

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-Graduação em Química
Mestrado em química

Nelson Luis Gonçalves Dias de Souza

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE UM
EXTRATO FÚNGICO A PARTIR DE VARIADOS POLÍMEROS PARA
APLICAÇÕES EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Juiz de Fora

2011

Nelson Luis Gonçalves Dias de Souza

Desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de um extrato fúngico a partir de variados polímeros para aplicações em medicina veterinária

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração: Físico-Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira
Co-orientador: Dr. Humberto de Mello Brandão

Juiz de Fora
2011

Souza, Nelson Luís Gonçalves Dias de.

Desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de um extrato fúngico a partir de variados polímeros para aplicações em Medicina Veterinária / Nelson Luís Gonçalves Dias de Souza. – 2011.

107 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Química)–Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011.

1. Fungos. 2. Espectroscopia I. Título.

CDU 582.28

Este trabalho é dedicado a toda minha família e amigos que estiveram ao meu lado me incentivando e apoiando e de alguma forma fizeram possível à conclusão desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

À *minha mãe Patrícia*, pela dedicação, incentivo, paciência e amor que teve durante toda minha vida, que fez com que pudesse crescer e realizar meus sonhos, objetivos e concluir mais essa etapa.

Ao meu pai Severino, pelo amor e por ter tornado possível a conclusão dos meus estudos, serei imensamente grato.

À *minha irmã Clarissa*, que sempre esteve presente e me incentivou, sendo além de irmã amiga, ajudando na obtenção dos meus objetivos, agradeço de coração.

À *avó, Zuca, Tia Cláudia e Prima Fernanda*, pelo amor e apoio dado durante minha trajetória, que a tornou mais fácil.

Ao meu Tio Hélio, pelo carinho, ajuda e apoio que por diversas vezes fez ser possível a conclusão dos meus estudos.

À *Ruth*, pela ajuda e apoio dado a toda minha família.

À *amiga Stephane*, por ter feito parte da minha vida desde oitava série, agradeço pelos inúmeros momentos de alegria e felicidade que passamos juntos e pela amizade e compreensão incondicional.

À *amiga Vanessa*, um agradecimento especial, pela ajuda científica e amizade que fez com que o trabalho no laboratório tornasse sempre agradável.

Às *amigas Carol e Maria Edwiges*, pela amizade incondicional, paciência, por sempre estarem dispostas a me ouvir e pelos momentos essenciais de descontração.

Ao amigo Kelber, pela amizade e carinho e que apesar de estar distante sempre estará presente na minha vida.

Ao amigo Arthur, por ter participado do meu crescimento pessoal.

Aos orientadores Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira e Dr. Humberto de Mello Brandão, pela excelente orientação, pela paciência, incentivo, compreensão, amizade. Pelo exemplo que é como pessoa e pesquisador. Muito obrigado por ter me dado esta oportunidade.

A Universidade Federal de Juiz de Fora e a EMBRAPA Gado de Leite por possibilitar a realização deste trabalho.

Aos órgãos (CNPQ/CAPES/FAPEMIG) pelo financiamento.

Aos colaboradores da EMBRAPA (Jailton da Costa Carneiro e Anna Carolynne Alvin Duque), pela colaboração na realização dos experimentos com os animais, sem os quais não seria possível realizar este trabalho.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Química da UFJF, que contribuíram para minha formação.

Aos parceiros e todos os colegas do NEEM e do NUPEQ, pelos necessários momentos de descontração.

A Deus, por permitir o cumprimento de mais uma etapa.

*"Obstáculo é aquilo que você enxerga,
quando tira os olhos do seu objetivo."*

Henry Ford

RESUMO

A bovinocultura é uma das principais atividades pecuaristas que é desenvolvida no Brasil, sua importância é refletida no desenvolvimento econômico e social do país. Essa atividade é responsável pelo desenvolvimento de empregos sendo esses tanto diretamente na fazenda (produção de gado para corte ou leiteiro) ou no beneficiamento desses produtos. Sua importância é tão relevante que o número de cabeças de gado presentes no país já ultrapassa o dos habitantes. Devido a sua relevância os fatores que afetam sua produtividade e de extrema importância. Um dos fatores que podem influenciar sua produção é a ocorrência de doenças ou deficiências nutricionais que, contudo podem ser resolvidas utilizando medicamentos ou suplementos alimentares. Porém a aplicação dessas drogas se torna difícil e caro devido à necessidade da manipulação frequente do rebanho. Uma das formas de se contornar essa dificuldade é a utilização de sistemas de liberação controlada. Esses sistemas podem ser concebidos de diversas maneiras, uma dessas formas é uso de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis como matriz para a liberação do medicamento. Assim esse trabalho num primeiro momento estuda a estabilidade físico-química de dois polímeros, quitosana e poli(ϵ -caprolactona), ao entrarem em contato com o ambiente ruminal com o objetivo de analisar seu uso como matriz para sistemas de liberação. Para avaliação da estabilidade dos polímeros foi utilizado às técnicas vibracionais: absorção no infravermelho e Raman; termogravimétricas: TG e DSC e espectroscopia eletrônica. Num segundo momento o presente trabalho prevê a construção de sistemas de liberação utilizando esses polímeros juntamente com o coacervato de cálcio de modo a liberar um extrato fúngico entre 8 e 12 horas. No fim do trabalho foi possível verificar uma maior estabilidade do polímero PCL (poli(ϵ -caprolactona)) que foi utilizado para a construção do sistema de liberação, já a quitosana apresentou uma baixa estabilidade e por esse motivo não se construiu nenhum sistema a partir da mesma. Os dispositivos construídos a partir do PCL e coacervato se mostraram versáteis podendo-se obter diferentes taxas de liberação dependendo da proporção entre eles, seu formato e área superficial.

Palavras-chave: Quitosana, poli(ϵ -caprolactona), espectroscopia vibracional, análise termogravimétrica, Sistemas de liberação.

ABSTRACT

The cattle industry is one of the main activities developed in Brazil, and its importance is reflected in the country economic and social development. This activity is responsible for developing jobs which come from the farm (production of cattle for beef or dairy) until the high technology industry of dairy products. Because of this, the factors which affect its productivity are extremely important. One factor that influences its production is the occurrence of diseases or nutritional deficiencies, which can be solved using drugs or food supplements; however, the application of these drugs becomes difficult and expensive due to the need for frequent handling of the herd. One way of circumventing this difficulty is the use of controlled delivery systems. These systems can be designed in different ways; one of those ways is the use of biodegradable and biocompatible polymers as a matrix for drug release. Therefore, this work presents the study of the physical and chemical stability of both polymers, chitosan and poly(ϵ -caprolactone), in the ruminal environment in order to examine their use as a matrix for delivery systems. To evaluate the stability of polymers it has been used vibrational techniques (infrared absorption and Raman), thermogravimetric (TG and DSC) as well as electronic spectroscopy. In a second step this work involves the construction of delivery systems using these polymers and calcium polyphosphate coacervate to produce a blend in order to release a fungal extract between 8 and 12 hours. At the end of the study it has been shown the great stability of the PCL polymer, which was used to build a delivery system, already chitosan has showed a low chemical stability and therefore it was not use to build system delivery. The devices constructed from PCL and coacervate showed to be versatile can generate different release rates depending on the ratio between its constituents, their shape and surface area.

