sup>2+</sup>/quitosana produzidas, avaliando o efeito da concentração da solução e o tempo de reação sobre as características das partículas;
- Caracterização e avaliação do potencial das esferas de pectina/Ca<sup>2+</sup>/quitosana reacetiladas e não-reacetiladas como veículos em sistemas de liberação de mangiferina.

## **METODOLOGIA**

### **Materiais**

↻ As amostras de pectina cítrica (PEC) foram obtidas da VETEC - Produtos Químicos (VP) e do NUTEC – Núcleo de Tecnologia do Ceará (NP), com graus de metilação de 48 e 59%, respectivamente (determinado neste trabalho por RMN <sup>1</sup>H).

↻ A quitosana (QT), com grau de desacetilação de 81% e massa molar  $2,35 \times 10^5$  g/ mol, utilizada no desenvolvimento do trabalho, foi cedida pela Quitoquímica (obtida pela desacetilação da quitina extraída de cascas de camarão).

↻ A mangiferina (Mang) foi obtida do caule da planta *Mangifera indica* e estudada e caracterizada por Barreto (2007).

### **Métodos de preparação das esferas e caracterização**

#### *Preparação das esferas*

O procedimento de preparação das partículas de pectina/cálcio e pectina/cálcio/quitosana é similar ao usado por Siriamornsak e Nunthanid (1998):

↻ Pectina de baixo grau de metoxilação foi dissolvida em água destilada na concentração de 6% m/v, gotejada numa solução de cloreto de cálcio 6 % m/v sob agitação lenta, através de uma agulha de 0,45 mm fixa a um tubo e conectada a uma bomba peristáltica.

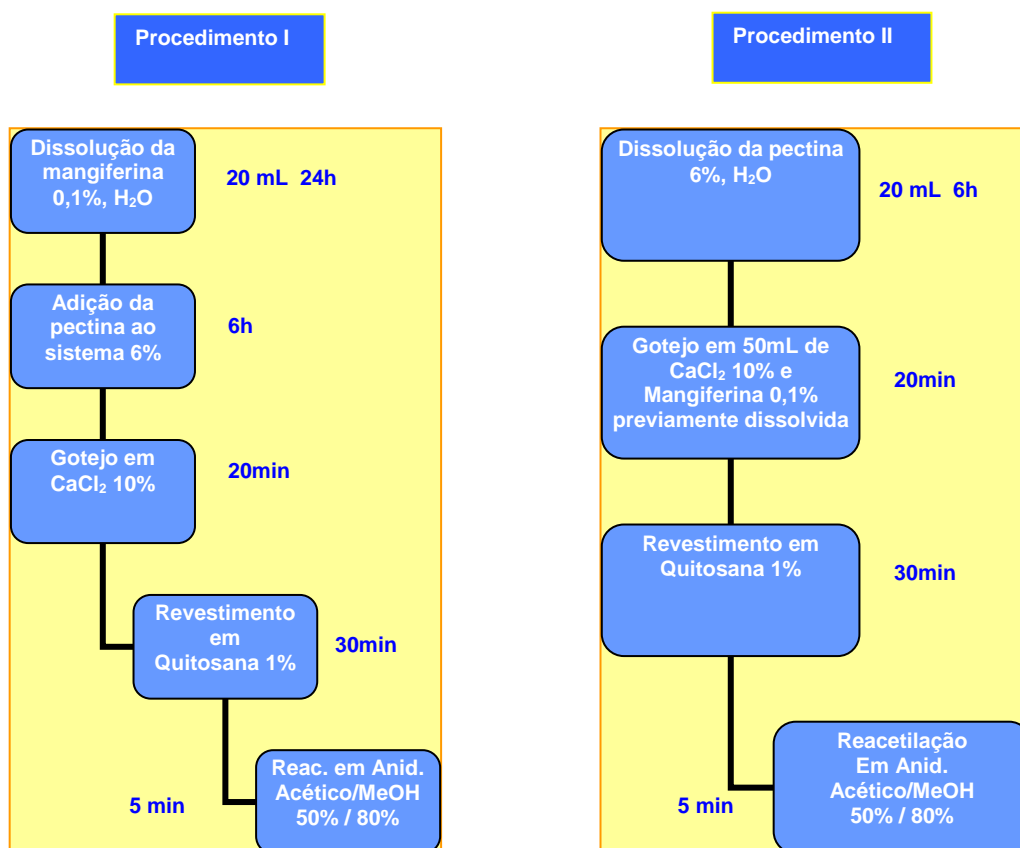
↻ Após a etapa de filtração as esferas de pectina previamente preparadas, foram transferidas para um recipiente contendo 25 mL de solução de quitosana e recobertas por 30 min sob agitação lenta. Em seguida, as esferas recobertas foram lavadas com água, filtradas e secadas à temperatura ambiente por 12 h. A solução de quitosana (1% m/v) foi preparada dissolvendo-se o polímero em

ácido acético 2% (m/v) e o valor do pH da solução foi ajustado para aprox. 6 adicionando-se solução de NaOH 4M.

⇨ Na etapa de reacetilação, as esferas foram modificadas usando uma solução de anidrido acético em metanol. Duas concentrações de anidrido foram utilizadas para fins de comparação: 50 e 80 %, à temperatura ambiente e agitação contínua por 5 min. Em seguida as esferas foram lavadas com metanol para remoção do excesso de anidrido.

#### Incorporação do princípio ativo mangiferina

⇨ Dois procedimentos foram desenvolvidos, após várias tentativas, para a obtenção das microesferas de pec/Ca<sup>2+</sup>/Qt reacetiladas contendo o bioativo mangiferina, no intuito de saber qual deles seria o mais eficiente (Figura 10):



**Figura 10** – Fluxograma da preparação das partículas contendo a mangiferina.

No procedimento I, a mangiferina foi adicionada à solução do polissacarídeo pectina (mang-pec), enquanto que no procedimento II, o bioativo foi adicionado à solução reticulante de  $\text{CaCl}_2$  (mang- $\text{CaCl}_2$ ).

Dessa forma, sete tipos de esferas foram produzidas (Tabela 1) através da metodologia de geleificação ionotrópica:

**Tabela 1** – Tipos de esferas produzidas.

<b>PCa</b>	Pectina/Cálcio
<b>PCaQt</b>	Pectina/Cálcio/Quitosana
<b>PCaQt50</b>	Pectina / Cálcio / Quitosana / 50% reacetilada (matrix);
<b>PCaQt80</b>	Pectina / Cálcio / Quitosana / 80% reacetilada (matrix).
<b>PCaQt50-M1</b>	Pectina / Cálcio / Quitosana / 50% reacetilada (mang - $\text{CaCl}_2$ );
<b>PCaQt50-M2</b>	Pectina / Cálcio / Quitosana / 50% reacetilada (mang - pec);
<b>PCaQt80-M</b>	Pectina / Cálcio / Quitosana / 80% reacetilada (mang - pec).

*Determinação do teor de íons cálcio por espectrometria de emissão atômica por plasma induzido (ICP-OES)*

Foram dissolvidos aproximadamente 10 mg de amostra de esferas em HCl 1M por 2h a 80 °C. As amostras foram filtradas em membranas Millipore com diâmetro de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  e o teor de cálcio foi quantificado por espectroscopia de emissão atômica por plasma induzido (ICP).

*Determinação da quantidade de bioativo incorporado*

A quantificação da mangiferina incorporada foi realizada através de extração em metanol devido à solubilidade do bioativo neste solvente. A quantidade de 0.045 g de esferas foi macerado e misturado com 8 ml de metanol. Após 24 h, em temperatura ambiente, a mistura foi filtrada e o extrato foi analisado em UV-VIS a 276 nm (Barreto et al., 2008). Os cálculos foram

realizados usando uma curva de calibração em metanol em uma faixa de concentração de 3.6 a 72 mg/l, com coeficiente de correlação linear de 0.9965.

#### *Ensaio de liberação do bioativo*

As esferas contendo mangiferina (massa de aproximadamente 0,15 g) incorporada foram colocadas em 20 mL de solução de fluido gástrico simulado (FGS) pH 1,2 por 2 h e então foram filtradas, lavadas com água destilada e colocadas em 20 mL de fluido intestinal simulado (FIS) pH 7,4, a 37 °C. Alíquotas de 3 mL foram recolhidas para análise no UV – Vis a 379 nm. As alíquotas foram retiradas no intervalo de 10 min na primeira hora, 20 min na segunda hora, e 30 min nas últimas 2 horas. Os cálculos foram realizados a partir de curvas de calibração nos meios de FGS e em FIS na faixa de concentração de 15-50 mg/l a 5.0-23 mg/l, respectivamente. Os coeficientes de correlação linear são 0.9998 e 0.9933 para as retas em FIS e em FGS, respectivamente.

#### *Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)*

Os espectros de infravermelho foram gravados em modo de absorbância à temperatura ambiente (na região entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ ) usando um espectrômetro Shimadzu modelo IRPrestige-21 com programa IRsolution acoplado. Um total de 10 varreduras foi medido com a resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . As amostras foram prensadas em pastilhas de brometo de potássio de pureza espectroscópica.

#### *Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$*

Os espectros foram obtidos em espectrômetros BRUKER modelo AVANCE-DMX-500 (CENAUREMN – DQOI- UFC), acoplados a transformador de Fourier. As amostras foram dissolvidas em água deuterada durante 12 horas. As frequências de observação dos núcleos foram de 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) e de 500 MHz ( $^1\text{H}$ ).

### *Propriedades Reológicas*

Todas as propriedades reológicas foram determinadas em um Advanced Rheometer AR550 (DP Union). A geometria cone-e-placa (40 mm de diâmetro e ângulo de 0° 59' 1") foi usada para ambas as medidas oscilatórias e de fluxo contínuo. A viscosidade de fluxo contínuo foi determinada em várias concentrações na faixa de 0.1-1000 s<sup>-1</sup>. As propriedades viscoelásticas, i.e. o módulo de armazenamento (G') e o módulo de perda (G''), foram determinados por testes oscilatórios de baixa amplitude em frequências de 0,1 a 5 rad/s. Antes de qualquer experimento dinâmico, uma rampa teste de deformação foi conduzida em uma frequência constante de 0,1 Hz para ajustar o limite superior da zona de viscoelasticidade linear. Todos os testes oscilatórios foram executados em um valor de deformação de 0,02 (2%), o qual estava dentro da região viscoelástica linear.

### *Medidas de Intumescimento*

O comportamento de intumescimento das partículas foi estudado através de medidas do diâmetro das partículas usando um microscópio óptico Olympus CH30. Todos os ensaios foram feitos em triplicata e o grau de intumescimento foi representado pela razão da média dos diâmetros das partículas intumescidas e das partículas secas. O aumento do diâmetro foi determinado como  $(D - D_p) / D_p$ , onde  $D_p$  é a média do diâmetro das esferas secas e  $D$ , a média das esferas intumescidas após um determinado intervalo de tempo.

### *Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV*

As microesferas foram analisadas e medidas em um equipamento Philips modelo XL-30 Holland, em baixa energia de 13 a 15 KV.

### *Cromatografia de permeação em gel (GPC)*

O GPC foi realizado em uma coluna de Ultrahydrogel Linear (7,8 x 300 mm) equilibrada com nitrato de sódio 0,1 M a 25 °C. Soluções (50 µL) foram carregadas na coluna e eluídas através de eluição superior a 0,5 mL/min. Sete soluções dos padrões polissacarídicos foram injetadas e os dados de tempo de retenção das amostras foram usados para construir uma curva de calibração

de regressão linear padrão do log da massa molar *versus* tempo de retenção, em minutos.

## **Ensaio de preparação de nanocomplexos pectina/quitosana**

### *Preparação das soluções polieletrólíticas*

A pectina foi dissolvida em água deionizada e a quitosana foi dissolvida em ácido acético 2,0 %, ambos os polissacarídeos na concentração de  $1 \times 10^{-3}$  M. Todas as soluções foram filtradas em membranas Millipore com diâmetro de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ .

### *Nanopartículas de PEC/QT*

Para a formação dos complexos, volumes pré-determinados das soluções poliméricas (Pec ou QT) foram gotejados lentamente sobre a outra solução com uso de uma bomba peristáltica e mantida sob forte agitação durante o gotejamento. O produto final foi deixado em repouso por 24 h. Foi verificado o efeito da ordem de adição e das proporções da solução polimérica adicionada.

### *Tamanho de partícula*

O diâmetro hidrodinâmico e a distribuição de tamanho das nanopartículas foram determinados a 25 °C utilizando o equipamento Nano Zetasizer da Malvern modelo ZEN 3500. O índice de polidispersão, que mede a variação ou distribuição no tamanho das cadeias poliméricas, também foi analisado para as amostras estudadas.

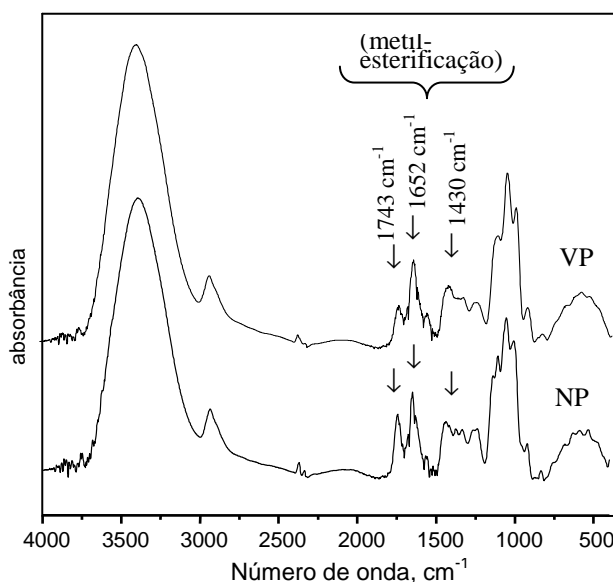
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Parte I – Caracterização das pectinas

#### *Espectroscopia de Infravermelho – Análise do grau de metilação*

Uma visão geral dos espectros de infravermelho das amostras de pectina é apresentada na Figura 11. A região dita “impressão digital” do espectro (até  $2000\text{ cm}^{-1}$ ), incluindo as bandas que contribuem para a energia de absorção ressonante das vibrações do ciclo piranosídico ( $950 - 1200\text{ cm}^{-1}$ ), assim como a região  $1200-1800\text{ cm}^{-1}$ , que caracteriza o estado dos grupos carboxílicos (Filippov, 1992; Kamnev e col., 1995; Zhbankov, 1992).

Apesar da similaridade geral dos espectros (Figura 11), uma análise detalhada mostra diferenças qualitativas (relacionada à posição das bandas) e quantitativas (caracterizado pela redistribuição das intensidades de absorção ressonantes relativas) nas regiões características que são indicativas de certas diferenças nas estruturas e composições das pectinas estudadas (Matora e col., 1995; Ptitchkina e col., 1994; Zhemerichkin & Ptitchkina, 1995).



**Figura 11** - Espectro de infravermelho das pectinas estudadas.

As regiões de estiramento O-H e C-H são menos informativas, devido principalmente às amplitudes (OH) e intensidades relativamente pequenas (CH) de bandas. Pode-se notar alguma intensidade fraca de bandas de

estiramento C-H ( $2800-3000\text{ cm}^{-1}$ ) para as pectinas, que pode ser atribuída a um grau de metil-esterificação relativamente baixo das pectinas (Kravtchenko e col., 1992; Zhemerichkin & Ptitchkina, 1995) e a um baixo conteúdo acetílico (Matora e col., 1995).

As amostras apresentaram ainda uma região característica do estado dos grupos carboxílicos (ca.  $1750 - 1350\text{ cm}^{-1}$ ). A banda em  $1743\text{ cm}^{-1}$  é referente ao estiramento C-O do grupo carboxílico não-ionizado (metilado ou protonado) e observa-se uma menor intensidade dessa banda para VP evidenciando um menor grau de metilação quando comparado a NP. A ionização (i.e formação de sais) leva ao seu desaparecimento, e duas novas bandas aparecem devido ao modos de estiramento simétrico e assimétrico da  $\text{COO}^-$  em aprox.  $1600 - 1650$  e  $1400 - 1450\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Por isso, em princípio, considerando as intensidades relativas das bandas nestas regiões, pode-se correlacioná-las à quantidade relativa e grau de esterificação dos grupos carboxílicos das amostras (Filippov, 1992).

#### *Análise das pectinas por RMN $^1\text{H}$ : determinação do GM (Grau de Metilação)*

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  foram obtidos a  $80\text{ }^\circ\text{C}$  com soluções diluídas de pectina em  $\text{D}_2\text{O}$  com o objetivo de diminuir a viscosidade da amostra. Obter o espectro a  $80\text{ }^\circ\text{C}$  tem a vantagem adicional de mudar o sinal da água residual para aproximadamente 4,2 ppm, onde ele não interfere em qualquer dos sinais de pectina. Os limites de integração foram definidos manualmente para cada espectro de acordo com sua aparência.

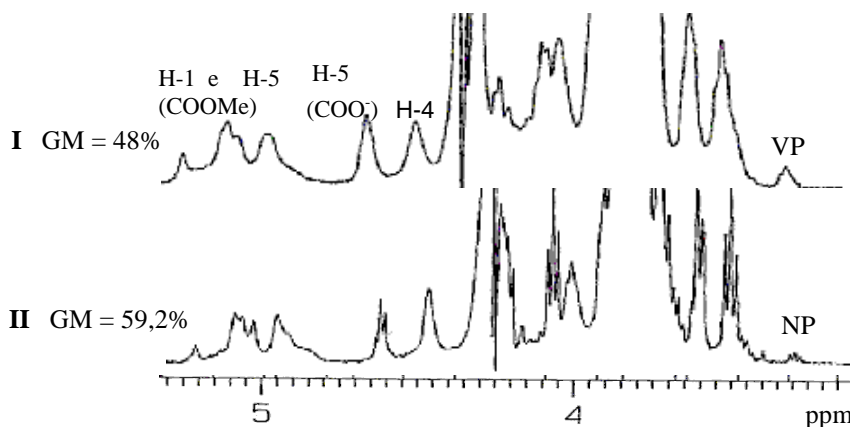
Os prótons H-5 adjacentes aos grupos carboxílicos livres são claramente vistos em 4,6–4,8 ppm onde os sinais para os prótons H-5 adjacentes aos grupos ésters sofreram deslocamento para aproximadamente 5,0 ppm, como pode ser visto ao compararmos os espectros I e II (Figura 12). O sinal dos prótons H-1 é encontrado na região mais baixa. Os prótons H-4 absorvem em torno de 4,4 ppm e são deslocados levemente abaixo quando metilado (Rosenbohm e col, 2003).

O grau de metilação (GM) é definido como a quantidade de grupos ésteres comparado a quantidade total de ácido carboxílico e grupos ésteres. Para a determinação do GM, as integrais de H-5 adjacentes ao éster ( $I_{\text{COOMe}}$ ) são comparadas à soma das integrais de H-5 adjacentes ao éster ( $I_{\text{COOMe}}$ ) e H-5 adjacente ao carboxilato ( $I_{\text{COO}^-}$ ).

Devido à grande proximidade (ou sobreposição) dos sinais para H-1 e H-5<sub>COOMe</sub>, é somente possível determinar as integrais combinadas para H-1 e H-5<sub>COOMe</sub> ( $I_{\text{H1}} + I_{\text{COOMe}}$ ). Este valor pode ser inserido na equação para o GM desde que a quantidade total de prótons H-5 é igual à soma dos prótons anoméricos H-1:  $I_{\text{COOMe}} + I_{\text{COO}^-} = I_{\text{H1}}$ . Após algumas manipulações matemáticas simples, o GM pode ser determinado a partir da Eq (1) (Rosenbohm e col, 2003):

$$\begin{aligned} \text{GM} &= \frac{I_{\text{COOMe}}}{I_{\text{COOMe}} + I_{\text{COO}^-}} = \frac{2 I_{\text{COOMe}}}{2 (I_{\text{COOMe}} + I_{\text{COO}^-})} \\ &= \frac{I_{\text{COOMe}} + I_{\text{COOMe}} + (I_{\text{COO}^-} - I_{\text{COO}^-})}{I_{\text{COOMe}} + I_{\text{COOMe}} + I_{\text{COO}^-} + I_{\text{COO}^-}} \\ &= \frac{(I_{\text{COOMe}} + I_{\text{H1}}) - I_{\text{COO}^-}}{(I_{\text{COOMe}} + I_{\text{H1}}) + I_{\text{COO}^-}} \end{aligned}$$

A determinação do GM por RMN<sup>1</sup>H teve como pioneiro Grasdalen (Grasdalen e col., 1988) que realizou análise detalhada da seqüência de ácido galacturônico livre e metil-ésteres em fragmentos tri- e tetramétricos de pectina. O objetivo era usar um método conveniente para análise do GM de pectinas de alta massa molar com diferentes graus de metilação, compostos que têm sido preparados pela modificação de pectina por meios químicos.