Keywords: Chitosan, poly(ϵ -caprolactone), vibrational spectroscopy, thermal analysis, drug delivery systems.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Unidades estruturais da lignina álcoois p-comaril (a), conferil (b) e sinapil (c) além dos ácidos p-cumárico (d), ferúlico (e) e sinápico (f).....	20
Figura 2. Esquema do sistema digestivo bovino.....	22
Figura 3. Estrutura química da celulose.....	23
Figura 4. Esquema da degradação da matriz e conseqüente liberação da droga.....	24
Figura 5. Esquema de difusão de um sistema de liberação do tipo reservatório.....	26
Figura 6. Esquema de difusão de um sistema de liberação do tipo matriz dispersa.....	26
Figura 7. Estrutura química de homopolímeros: (a) polietileno, (b) polipropileno, (c) poli(cloreto devinila).....	27
Figura 8. Estrutura química das unidades repetitivas (meros) do poli(cis-isopreno) e do poli(transisopreno).....	28
Figura 9. Classificação dos polímeros quanto a sua natureza.....	30
Figura 10. Estrutura química do PCL, onde n=5.....	32
Figura 11. Estrutura química da quitosana (x < 50 %) e quitina (x > 50 %).	32
Figura 12. Desacetilação alcalina da quitina.....	33
Figura 13. Esquema rompimento da ligação P-O-P nos polifosfatos.....	34
Figura 14. Transição vibracional.....	38
Figura 15. Transição vibrônica.....	39
Figura 16. Esquema dos mecanismos de espalhamento.....	42
Figura 17. Diagrama de níveis de energia.....	45
Figura 18. Curva TG.....	48
Figura 19. Exemplo de curva DSC.....	49
Figura 20. Esquema para incubação das amostras.....	51
Figura 21. Vaca com fístula ruminal.....	52
Figura 22. Formação de enedióis (a) redução do 3,5-dinitro-salicílico (b).....	55
Figura 23. Espectro na região do infravermelho de QA (a) e QB (b).....	59
Figura 24. Espectro na região do infravermelho da amostra de QA incubada na vaca A com alimentação exclusiva a <i>brachiaria decumbens</i> nos respectivos tempos de incubação.....	59

Figura 25. Espectro na região do infravermelho da amostra de QA incubada na vaca B com alimentação exclusiva a <i>brachiaria decumbens</i> nos respectivos tempos de incubação.	60
Figura 26. Espectro na região do infravermelho da amostra de QA incubada na vaca C com alimentação exclusiva a <i>brachiaria decumbens</i> nos respectivos tempos de incubação.	60
Figura 27. Espectro na região do infravermelho da amostra de QB incubada na vaca A com alimentação exclusiva a <i>brachiaria decumbens</i> nos respectivos tempos de incubação.	61
Figura 28. Espectro na região do infravermelho da amostra de QB incubada na vaca B com alimentação exclusiva a <i>brachiaria decumbens</i> nos respectivos tempos de incubação.	61
Figura 29. Espectro na região do infravermelho da amostra de QB incubada na vaca C com alimentação exclusiva a <i>brachiaria decumbens</i> nos respectivos tempos de incubação.	62
Figura 30. Espectro na região do infravermelho da amostra de QA incubada na vaca D com alimentação exclusiva a silagem nos respectivos tempos de incubação.....	62
Figura 31. Espectro na região do infravermelho da amostra de QA incubada na vaca E com alimentação exclusiva a silagem milho nos respectivos tempos de incubação.	63
Figura 32. Espectro na região do infravermelho da amostra de QA incubada na vaca F com alimentação exclusiva a silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.	63
Figura 33. Espectro na região do infravermelho da amostra de QB incubada na vaca D com alimentação exclusiva a silagem milho nos respectivos tempos de incubação.	64
Figura 34. Espectro na região do infravermelho da amostra de QB incubada na vaca E com alimentação exclusiva a silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.	64
Figura 35. Espectro na região do infravermelho da amostra de QB incubada na vaca F com alimentação exclusiva a silagem milho nos respectivos tempos de incubação.	65
Figura 36. Espectro na região do infravermelho da amostra de QA incubada na vaca A com alimentação exclusiva a <i>brachiaria decumbens</i> incubada no rúmen por 168 h. ..	65
Figura 37. Espectro na região do infravermelho ampliado da amostra de QB encubada na vaca E por 168 horas com alimentação restrita a silagem de milho.	67
Figura 38. Espectro eletrônico das amostras de QA incubadas na vaca A com alimentação exclusiva de <i>brachiaria decumbens</i> nos respectivos tempos de incubação.	67

Figura 39. Espectro eletrônico das amostras de QA incubadas na vaca B com alimentação exclusiva de <i>brachiaria decumbens</i> nos respectivos tempos de incubação.	67
Figura 40. Espectro eletrônico das amostras de QA incubadas na vaca C com alimentação exclusiva de <i>brachiaria decumbens</i> nos respectivos tempos de incubação.	68
Figura 41. Espectro eletrônico das amostras de QB incubadas na vaca A com alimentação exclusiva de <i>brachiaria decumbens</i> nos respectivos tempos de incubação.	68
Figura 42. Espectro eletrônico das amostras de QB incubadas na vaca B com alimentação exclusiva de <i>brachiaria decumbens</i> nos respectivos tempos de incubação.	68
Figura 43. Espectro eletrônico das amostras de QB incubadas na vaca C com alimentação exclusiva de <i>brachiaria decumbens</i> nos respectivos tempos de incubação.	68
Figura 44. Espectro eletrônico das amostras de QA incubadas na vaca D com alimentação exclusiva de silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.....	68
Figura 45. Espectro eletrônico das amostras de QA incubadas na vaca com alimentação exclusiva de silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.....	68
Figura 46. Espectro eletrônico das amostras de QA incubadas na vaca com alimentação exclusiva de silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.....	69
Figura 47. Espectro eletrônico das amostras de QB incubadas na vaca D com alimentação exclusiva de silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.....	69
Figura 48. Espectro eletrônico das amostras de QB incubadas na vaca E com alimentação exclusiva de silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.....	69
Figura 49. Espectro eletrônico das amostras de QB incubadas na vaca F com alimentação exclusiva de silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.....	69
Figura 50. Espectro Raman das amostras de quitosana.	70
Figura 51. Espectros na Raman das amostras de QA incubadas na vaca A, B e C com alimentação exclusiva de <i>brachiaria decumbens</i> nos respectivos tempos de incubação.	71
Figura 52. Espectros na Raman das amostras de QB incubadas na vaca A, B e C com alimentação exclusiva de silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.	71
Figura 53. Espectros na Raman das amostras de QA incubadas na vaca D, E e F com alimentação exclusiva de silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.	72

Figura 54. Espectros na Raman das amostras de QB incubadas nas vacas D, E e F com alimentação exclusiva de <i>brachiaria decumbens</i> nos respectivos tempos de incubação.	72
Figura 55. Curva TG das amostras de QA e QB.....	73
Figura 56. Curvas TG das amostras de QA, QB e das amostras incubadas por 168 h no rúmen.	74
Figura 57. Curvas DSC das amostras QA e QB.....	75
Figura 58. Curvas DSC das amostras de QA e QB antes e após serem incubadas nas vacas com alimentação exclusiva de <i>brachiaria decumbens</i> por 168 horas.	76
Figura 59. Curvas DSC das amostras de QA e QB antes e após serem incubadas nas vacas com alimentação exclusiva de silagem de milho por 168 horas.....	76
Figura 60. Espectros de absorção no infravermelho das amostras indicadas.....	78
Figura 61. Espectros Raman das amostras indicadas.....	78
Figura 62. Espectro Raman das enzimas proteolíticas do rúmen.....	78
Figura 63. Espectros eletrônicos dos compostos indicados.	79
Figura 64. Curvas TG das amostras de QA, QB, EA e EB.....	80
Figura 65. Curva da DSC das amostras indicadas.	81
Figura 66. Esquema dos processos de decomposição que ocorre na QA e QB ao entrar no ambiente ruminal.	82
Figura 67. Espectros na região do infravermelho para amostras de PCL incubadas na vaca A com alimentação exclusiva de <i>brachiaria decumbens</i> nos respectivos tempos de incubação.	83
Figura 68. Espectros na região do infravermelho para amostras de PCL incubadas na vaca B com alimentação exclusiva de <i>brachiaria decumbens</i> nos respectivos tempos de incubação.	83
Figura 69. Espectros na região do infravermelho para amostras de PCL incubadas na vaca C com alimentação exclusiva de <i>brachiaria decumbens</i> nos respectivos tempos de incubação.	84
Figura 70. Espectros na região do infravermelho para amostras de PCL incubadas na vaca D com alimentação exclusiva de Silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.	84

Figura 71. Espectros na região do infravermelho para amostras de PCL incubadas na vaca E com alimentação exclusiva de Silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.	85
Figura 72. Espectros na região do infravermelho para amostras de PCL incubadas na vaca F com alimentação exclusiva de Silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.	85
Figura 73. Espectros Raman das amostras de PCL incubadas na vaca A com alimentação exclusiva de <i>brachiaria decumbens</i> nos respectivos tempos de incubação.	86
Figura 74. Espectros Raman das amostras de PCL incubadas na vaca B com alimentação exclusiva de <i>brachiaria decumbens</i> nos respectivos tempos de incubação.	87
Figura 75. Espectros Raman das amostras de PCL incubadas na vaca C com alimentação exclusiva de <i>brachiaria decumbens</i> nos respectivos tempos de incubação.	87
Figura 76. Espectros Raman das amostras de PCL incubadas na vaca D com alimentação exclusiva de silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.	88
Figura 77. Espectros Raman das amostras de PCL incubadas na vaca E com alimentação exclusiva de Silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.	88
Figura 78. Espectros Raman das amostras de PCL incubadas na vaca F com alimentação exclusiva de Silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.	89
Figura 79. Curvas TG das amostras de PCL e das incubadas por 168 h no rúmen para alimentação exclusiva de silagem de milho (vacas D, E e F) e <i>a brachiaria decumbens</i> . (vacas A, B e C).	90
Figura 80. Curvas DSC das amostras de PCL incubadas nas vacas por 168 horas com alimentação restrita a <i>brachiaria decumbens</i> (a) e a silagem (b).	91
Figura 81. Curva de liberação do sistema composto por PCL e o extrato enzimático fúngico.	92
Figura 82. Curva de liberação do sistema composto por 40 % PCL e 60% de coacervato. ...	93
Figura 83. Curva de liberação do sistema composto por 70 % de PCL e 30 % de coacervato de cálcio.	93
Figura 84. Curva de liberação do sistema composto por 30 % de PCL e 70 % de coacervato de cálcio.	94
Figura 85. Curva de liberação do sistema composto por 50 % de PCL e 50 % de coacervato de cálcio.	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Curva de calibração.	56
Tabela 2 Valor de número de ondas (cm^{-1}) obtido no espectro de absorção no infravermelho para as amostras de QA e QB.	58
Tabela 3 Valores do número de onda (cm^{-1}) dos espectros Raman obtidos das amostras de quitosana.	70
Tabela 4 Dados termogravimétricos das amostras incubadas no rúmen bovino por 168 h.	74
Tabela 5 Resultados de DSC das amostras incubadas no rúmen bovino por 168 h.	77
Tabela 6 Dados termogravimétricos das amostras incubadas no rúmen bovino por 168 h.	80

LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E SÍMBOLOS

PCL	Poli(ϵ-caprolactona)
QA	Quitosana alta densidade
QB	Quitosana baixa densidade
EA	Quitosana alta densidade incubada <i>in vitro</i>
EB	Quitosana baixa densidade incubada <i>in vitro</i>
TG	Análise termogravimétrica
DSC	Calorimetria Diferencial Exploratória
IV	Infravermelho
υ	Estiramento
δ	Deformação
DNS	cido 3,5 dinitrosalicílico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	BOVINOCULTURA	19
1.2	RUMINANTES	21
1.3	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO	24
1.4	POLÍMEROS	27
1.4.1	Biodegradação de polímeros	29
1.4.2	Polímeros em sistemas de liberação	29
1.4.3	PCL	31
1.4.4	Quitosana	32
2	TÉCNICAS UTILIZADAS	36
2.1	ESPECTROSCOPIA MOLECULAR	36
2.1.1	Espectroscopia de Absorção no infravermelho	37
2.1.2	Espectroscopia Raman	39
2.2	ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA	44
2.3	Métodos Térmicos	47
2.3.1	Temogravimetria (TG)	47
2.3.2	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	49
3	PARTE EXPERIMENTAL	50
3.1	EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS RUMINAL	50
3.2	ENSAIOS DE INCUBAÇÃO	50
3.2.1	Incubação ruminal in vivo	50
3.2.2	Incubação <i>in vitro</i>	52
3.3	CONSTRUÇÃO DOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO	53
3.3.1	Síntese do coacervato de cálcio	53
3.3.2	Sistema de liberação composto por PCL e coacervato de cálcio	53
3.3.3	Sistema de liberação composto por PCL	53
3.4	ENSAIOS DE ENTREGA CONTROLADA	54
3.5	MÉTODOS PARA ANÁLISE DA ENTREGA CONTROLADA	54
3.5.1	Descolorimetria	54

3.5.2	Método de Miller	55
3.6	INSTRUMENTAÇÃO	56
3.6.1	Espectroscopia vibracional	56
3.6.2	Espectroscopia Eletrônica	57
3.6.3	Termogravimetria e diferencial termogravimétrica	57
3.6.4	Calorimetria Diferencial Exploratória	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
4.1	INCUBAÇÃO <i>IN VIVO</i> DAS AMOSTRAS DE QUITOSANA ALTA E BAIXA DENSIDADE	58
4.2	INCUBAÇÃO <i>IN VITRO</i> DAS AMOSTRAS DE QUITOSANA ALTA E BAIXA DENSIDADE	77
4.3	INCUBAÇÃO <i>IN VIVO</i> DAS AMOSTRAS DE PCL.....	82
4.4	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO.....	91
5	CONCLUSÕES	96
	REFERÊNCIAS	98
	ANEXO	106

1 Introdução

1.1 Bovinocultura

A bovinocultura constitui uma atividade tradicional da pecuária desde o processo de colonização do Brasil, sendo reconhecida como uma das mais importantes do agronegócio, tanto sob a ótica social quanto econômica. Está presente em todo território nacional, desempenhando um papel relevante no suprimento de alimentos, na geração de empregos e de renda para a população (Pereira, 2009). O Brasil tem o maior rebanho bovino do mundo sendo cerca 195,5 milhões de cabeças de gado, mais do que a população brasileira - aproximadamente 182 milhões de pessoas (Rocha, 2010).