**Figura 12** - Espectros de  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ) de pectinas com diferentes graus de metoxilação (GM).

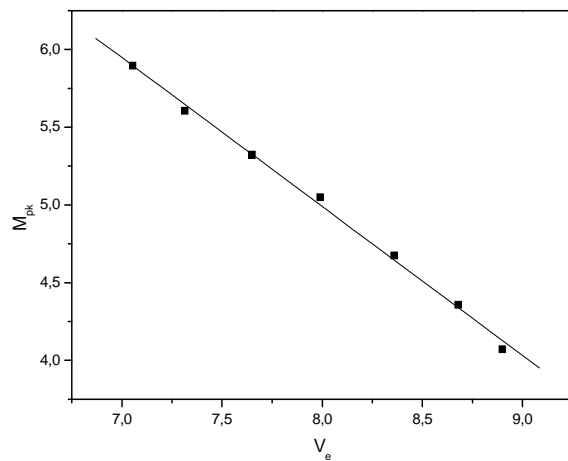
A caracterização das pectinas por RMN $^1\text{H}$  possibilitou a determinação do grau de metoxilação das duas pectinas comerciais. As pectinas NP e VP foram caracterizadas de acordo com o seu GM (maior ou menor que 50) como de alto e baixo grau de metoxilação (59 e 48%), respectivamente.

*Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)*

Para a determinação da massa molar de pico das duas amostras, foi feito uma curva padrão (Figura 13) utilizando-se pululanas de massas molares conhecidas e monodispersas, relacionando a resposta do volume de eluição de pico com a massa molar destas. O gráfico da curva padrão originou a equação da reta que relaciona a massa molar de pico em logaritmo com o volume de eluição (Equação 2).

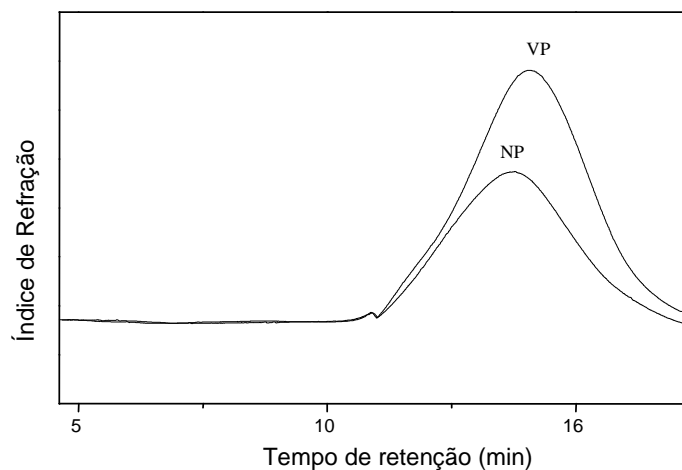
$$\log \text{Mpk} = 12,65 - 0,96 \text{ Ve}$$

Equação 02



**Figura 13** – Curva de Calibração das amostras de pullulana

As sete soluções dos padrões polissacarídicos foram injetadas e os dados de tempo de retenção das amostras foram usados para construir uma curva de calibração de regressão linear padrão do log da massa molar *versus* tempo de retenção, em minutos. As soluções de pectina foram preparadas de modo similar e a resposta pode ser vista na Figura 14.



**Figura 14** – Cromatograma das amostras de pectina.

A massa molar de pico das amostras de pectina cítrica pode ser vistas na Tabela 2 abaixo.

**Tabela 2.** Massa molar média de pico ( $M_{pk}$ ) das pectinas.

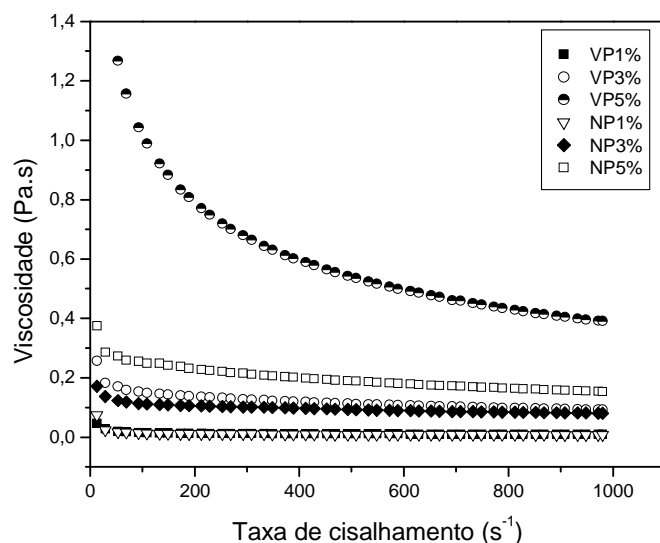
<b>Pectina</b>	<b><math>M_{pk}</math> (g/mol)</b>
VP	$2 \times 10^5$
NP	$3 \times 10^5$

Observa-se que VP, caracterizada como de baix grau de metilação, apresentou uma massa molar média de pico menor em relação a NP.

#### *Propriedades reológicas*

##### *Comportamento de fluxo - Efeito da concentração*

As curvas de fluxo das soluções de pectina nas concentrações de 1– 5% (w/v) a 25 °C são mostradas na Figura 15. O grupo de mais alta concentração (5 %) exibiu comportamento de fluxo pseudoplástico e ainda mais pronunciado na região de baixa taxa de cisalhamento. Para as curvas de fluxo de concentração de 1 e 3 %, valores significativamente mais baixos foram observados em um comportamento de fluxo Newtoniano. Resultados similares foram determinados no estudo feito por Singthong e col. (2005) com pectina extraída das folhas de *Cissampelos pareira*, uma espécie de planta utilizada na herbologia chinesa.



**Figura 15** - Curvas de fluxo de cisalhamento contínuo de soluções de pectinas em diferentes concentrações a 25 °C.

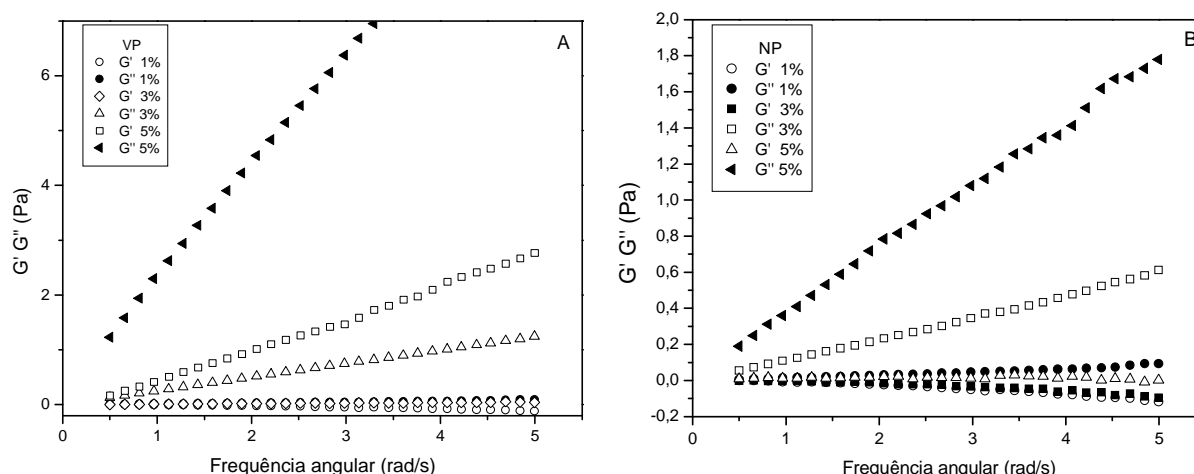
As mudanças de comportamento de fluxo das soluções de pectina em diferentes concentrações podem ser explicadas pelo efeito da concentração de polissacarídeos. É sabido que algumas cadeias polissacarídicas são capazes de formar estruturas ordenadas através de interligações cadeia-cadeia. Para sistemas poliméricos concentrados (neste caso, géis de pectina cítrica), a aplicação de uma força de cisalhamento ao sistema irá causar rupturas nas estruturas ordenadas, o que levará a um decréscimo da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento (Singthong e col., 2005).

Em soluções semi-diluídas (1% m/v), há uma constante formação e ruptura de interligações cadeia-cadeia. Às taxas de cisalhamento mais baixas, as taxas de ruptura e formação das interligações da cadeia polimérica estão em equilíbrio. Como resultado, as pectinas VP e NP em uma mesma concentração, mostradas na Figura 15, seguem quase a mesma tendência para um comportamento Newtoniano. Contudo, ao aumentar a concentração (3% e 5%), o polissacarídeo tende a exibir um comportamento de fluxo pseudoplástico mais pronunciado quando comparado a uma concentração mais baixa.

A solução VP 5% exibiu os mais altos valores de viscosidade em um comportamento predominantemente pseudoplástico. Em altas concentrações de polissacarídeo há conseqüentemente, uma concentração efetiva mais alta de cargas de íons carboxílicos, aumentando dessa forma, o volume hidrodinâmico da amostra e subseqüentemente a viscosidade, tendo em vista também o menor grau de metoxilação de VP.

#### Comportamento viscoelástico - Efeito da concentração

As propriedades viscoelásticas de VP e NP foram examinadas por medidas experimentais oscilatórias (Figura 16a e b). Nas concentrações de 1 a 5% a resposta mecânica foi predominantemente “líquida” onde os valores do módulo de perda ( $G''$ ) apresentaram-se mais baixos que o módulo de armazenamento ( $G'$ ) sob a faixa de freqüência acessível.

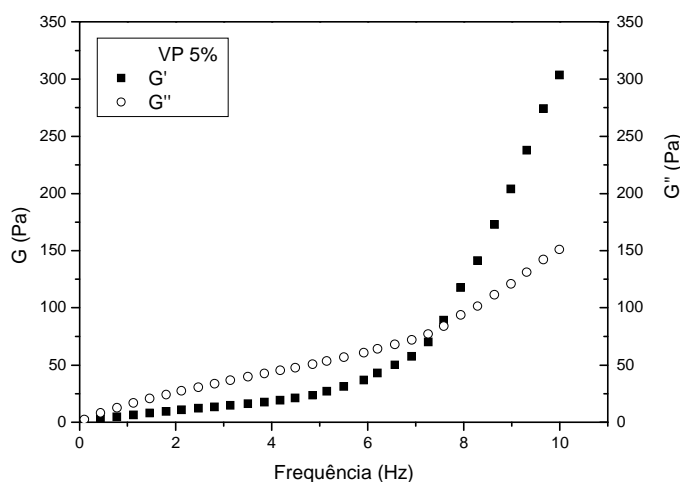


**Figura 16-** Dependência da freqüência dos módulos de armazenamento ( $G'$ ) e perda ( $G''$ ) das pectina (1-5%, m/v) a 25 °C, respectivamente: (a) VP; (b) NP.

As soluções de concentração mais baixa (1%) exibiram resposta mecânica semelhante. O mesmo ocorreu para a solução de concentração 3%. Quando a concentração polimérica foi aumentada para 5%, a solução de VP exibiu uma resposta “sólida” mais pronunciada (valores de  $G'$  mais altos) quando comparada com as soluções de NP, apresentando melhores propriedades

geleificantes nesta concentração. Estes resultados também estão de acordo com o estudo de reologia dinâmica realizado por Singthong e col. (2005) com pectina extraída das folhas de *Cissampelos pareira*.

Muito embora em uma mesma concentração polimérica, os módulos de VP tenham sido bem mais altos que os de NP, o comportamento permaneceu o mesmo. De qualquer forma, a resposta mecânica mudou significativamente para VP quando medida a frequências mais altas: o sistema se comportou como um gel, onde o módulo de perda foi maior que o módulo de armazenamento em frequências mais baixas e o inverso foi observado em frequências mais altas (acima de 7,8 Hz) (Fig. 17).

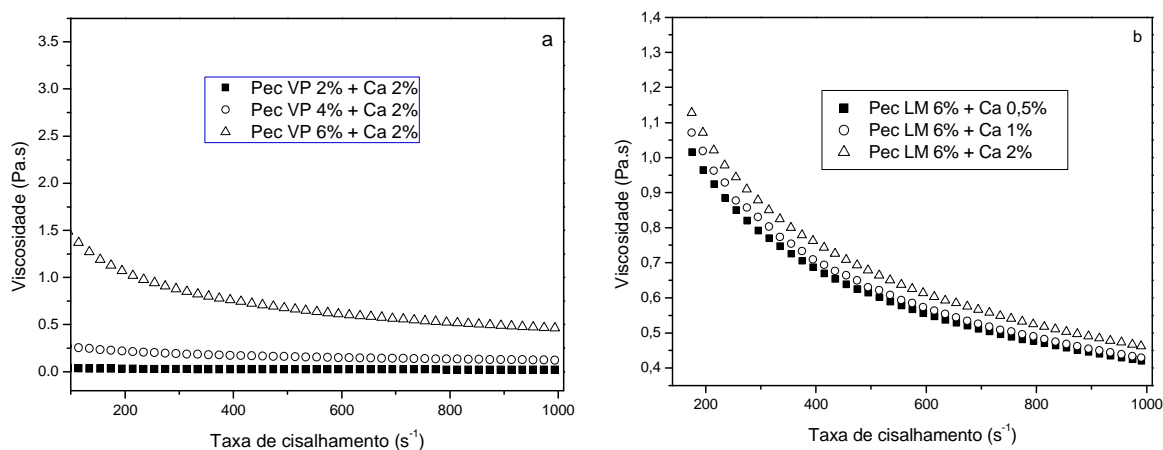


**Figura 17** - Determinação do ponto de geleificação para VP a 25 °C.

Durante o processo,  $G'$  continuou a aumentar com o aumento da frequência. Observa-se que a força do gel é altamente dependente da frequência. A forte consistência do gel de VP é concordante com a observação prévia obtida por medidas de cisalhamento contínuo, na qual valores de viscosidade mais altos foram atribuídos a uma concentração efetiva mais alta de cargas em VP.

Comportamento de fluxo – Efeito da concentração de pectina e de íons  $\text{Ca}^{2+}$ 

Os experimentos reológicos foram realizados com o objetivo de analisar as interações entre a pectina e os íons cálcio. As curvas de fluxo das soluções de pectina na presença de íons cálcio são mostradas nas Figuras 18 a e b.

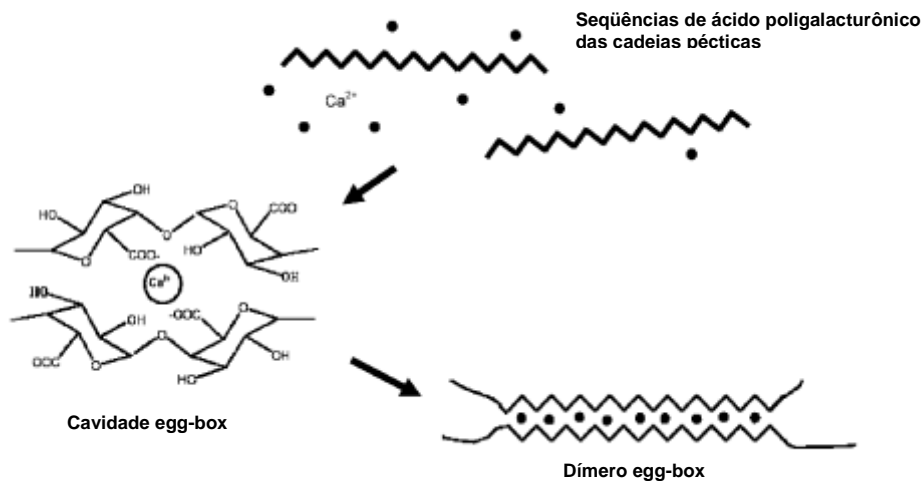


**Figura 18** - Curvas de fluxo de cisalhamento contínuo de soluções pecticas em diferentes concentrações do polissacarídeo e de íons  $\text{Ca}^{2+}$  a 25 °C. (a) variação da concentração de pectina de 2 (■), 4 (○) e 6 (△) %, respectivamente, com uma concentração constante de cálcio (2%). (b) variação da concentração de cálcio de 0,5 (■), 1 (○) e 2 (△) %, respectivamente, com uma concentração constante de pectina (6%).

Foram realizados dois estudos, sendo o primeiro (Figura 18a) com a variação da concentração do polissacarídeo de 2–6%, em presença de uma concentração constante de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . No segundo estudo (Figura 18b), manteve-se uma concentração constante do polissacarídeo, mas variou-se a concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  de 0,5 - 2%. Observa-se na Figura 18a que o grupo de mais alta concentração (4 e 6%) exibiu comportamento de fluxo pseudoplástico, e mais pronunciado na região de baixa taxa de cisalhamento. Para a curva de fluxo da concentração mais baixa (2%), valores significativamente mais baixos foram observados em um comportamento de fluxo Newtoniano. Variando-se a concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 18b),

observa-se em todas as concentrações um aumento gradativo nos valores de viscosidade com maiores valores quando na presença de 2% de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Capel e col. (2006) estudou a influência da concentração de íons cálcio na reologia dinâmica de uma pectina amidada e observou que alta concentração de cálcio levou às soluções estáveis levando à formação de géis. Capel e col. observou também que o comportamento entre uma pectina amidada e uma não amidada é muito similar.

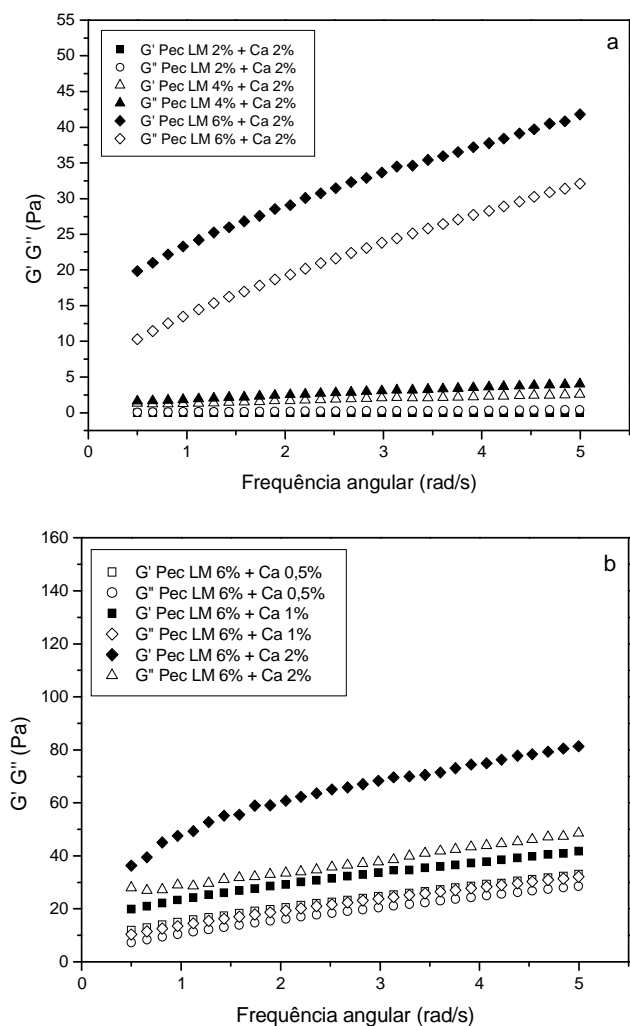
Vale ressaltar que o aumento nos valores de viscosidade deve-se à gelatinização da solução. Ligações cruzadas são formadas entre os íons  $\text{Ca}^{2+}$  e os grupos carboxílicos negativamente carregados, das moléculas de pectina, levando à formação de estruturas conhecidas como caixas de ovos (“egg-box”), Figura 19).



**Figura 19** – Ilustração esquemática do modelo “egg-box” (Tho e col., 2005).

Comportamento Viscoelástico - Efeito da concentração de pectina e íons  $Ca^{2+}$

As propriedades viscoelásticas das soluções de pectina e  $Ca^{2+}$  também foram examinadas por medidas experimentais oscilatórias como pode ser visto na Figura 20 a e b.