Muitos fatores estão envolvidos na produtividade da bovinocultura no Brasil; um desses fatores é o tipo de alimentação que é fornecida ao rebanho e, entre os tipos de alimentação fornecida, as mais comumente usadas são forrageiras. Estas se dividem em dois grupos quanto ao metabolismo fotossintético: as espécies de ciclo C3, que apresentam fotorrespiração e temperaturas ótimas para a fotossíntese entre 15 e 20 °C (leguminosas e gramíneas temperadas, como a aveia preta e o azevém), o ponto de saturação de luz é baixo, sendo os limites de temperatura mínima de 5 e de máxima de 24 °C. No outro grupo, as espécies de ciclo C4 não apresentam fotorrespiração aparente e as temperaturas ótimas para a fotossíntese encontram-se entre 28 e 38 °C (gramíneas tropicais). O ponto de saturação de luz é alto e os limites de temperatura mínima é 10 e máxima de 45 °C. A concentração de oxigênio não afeta a fotossíntese e apresenta maior eficiência fotossintética em relação às espécies C3 (Pilau, 2003).

As plantas C4 apresentam maior eficiência de utilização do nitrogênio nos processos de assimilação, assim produzindo duas vezes mais matéria seca por unidade de nitrogênio presente nas folhas. Porém, apresenta menor grau de digestibilidade devido à maior concentração de lignina, o que acaba limitando o aumento da produtividade (Hatfield, Ralph et al., 1999).

Do ponto de vista estrutural, em geral, a lignina possui três álcoois aromáticos conhecidos como conferil, sinapil e *p*-coumaril e também alguns ácidos (Figura 1). Os termos “core” e “con-core” têm sido utilizados para diferenciar alguns tipos de ligninas em forrageiras (Paciullo, 2002). O primeiro tipo refere-se ao polímero de fenilpropanóides

depositado na parede celular, pela polimerização dos álcoois precursores coniferil, sinapil e ρ -coumaril. A lignina “non-core” representa os ácidos fenólicos ρ -cumárico, ferúlico e sinápico (e seus dímeros) depositados na parede celular durante sua formação. Esses ácidos podem estar ligados à lignina “core”, aos polissacarídeos ou a ambos, simultaneamente (Paciullo, 2002).

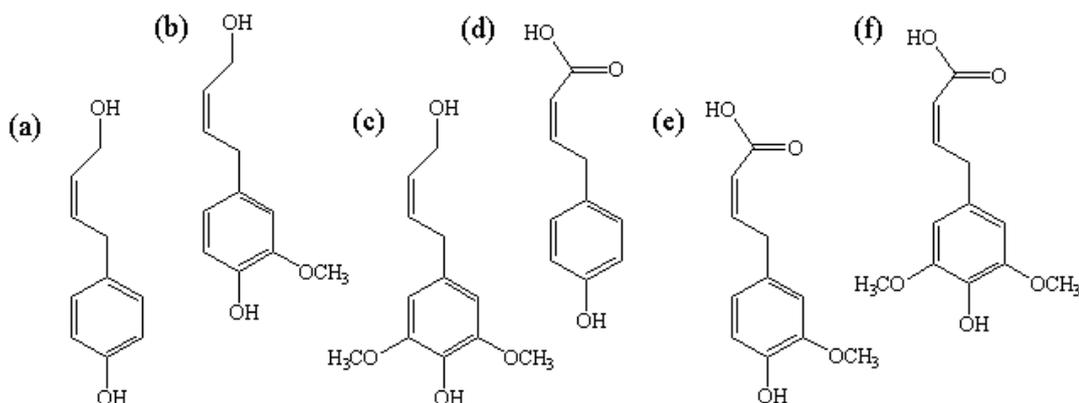


Figura 1. Unidades estruturais da lignina álcoois ρ -coumaril (a), coniferil (b) e sinapil (c) além dos ácidos ρ -cumárico (d), ferúlico (e) e sinápico (f).

A lignificação da parede celular pode limitar a digestão dos polissacarídeos por meio de três mecanismos: efeito tóxico de componentes da lignina aos microrganismos do rúmen; impedimento físico causado pela ligação entre a lignina e polissacarídeo, que limita o acesso das enzimas fibrolíticas ao centro de reação de um carboidrato específico, e através da limitação da ação de enzimas hidrofílicas causada pela hidrofobicidade criada pelos polímeros de lignina (Paciullo, 2002).

Os ácidos fenólicos (lignina “non-core”) presentes na parede celular das forrageiras mereceram maior atenção, pois apresentam maiores correlações negativas entre as concentrações destes ácidos e a digestibilidade, sendo, em geral, o ácido ρ -cumárico o que apresenta maior efeito negativo sobre a digestibilidade de forrageiras (Paciullo, 2002).

A criação de gado no Brasil acontece majoritariamente de forma extensiva, muitas vezes em áreas com pastagem degradadas e, portanto, de baixa produtividade. Este sistema se caracteriza pelo baixo investimento em formação e manutenção de pastagem (principalmente quando a terra adquirida já contém algum tipo de pasto). Isto possibilita à atividade uma grande oportunidade de redução do impacto causado ao meio ambiente, uma vez que ações tomadas no sentido de melhorar o rendimento animal devem resultar em um menor consumo

de recursos naturais (como por exemplo, terra e água) e maior eficiência do sistema digestivo animal (De Zen *et al.*, 2008).

A produção pecuária mal manejada causa diversos problemas ambientais, como a degradação do solo, emissão de gases do efeito estufa (isto é, metano) e poluição dos recursos hídricos. Além do mau planejamento, o aumento da pressão sobre as áreas de fronteira agrícolas causa a destruição destes sistemas ambientais, uma vez que o esgotamento ou a baixa produtividade incentiva a expansão de domínios sobre áreas naturais, destruindo o habitat natural de várias espécies. Juntamente com outras atividades agrícolas e madeireiras, a pecuária é apontada como um dos principais vetores de expansão da fronteira agrícola, ameaçando biomassa como a do Cerrado e Amazônia (De Zen *et al.*, 2008).

Uma das formas de minimizar a pressão sobre a abertura de novas áreas de pastagem e diminuir os impactos ambientais oriundos da pecuária seria a verticalização da produção. Dentre as estratégias de verticalização de produção, o aumento da digestibilidade das forrageiras já implantadas é a que pode apresentar potencialmente o menor custo de adoção, uma vez que não demanda reformas de pastagens, ou mesmo pode ser realizada independente da utilização de fertilizantes. Uma destas estratégias é aumentar a digestibilidade das forrageiras no rúmen para degradar a lignina, permitindo uma melhor digestão dos polissacarídeos (Paciullo, 2002). Uma das formas de se realizar este processo é a utilização de extratos fúngicos ricos em enzimas como xilanases e ligninases que podem hidrolisar a lignina deixando os polissacarídeos mais disponíveis para a digestão ruminal (Wong, Tan *et al.*, 1988).