**Figura 20** - Dependência da frequência para os módulos de armazenamento ( $G'$ ) e perda ( $G''$ ) das soluções de pectina/ $Ca^{2+}$  a 25 °C. (a) variação da concentração de pectina de 2 (( $G'$ ■), ( $G''$ ○)), 4 (( $G'$ △), ( $G''$ ▲)) e 6 (( $G'$ ◆), ( $G''$ ◇)) % respectivamente com uma concentração constante de cálcio (2%). (b) variação da concentração de cálcio de 0,5 (( $G'$ ■), ( $G''$ ○)), 1 (( $G'$ △), ( $G''$ ▲)) e 2 (( $G'$ ◆), ( $G''$ ◇)) % respectivamente com uma concentração constante de pectina (6%).

Em todas as concentrações de pectina e cálcio a resposta mecânica foi predominantemente de um material mais consistente, haja vista que os valores do módulo de armazenamento ( $G'$ ) apresentaram-se mais altos que o módulo de perda ( $G''$ ) sob a faixa de frequência acessível.

As soluções de concentração pectínica mais baixa (2%) exibiram resposta mecânica semelhante. O mesmo ocorreu para as soluções na concentração de 4%. Quando a concentração polimérica foi aumentada para 6%, valores de  $G'$  mais altos foram obtidos quando comparada as soluções de concentrações mais baixas, apresentando melhores propriedades geleificantes nessa concentração.

Pode-se observar também que a solução de mais alta concentração (6%) apresentou mais alta dependência da frequência.

## **Parte II – Preparação e Caracterização das microesferas**

Devido ao seu menor grau de metoxilação, a pectina da Vetec (VP) foi escolhida para a preparação das microesferas de PCaQt.

### *Espectroscopia de infravermelho*

A Figura 21 mostra os espectros de infravermelho das amostras analisadas. No espectro de PCa a banda de baixa intensidade em  $1735\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao grupo C=O do ácido não-ionizado e de éster está em concordância com o baixo GM da pectina (Kamnev et al., 1998).

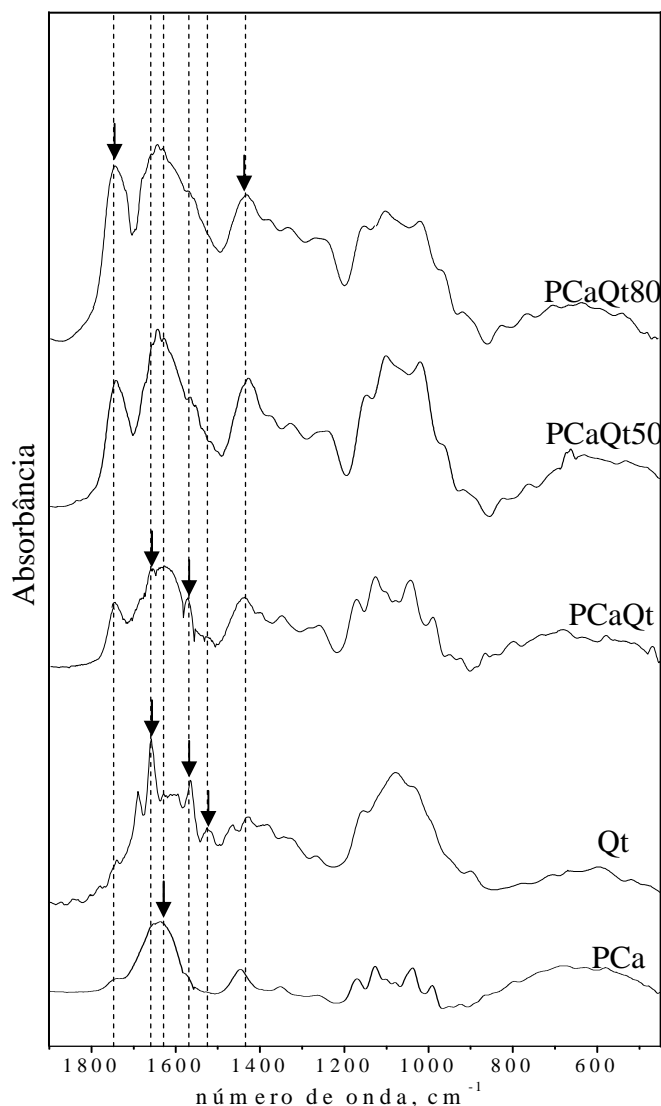


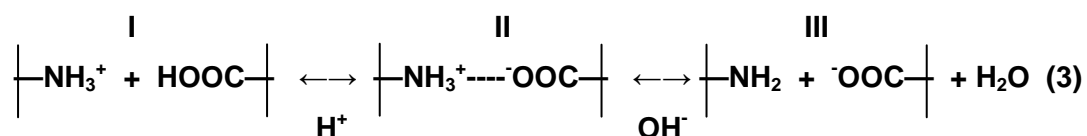
Figura. 21 – Espectros de FTIR das amostras de esferas

Esta banda no espectro da pectina (dado não mostrado) é mais intensa e a banda em torno de  $1640 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{COO}^-$ ) está mais fraca. A intensificação na banda de  $\text{COO}^-$  e a redução na banda de  $\text{C=O}$  (ácido e éster) indicam que a banda remanescente em  $1643 \text{ cm}^{-1}$  no espectro de PCa é realmente devido ao grupo carboxílico da fração éster da pectina.

A presença de quitosana nas esferas de PCaQt pode ser observada pelo aparecimento da banda em  $1561 \text{ cm}^{-1}$ , atribuído a  $\text{NH}_2$  e  $\text{NH}$  de quitosana, também notado no espectro deste polissacarídeo. As fracas absorções na

região de 1510-1530  $\text{cm}^{-1}$  e próximo a 1630  $\text{cm}^{-1}$  (Lawrie et al., 2007) indicam a presença de grupo amino protonado da quitosana nos espectros de PCa e PCaQt. A banda em 1735  $\text{cm}^{-1}$ , atribuído a COOH e C=O de grupo éster no espectro de PCa é intensificado quando esta esfera está coberta com quitosana. Levando em conta que a interação pectina-quitosana não aumenta a quantidade de grupo éster da pectina, uma possível explicação é a protonação parcial de grupos carboxilatos levando ao aumento do grupo COOH. De fato, o ombro em torno de 3230-3240  $\text{cm}^{-1}$  (parte do espectro não mostrado), devido ao OH do ácido, torna-se mais pronunciado no espectro de PCaQt, em concordância com a suposição de protonação do carboxilato. Um decréscimo na absorvância das bandas do grupo carboxilato (1641, 1431  $\text{cm}^{-1}$ ) não foi possível de ser verificado devido à superposição com outras bandas.

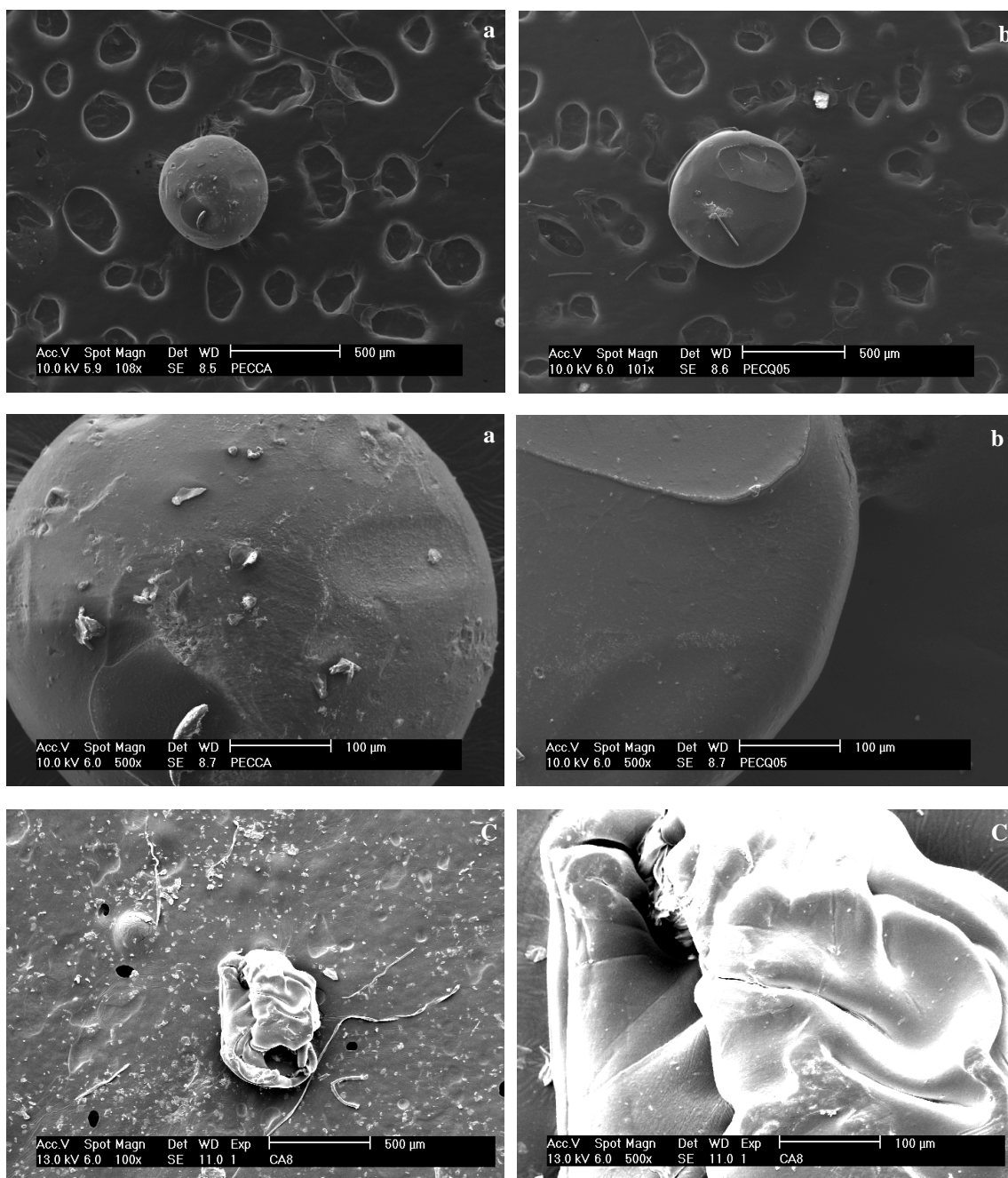
A protonação parcial da pectina não é o comportamento usual observado quando a pectina interage com a quitosana (equação 3, Bernabé et al., 2005). Normalmente, neste e em outros sistemas, pectina é misturada com quitosana em meio ácido e um complexo polieletrólítico do tipo II é formado (Rashidova et al., 2004). Nos sistemas presentes, prótons do meio ácido e/ou dos íons  $\text{NH}_3^+$  da quitosana provavelmente deslocam íons cálcio da superfície da esfera de PCa dando COOH. A interação entre pectina e quitosana pode se dar através de ligações de hidrogênio. O deslocamento da banda C=O de 1735  $\text{cm}^{-1}$  (PCa) para 1744  $\text{cm}^{-1}$  (PCaQt) sugere que o ambiente eletrônico em torno de COOH da pectina muda com a interação com moléculas de quitosana e fortalece esta hipótese.



Algumas mudanças podem ser notadas no espectro de PCaQt após a reacetilação da quitosana (PCaQt50 e PCaQt80), devido à transformação dos grupos amina em amida. A absorção da banda em 1560-1561  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída principalmente ao grupo amina da quitosana no espectro de PCaQt, diminui nos espectros de PCaQt50 e PCaQt80. A proporção relativa dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{C=O}$  na quitosana deveriam aumentar. Isso é verificado respectivamente pela intensificação nas bandas em 1430  $\text{cm}^{-1}$  e em 1644-1645  $\text{cm}^{-1}$ , em comparação com a quitosana. A absorvência da banda em 1744  $\text{cm}^{-1}$ , devido a  $\text{C=O}$  de  $\text{COOH}$  de pectina aumenta significativamente. Um aumento concomitantemente na absorvência do ombro em 3230-3240  $\text{cm}^{-1}$  (parte do espectro não mostrado) atribuído a  $\text{OH}$  de ácido carboxílico foi observado, especialmente em PCaQt80. O anidrido acético, usado para a reacetilação da quitosana, provavelmente penetra nas esferas, no núcleo da pectina, reage com moléculas de água para dar ácido acético e causa a protonação do carboxilato e a liberação de cálcio. Quanto mais concentrado está o anidrido acético, maior penetração é esperada e mais ácido é obtido.

*Microscopia eletrônica de varredura*

As esferas resultantes tiveram formas aproximadamente esféricas (Figura 4). Os diâmetros médios foram  $660 \pm 7$  e  $670 \pm 13$   $\mu\text{m}$  para as esferas PCa e PCaQt, respectivamente. A cobertura de quitosana é muito fina, de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 22** - Microfotografias das microesferas de pectinato de cálcio: (a) PCa; (b) PCaQt e (c) PCaQt80.

Uma fina camada de quitosana foi também observada na pectina recoberta com quitosana, até mesmo com pectinas de diferente grau de metilesterificação (GM 26%) e quitosana (massa molar alta e média) (Kim et al., 2003).

A superfície da esfera de pectinato de cálcio mostrou uma superfície mais rugosa, enquanto que aquelas recobertas com quitosana apresentaram uma superfície mais lisa. Uma mudança drástica no formato da esfera com quitosana reacetilada pôde ser observada. A esfera PCaQt80 mostrou uma superfície mais irregular, rugosa e colapsada. Isso se deve provavelmente ao processo de reacetilação da quitosana. A alta volatilidade do anidrido acético pode promover um rápido processo de secagem, com liberação de água do núcleo de pectina causando mudanças no formato da esfera. A interação do anidrido acético e/ou ácido acético com a pectina dando COOH pode também contribuir para a forma colapsada.

*Determinação do teor de íons cálcio por espectrometria de emissão atômica por plasma induzido (ICP-OES)*

A determinação de cálcio foi realizada nas seguintes amostras de esferas mostradas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Determinação do teor de cálcio das esferas.

<b>Esferas analisadas</b>	<b>Teor de cálcio (mg) por (g) de esfera</b>
PCaQt	71,0
PcaQt50	31,9
PcaQt50M2	28,3

Esses valores são mais altos que a faixa de conteúdo de cálcio nas pectinas (0.10 - 9.85 mg/g) (Kamnev et al., 1998). Um mínimo de 61 mg de  $Ca^{2+}$  foi usado para geleificar as moléculas de pectina nas esferas de PCaQt. A menor quantidade de cálcio após a reacetilação da quitosana (PCaQt50) confirma a hipótese da liberação de cálcio, realizado no estudo de FTIR. O pequeno decréscimo no conteúdo do íon metálico em PCaQt50-M2 indica alguma interação entre a mangiferina e a pectina.

A função primordial do cálcio é a formação de ossos e dentes, bem como sua manutenção. Outras funções importantes são: participação na coagulação sanguínea, na contração e relaxamento muscular e também na transmissão nervosa e regulação do batimento cardíaco. A recomendação diária para adultos homens e mulheres é de 1.000 mg. Para se ter uma idéia, a Tabela 4 dá exemplos de alimentos ricos em cálcio que podem ser consumidos e que irão atingir a quantidade recomendada de cálcio por dia.

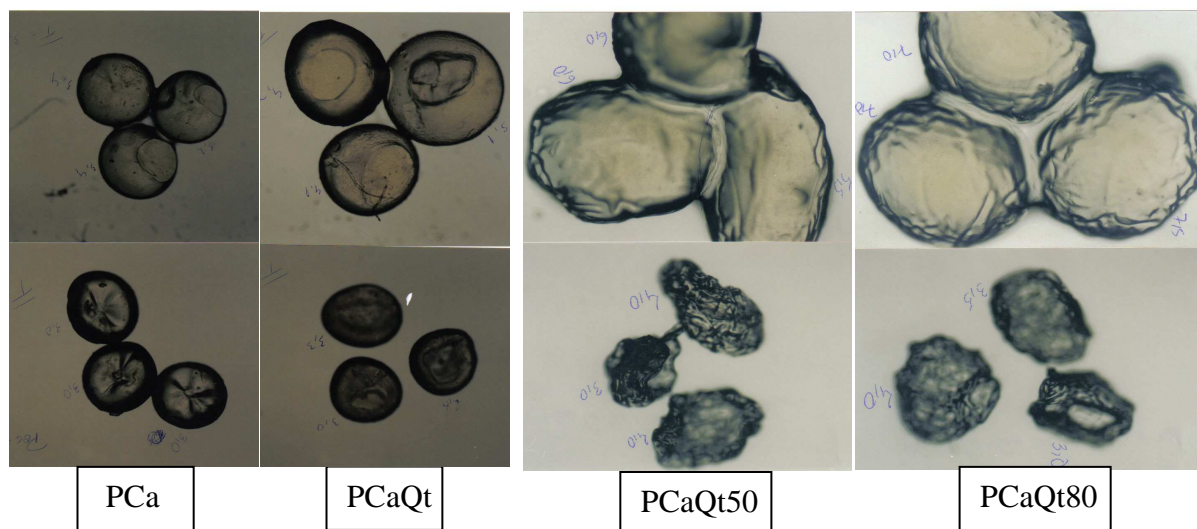
**Tabela 4.** Exemplos de alimentos ricos em cálcio (site Cyberdiet).

<b>Alimento</b>	<b>Quantidade de Cálcio</b>
Leite desnatado (copo grande)	297,6 mg
Queijo minas fresco (1 fatia média)	205,5 mg
Iogurte (200ml)	240 mg
Espinafre cozido (4 colheres de sopa)	160,5 mg
Couve refogada (2 colheres de sopa)	164 mg
Total	1067,6 mg

O consumo de alimentos contendo esferas P/Ca/Qt seria mais uma opção de biodisponibilidade de cálcio para a nutrição do organismo. A ingestão de 20g de esferas incorporadas em alimentos disponibilizaria aproximadamente 280 mg de cálcio para o organismo.

#### *Medidas de Intumescimento – esferas não-reacetiladas*

O intumescimento das partículas foi estudado através de medidas do diâmetro das partículas e pela determinação da razão de aumento do diâmetro utilizando para isso um microscópio acoplado a uma câmara digital Olympus. As fotografias das esferas antes e depois do intumescimento são mostradas na Figura 23.



**Figura 23.** Fotografia das esferas antes (abaixo) e depois (acima) do intumescimento. As partículas PCa e PCaQt estão em meio aquoso. As partículas PCaQt50 e PCaQt80 estão em meio ácido (pH 1.2).

Para o estudo de intumescimento em condições gástricas, as esferas foram imersas em um fluido gástrico simulado (FGS) pH 1,2 e comparado com ensaios realizados em meio aquoso (Figura 23a e b). A extensão do intumescimento das esferas pode desempenhar um importante papel na liberação da molécula. Observa-se que o revestimento com quitosana exerceu um aumento na razão de intumescimento independentemente do meio.

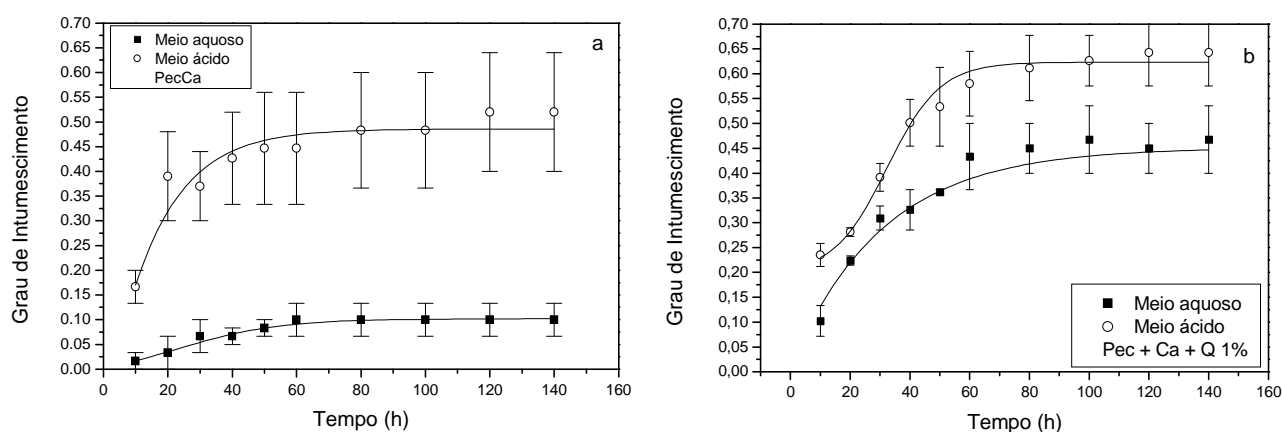


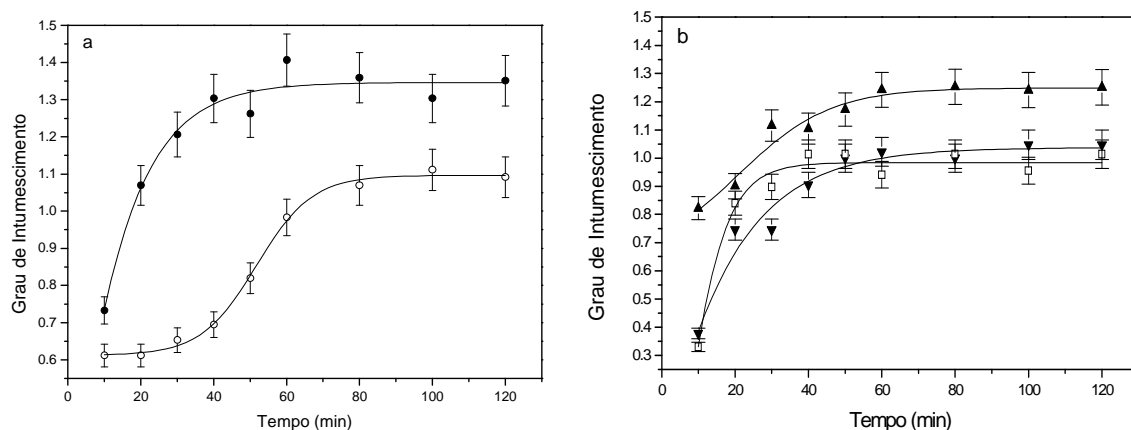
Figura 23 - Ensaio de intumescimento das esferas: (a) PCa e (b) PCaQt em meio aquoso (■) e ácido (○), respectivamente.

As duas esferas exibiram um maior grau de intumescimento em meio ácido. Observa-se também que a absorção máxima para as esferas em meio ácido se deu em tempos bem superiores aquele em meio aquoso.

O maior intumescimento em meio ácido para as partículas PCaQt pode ser explicado também pela protonação dos grupos amina levando à formação de grupos catiônicos ( $\text{NH}^{3+}$ ) os quais causam repulsão entre as cadeias e uma estrutura mais expandida e hidratada. Kim et al, 2003, observou o contrário: partículas de pectina exibiram um maior intumescimento do que quando recobertas com quitosana

#### Medidas de Intumescimento – esferas reacetiladas

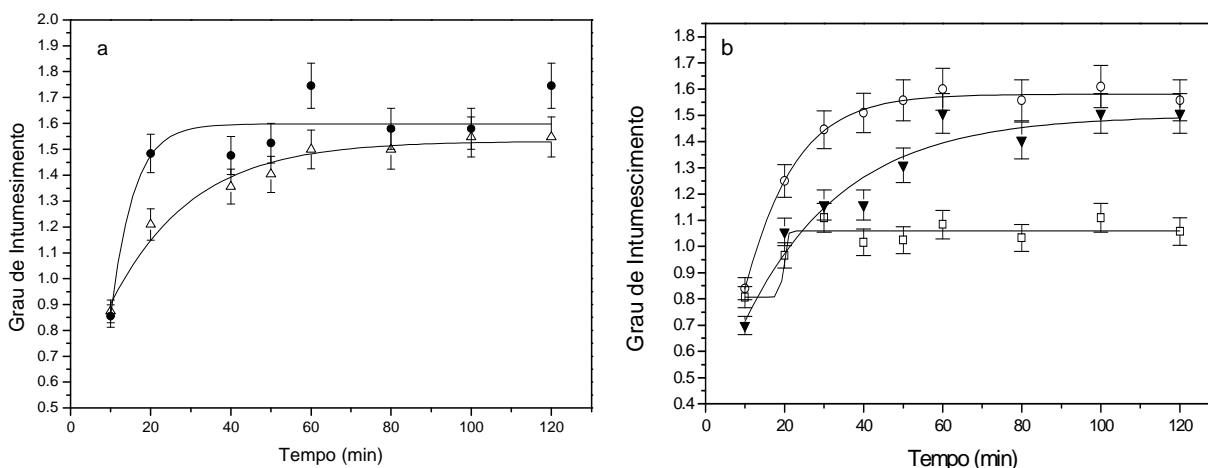
A reacetilação da quitosana foi realizada com o objetivo de evitar ou reduzir a dissolução das esferas PCaQt. As Figuras 24 e 25 apresentam os gráficos de intumescimento em função do tempo para as esferas de PCaQt reacetiladas, com ou sem o bioativo (matrizes) e com diferentes graus de reacetilação. Observa-se que para quase todas as esferas, com exceção de PCaQt80-M, o intumescimento aumenta com o grau de reacetilação da parede polimérica de quitosana.



**Figura 24** - Estudo de intumescimento das esferas em meio FGS para esferas de PCaQt50 (○), PCaQt80 (●), PCaQt50-M1 (▼), PCaQt50-M2 (▲) e PCaQt80-M (□).

As esferas reacetiladas com anidrido acético apresentam uma elevada taxa de intumescimento em pH 1,2 devido à repulsão entre os grupamentos protonados ( $-\text{NH}_3^+$ ) em meio ácido (Figura 24).

A mudança de pH da solução de 1,2 para 7,4 provoca ainda um maior grau de intumescimento (Figura 25).



**Figura 25** - Estudo de intumescimento em SIF das esferas PCaQt50 ( $\Delta$ ), PCaQt80 ( $\bullet$ ), PCaQt50-M1 ( $\blacktriangledown$ ), PCaQt50-M2 ( $\square$ ) e PCaQt80-M ( $\circ$ ).

Este comportamento é diferente das esferas de Qt co-reticuladas com tripolifosfato (TPP) e genipina, relatadas por Mi e col (2003) onde a mudança de pH de 1,2 para 7,4 provoca uma diminuição da capacidade de intumescimento.

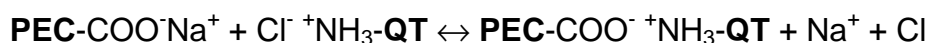
Observa-se ainda que, de uma forma geral, a incorporação do bioativo às esferas provoca uma diminuição no grau de intumescimento das mesmas. Uma evidência para isso pode ser o fato de que a presença da xantona glicosilada provocaria um aumento de interações entre as cadeias poliméricas, o que resulta em uma menor relaxação das cadeias.

## **Ensaio preliminares de preparação de nanocomplexos pectina/quitosana**

Nanopartículas a base de quitosana e pectina foram obtidas por meio de complexação polieletrólítica (PEC). A formação de PEC foi investigada variando a ordem de adição e das proporções volumétricas da solução polimérica adicionada.

A nanocomplexação de pectina já vem sendo estudada como, por exemplo, por Thirawong (2008), onde nanocomplexos de pectina-lipossoma foram preparadas por uma simples mistura de lipossomas catiônicos com solução de pectina, a fim de melhorar a absorção intestinal de calcitonina

A reação de formação do complexo quando a pectina é adicionada à solução de quitosana pode ser representada pela equação abaixo (Becherán-Marón e col., 2004):



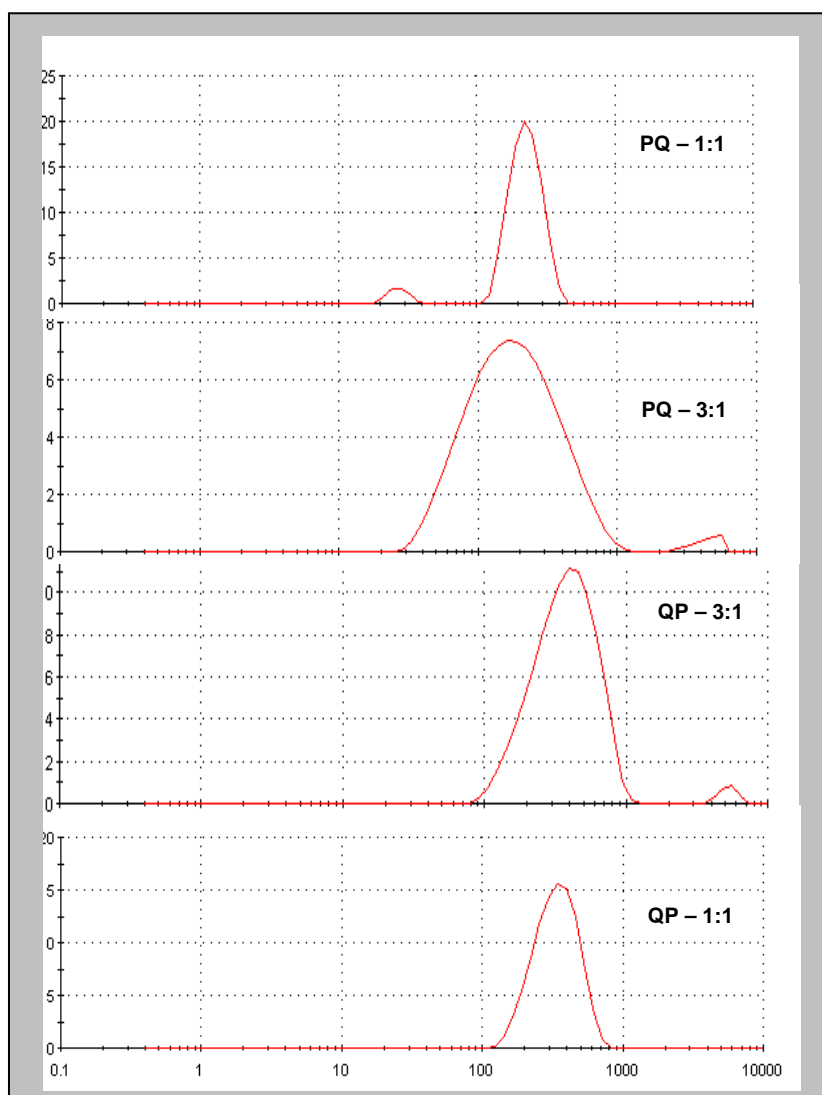
Onde: PEC = pectina e QT = quitosana

A Tabela 5 mostra os dados de diâmetro médio e índice de polidispersividade das nanopartículas.

**Tabela 5.** Dados de diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas formadas.

<b>Amostra</b>	<b>Diâmetro médio (nm)</b>	<b>Índice de polidispersão (PDI)</b>
PQ 1:1	261	0,348
PQ 3:1	140	0,383
QP 3:1	274	0,257
QP 1:1	291	0,237

A Figura 26 mostras as curvas de distribuição de tamanho para as amostras de nanopartículas.



**Figura 26** – Distribuição de tamanho (nm) das nanopartículas preparadas.

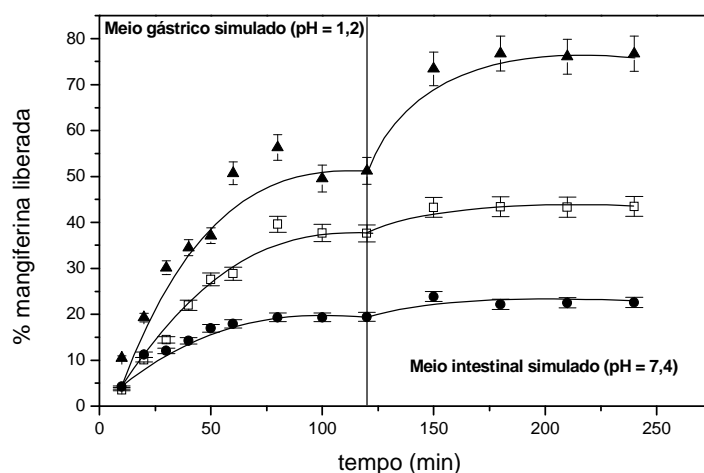
A distribuição de tamanho das nanopartículas preparadas por complexação pode ser observada na Figura 25. O diâmetro médio das nanopartículas foram inferiores a 300 nm para todas as razões V / V investigadas. Observa-se pela tabela 5 que com a ordem de adição pectina-quitosana (PQ) foram obtidas partículas com menores diâmetros do que com a ordem de adição quitosana-pectina (QP). O menor valor foi obtido para PQ na razão 3:1 (140nm) seguido de PQ 1:1 (261nm). Para a ordem de adição QP os valores de diâmetro médio foram de 274 e 291nm para 3:1 e 1:1, respectivamente. Muito embora os nanocomplexos obtidos pela ordem de

adição PQ tenham apresentado os menores valores de diâmetro médio, apresentaram também os maiores índices de polidispersão, ou seja, uma maior distribuição de tamanho formado. Já para os nanocomplexos obtidos pela ordem QP, o índice de polidispersão foi menor. Ao contrário do que foi observado por Thirawong (2008), os valores de índice de polidispersão foram inversamente proporcionais aos valores obtidos de diâmetro médio.

### Parte III – Liberação controlada de mangiferina *in vitro*

#### Ensaio de liberação de mangiferina *in vitro*

O efeito da reacetilação das esferas na liberação do bioativo é mostrado na Figura 27. Em tampão pH 7,4 aproximadamente 75% de mangiferina é liberado das esferas de PCaQt80-M, porém foram as que menos liberaram em massa. Embora se observe um menor percentual de liberação do bioativo das esferas de PCaQt50-M2, estas liberam a maior quantidade de mangiferina (Tabela 6). Uma evidência para isso seria uma interação do bioativo entre as cadeias poliméricas, tendo em vista que ele foi adicionado diretamente à solução do polissacarídeo.



**Figura 27** – Ensaio de liberação das esferas contendo mangiferina: PCaQt50-M1 (□), PCaQt50-M2 (●) and PCaQt80-M (▲).

Observa-se também que a incorporação da mangiferina através do procedimento II (mang-CaCl<sub>2</sub>) acarretou em um aumento do percentual de liberação (PL) do bioativo (45%), quando comparado ao procedimento I (mang-pec), mas não da quantidade real em massa (QL).

#### *Rendimento das partículas contendo mangiferina*

O rendimento da produção das partículas pode ser estimado pela massa de partículas obtida e a quantidade de pectina, quitosana e mangiferina na solução inicial, 1.2 g, 250 mg e 20 mg, respectivamente, mais a quantidade de cálcio incorporada, em torno de 28 mg. Os rendimentos estimados são 36.4, 18.9 e 19.7 %, para PCaQt50-M2, PCaQt50-M1 e PCaQt80-M, respectivamente.

A eficiência de incorporação depende das partículas. Para PCaQt50-M2, PCaQt50-M1 e PCaQt80-M obtemos 58, 27 e 13%, respectivamente. O grau de reacetilação mais baixo da quitosana prova que foi o melhor sistema para incorporar a mangiferina. Dentre esses, a incorporação na solução de pectina leva a uma maior incorporação. As eficiências de incorporação de albumina em partículas de pectina recobertas com quitosana foram bem mais altos, na faixa de 58 a 74% (Kim et al., 2003). Uma perda de bioativo pode ter ocorrido durante o processo de reacetilação.

As percentagens de mangiferina nas partículas, sem contar com a massa de quitosana, foram 2.13, 1.91 e 0.88%, para PCaQt50-M2, PCaQt50-M1 e PCaQt80-M, respectivamente. A massa de bioativo adicionada na solução inicial representa 1.33% da massa total inicial. A porcentagem mais baixa de mangiferina incorporada em PCaQt80 confirma a possibilidade de o bioativo estar sendo perdido na etapa de reacetilação, que foi a maior perda neste caso.

Uma comparação entre as três partículas pode ser visto na tabela 6. Em relação ao rendimento, e à quantidade de mangiferina incorporada, a partícula com menor grau de reacetilação e mangiferina adicionada na solução de pectina (PCaQt50-M2) é a melhor escolha, seguida por PCaQt50-M1.

Tabela 6. Comparação entre as partículas em relação à mangiferina incorporada.

Parâmetro	PCaQt50-M2	PCaQt50-M1	PCaQt80-M
Rendimento da produção das partículas (%)	36	19	20
Eficiência de encapsulação (%) <sup>a</sup>	58	27	13
Conteúdo de mangiferina nas partículas (%)	2.1	1.9	0.88

<sup>a</sup> em relação à quantidade de mangiferina inicialmente adicionada (20 mg)

#### *Mecanismo de liberação do bioativo a partir das esferas*

A liberação dinâmica de fármacos pode ser analisada por uma equação empírica proposta por Ritger & Pepas [1987]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (7)$$

Onde  $\frac{M_t}{M_\infty}$  representa a fração de fármaco liberado em função do tempo,

k é a constante de velocidade e n é um parâmetro que representa o tipo de transporte.

Um mecanismo de transporte Fickiano do tipo I é descrito por um fenômeno de difusão, enquanto que um mecanismo Fickiano tipo II é caracterizado por um fenômeno de relaxação constante. Estes dois fenômenos possuem valores de n para sistemas esféricos de 0,45 e 0,89 respectivamente. Um fenômeno de transporte não Fickiano é descrito por um fenômeno de relaxação e difusão e para sistemas esféricos possuem valores  $0,45 < n < 0,89$  (Ritger & Pepas, 1987).

Sinclair & Peppas (1984) tem também demonstrado a avaliação dos dois mecanismos competitivos no processo de liberação: a liberação difusional Fickiana e o caso II – liberação por relaxamento, conforme os valores de n (Tabela 7).

**Tabela 7.** Parâmetros de liberação de esferas (Cox e col,1999).

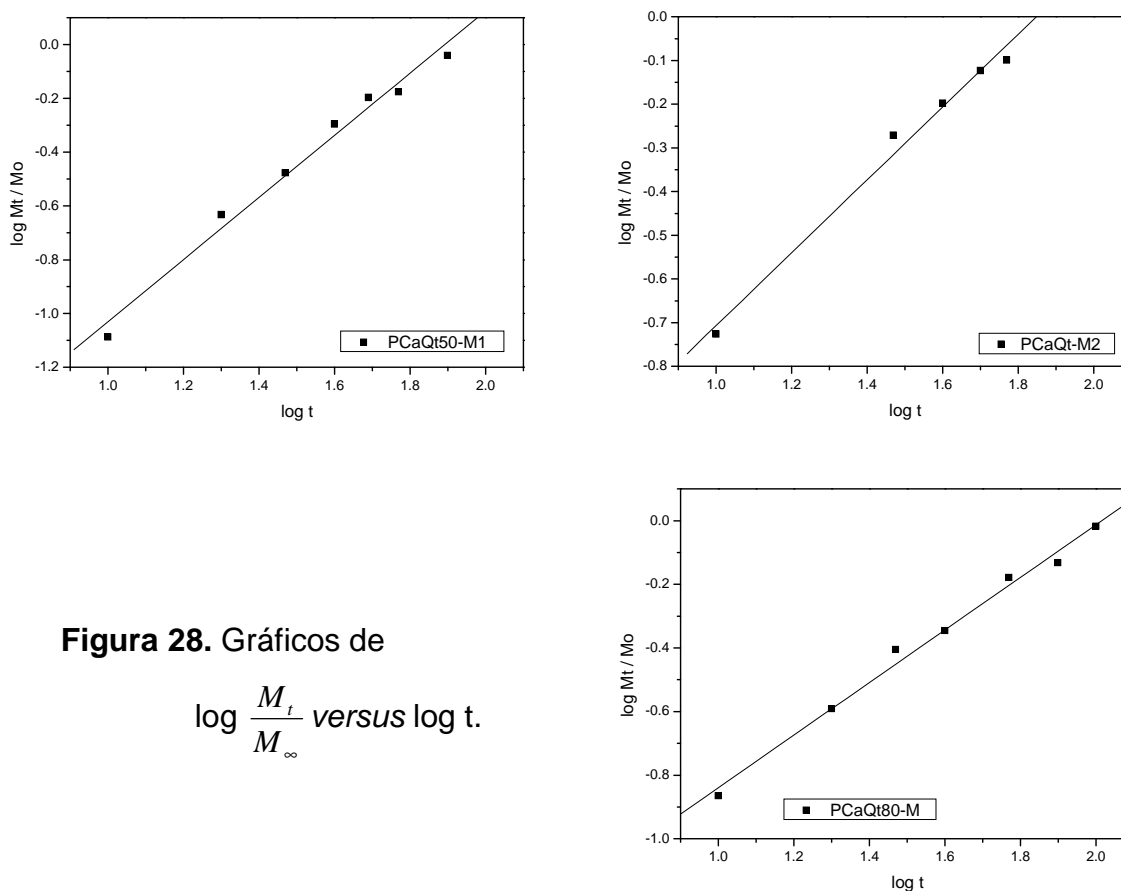
Expoente de difusão (n)	Mecanismo de difusão do soluto
0,45	Liberação fickiana
$0,45 < n < 0,89$	Difusão anômala (não-fickiana)
0,89	Transporte caso II
$n > 0,89$	Super transporte caso II

A liberação difusional fickiana ocorre pela liberação difusional usual da molécula da droga devido a um gradiente de potencial químico. A liberação de relaxação caso II é o mecanismo de transporte do bioativo associado ao estresse e ao estado de transição em polímeros vítreos hidrofílicos que intumescem em água ou fluidos biológicos (Cox e col.,1999).