1.2 Ruminantes

Os animais domésticos podem ser classificados de acordo com suas habilidades alimentares: em espécies herbívoras (comumente cavalos, bovinos, ovinos, caprinos e veados), criaturas onívoras (suínos) e carnívoras (cães e gatos). Uma característica distintiva dos herbívoros é sua dependência nutricional em processos de fermentação bacteriana. Outra classificação para os animais domésticos refere-se à disposição anatômica do trato gastrointestinal. Um dos tipos dessa classificação são os ruminantes quem engloba os bovinos, caprinos e ovinos (Vandamme e Ellis, 2004).

Os ruminantes, como bovinos, ovinos e caprinos, são as principais fontes de carne, leite, lã e couro e, portanto, são importantes segmentos da economia agrícola. O seu papel na cadeia alimentar é de suma importância, porque esses animais são capazes de digerir a celulose. Composto abundante na natureza, presentes, em palhas, capins, etc e que pode ser ou não mal utilizados por outros animais e pelos seres humanos (Wu e Papas, 1997).

Os ruminantes têm um sistema digestivo composto por um estômago que se divide em quatro compartimentos (Rúmen, retículo, omaso e abomaso) representando na Figura 2.

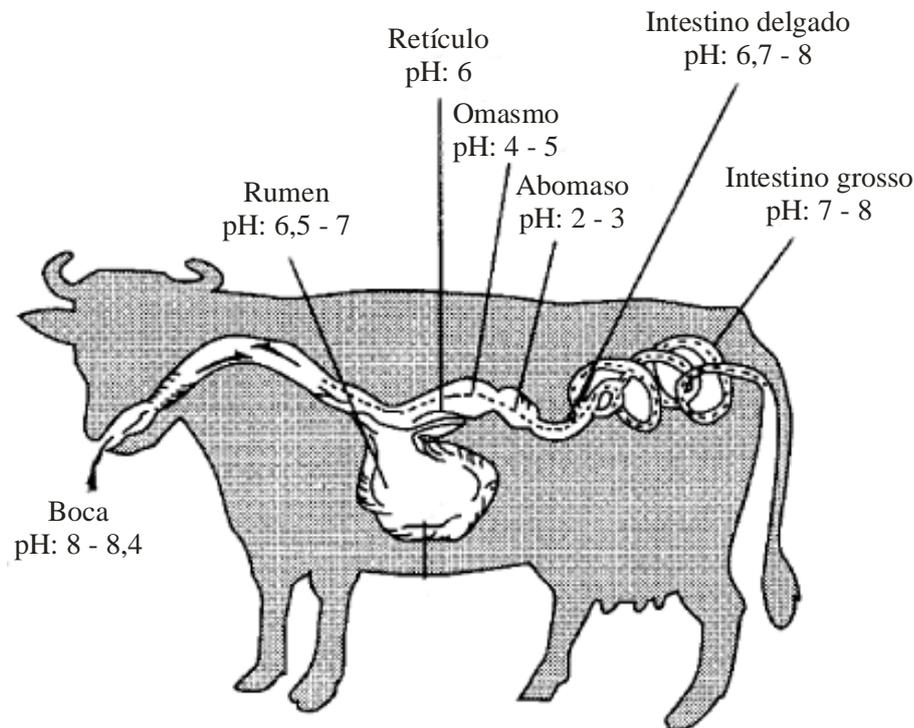


Figura 2. Esquema do sistema digestivo bovino.

A função do abomaso é semelhante ao de o estômago dos mamíferos. Os primeiros compartimentos que compõe a frente do estômago são os principais locais onde ocorre à fermentação microbiana e a digestão dos alimentos. Esses órgãos estão envolvidos na digestão da celulose (Figura 3), do nitrogênio não proteico, no auxílio na síntese dos ácidos graxos voláteis e ainda facilitam tanto o retorno de material fibroso para a boca (para uma nova salivação e mastigação) quanto à passagem do material digerido para o abomaso. Já a digestão dos carboidratos irá ocorrer no intestino grosso. Os animais monogástricos (suínos, cão, gato) têm uma anatomia do intestino completamente diferente, enquanto alguns animais como os cavalos ocupar um lugar intermediário (Wu e Papas, 1997).

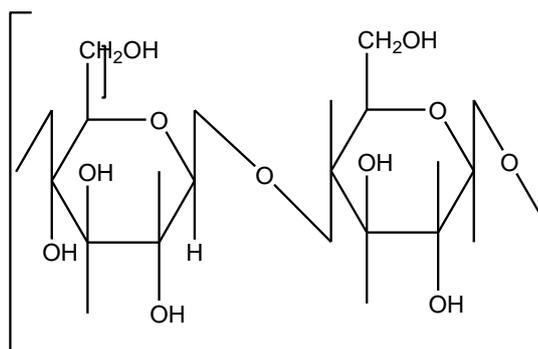


Figura 3. Estrutura química da celulose.

O rúmen é o maior dos quatro compartimentos que compõem o sistema digestivo ruminante; é o primeiro lugar onde ocorre a fermentação da celulose, pelas bactérias anaeróbicas e protozoários presentes. Nessa etapa a celulose é transformada em ácidos graxos como o butírico e propiônico, que são utilizados pelo animal em outros processos metabólicos. Algumas dessas bactérias também são capazes de utilizar nitrogênio não proteico, como amônia, para a síntese de aminoácidos e proteínas (Wu e Papas, 1997). Outros componentes como metano (20 a 40 %), dióxido de carbono (40 a 70 %), nitrogênio (15 a 35 %), sulfeto de hidrogênio (0,1 a 0,5 %), oxigênio (0,1 a 7 %), e ácidos orgânicos também são produzidos devido metabolismo da celulose (Cardinal, 2000).

O volume do retículo-rúmen varia de 100 a 225 L no gado adulto e 10-25 L em ovinos e espécies caprinas. Dependendo do tipo de alimentação, bebida e do teor de água do rúmen a massa digestiva pode ter uma consistência entre um aspecto líquido a um semissólido (Wu e Papas, 1997). Apesar da grande quantidade de ácido graxo produzida no rúmen bovino o pH do rúmen bovino varia entre 5,5 e 6,5. Isto é conseguido através da secreção de agentes tamponantes no rúmen (Masson e Phillipson, 1951).

Devido ao seu grande volume qualquer principio bioativo que seja manipulado tende a estar em baixa concentração no rumem. Além disso, a microflora ruminal pode inativar alguns medicamentos devido à presença de metabólicos (Vandamme e Ellis, 2004).

O metabolismo do rúmen pode ser alterado de duas maneiras diferentes para aumentar sua eficiência na digestão; essas maneiras se dividem em manipulação direta ou indireta. A manipulação indireta está relacionada com a natureza do alimento, a utilização de minerais, fonte de energia ou de nitrogênio; todos esses fatores influenciam no aumento da atividade dos microrganismos no rúmen, aumentando assim a digestibilidade do alimento (McSweeney, Dalrymple et al., 1999). Por outro lado, a manipulação direta está vinculada ao uso de aditivos

biológicos ou químicos que modificam a fermentação ruminal devido ao seu efeito sobre a flora microbiana (Abreu, Carulla et al., 2004).