Os gráficos de  $\log \frac{M_t}{M_\infty}$  versus  $\log t$  para as curvas de liberação das amostras de esferas contendo o bioativo são mostrados na Figura 28. Os valores de n obtidos são 0,83 para o procedimento mang-pec e 1,15 para o procedimento mang-CaCl<sub>2</sub> (Tabela 8), caracterizando mecanismos de liberação não-fickiano e super transporte caso II, respectivamente.

**Tabela 8** –Resultados dos parâmetros de liberação das esferas.

Esferas	Expoente de difusão (n)	Mecanismo de difusão do soluto
PCaQt50-M1	1,15	Super transporte caso II
PCaQt50-M2	0,83	Difusão anômala (não-fickiana)
PCaQt80-M	0,83	Difusão anômala (não-fickiana)



**Figura 28.** Gráficos de  $\log \frac{M_t}{M_\infty}$  versus  $\log t$ .

Pôde-se observar com base nos resultados de mecanismo de liberação das esferas que para todas as esferas, predominou o mecanismo de relaxamento das cadeias poliméricas com valores mais altos de  $n$  (entre 0,83 e 1,15). Comparando sistemas poliméricos reacetilados e reticulados, podemos analisar que no processo de reacetilação, há menos interação entre as cadeias poliméricas do que em cadeias reticuladas e a presença do meio ácido provocaria um relaxamento maior em esferas reacetiladas, favorecendo o processo de relaxamento das cadeias poliméricas.

As esferas obtidas pelo procedimento mang- $\text{CaCl}_2$  tiveram o maior valor de  $n$  (1,15) caracterizando um sistema super transporte caso II onde predomina um grande relaxamento das cadeias poliméricas no processo de liberação. Esse valor de  $n$  está de acordo com valor do percentual de liberação onde esferas do tipo mang- $\text{CaCl}_2$ , que foram preparadas com a adição do bioativo à solução reticulante de cálcio, exibiram maior percentual de liberação (45%). Já

para as esferas mang-pec com 50% de reacetilação, o valor de percentual de liberação foi de 23% e uma evidência para isso seria uma maior interação do bioativo entre as cadeias poliméricas, tendo em vista que ele foi adicionado diretamente à solução do polissacarídeo.

## **CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O grau de metoxilação (GM) das pectinas estudadas foi de 48 e 59,2% para VP e NP, caracterizadas como pectinas de baixa e alta metoxilação (HMP e LMP), respectivamente.

Medidas de cisalhamento contínuo das soluções de pectina revelam comportamento pseudoplástico, exceto para a solução de mais baixa concentração onde o comportamento foi predominantemente Newtoniano.

Nas medidas experimentais oscilatórias as amostras exibiram resposta mecânica predominantemente “sólida” em presença de cálcio, muito embora VP tenha exibido uma resposta sólida mais pronunciada quando comparada a NP. O ponto de geleificação foi observado para VP a altas frequências. A massa molar média das amostras foi calculada por GPC. As massas molares de pico foram de  $2,36 \times 10^5$  e  $3,51 \times 10^5$  g/mol, para VP e NP, respectivamente.

A pectina VP por ser de baixa metoxilação, foi escolhida para a preparação das microesferas.

Esferas de pectina/cálcio e pectina/cálcio/quitosana reacetiladas e não-reacetiladas foram preparadas com êxito, assim como a utilização destes sistemas na etapa de encapsulamento da mangiferina. A formação do complexo pôde ser observada por FTIR e a superfície das esferas mostrou variações quando recoberta com quitosana. Observou-se também que o comportamento e o tempo máximo de intumescimento das esferas foram dependentes do meio (ácido, básico ou neutro) e principalmente dependentes do revestimento externo de quitosana, do processo de reacetilação da mesma e da presença do princípio ativo.

Os estudos preliminares de liberação *in vitro* das esferas mostraram que as esferas iniciaram a liberação do fármaco em meio FGS e continuaram até

atingir um patamar de equilíbrio. Os valores de percentual de liberação foram bastante significativos, chegando até 75% para PCaQt80-M. Os resultados dos mecanismos de liberação evidenciaram os processos de transporte caso II e super caso II onde predomina o processo de relaxamento das cadeias poliméricas.

Portanto, os resultados sugerem que foi possível o encapsulamento de mangiferina em matrizes de pectina/cálcio revestidas com quitosana para uso nutracêutico em iogurtes e outros alimentos.

## REFERÊNCIAS

- AMASS, W., AMASS, A., TIGHE, B., **Polymer Internacional**, 47 (1998) 89-144.
- ANDREU, G.P., DELGADO, R., VELHO, J., INADA, N.M., CURTI, C., VERCESI, A.E., **Pharmacological Research**, 51 (2005) 427–435.
- ARBÓS, P., ARANGO, M. A., CAMPANERO, M. A., & IRACHE, J. M., **International Journal of Pharmaceutics**, 242 (2002) 129–136.
- BARRETO, J. C., TREVISAN, M. T. S., HULL, W. E., ERBEN, G., DE BRITO, E. S., PFUNDSTEIN, B., WURTELE, G., SPIEGELHALDER, B. & OWEN, R. W. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56 (2008) 5599-5610.
- BARRETO, J. C. PROSPECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE EM CULTIVARES de *Mangifera indica* Linn.: Identificação e Quantificação de Compostos Fenólicos, Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Química Orgânica - UFC, Fortaleza (2007).
- BEAULIEU, L., SAVOIE, L., PAQUIN, P., SUBIRADE, M., **Biomacromolecules**, 3, (2002) 2239–2248.
- BECHERÁN-MARÓN, L., PENICHE, C., ARGÜELLES-MONAL, W., **International journal of biological macromolecules**, 34 (2004) 127-133.
- BEHALL, K., & REISER, S., **Chemistry and functions of pectins**, in M. L.

- Fishman, & J. J. Ren (Eds.). Washington, DC: American Chemical Society, (1986) 248–265.
- BELL, L. N., Stability testing of nutraceuticals and functional foods. **Handbook of nutraceuticals and functional foods**, (2001) 501–516.
- BENOIT, J.P., MARCHAIS, H., ROLLAND, H., VELDE, V. V., Biodegradable microspheres: Advances in production technology, **Microencapsulation – Methods and Industrial Applications**, Nova Iorque: Marcel Dekker, (1996) 35-72
- BERNABÉ, P., PENICHE, C. & ARGUELLES-MONAL, W., **Polymer Bulletin**, 55 (2005) 367-375.
- BHATTACHARYA, S.K., SANYAL, A.K., GHOSAL, S., **Naturwissenschaften**, 59 (1972) 651.
- BRANNON-PEPPAS, L., **Polymeric delivery systems**, 520 (1993) 42–52.
- BURGESS, D. J., HICKEY, A.J., In: SWARBRRICK, J., BOYLAN, J.C., **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**, Nova Iorque: Marcel Dekker. 10 (1994) 1-29.
- CAPEL, F., NICOLAI, T., DURAND, D., BOULENGUER P., LANGENDORFF, V., **Food hydrocolloids**, 20 (2006) 901-907.
- CHANDY, T., SHARMA, C. P., **Biomaterials, artificial cells, and artificial organs**, 18 (1990) 1-24.
- CHEN, L., REMONDETTO, G. E., SUBIRADE, M., **Trends in Food Science & Technology**, 17 (2006) 272–283.
- CHITRA, K., PILLAI, M., **Journal of Physiology and Pharmacology**, 46 (1) (2002) 1-5.
- CHUN-NAN, L., CHENG-HSIUNG, CH., MUNEHISA, A., MINEO, SH., MORITA, N., **Phytochemistry**, 21 (1982) 205–208.

COSTA, P., LOBO, S., **Revista Portuguesa de Farmácia**, XLIX (1999) 181-190.

COX, P. J.; KHAN, K. A.; MUNDAY, D. L.; SUJJA-AREEVATH, **International Journal of Pharmaceutics**, 193 (1999) 73-84

**CyberDiet**. Disponível em:

[http://www1.uol.com.br/cyberdiet/colunas/050829\\_nut\\_calcio.htm](http://www1.uol.com.br/cyberdiet/colunas/050829_nut_calcio.htm). Acesso em 17/04/2008.

DESAI, M. P., LABHASETWAR, V., WALTER, E., LEVY, R. J., & AMIDON, G. L., **Pharmaceutical Research**, 14 (1997) 1568–1573.

DODANE, V., VILIVALAM, V.D., **Pharmaceutical Science and Technology Today**, 1 (1998) 246-253.

DUMITRIU, S., CHORNET, E., **Advanced Drug Delivery Reviews**, 31 (1998) 223-246.

ELLIOTT, R., ONG, T. J., **British Medical Journal**, 324 (2002) 1438–1442.

FILIPOV, M. P., **Food Hydrocolloids**, 6 (1992) 115-142.

**Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em:

<http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/monograph4/additive-306-m4.pdf>. Acesso em 30/11/2007.

FUKUDA, L., **Bulletin of Chemical Society of Japan**, 53 (1980) 837-840.

GERASSIM, M.K., PARASKEV, T.N., **Biochemical Systematics and Ecology**, 26 (1998) 647-.

GIBALDI M., FELDMAN S., **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 56 (1967) 1238.

GONZAÇALES-RODRIGUES M. L., HOLGADO M. A, SANCHEZ-LAFLUENTE C. RABASCO A. M, FINI, A., **International Journal of Pharmaceutics**, 232

(2002) 225.

GRASDALEN, H., BAKØY, O. E., LARSEN, B., **Carbohydrate Research**, 184 (1988) 183–191.

HANS, M.L., LOWMAN, A.M., **Solid State and Material Science**, 6 (2002) 319-327.

HE, P., DAVIS, S.S., ILLUM, L., **International Journal of Pharmaceutics**, 187 (1999) 53-65.

HIGUCHI T., **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 52 (1963) 1145

HOSTETTMANN, K., WAGNER, H., **Phytochemistry**, 16 (1977). 821–829.

ILLUM ,L., DAVIS, S. S., **Biomaterials**, 9 (1988) 111-115,.

ILLUM, L., JABBAL-GILL, I., HINCHELIFFE, M., FISHER, A.N., DAVIS, S.S., **Advanced Drug Delivery Reviews**, 51 (2001) 81-96.

KAMATH, K. R., PARK, K., **Advanced Drug Delivery Reviews**, 11 (1993) 59–84.

KAMNEV, A. A., COLINA, M., RODRIGUEZ, J., PTITCHKINA, N. M. & IGNATOV, V. V., **Food Hydrocolloids**, 12 (1998) 263-271.

KAMNEV, A. A., PTITCHKINA, N. M., PERFILIEV, YU. D., SHKODINA, O. G., & IGNATOV, V. V. J., **Inorganic Biochemistry**, 59 (1995) 340.

KAS, H. S., **Journal of Microencapsulation**, 14 (1997) 689-711.

KAWASHIM, Y., **Advanced Drug Delivery Reviews**, 47 (2001) 1–2.

KIM, T. H., PARK, Y. H., KIM, K. J., CHO, C. S., **International Journal of Pharmaceutics**, 250 (2003) 371-383.

KO, J.A., PARK, H.J., HWANG, S.J., PARK, J.B., LEE, J. S., **International Journal of Pharmaceutics**, 249 (2002) 165-174.

KORSMEYER R. W., PEPAS N. A., T.J. ROSEMAN, S. Z., in MANSDORF (eds.),

- Controlled Release Delivery Systems**, Marcel Dekker, New York (1983) 77.
- KRAVTCHENKO, T. P., VORAGEM, A. G. J., & PILNIK, W., **Carbohydrate Polymers**, 18 (1992) 17-25.
- KUMAR, M.N.V.R., **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 3 (2000) 234-258.
- JAIN, R., SHAH, N. H., MALICK, A. W., RHODES, C. T., **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 24 (1998) 703-727.
- LAMPRECHT, A., SAUMET, J.-L., ROUX, J., & BENOIT, J.-P., **International Journal of Pharmaceutics**, 278 (2004) 407–414.
- LAN, E. H., DUNN, B., & ZINK, J. I., **Protein nanotechnology**, (2005) 53–80.
- LANGER, R., PEPPAS, N. A., **AIChE Journal**, 49 (2003) 2990– 3006.
- LANGER, R., **Nature**, 392 (1998) 5-10.
- LAWRIE, G., KEEN, I., DREW, B., CHANDLER-TEMPLE, A., RINTOUL, L., FREDERICKS, P. & GRØNDAHL, L., **Biomacromolecules**, 8 (2007) 2533-2541.
- LEE, D.W., HWANG, S.J., PARK, J.B., PARK, H.J., **Journal of Microencapsulation**, 20 (2003) 179-.
- MACIEL J. S., PAULA R. C. M., PAULA H. C. B., MIRANDA M. A. R., SASSAKI J. M., **Journal of Applied Polymer Science**, 99 (2006) 326.
- MATORA, A. V, KORSHUNOVA, V. E., SHKODINA, O. G., ZHEMERICHKIN, D. A., PTITCHKINA, N. M., & MORRIS, E. R., **Food Hydrocolloids**, 9 (1995) 43-46.
- MI F.-L., SUNG H-W., SHYU S.-S., SU C.-C., PENG C.-K., **Polymer**, 44 (2003) 6521.
- MIMA, S.; MIYA, M.; IWAMOTO, R., **Journal of Applied Polymer Science**, 28 (1983) 1909-1917.

- NINFATEV, N.E., CHERNETSKII, V.N., **Mendeleev Chemistry Journal**, 41 (1998) 96-100.
- OLANO-MARTIN, E., RIMBACH, G. H., GIBSON, G. R., & RASTALL, R. A., **Anticancer Research**, 23(1A) (2003) 341–346.
- PARDO-ANDREU, G. L., SÁNCHEZ-BALDOQUÍN, C., ÁVILA-GONZÁLEZ, R., DELGADO, R., NAAL, Z., CURTI, C., **European Journal of Pharmacology**, 547 (2006) 31-36.
- PARK, H., PARK, K., **Hydrogels and biodegradable polymers for bioapplications**, (1996) 2–9.
- PEPPAS, N. A., **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, 2 (1997) 531–537.
- PEPPAS, N. A., BURES, P., LEOBANDUNG, W., & ICHIKAWA, H., **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 50 (2000) 27–46.
- PÉREZ, S., MAZEAU, K., & DU-PENHOAT, C.H., **Plant Physiology and Biochemistry**, 38 (2000) 37-55.
- PETER, M.G., **Journal of Macromolecular Sciences**, 32 (1995) 629-640.
- PHILIPON, P., **Biofutur**, 171 (1997) 25–27.
- PITITCHKINA, N. M., DANILOVA, I. A., DOXASTAKIS, G., KASAPIS, S., & MORRIS E. R., **Carbohydrate Polymers**, 23 (1994) 265–273.
- QUISUMBING, E., **Medicinal Plants of the Philippines**, Katha Publishing Co. and JMC Press, Quezon, (1978).
- QIU, Y., PARK, K., **Advanced Drug Delivery Reviews**, 53 (2001) 321–339.
- RASHIDOVA, S. SH., MILUSHEVA, R. YU, SEMENOVA, L. N., MUKHAMEDJANOVA, M. YU., VOROPAEVA, N. L., VASILYEVA, S., FAIZIEVA, R. & RUBAN, I. N., **Chromatographia**, 59 (2004) 779-782.

- RASTOGI, R. P., **British Chemical Abstracts**, 1 (1968) 69-72.
- RIDLEY, B. L., O'NEILL, M. A., & MOHNEN, D., **Phytochemistry**, 57 (2001) 929–967.
- RINAUDO, M., **pectins and pectinases**, in J. Visser, & A. G. J. Voragen (eds.). London: Elsevier, (1996) 21–33.
- RITGER P. L., PEPPAS N. A., **Journal of Controlled Release**, 5 (1987) 37.
- ROBERTS, G.A.F., **Chitin Chemistry**, Mcmillan, Londres, (1992).
- ROBERTS, J.C., **Chemical Reviews**, 61 (1961) 591–605.
- ROSENBOHM, C., LUNDT I., TOVE M.I.E CHRISTENSEN, NIAL W.G. YOUNG., **Carbohydrate Research**, 338 (2003) 637–649.
- ROSSLER, B., KREUTER, J., SCHERER, D., **Journal of Microencapsulation**, 12 (1995) 49-57.
- SATO, T., KAWAMOTO, A., TAMURA, A., TATSUMI, Y., FUJII, T., **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 40 (1992) 721–724.
- SANCHEZ, G.M., NUNEZ-SELLES, R.L., DAVISON, LEON-FERNANDEZ, G.P., O.S., **Pharmacological Research**, 42 (2000) 565–573.
- SCHÄFER, V., VON BRIESEN,H., ANDREESEN, R., STEFFAN, A.M., ROYER, C., TRÖSTER, S., KREUTER, J., RÜBSAMEN-WAIGMANN, H., **Pharmaceutical Research**, 9 (1992) 541–546.
- SINCLAIR, G. W., PEPPAS, N. A., **Journal of Membrane Science**, 17 (1984) 329-331.
- SINGTHONG, J., NINGSANOND, S., CUI, S. W., GOFF, H. D., **Food Hydrocolloids**, 19 (2005) 793-801.
- SINHA, V.R., SINGLA, A.K., WADHAWAN, S., KAUSHIK, R., KUMRIA, R., **International Journal of Pharmaceutics**, 274 (2004) 1-33.

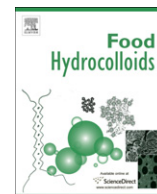
- SRINIVASAN, K. K., SUBRAMANIAN, S. S., **Journal of Health Science**, 7 (1981) 140-41.
- SRIAMORNSAK, P., NUNTHANID, J., **International Journal of Pharmaceutics**, 160 (1998) 207-212.
- SMITH, B.G. AND HARRIS, P.J., **Biochemical Systematics and Ecology**, 27 (1999) 33–53.
- THIRAWONG, N., THONGBORISUTE, J., TAKEUCHI, H., SRIAMORNSAK, P., **Journal of Controlled Release**, 125 (2008) 236-245.
- THE ROYAL SOCIETY., **The Royal Society & The Royal Academy of Engineering**, (2004) 25–34.
- THO, I., SANDE, S. A., KLEINEBUDDE, P., **Chemical Engineering Science**, 60 (2005) 3899-3907.
- TORRES, M. A., VIEIRA R. S., BEPPU M. M., SANTANA, C. C., **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. 15 (2005) 306-312.
- ULUBAYRAM, K., EROGLU, I., HASIRCI, N., **Journal of Biomaterials Applications**, 16 (2002) 227-241.
- VARELAS C. G., DIXON D. G., STEINER C., **Journal of Controlled Release**, 34 (1995) 185-.
- VENTER, J.C., **Pharmaceutical Technology - Ed. Brasileira**, 5 (2001) 50-56.
- VINCKEN, J. P., SCHOLS, H. A., OOMEN, R. J., MCCANN, M. C., ULVSKOV, P., VORAGEN, A. G., E COL., **Plant physiology**, 132 (2003) 1781–1789.
- VO-DINH, T. **Protein nanotechnology** (2005) 1– 14.
- VORAGEN, A. G. J., PILNIK, W., THIBAUT, J. F., AXELOS, M. A. V., & RENARD, C. M. G. C., **Food polysaccharides**, New York: Marcel Dekker, (1995) 287–339.

- WAGNER J. G., **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 58 (1969) 1253.
- WILDMAN, R. E. C., **Handbook of nutraceuticals and functional foods**, In R. E. C. Wildman (Ed.) New York: CRC Press. (2001).
- WILLATS, W.G.T., KNOX, J. PAUL, MIKKELSEN J.D., **Trends in Food Science & Technology**, 17 (2006) 97–104.
- WILLATS, W. G., MCCARTNEY, L., MACKIE, W., & KNOX, J. P., **Plant Molecular Biology**, 47(1–2) (2001) 9–27.
- YAMADA, H., **Pectins and pectinases**, in J. Visser, & A.G. J. Voragen (Eds.). Amsterdam: Elsevier, (1996) 173– 190.
- YAMADA, H., KIYOHARA, H., & MATSUMOTO, T., **Advances in pectin and pectinase research**, in F. Voragen, H. Schols, & R. Visser (Eds.). (2003) 481–490. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- ZHBANKOV, R. G., **Journal of Molecular Structure**, 275 (1992) 65-84.
- ZHEMERICHKIN, D. A., & PTITCHKINA, N. M., **Food Hydrocolloids**, 9 (1995) 147-149.

**ANEXO**

**Artigo científico publicado**

Chitosan-coated pectin beads: Characterization and in vitro release of mangiferin



## Chitosan-coated pectin beads: Characterization and *in vitro* release of mangiferin

José Roberto R. de Souza, José Ivan X. de Carvalho, Maria Teresa S. Trevisan, Regina C.M. de Paula, Nágila M.P.S. Ricardo, Judith P.A. Feitosa\*

Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6.021, CEP 60455-760, Fortaleza, Ceará, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 October 2008

Accepted 4 June 2009

#### Keywords:

Mangiferin

Pectin

Chitosan

Nutraceutical

Controlled release

### ABSTRACT

Microspheres of low degree of esterification (DE) pectin with calcium and the same sphere coated with chitosan (PCaC) were prepared. The spheres have diameters in the range 650–680  $\mu\text{m}$ . The layer of chitosan is about of 5–15  $\mu\text{m}$  thick. To obtain firm and stable PCaC beads, chitosan was reacylated. Two different degrees of acetylation, giving PCaC50 and PCaC80 were adopted. The beads were characterized by FTIR, SEM and swelling measurements. Mangiferin was loaded in PCaC reacylated in two different ways: by addition in pectin solution ( $M_p$ ) and by addition in  $\text{CaCl}_2$  solution ( $M_c$ ). The yield in producing the beads, the efficiency in encapsulation and the content of mangiferin in beads were determined. A swelling kinetics study was done in simulated gastric fluid (SGF, pH 1.2) and in simulated intestine fluid (SIF, pH 7.4). The release of mangiferin from the beads was performed in SGF followed by the release in SIF. Based on the yield and efficiency in encapsulation the best bead was found to be PCaC50- $M_p$ . The highest release (7.8 mg of mangiferin/g of bead) was achieved by the PCaC50- $M_c$ . For all beads more bioactive was released in SGF than in SIF.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Dietary compounds with health benefits offer an excellent opportunity to improve public health. The list of these compounds, known as nutraceutical, is endless and includes vitamins, probiotics, bioactive peptides, antioxidants (Wildman, 2001).

Mangiferin, a xanthone glucoside (Fig. 1), is an active phytochemical present in various plants including *Mangifera indica* L. (Barreto et al., 2008). This phytochemical is recommended in the Indian system of medicine for the treatment of immuno-deficiency diseases such as arthritis, diabetes, hepatitis, cardiac and mental disorders (Sanchez et al., 2000). In Cuba, there is a mangiferin-enriched extract named Vimang, produced in industrial scale, mainly used as a nutritional supplement (Pardo-Andreu et al., 2006).

This xanthone glucoside has been reported to have analgesic and antioxidant activities (Dar et al., 2005), anti-allergic properties (Rivera et al., 2006), anthelmintic property (Garcia, Escalante, Delgado, Ubeira, & Leiro, 2003), gastro-protective effect (Carvalho et al., 2007), antitumor activity (Guha, Ghosal, & Chattopadhyay, 1996), and antiviral property (Yoosook, Bunyapraphatsara, Boonyakiat, & Kantasuk, 2000). Mangiferin was also used as foodstuffs for treating diabetes (Wada, 2007) and treating and preventing neurodegenerative diseases and aging symptoms (Matute et al.,

2007). The bioactive can be considered as non-toxic as its reported oral  $\text{LD}_{50}$  value in mice was 400 mg/kg (Jagetia & Baiga, 2005).

The solubility in water of mangiferin is very low: 0.111 mg/mL (Wang, Deng, Li, & Wang, 2007). Some efforts were done in order to increase its solubility and bioavailability, such as embodying within cyclodextrin derivatives (Teng, Yu, Zhai, Li, & Liu, 2007), preparing an inclusion compound (Wang et al., 2007) or monosodium salt (Deng & Yuan, 2007). One strategy to preserve the chemical integrity and increase bioavailability for poorly water soluble food substrates is encapsulation (Duchateau & Klaffke, 2008). Encapsulation matrices provide maximal physical stability, protect ingredients against chemical degradation, and allow for precise control over the release of encapsulated components during mastication and digestion to maximize adsorption (Weiss et al., 2008).

Pectin is known in the food industry primarily as a gelling agent and is widely used in the production of jams and jellies, fruit juice, confectionery products, bakery fillings and for the stabilization of acidified milk drinks and yogurts (Willats, Knox, & Mikkelsen, 2006). Chemically, pectin is a family of complex heterogeneous oligosaccharides and polysaccharides. The dominant structural feature is a linear chain of poly- $\alpha$ -D-galacturonic acid with 1  $\rightarrow$  4 linkages. In pectin from all sources, the carboxyl groups are partially in the methyl ester form. The degree of esterification (DE) varies depending on the source. This polysaccharide is non-toxic, not digested by gastric or intestinal enzymes and almost totally degraded by pectinolytic enzymes produced by the colonic microflora (Bourgeois, Gernet, Pradeau, Andremont, & Fattal, 2006).

\* Corresponding author. Tel.: +55 85 33669365; fax: +55 85 33669978.  
E-mail address: [judith@dqi.ufc.br](mailto:judith@dqi.ufc.br) (J.P.A. Feitosa).

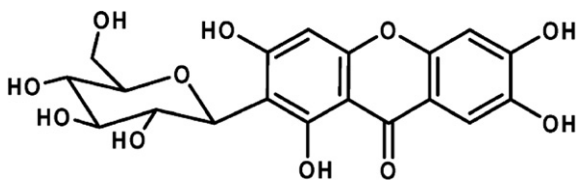


Fig. 1. Chemical structure of mangiferin (Barreto et al., 2008).

Chitosan (copolymer of  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-D-glucosamine and  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-N-acetyl-D-glucosamine), is obtained from chitin – found in abundance in nature, mainly in carapace of crustaceans. The cationic polyelectrolyte nature of chitosan can also provide a strong electrostatic interaction with the mucus or a negatively charged mucosal surface. This mucoadhesive property may extend the time of residence of the sphere containing the bioactive in the gastric intestine (Kim, Park, Kim, & Cho, 2003).

Pectin capsules were used as a food carrier for the delivery of folic acid (Madziva, Kailasapathy, & Phillips, 2006). Pectin-based systems have been applied for colon-specific drug delivery via oral route (Liu, Fishman, Kost, & Hicks, 2003). The interaction between pectin and chitosan is known (Bernabé, Peniche, & Arguelles-Monal, 2005; Kamburova, Milkova, Petkanchin, & Radeva, 2008; Rashidova et al., 2004). These systems would be useful for colon-specific delivery of bioactive (Zhang & Lin, 2000), albumin delivery (Kim et al., 2003) and bimodal drug release (Macleod, Collett, & Fell, 1999).

In the present paper, pectin spheres coated with chitosan were prepared and characterized. The reacetylation of the chitosan coating wall was done as a way to protect beads from dissolving in gastric medium. These beads were tested on the controlled release of mangiferin.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

Citric pectin (P) samples were obtained from Vetec – Chemicals. Chitosan (C) with molar mass  $7.82 \times 10^4$  g/mol and degree of deacetylation of  $81 \pm 1\%$  was obtained from Quitoquímica – Chemicals and characterized by Magalhães et al. (2009). Mangiferin (M) sample was obtained and characterized by Barreto et al. (2008). All other chemicals used were of analytical grade.

### 2.2. Methods of beads preparation

#### 2.2.1. Preparation of beads of pectin/calcium and pectin/calcium/chitosan

The procedure for the preparation of particles of pectin/calcium and pectin/calcium/chitosan is similar to that used by Sriamornsak & Nunthanid (1998). A volume of 20 ml of aqueous solution of low DE pectin at the concentration of 6% (w/v) was dropped through a needle of 0.45 mm fixed to a pipe and connected to a peristaltic pump into 100 ml of a solution of calcium chloride 10% (w/v) under slow stirring. After that the beads were filtered and dried at room temperature (25–28 °C) during 12 h. In the systems with chitosan, the beads were immersed in 25 ml of chitosan solution (1% w/v) of acetic acid 2% (w/v) at pH close to 6 for 30 min under slow stirring. The recovered spheres were washed with water, filtered and dried at room temperature for 12 h.

#### 2.2.2. Preparation of beads containing the bioactive mangiferin

Two methods were tried to obtain P/Ca<sup>2+</sup>/C beads containing the mangiferin. In the first one, 20 mg of mangiferin was added directly to 20 ml of the pectin solution (6%). The subsequent steps

were the same as those utilized for the preparation of pectin/chitosan beads. Unfortunately, beads were not obtained, but a soft aggregate material that collapse when dried. In the second method 20 mg of the bioactive was added to CaCl<sub>2</sub> 10% (w/v) solution. The other steps were similar to those used for the preparation of pectin/calcium/chitosan spheres. Once more, a soft and collapsed material after drying was formed, inadequate to the proposed use as food nutraceutical.

To solve this problem the two methods of loading mangiferin was adopted, but then the coated chitosan was reacetylated. In total, seven types of beads were produced. The formulation of these spheres can be seen in Table 1.

### 2.2.3. Reacetylation of chitosan-coated beads

The pectin–chitosan beads were immersed in a solution of acetic anhydride in methanol at room temperature and gently stirred for 5 min. After that the spheres were washed with methanol for removal of the anhydride excess. Two concentrations of acetic anhydride (50 and 80%, v/v, in methanol) were used for comparison. The reacetylation of the chitosan coat gives firm and stable beads after drying, adequate to the present study and further application.

## 2.3. Methods of characterization

### 2.3.1. Infrared spectroscopy

The Fourier transform IR spectra (FTIR) of samples were recorded with a Shimadzu IR spectrophotometer (model 8300) in the range of 400 and 4000 cm<sup>-1</sup> as KBr pellet.

### 2.3.2. GPC

The peak molar mass ( $M_{pk}$ ) of pectin was determined by gel permeation chromatography (GPC) with a Shimadzu instrument at room temperature using an Ultrahydrogel linear column (7.8  $\times$  300 mm), flow rate of 0.5 ml/min, polysaccharide concentration of 0.1% (w/v) and 0.1 M NaNO<sub>3</sub> as the solvent. A differential refractometer was used as the detector. The elution volume was corrected by the use of the internal marker ethylene glycol at 11.25 ml. Pullulan samples (Shodex Denko) of molar mass  $5.9 \times 10^3$ ,  $1.18 \times 10^4$ ,  $4.73 \times 10^4$ ,  $2.12 \times 10^5$ , and  $7.88 \times 10^5$  g/mol were used as standards.

### 2.3.3. Nuclear magnetic resonance spectroscopy

<sup>1</sup>H NMR spectra of 0.1% (w/v) solutions in D<sub>2</sub>O were recorded at 70 °C on a Fourier transform Bruker Avance DRX 500 spectrometer with an inverse multinuclear gradient probe-head equipped with z-shielded gradient coils, and with Silicon Graphics. Sodium 2,2-dimethylsilapentane-5-sulphonate (DSS) was used as the internal standard (0.00 ppm for <sup>1</sup>H).

### 2.3.4. Scanning electron microscopy (SEM)

The surface of pectin beads, chitosan-coated and reacetylated chitosan-coated pectin beads were observed using Phillips X-L 30 Scanning Electron Microscope (in low energy from 13 to 15 kV). The samples were deposited on copper and coated with carbon, using

Table 1  
Formulations for pectin/CaCl<sub>2</sub>/chitosan beads.

System	Chitosan presence	Chitosan reacetylation	Degree of reacetylation	Mangiferin presence	Mangiferin addition
Pca	No	No	–	No	–
PCaC	Yes	No	–	No	–
PCaC50	Yes	Yes	low	No	–
PCaC80	Yes	Yes	high	No	–
PCaC50-M <sub>c</sub>	Yes	Yes	low	Yes	CaCl <sub>2</sub>
PCaC50-M <sub>p</sub>	Yes	Yes	low	Yes	pectin
PCaC80-M <sub>p</sub>	Yes	Yes	high	Yes	pectin

vapor deposition techniques. The surface was scanned using magnification of 100 and 500.

### 2.3.5. Inductively Coupled Plasma by Optical Emission Spectrometry (ICP-OES)

Approximately 10 mg of PCaC, PCaC50 and PCaC50- $M_p$  samples were dissolved in 1 M HCl at 80 °C for 2 h and filtered using Millipore membranes with 0.22  $\mu\text{m}$  pore diameter. The amount of calcium was quantified by Inductively Coupled Plasma by Optical Emission Spectrometry (ICP-OES). The spectrometer used was a Perkin-Elmer, model OPTIMA 4300 DV.

### 2.3.6. Swelling studies

The swelling behavior was studied by measuring the diameter of the beads using a digital camera (Philips XL-30, Holland) and magnification of 4. Nine beads of each system (PCa and PCaC) were used to the calculation of average diameters. For the effect of pH over the swelling, beads were immersed in 0.1 M HCl/NaCl buffer solution, pH 1.2, as simulated gastric fluid (SGF), and in 0.2 M sodium phosphate buffer solution for pH 7.4, as simulated intestine fluid (SIF) (Kim et al., 2003). All assays were performed in triplicate. The swelling was associated with diameter increase ratio (DIR), measured by the following equation (Chang & Lin, 2000):

$$\text{DIR} = (\text{D}_s - \text{D}_d) / \text{D}_d \quad (1)$$

where  $\text{D}_d$  is the average diameter of the dry bead and  $\text{D}_s$ , the average of swelled beads.

### 2.4. Loading efficiency of mangiferin in beads

Initially, the solubility of mangiferin at pH 7.4 (SIF) and 1.2 (SGF) was determined at room temperature. The quantification of the incorporated mangiferin was made by an extraction in methanol, due to solubility of the bioactive in this solvent. The amount of 0.045 g of each bead was macerated and mixed with 8 ml de methanol. After 24 h, at room temperature, the mixture was filtered and the extract analyzed in the UV-VIS at 276 nm (Barreto et al., 2008). Calculations were performed using a calibration curve in methanol in the concentration range of 3.6–72 mg/l, with linear correlation coefficient of 0.9965.

### 2.5. Measurement of in vitro mangiferin release

The spheres (mass of approximately 0.15 g) loaded with mangiferin were placed in 20 ml of solution of SGF (pH 1.2) for 2 h at 37 °C and then filtered, washed with distilled water and placed in 20 ml of SIF (pH 7.4) at the same temperature (Liu, Fishman, & Hicks, 2007). Aliquots of 3 ml were picked up for analysis in UV-Vis at 379 nm. The aliquots were removed in intervals of 10 min for the first hour, 20 min for the second hour and 30 min for the last 2 h. The calculations were made from curves of calibration obtained in SGF and in SIF mediums in the concentration range of 15–50 mg/l, and 5.0–23 mg/l, respectively. The linear correlation coefficients are 0.9998 and 0.9933 for the lines in SIF and in SGF, respectively.

The solubility of mangiferin at pH 7.4 (SIF) and 1.2 (SGF) was determined.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Characterization of pectin

#### 3.1.1. GPC

A single and wide peak with no shoulders is present in the chromatogram of pectin sample (data not showed). The peak molar

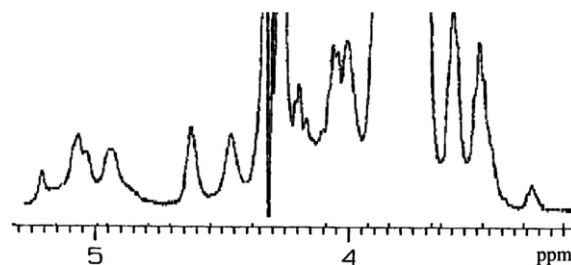


Fig. 2. Part of  $^1\text{H}$  NMR spectrum of the pectin sample.

mass ( $M_{pk}$ ) of polysaccharide was estimated using pullulan (a neutral polysaccharide) standard plot. Taking into account that the pectin is a polyelectrolyte, it is expected that it elutes at a lower volume than a neutral macromolecule with the same molar mass. This is due to chain stiffening and extent, as a consequence of electrostatic repulsion of carboxylate groups. The estimated  $M_{pk}$  is  $3 \times 10^5$  g/mol. So, the molar mass of pectin is equal or lower than this value. The molar mass of pectins ranges from  $1.4 \times 10^5$  to  $2.3 \times 10^5$  g/mol (Morris et al., 2008; Yoo, Fishman, Hotchkiss, & Lee, 2006), in broad agreement with the estimated value.

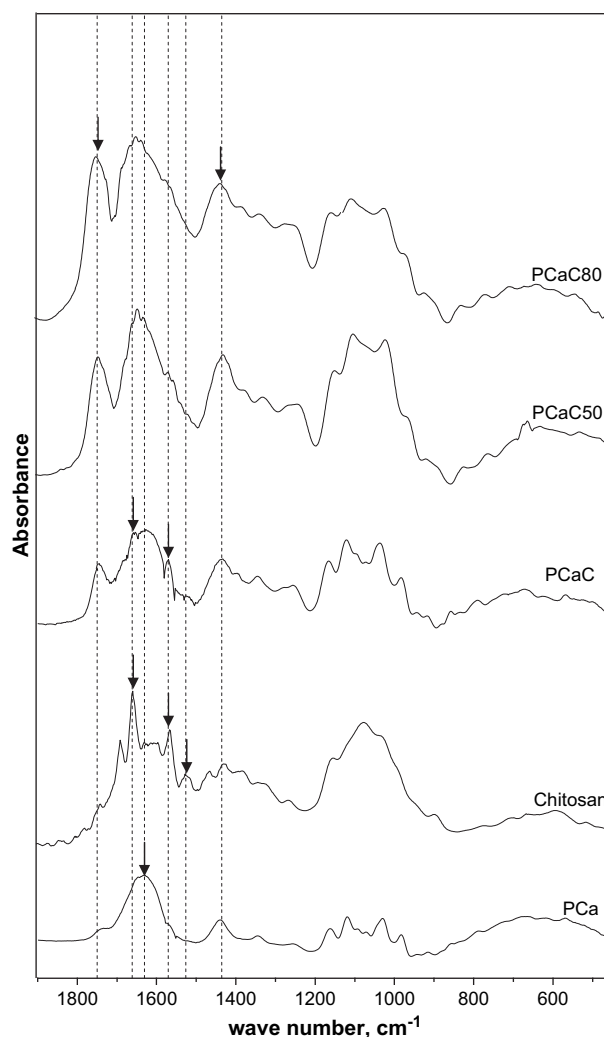


Fig. 3. FTIR spectrum of: Chitosan; and pectin/ $\text{CaCl}_2$ /chitosan reacylated spheres: PCaC50; PCaC80.

### 3.1.2. NMR

$^1\text{H}$  NMR spectroscopy is a reliable method for the determination of the composition and also the degree of esterification (DE) of pectin samples (Grasdalen, Bakoy, & Larsen, 1988; Rosenbohm, Lundt, Christensen, & Young, 2003; Wining, Viereck, Nørgaard, Larsen, & Engelsen, 2007). Fig. 2 shows the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of pectin sample in the low field regions (5.2–4.3 ppm). Those signals are due to H-1 of galacturonic acid and rhamnose residues and also to H-5 of methyl esterified and unesterified galacturonic acid (Grasdalen et al., 1988; Rosenbohm et al., 2003). The low intensity signal at 5.21 ppm was attributed to H-1 of rhamnose and the signal at 5.07 ppm was assigned to H-1 of galacturonic acid (Coenen, Bakx, Verhoef, Schols, & Voragen, 2007). The H-5 of proton adjacent to unesterified galacturonic acid shows signals in the region of 4.6–4.7 ppm (H-5COO<sup>-</sup>). The presence of methyl ester shifts the H-5 signal to low field in the region of 4.9–5.1 ppm depending on the block substitution pattern. The DE of pectin sample was calculated using the approach proposed by Rosenbohm et al. (2003). In this calculation the area of H-5 adjacent to ester (H<sub>COOMe</sub>) is compared to the area of H-5 adjacent to carboxylates (HCOO<sup>-</sup>, unesterified). As the signals due to H-5 adjacent to ester are very closed to H-1 of acid (H-1COO<sup>-</sup>) the authors used in the DE calculation the combined areas of H-1COO<sup>-</sup> and H-5<sub>COOMe</sub> (peaks in the region of 4.9–5.1 ppm) in the equation:

$$\text{DE} = \frac{A(\text{H} - 5_{\text{COOMe}} + \text{H} - 1\text{COO}^-) - A(\text{H} - 5\text{COO}^-)}{A(\text{H} - 5_{\text{COOMe}} + \text{H} - 1\text{COO}^-) + A(\text{H} - 5\text{COO}^-)} \quad (2)$$

The degree of esterification of pectin sample was 0.48 or 48%. So, the sample is considered as low DE pectin.