1.3 Sistemas de liberação

Dispositivos de administração de medicamentos intra-ruminal são concebidos para proporcionar longo prazo de entrega e liberação de drogas no retículo/rúmen. Como tal, a administração de drogas durante o pastoreio é complicada pela necessidade de reunir primeiro os animais antes de administrar a droga. A fim de contornar este problema, diminuir os custos e melhorar a eficiência para o agricultor, tem sido desenvolvidos inúmeros sistemas para liberação programada de substâncias (Vandamme e Ellis, 2004).

Muitos desses sistemas são descritos na literatura e sua concepção e os vários mecanismos de liberação foram matematicamente descritos através dos sistemas chamados erodíveis (Cardinal, 2000). Sistema erodível talvez seja o tipo mais comum de liberação sustentada intra-ruminal; o sistema é projetado para se dissolver ou desagregar devido à dissolução ou ação mecânica do rúmen (Figura 4).

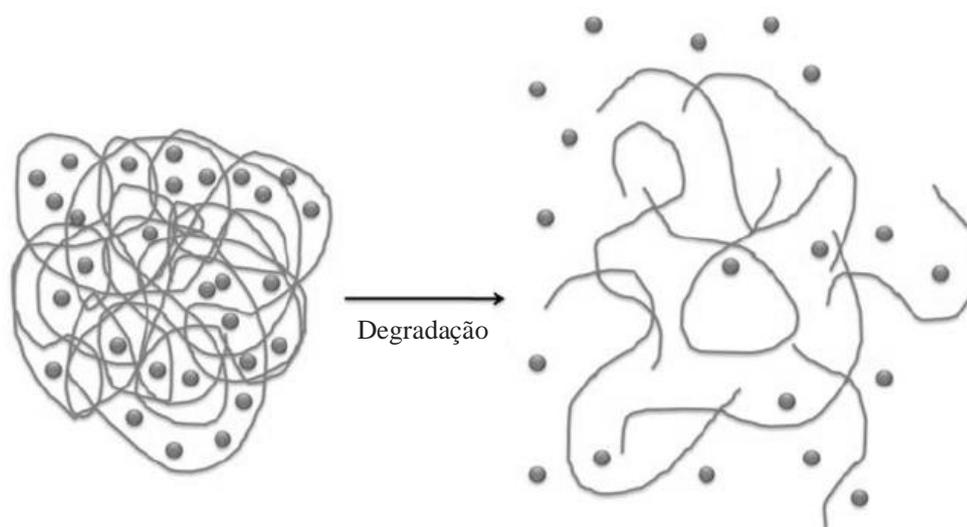


Figura 4. Esquema da degradação da matriz e consequente liberação da droga.

Essa abordagem foi utilizada em um dos primeiros exemplos de um dispositivo intra-ruminal de liberação controlada (Cardinal, 2000). Vários autores têm empregado tal sistema

para liberar diversas drogas, oligo-elementos ou nutrientes para pastoreio de ovinos ou bovinos. Destes, vários têm sido comercializados para a entrega de drogas (sulfas) no tratamento da febre decorrente de transporte marítimo (em gados de corte e leiteiro fora do período de lactação). Exemplos desses produtos disponíveis nos Estados Unidos incluem o Albon SR® (sulfadimetoxina), Spanbolet II (sulfametazina), sulfa SR (sulfametazina); em geral, esses produtos são concebidos para assegurar o fornecimento sustentado do fármaco durante um período de 72 horas (Cardinal, 2000).

Outra abordagem para o desenvolvimento destes sistemas é a utilização de vidros solúveis em soluções aquosas tamponadas (Allen, Sansom et al., 1984). Por exemplo, vidros preparados a partir de P_2O_5 , Na_2O , e CaO , P_2O_5 podem ser utilizados para projetar sistemas que fornecem nutrientes por períodos de até 1 ano (Allen, Sansom et al., 1984).

Sistemas erodíveis podem ser concebidos tanto para curta quanto longa duração e, em geral, as suas taxas de liberação são em função da natureza e da concentração do medicamento no sistema. Além disto, a taxa de sua liberação é variável e, portanto, são mais adequadas para medicamentos que têm grande índice terapêutico, tais como nutrientes ou suplementos minerais (Cardinal, 2000). O bom controle da taxa de entrega geralmente é limitado quando se trata de substâncias de doses diárias que possuem alta ou baixa solubilidade aquosa. Devido a estas limitações vários grupos têm trabalhado para desenvolver estes dispositivos onde a taxa de liberação é largamente independente da solubilidade aquosa do medicamento e ainda fornece precisão no controle da taxa de entrega (Cardinal, 2000).

Outros tipos de sistemas de liberação eficazes são baseados na pressão osmótica para liberação de compostos solúveis ou insolúveis em água (como exemplo as bombas osmóticas) (Cardinal, 2000). O trabalho pioneiro estabelece sistemas em que a taxa de transporte de água em toda uma membrana semipermeável poderá ser utilizada como o princípio determinante para a taxa de liberação do dispositivo de administração de medicamentos. As características específicas do projeto tornam-no particularmente bem adaptado para o fornecimento de compostos altamente insolúveis em água e/ou aqueles com índice terapêutico estreito (Cardinal, 2000).

A droga ivermectina (vermífugo) é um exemplo de tal composto que possui os dois atributos: é um composto altamente insolúvel em meio aquoso e altamente potente e eficaz para o combate de ecto e endoparasitos (Cardinal, 2000).

Outro tipo de sistema utilizado para a liberação controlada de medicamentos é o “sistema reservatório” (Figura 5).

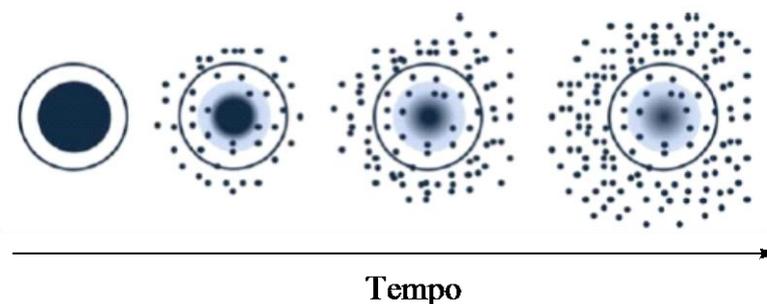


Figura 5. Esquema de difusão de um sistema de liberação do tipo reservatório.

Um dos primeiros exemplos de um produto comercialmente bem sucedido que utiliza esse sistema é encontrado na obra de Dresback e colaboradores em 1980; este produto chamado de Paratect® bólus, foi projetado para fornecer uma administração contínua de tartarato de morantel durante o pastejo – tal droga é eficaz para o tratamento de parasitas gastrointestinais em bovinos (Cardinal, 1997). Este sistema é composto de um cilindro de aço inoxidável de cerca de 10 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro; o cilindro é limitado em cada extremidade por discos porosos de polietileno impregnados com triacetato de celulose (Cardinal, 1997). O reservatório gerado dentro do cilindro é então preenchido com uma mistura de drogas mais polietileno glicol. A liberação da droga ocorre por difusão em cerca de 90 dias através dos discos impregnados (Cardinal, 1997).

Por fim existe também o sistema de matriz dispersa, composto por uma matriz onde estão dispersos uniformemente as partículas da droga (Figura 6); tal matriz pode ser composta por um polímero biodegradável (Cardinal, 1997). Um dispositivo que utiliza esse sistema foi desenvolvido utilizando três lâminas, onde a lâmina do meio é composta por uma matriz de droga dispersas em etileno-acetato de vinila (EVA). A droga corresponde de 30 a 75 % do polímero, o que produz um dispositivo mecânico que tem força suficiente para ser eficaz na administração de medicamentos (Cardinal, 2000).