## 3.2. Beads characterization

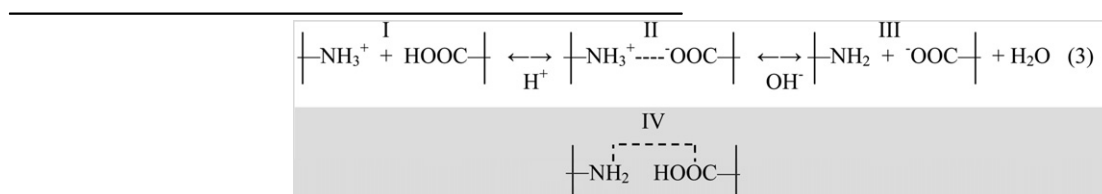
### 3.2.1. Infrared spectroscopy

Fig. 3 shows the FTIR spectra of the analyzed samples. In PCa spectrum the low intense band at 1735 cm<sup>-1</sup>, attributed to C=O

intensification in the band of COO<sup>-</sup> and reduction in the band of C=O (acid and ester) indicates that the remained band at 1744 cm<sup>-1</sup> in PCa spectra is really due to carboxyl group from the ester fraction of pectin Table 2.

The presence of chitosan in PCaC beads can be shown by the appearance of the band at 1561 cm<sup>-1</sup>, attributed to NH<sub>2</sub> and NH of chitosan, also noted in the spectrum of this polysaccharide alone. The weak absorptions in the range of 1510–1530 cm<sup>-1</sup> and near 1630 cm<sup>-1</sup> (Lawrie et al., 2007) indicate the presence of protonated amine group from chitosan in PCa and in PCaC spectra. The band at 1735 cm<sup>-1</sup>, attributed to COOH and C=O from ester group in PCa spectra is intensified when this bead is coated with chitosan. Taking into account that the interaction pectin–chitosan does not increase the amount of ester group of pectin, a possible explanation is the partial protonation of carboxylate group leading to the increase in COOH group. As a matter of fact, the shoulder at around 3230–3240 cm<sup>-1</sup> (part of the spectrum not showed), due to OH from acid, becomes more pronounced in PCaC spectrum, in agreement with the supposition of protonation of carboxylate. A decrease in the absorbance of carboxylate group bands (1641, 1431 cm<sup>-1</sup>) was not possible to be verified due to the superposition with other bands.

The partial protonation of pectin is not the usual behavior observed when pectin interacts with chitosan (equation (1), Bernabé et al., 2005). Normally, in this and in other systems, pectin is mixed with chitosan in acid medium and only a type II polyelectrolyte complex is formed (Rashidova et al., 2004). In the present systems, protons from acid medium and/or from NH<sub>3</sub><sup>+</sup> of chitosan partially displace calcium ions from the surface of PCa bead giving COOH. As some COO<sup>-</sup> and NH<sub>3</sub><sup>+</sup> groups still remain in PCaC, an electrostatic complex of type II is present. Interaction between COOH of pectin and NH<sub>2</sub> of chitosan through hydrogen bonding (type IV) also contributes to the binding between the two polysaccharides. The shift of the C=O band from 1735 cm<sup>-1</sup> (PCa) to 1744 cm<sup>-1</sup> (PCaC) suggests that the electronic environment around COOH of pectin changes with the interaction with chitosan molecules and strengths this assumption.



group from non-ionized acid and from ester is in agreement with low DE pectin (Kamnev, Colina, Rodriguez, Ptitchkina, & Ignatov, 1998). This band in pectin spectrum (data not shown) is more intense and the band at around 1640 cm<sup>-1</sup> (COO<sup>-</sup>) is weaker. The

Some changes can be noted in the spectra of PCaC after reacylation of chitosan (PCaC50 and PCaC80), due to the transformation of amine into amide groups. The absorption of the band in 1560–1561 cm<sup>-1</sup>, attributed mainly to amine group of chitosan in

**Table 2**

Assignment of bands in FTIR for chitosan, pectin–CaCl<sub>2</sub>, and pectin–CaCl<sub>2</sub>–chitosan systems (Kamnev et al., 1998; Lawrie et al., 2007; Rashidova et al., 2004).

System	Assignment				
Chitosan	PCa	PCaC	PCaC50	PCaC80	
–	1735	1744	1745	1749	$\nu\text{C}=\text{O}$ of COOH and ester of pectin
1652	1643	1647	1645	1644	$\nu\text{C}=\text{O}$ (amide I) of chitosan, $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$ of pectin and OH from trace or bound water
1560	–	1561	1568	1569	$\delta\text{NH}_2$ from amine and $\delta\text{NH}$ (amide II) of chitosan
1520	–	1510–1530	–	–	$\delta_s\text{NH}_3^+$ of chitosan
1425	1431	1425	1430	1430	$\delta_s\text{CH}_2$ of chitosan and $\nu_s\text{COO}^-$ of pectin
1380	1382	1383	1375	1378	$\delta_s\text{CH}_3$ of chitosan and pectin
1155	1148	1148	1151	1151	$\nu\text{C}-\text{O}-\text{C}$ of chitosan and pectin
1077	1102	1100	1103	1102	$\nu\text{C}-\text{O}-\text{C}$ of chitosan and pectin
1033	1010	1015	1021	1019	Skeletal vibration involving $\nu\text{C}-\text{O}$ of chitosan and pectin
920–580	920–580	920–580	920–580	920–580	Pulsation and some types of pyranose ring deformation

PCaC spectra, decreases in PCaC50 and in PCaC80 spectra. The relative proportion of  $\text{CH}_2$  and  $\text{C}=\text{O}$  groups in chitosan should increase. This is verified respectively by the intensification in the bands at  $1430\text{ cm}^{-1}$  and at  $1644\text{--}1645\text{ cm}^{-1}$ , in comparison with the chitosan itself. The absorbance of the band at  $1744\text{ cm}^{-1}$ , due to  $\text{C}=\text{O}$  from  $\text{COOH}$  of pectin increases significantly. A concomitant increase in the absorbance of the shoulder at  $3230\text{--}3240\text{ cm}^{-1}$  (part of the spectrum not showed) attributed to  $\text{OH}$  from carboxylic acid was observed, especially in PCaC80. The acetic anhydride, used for chitosan reacylation, probably penetrates inside the beads, in the core of pectin, reacts with water molecules to give acetic acid and causes the protonation of carboxylate and calcium release. The more concentrate the acetic anhydride is, more penetration is expected and more acid is obtained.

### 3.2.2. Scanning electron microscopy (SEM)

The resulting beads had approximately spherical forms (Fig. 4). The average diameters were  $660 \pm 7\ \mu\text{m}$  and  $670 \pm 13\ \mu\text{m}$  for PCa and PCaC beads, respectively. The difference between the two diameters gives an estimative of chitosan coating thickness. So, the coating is very thin, of approximately in the range of  $5\text{--}15\ \mu\text{m}$  thick.

Thin layer of chitosan was also seen in chitosan-coated pectin, even with different pectin (DE 26%) and chitosan (high and medium molecular weight) (Kim et al., 2003). The surface of the sphere of calcium pectinate showed a rougher surface, while those coated with chitosan presented a much smoother surface. A drastic change in the shape of the bead with reacylated chitosan can be observed. The PCaC80 bead showed a more irregular and rough surface. This is probably due to the process of reacylation of chitosan. The high volatility of acetic anhydride may promote a quick drying process, with release of water from the pectin core causing changes in the shape of the bead. The interaction of acetic anhydride and/or acetic acid with pectin giving  $\text{COOH}$  can also contribute for the irregular shape.

### 3.2.3. Calcium content in beads

The presence of calcium in beads was detected and quantified. The calcium contents in beads are  $71.0$ ;  $31.9$  and  $28.3\ \text{mg/g}$ , for PCaC, PCaC50 and PCaC50- $M_p$ , respectively. These values are higher than the range of calcium content in pectins ( $0.10\text{--}9.85\ \text{mg/g}$ ) (Kamnev et al., 1998). A minimum of  $61\ \text{mg}$  of  $\text{Ca}^{2+}$  was used to gel pectin molecules in the PCaC beads. The lower amount of calcium

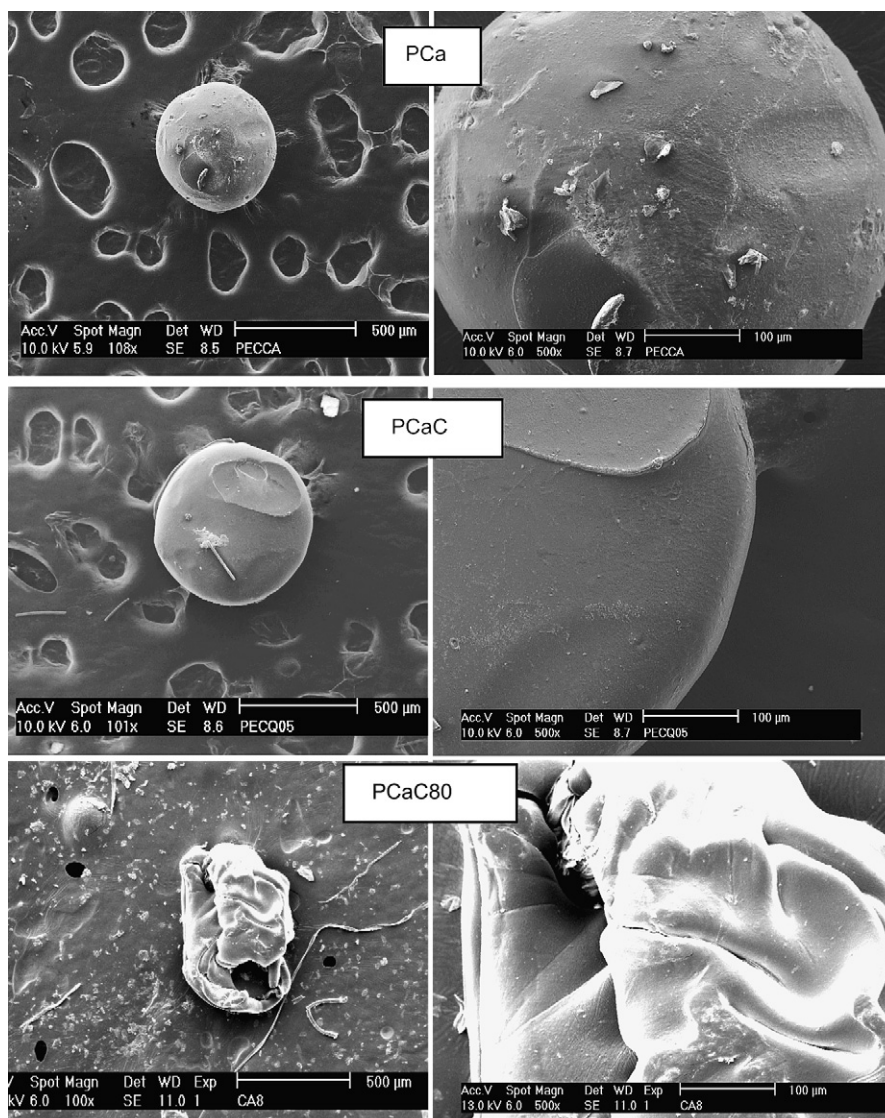


Fig. 4. Scanning electron micrographs of the PCa, PCaC and PCaC80 beads in two different amplifications.

after chitosan reacylation (PCa50 beads) corroborates the assumption of calcium release, done in FTIR study. The small decrease in the metal ion content in PCa50-M<sub>p</sub> indicates some interaction between mangiferin and pectin.

### 3.3. Swelling measurements

The swelling behavior of the beads was studied by the measurement of the diameter of the particles and determination of diameter increase ratio (DIR). Photography of beads after and before swelling is depicted in Fig. 5. The coating with chitosan, even being a thin layer, promotes the swelling in water. The PCa50 and PCaC80 beads after swelling are not spherical, as indicated by SEM. Both beads swell in high proportion in acid medium (pH = 1.2) and PCaC80 becomes more symmetric after absorption of acid.

#### 3.3.1. Kinetic of swelling - non-reacylated beads

The increase in swelling of PCa and PCaC beads with time can be seen in Fig. 6. For the simulation of gastric conditions, pH 1.2 buffer solution was used. Swelling in aqueous medium was also done.

The chitosan coating promotes an increase in the swelling degree, regardless of the medium. In acid medium, both spheres exhibited a higher degree of swelling in comparison with the swelling in water. In water a plateau was observed before 80 min, meaning that the swelling reaches equilibrium. In acid, the plateau, if reached, was only before 120 min. Different behavior was noted by Kim et al., (2003), where chitosan-coated pectin beads reached the equilibrium in the first 30 min in acid medium. It can be explained by higher molecular weight employed by them. Larger molecules of chitosan form more entanglements between chitosan and pectin and produce a stronger outer coating membrane (Kim et al., 2003).

The higher swelling in acid medium of PCaC beads can also be explained by the protonation of amine groups giving cationic groups (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) which cause repulsion between chains and a more expanded and hydrated structure. Kim et al. (2003), observed the contrary: pectin beads exhibited a higher swelling than the chitosan-coated. In chitosan-coated pectin beads, studied by them, no protonation of carboxyl groups of pectin was verified after coating, different from the behavior found here by FTIR.

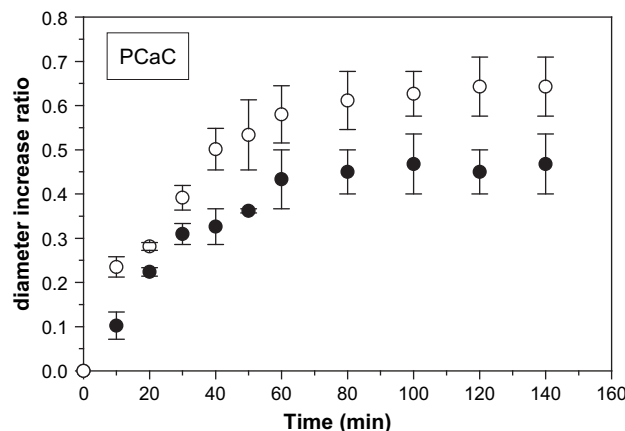
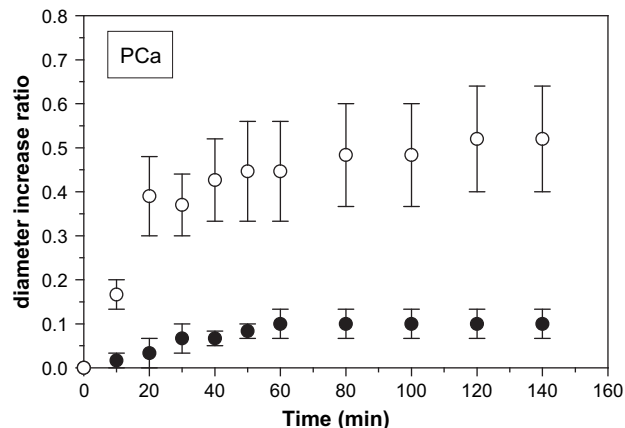


Fig. 6. Swelling for PCa and PCaC beads in aqueous (●) and acid (○) medium.

#### 3.3.2. Kinetic of swelling – reacylated beads

Fig. 7 shows the kinetic of swelling in pH 1.2 (SGF) and pH 7.4 (SIF) for the reacylated beads, with two different degree of reacylation. In all curves a plateau was observed at least at 80 min. The swelling reached equilibrium. The behavior is different

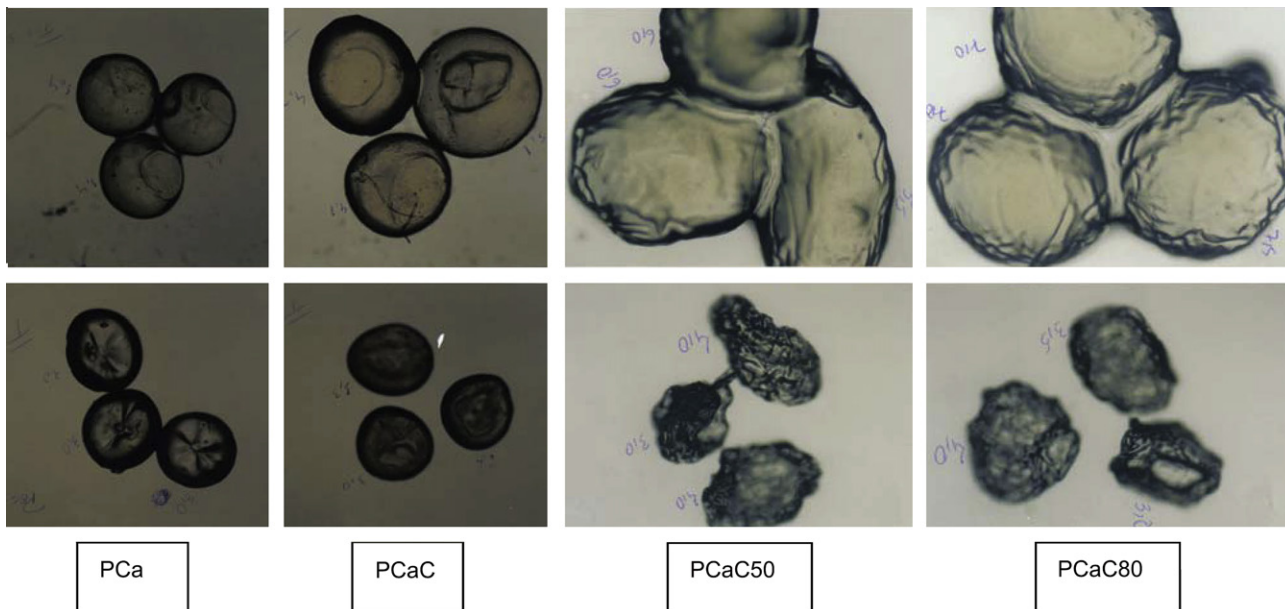


Fig. 5. Photography's of beads after (down) and before (up) swelling. PCa and PCaC beads in water. PCa50 and PCaC80 in acid medium (pH 1.2).

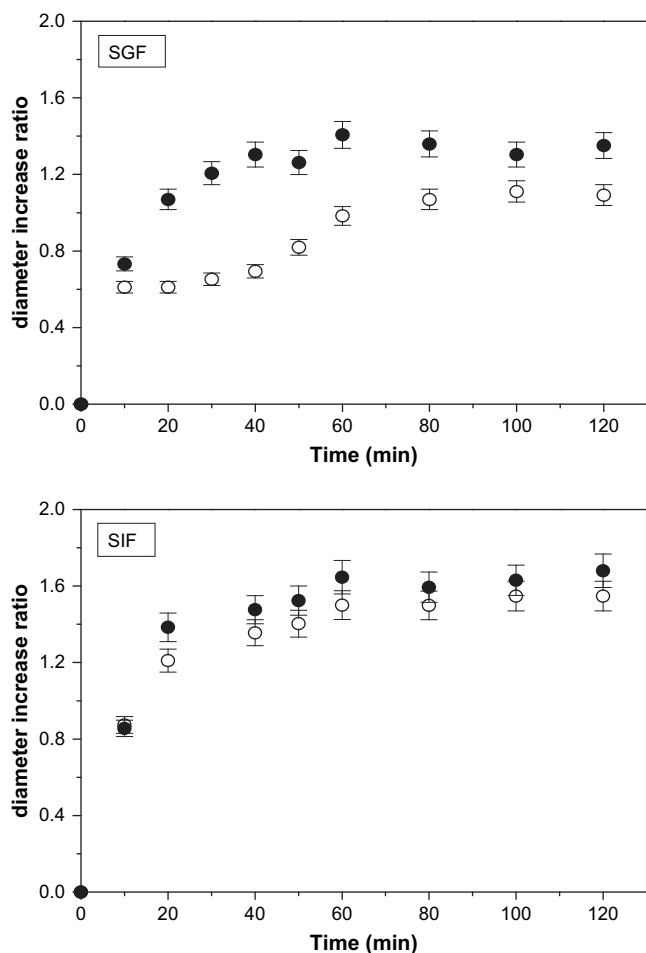


Fig. 7. Swelling in SGF (pH 1.2) and in SIF (pH 7.4) for PCaC reacylated beads: (○) PCaC50 and (●) PCaC80.

from that seen for PCaC beads (Fig. 6) in acid medium, attributed for the partial dissolution of chitosan. As expected, the reacylation prevented or reduced the dissolution.