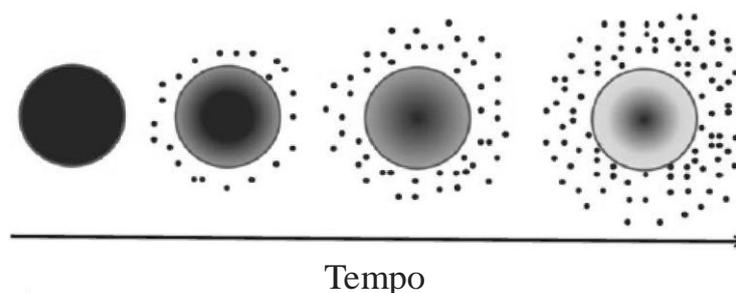


Figura 6. Esquema de difusão de um sistema de liberação do tipo matriz dispersa.

No setor veterinário, a incorporação de drogas em matrizes poliméricas, a fim de estabelecer uma liberação pré-definida e reprodutível de droga por períodos prolongados, proporciona benefícios significativos ao longo em que a droga começa a ser liberada no organismo animal. Esses benefícios incluem: (1) a redução da dor e sofrimento para os animais, diminuindo o número de vezes que o animal é tratado e submetido a um procedimento administrativo, (2) benefícios financeiros para o usuário final resultante da redução dos custos, (3) melhoramento dos custos/benefícios para o utilizador final e (4) melhoramento dos resultados terapêuticos (Cardinal, 2000).

1.4 Polímeros

Os polímeros constituem um grupo particular de macromoléculas (moléculas de alto peso molecular constituídas por grandes cadeias de átomos) caracterizado pela repetição de um ou mais grupos atômicos (monômero), que são responsáveis pela formação da cadeia polimérica e, conseqüentemente, suas características físico-químicas. Suas propriedades derivam principalmente das interações que ocorrem entre os elementos da sua macroestrutura (interações intramoleculares) ou com outros compostos (interações intermoleculares) (Mano e Mendes, 1999). As macromoléculas podem se encontradas na natureza como proteínas e polissacarídeos, ou podem ser sintetizadas como o ácido polifosfórico.

Devido as suas propriedades e variedades de materiais dessa classe, os polímeros possuem uma ampla aplicação como: tinta, utensílios domésticos, embalagens, peças para carros, moveis entre outras (Mano e Mendes, 1999).

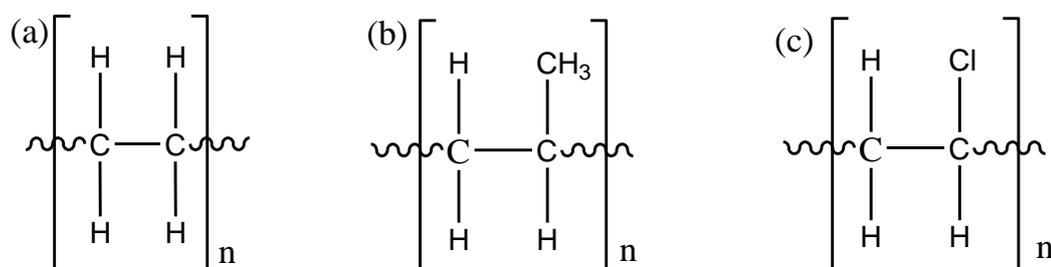


Figura 7. Estrutura química de homopolímeros: (a) polietileno, (b) polipropileno, (c) poli(cloreto devinila).

Os polímeros inicialmente podem ser classificados como aqueles formados apenas por uma unidade monomérica (Figura 7), e os chamados copolímeros, que são formados por duas ou mais unidades monoméricas diferentes, ou seja, são obtidos usando dois ou mais comonômeros, (Figura 8). Os homopolímeros ainda podem ser classificados como lineares ou ramificados. Por exemplo, no caso do polietileno: o de baixa densidade apresenta um alto teor de ramificações, o linear de baixa densidade tem um número menor de ramificações e o de alta densidade é praticamente linear. O teor de ramificações pode ser determinado com precisão por métodos espectroscópicos (Quental, Hanamoto et al., 2005)

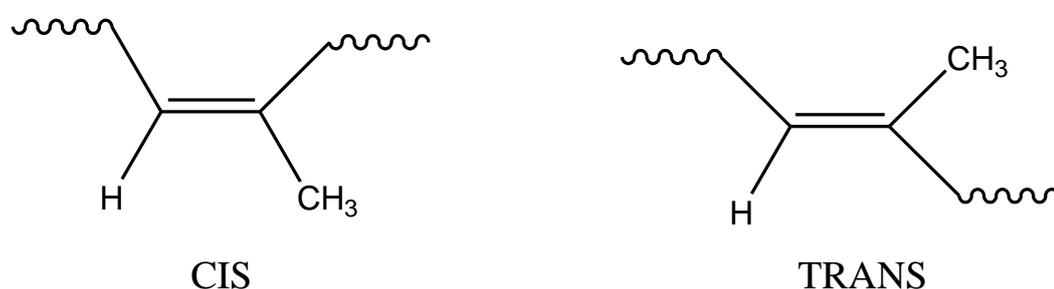


Figura 8. Estrutura química das unidades repetitivas (meros) do poli(cis-isopreno) e do poli(transisopreno).

Uma importante propriedade dos polímeros que deve ser avaliada no estudo da sua degradação é o grau de cristalinidade. Diferentemente de moléculas de baixa massa molar ou de metais, os polímeros não formam sólidos cristalinos ou amorfos, eles formam sólidos com uma fase cristalina e outra amorfa. A relação estequiométrica entre elas é chamada de grau de cristalinidade, que é expresso em porcentagem. Nestas fases cristalinas podemos ter a formação de cristalitos com diferentes morfologias, por exemplo: esferulitos ou lamelas (de Paoli, 2008).

Essa propriedade pode ser controlada pela taxa de resfriamento do molde durante a produção do polímero ou pelo uso de aditivos chamados de agentes nucleantes, como por exemplo, o talco. O grau de cristalinidade afeta diversas propriedades desses materiais, como transparência a luz, propriedade de barreira a gases e propriedades mecânicas de tração e impacto (de Paoli, 2008).

Os polímeros biodegradáveis têm sido o foco principal dos estudos que visam desenvolver sistemas mais efetivos na atuação dos fármacos. Alguns exemplos de polímeros que podem ser estudados para entrega controlada são os poliésteres alifáticos [poli (ácido láctico), poli (ácido glicólico), PCL e seus copolímeros (Arshady, 1991)], quitosana (Rinaudo, 2006) e os vidros a base de fosfato. (Allen, Sansom et al., 1984).