The swelling in both medium of PCaC80 is higher than for PCaC50, and so increases with the degree of reacylation of the chitosan. In acid medium the beads swell less than in alkali. The beads could swell to a larger extent in alkali medium because the repulsion of fully negative charged  $-\text{COO}^-$  groups of pectin (Chang & Lin, 2000). A higher ionic strength of acid medium can also contribute for this behavior.

Comparison among the swelling of beads in equilibrium or close to in different medium can be seen in Table 3.

### 3.4. Beads loaded with mangiferin

The yield in producing the beads can be estimated by the mass of beads obtained and the amount of pectin, chitosan and mangiferin in the initial solution, 1.2 g, 250 mg and 20 mg, respectively, plus the amount of calcium incorporated, around 28 mg. The estimated yields are 36.4, 18.9 and 19.7%, for PCaC50- $M_p$ , PCaC50- $M_c$  and PCaC80- $M_p$ , respectively.

The loading efficiency depends on the beads. For PCaC50- $M_p$ , PCaC50- $M_c$  and PCaC80- $M_p$  it was 58, 27 and 13%, respectively. The lowest degree of reacylation of chitosan proves that it was the best system to load mangiferin. Between them, the incorporation in the pectin solution leads to a higher incorporation. The loading efficiencies of albumin in chitosan-coated pectin beads were much

Table 3

Comparison among the swelling degree of beads at equilibrium.

Beads	Diameter increase ratio in		
	Water	SGF (pH 1.2)	SIF (pH 7.4)
PCa	0.10	0.52	–
PCaC	0.46	0.64	–
PCaC50	–	1.10	1.52
PCaC80	–	1.34	1.64
PCaC50- $M_p$	–	1.25	1.07
PCaC50- $M_c$	–	1.05	1.49
PCaC80- $M_p$	–	0.99	1.59

higher, in the range of 58–74% (Kim et al., 2003). A loss of bioactive may have occurred during the reacylation process. This investigation has not yet been carried out by the authors.

The percentages of mangiferin in beads, not counting the mass of chitosan, were 2.13, 1.91 and 0.88%, for PCaC50- $M_p$ , PCaC50- $M_c$  and PCaC80- $M_p$ , respectively. The mass of the bioactive added in the initial solution represents 1.33% of total initial mass. The lowest percentage of mangiferin incorporated in the PCaC80 corroborates the possibility of bioactive being lost by reacylation, increased in this case.

A comparison among the three beads can be seen in Table 4. In relation to the yield, and the amount of mangiferin incorporated, the bead with the smaller degree of reacylation, and mangiferin added in pectin solution (PCaC50- $M_p$ ) is the best choice, followed by PCaC50- $M_c$ .

#### 3.4.1. Kinetic of swelling

The shape of beads loaded with mangiferin after and before swelling was similar to that observed in Fig. 5 for non-reacylated chitosan (PCaC50 and PCaC80). The swelling of PCaC50- $M_p$  is the highest in SGF, but the lowest in SIF (Fig. 8). The values for PCaC50- $M_c$  and PCaC80- $M_p$  can be considered as similar, either in SGF or in SIF. The swelling of PCaC50- $M_c$  increases slowly, in both medium, in comparison with the other beads. In this case, the mangiferin could be more superficial, increasing the hydrophobicity of the surface due to its insolubility in water and at pH 1.2 (0.10 mg/ml) and 7.4 (0.154 mg/ml). Another factor that certainly affects the swelling is the amount of loaded mangiferin, different in each case.

#### 3.4.2. Controlled release in vitro

The effect of the degree of reacylation of chitosan and the way in which the mangiferin was loaded over the cumulative release of the bioactive is depicted in Fig. 9. The release was divided in two zones: SGF and SIF. In addition, there is a third zone, at pH 5.0 containing pectinases, in conditions not studied here (Liu et al., 2007). The total released and the distribution in SGF and SIF depends on the bead. The low percentage released and the low ratio mass released/mass of bead are showed by PCaC50- $M_p$  (Table 5), the same bead that presented the highest yield and loading efficiency (Table 4). The percentage of albumin released from chitosan-coated pectin beads was around 35% in pH 7.4 and around 30% in pH 1.2 (Kim et al., 2003), lower than the values found here, except by PCaC50- $M_p$ . If the release is to be done in intestine, the PCaC80- $M_p$  is the adequate choice. The release depends on

Table 4

Comparison among the beads in relation to mangiferin loading.

Parameter	PCaC50- $M_p$	PCaC50- $M_c$	PCaC80- $M_p$
Yield in producing beads (%)	36	19	20
Efficiency in encapsulation (%) <sup>a</sup>	58	27	13
Mangiferin content in beads (%)	2.1	1.9	0.88

<sup>a</sup> In relation to the amount of mangiferin initially added (20 mg).

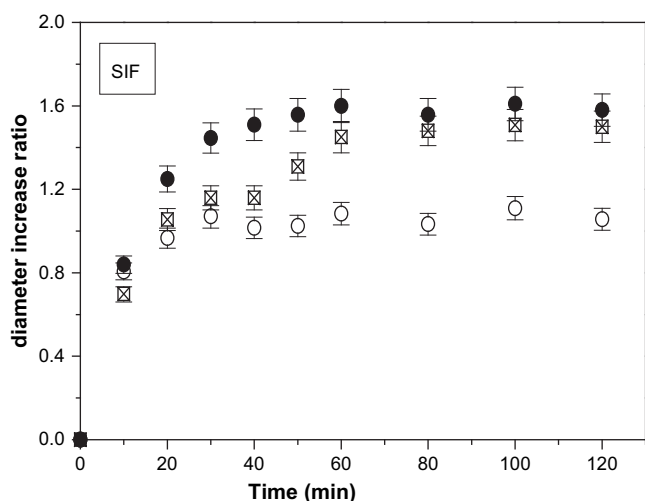
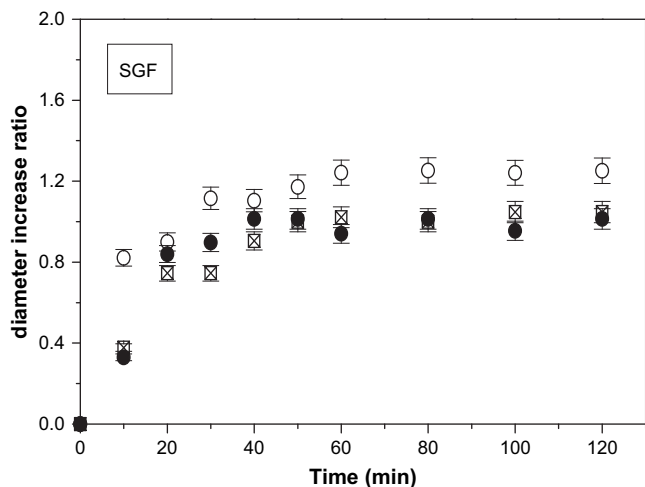


Fig. 8. Swelling in SGF (pH 1.2) and SIF (pH 7.4) for PCaC reacylated beads loaded with mangiferin: (○) PCaC50-M<sub>p</sub>, (□) PCaC50-M<sub>c</sub> and (●) PCaC80-M<sub>p</sub>.

various factors, such as solubility of mangiferin in the medium ( $S_m$ ), degree of swelling ( $W$ ), interaction bioactive-matrix and permeability of beads. If analyzed one by one, the release may increase with the increasing  $S_m$ , increasing  $W$ , increasing permeability of beads and decreasing interaction bioactive-matrix. Taking into

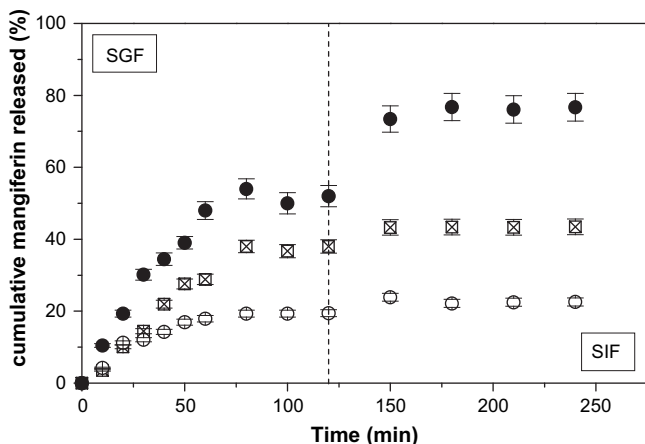


Fig. 9. Release of mangiferin from the beads: beads loaded with mangiferin: (○) PCaC50-M<sub>p</sub>, (□) PCaC50-M<sub>c</sub> and (●) PCaC80-M<sub>p</sub>.

Table 5  
Data of mangiferin encapsulation and release from beads.

Beads	% released <sup>a</sup> in		Total release (%)	Relative release (mg of M/g bead)		
	SGF	SIF		SGF	SIF	total
PCaC50-M <sub>p</sub>	19.4	5.8	25.2	4.1	1.3	5.4
PCaC50-M <sub>c</sub>	37.6	3.1	40.7	7.2	0.6	7.8
PCaC80-M <sub>p</sub>	52.0	24.3	76.3	4.6	2.1	6.7

<sup>a</sup> In relation to the mangiferin loaded.

account these parameters, the PCaC80-M<sub>p</sub> is the most permeable to mangiferin in SGF and PCaC50-M<sub>c</sub> is the least permeable and/or the one what promotes more interaction mangiferin-polymer in SIF.

The total release in vivo is probably higher, due to the adsorption of chitosan in the mucosa of the gastrointestinal tract (Kim et al., 2003) and the digestion of pectin by pectinases in colonic microflora (Bourgeois et al., 2006).

#### 4. Conclusion

Microspheres of pectin/Ca/chitosan were prepared. The layer of chitosan is in the range of 5–15 μm thick in a bead of approximately 660 μm of diameter. Chitosan was reacylated and the new bead was successfully used to load mangiferin. The reacylation causes deformation on the bead shape, which becomes more irregular and rough. The yields on the preparation of beads varied between 19 and 36%, being the bead with the lowest degree of reacylation and with mangiferin incorporated in pectin solution (PCaC50-M<sub>p</sub>) the one that presented better result. The swelling ratio of the beads in simulated gastric fluid (pH 1.2) stayed in the range of 0.99–1.25 and in a range slightly higher (1.07–1.59) in simulated intestine fluid (pH 7.4). Taking into account the yield and the efficiency in mangiferin encapsulation, PCaC50-M<sub>p</sub> was the best choice.

The release percentage of mangiferin from all the beads is higher in SGF than in SIF, which means that the major fraction of the bioactive is lost in the stomach. If the release in intestine is expected, the most efficient beads are the PCaC80-M<sub>p</sub>, which gives 2.1 mg of mangiferin per g of bead.

The final conclusion is that it is possible to load mangiferin in matrices of pectin/calcium/chitosan reacylated and release it in stomach and intestine. The material shows a potential application as nutraceutical to be added in functional foods, and also to improve gastroprotection, already found for mangiferin itself (Carvalho et al., 2007). The gastroprotection effect of chitosan-coated pectin bead loaded with mangiferin is being tested and will be subject of a future paper.

#### Acknowledgements

The authors would like to express their thanks to financial support by CNPq, CAPES, FUNCAP, and also to Rede Nanobiocombiotec/MCT/CNPq.

#### References

Barreto, J. C., Trevisan, M. T. S., Hull, W. E., Erben, G., de Brito, E. S., Pfundstein, B., et al. (2008). Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves and peel of mango. (*Mangifera indica* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5599–5610).

Bernabé, P., Peniche, C., & Arguelles-Monal, W. (2005). Swelling behavior of chitosan/pectin polyelectrolyte complex membrane. Effect of thermal cross-linking. *Polymer Bulletin*, 55, 367–375.

Bourgeois, S., Gernet, M., Pradeau, D., Andremont, A., & Fattal, E. (2006). Evaluation of critical formulation parameters influencing the bioactivity of β-lactamases entrapped in pectin beads. *International Journal of Pharmaceutics*, 324, 2–9.

Carvalho, A. C. S., Guedes, M. M., de Souza, A. L., Trevisan, M. T. S., Lima, A. F., Santos, F. A., et al. (2007). Gastroprotective effect of mangiferin, a xanthonoid

- from *Mangifera indica*, against gastric injury induced by ethanol and indomethacin in rodents. *Planta Medica*, 73, 1372–1376.
- Coenen, G. J., Bakx, E. J., Verhoef, R. P., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (2007). Identification of the connecting linkage between homo- or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I. *Carbohydrate Polymers*, 70, 224–235.
- Dar, A., Faizi, S., Naqvi, S., Roome, T., Zikr-ur-Rehman, S., Ali, M., et al. (2005). Analgesic and antioxidant activity of mangiferin and its derivatives: the structure activity relationship. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28, 596–600.
- Deng, J., & Yuan, Y. (2007). Preparation method and application of water-soluble mangiferin monosodium salt. CN1919857-A Chinese Patent.
- Duchateau, G. S. M. J. E., & Klaffke, W. (2008). Product composition, structure, and bioavailability. *Food Biophysics*, 3, 207–212.
- Garcia, D., Escalante, M., Delgado, R., Ubeira, F. M., & Leiro, J. (2003). Anthelmintic and anti-allergic activities of *Mangifera indica* L. stem bark components Vimang and mangiferin. *Phytotherapy Research*, 17, 1203–1208.
- Grasdalen, H., Bakoy, O. E., & Larsen, B. (1988). Determination of the degree of esterification and the distribution of methylated and free carboxyl groups in pectins by H-1-NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 184, 183–191.
- Guha, S., Ghosal, S., & Chattopadhyay, U. (1996). Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone. *Chemotherapy*, 42, 443–451.
- Jageta, G. C., & Baiga, M. S. (2005). Radioprotection by mangiferin in DBAxC57BL mice: a preliminary study. *Phytomedicine*, 12, 209–215.
- Kamburova, K., Milkova, V., Petkanchin, I., & Radeva, T. (2008). Effect of pectin charge density on formation of multilayer films with chitosan. *Biomacromolecules*, 9, 1242–1247.
- Kamnev, A. A., Colina, M., Rodriguez, J., Ptitchkina, N. M., & Ignatov, V. V. (1998). Comparative spectroscopic characterization of different pectins and their sources. *Food Hydrocolloids*, 12, 263–271.
- Kim, T. H., Park, Y. H., Kim, K. J., & Cho, C. S. (2003). Release of albumin from chitosan-coated pectin beads in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*, 250, 371–383.
- Lawrie, G., Keen, I., Drew, B., Chandler-Temple, A., Rintoul, L., Fredericks, P., et al. (2007). Interaction between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*, 8, 2533–2541.
- Liu, L. S., Fishman, M. L., & Hicks, K. B. (2007). Pectin in controlled drug delivery – a review. *Cellulose*, 14, 15–24.
- Liu, L. S., Fishman, M. L., Kost, J., & Hicks, K. B. (2003). Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials*, 24, 3333–3343.
- Macleod, G. S., Collett, J. H., & Fell, J. T. (1999). The potential use of mixed films of pectin, chitosan and HPMC for bimodal drug release. *Journal of Controlled Release*, 58, 303–310.
- Madziva, H., Kailasapathy, K., & Phillips, M. (2006). Evaluation of alginate–pectin capsules in cheddar cheese as a food carrier for the delivery of folic acid. *LWT-Food Science and Technology*, 39, 146–151.
- Magalhães, G. A., Jr., Santos, C. M. W., Silva, D. A., Maciel, J. S., Feitosa, J. P. A., Paula, H. C. B., et al. (2009). Microspheres of chitosan/carboxymethyl cashew gum (CMCG): effect of chitosan molar mass and CMCG degree of substitution on the swelling and BSA release. *Carbohydrate Polymers*, 77, 217–222.
- Matute, A. C., Sanchez G. M. V., Campos, E. R., Alberti, A. E., Gottlieb, M., Ibarretxe, B. G., et al. (2007). Food products for treating and preventing neurodegenerative diseases and ageing symptoms, contain morin or mangiferin. WO2007077279-A1; ES2277567-A1 Spanish Patent.
- Morris, G. A., Garcial de al Torre, J., Ortega, A., Castile, J., Smith, A., & Harding, S. E. (2008). Molecular flexibility of citrus pectins by combined sedimentation and viscosity analysis. *Food Hydrocolloids*, 22, 1435–1442.
- Pardo-Andreu, G. L., Dorta, D. J., Delgado, R., Cavalheiro, R. A., Santos, A. C., Vercesi, A. E., et al. (2006). Vimang (*Mangifera indica* L. extract) induces permeability transition in isolated mitochondria, closely reproducing the effect of mangiferin, Vimang's main component. *Chemico-Biological Interactions*, 159, 141–148.
- Rashidova, S. Sh., Milusheva, R. Yu., Semenova, L. N., Mukhamedjanova, M. Yu., Voropaeva, N. L., Vasilyeva, S., et al. (2004). Characteristics of interactions in the pectin-chitosan system. *Chromatographia*, 59, 779–782.
- Rivera, D. G., Balmaseda, I. H., Leon, A. A., Hernandez, B. C., Montiel, L. M., Garrido, G. G., et al. (2006). Anti-allergic properties of *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and contribution of its glucosylxanthone mangiferin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58, 385–392.
- Rosenbohm, C., Lundt, I., Christensen, T. M. I. E., & Young, N. W. G. (2003). Chemically methylated and reduced pectins: preparation, characterisation by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy, enzymatic degradation, and gelling properties. *Carbohydrate Research*, 338, 637–649.
- Sanchez, G. M., Re, L., Giuliani, A., Nunez-Selles, A. J., Davison, G. P., & Leon-Fernandez, O. S. (2000). Protective effects of *Mangifera indica* L. extract, mangiferin and selected antioxidants against TPA-induced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. *Pharmacological Research*, 42, 565–573.
- Sriamornsak, P., & Nunthanid, J. (1998). Calcium pectinate gel beads for controlled release drug delivery: I. Preparation and in vitro release studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 160, 207–212.
- Teng, H., Yu, C., Zhai, D. Li, Z., & Liu, J. (2007). Medical combination containing mangiferin and its preparation. CN1977855-A Chinese Patent.
- Wada, M. (2007). Foodstuffs compounding agent for treating diabetes comprises glycoside having xanthone structure. JP2007204462-A Japanese Patent.
- Wang, Z., Deng, J. Li, X., & Wang, Q. (2007). Dissoluble mangiferin inclusion compound and its preparation method. CN101019877-A Chinese Patent.
- Weiss, J., Decker, E. A., McClements, J., Kristbergsson, K., Helgason, T., & Awad, T. (2008). Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. *Food Biophysics*, 3, 146–154.
- Wildman, R. E. C. (2001). In R. E. C. Wildman (Ed.), *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. New York: CRC Press.
- Willats, W. G. T., Knox, J. P., & Mikkelsen, J. D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 97–104.
- Winning, H., Viereck, N., Nørgaard, L., Larsen, J., & Engelsen, S. B. (2007). Quantification of the degree of blockiness in pectins using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and chemometrics. *Food Hydrocolloids*, 21, 256–266.
- Yoo, S.-H., Fishman, M. L., Hotchkiss, A. T., Jr., & Lee, H. G. (2006). Viscometric behavior of high-methoxy and low-methoxy pectin solutions. *Food Hydrocolloids*, 20, 62–67.
- Yoosook, C., Bunyapraphatsara, N., Boonyakiat, Y., & Kantasuk, C. (2000). Anti-herpes simplex virus activities of crude water extracts of Thai medicinal plants. *Phytomedicine*, 6, 411–419.