1.4.1 Biodegradação de polímeros

A biodegradação de um material acontece quando este é usado como nutriente por um determinado conjunto de microrganismos (bactérias, fungos ou algas) que existe no meio ambiente onde o material está exposto. Para que esses microrganismos cresçam utilizando o material como fonte de nutriente é necessário que esses microrganismos sejam capazes de produzir enzimas que possam quebrar algumas ligações químicas presentes no material polimérico para que assim ocorra a quebra das ligações químicas desse material e a reprodução microbiana. Além disso, algumas condições de temperatura, umidade, pH e disponibilidade de oxigênio são necessárias. A velocidade de crescimento da colônia de microrganismos vai determinar a velocidade com a qual o material é biodegradado, sendo essa a variável mais importante quando se estuda a biodegradação. De um modo geral, a escala de tempo adequada é da ordem de semanas ou meses (de Paoli, 2008).

Como o ataque enzimático das enzimas produzidas pelos microrganismos deve ocorrer inicialmente na superfície do polímero, isso irá depender da hidrofiliabilidade da cadeia polimérica. De um modo geral a biodegradação pode ser facilitada pelo aumento da hidrofiliabilidade superficial do polímero. Outra variável importante é a difusão de água pelas camadas superficiais do polímero que irá ser controlada pelo grau de cristalinidade do mesmo. Além disso, o ataque enzimático é dificultado nas regiões de segmentos rígidos (de Paoli, 2008). Por exemplo, para os poliuretanos alguns autores sugerem que o ataque pela enzima pode ocorrer apenas se existir um número suficientemente grande de cadeias carbônicas não ramificadas entre as ligações uretano e que a proximidade entre esses segmentos interfere na facilidade com que as enzimas se aproximam da cadeia iniciando o processo de degradação (Kim e Kim, 1998).

1.4.2 Polímeros em sistemas de liberação

Os polímeros que são utilizados como base para sistemas de liberação controlada podem ser, polímeros naturais ou sintéticos, que podem ser biodegradáveis ou não biodegradáveis (Figura 9). Estes sistemas poliméricos podem ser utilizados na liberação de fármacos, proteínas e células. Os polímeros usados com esse fim devem apresentar um

conjunto de propriedades que os tornam materiais adequados para interagir com o metabolismo dos seres vivos, sendo a biodegradabilidade uma das características mais importantes (Coelho, Ferreira et al., 2010).

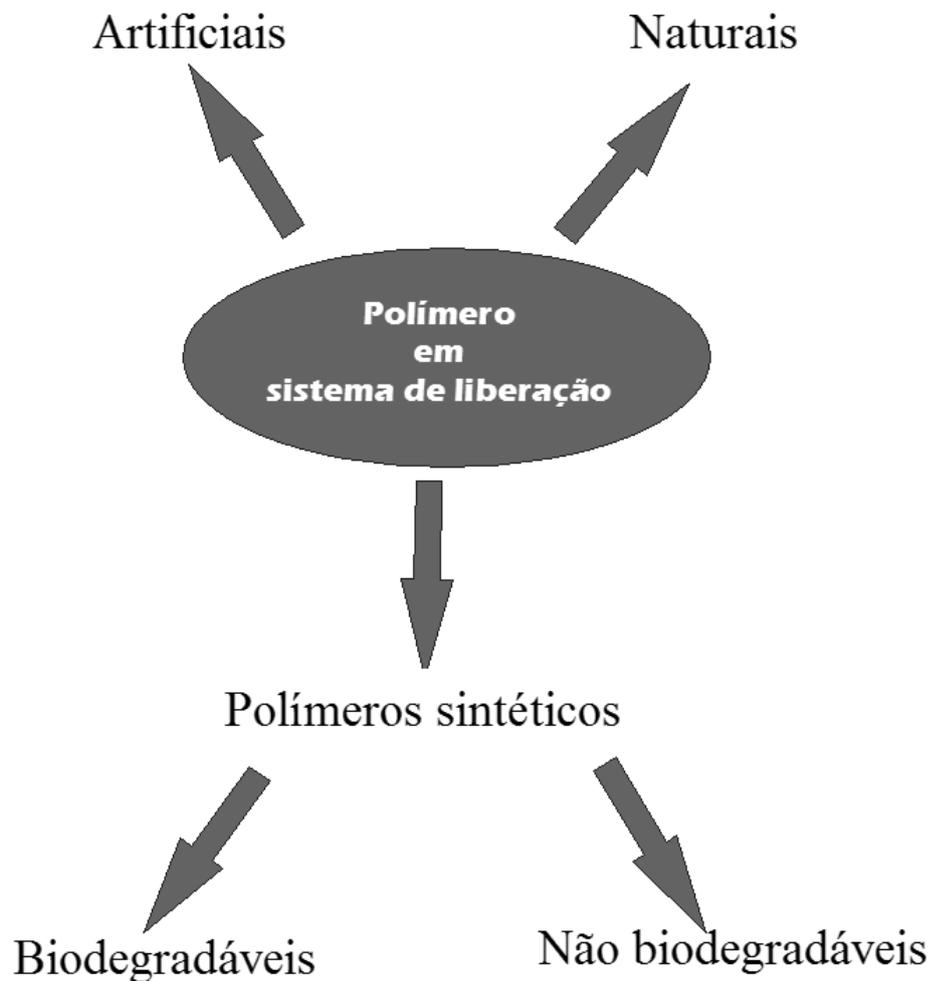


Figura 9. Classificação dos polímeros quanto a sua natureza.

Polímeros biodegradáveis são particularmente atraentes para aplicação em sistemas de entrega controlada, pois uma vez introduzidos no corpo humano, eles não exigem a remoção ou manipulação adicional e seus produtos de degradação são metabólitos normais que podem ser facilmente metabolizados e eliminados pelo organismo (Lakshmi e Cato, 2006).

Alguns polímeros naturais, sendo biodegradáveis e com excelente biocompatibilidade, são materiais muito atraentes para uso em sistemas de liberação. Além disso, eles são relativamente baratos. No entanto, alguns deles apresentam algumas limitações, como por exemplo, antigenicidade e risco de infecção viral (Lakshmi e Cato, 2006).

Por outro lado, os polímeros sintéticos oferecem uma grande variedade de composições com propriedades ajustáveis. A partir desses materiais tem-se a possibilidade de desenvolver novos sistemas de liberação com propriedades específicas (químicas, interfaciais, mecânicas e biológicas), simplesmente mudando a construção de blocos ou a técnica de preparo. A sua preparação é reprodutível, sendo assim facilmente possível preparar sistemas de liberação com as mesmas especificações (Coelho, Ferreira et al., 2010).

Outra estratégia possível para a construção de sistemas de liberação compreende na utilização de blocos naturais e sintéticos. O objetivo final é reunir em um mesmo material as melhores propriedades do polímero natural (biodegradabilidade e biocompatibilidade) e dos polímeros sintéticos (por exemplo, propriedades mecânicas) (Sahoo, Sasmal et al., 2010).

1.4.3 PCL

O polímero poli(ϵ -caprolactona), conhecido como PCL (Figura 10), é um poliéster alifático, semicristalino e biodegradável que apresenta baixa temperatura de transição vítrea (60 °C), normalmente obtido através da polimerização do ϵ -caprolactona (Rosa, Chui et al., 2002). Devido à sua cristalinidade, hidrofobicidade e lenta degradação *in vitro*, o PCL torna-se um polímero adequado para modular a taxa de entrega em blendas, e na elaboração de dispositivos que exijam longos períodos de liberação (Vandamme e Legras, 1995).

Os dispositivos a base de PCL mantêm sua forma durante a fase inicial de biodegradação, quando a massa molar decresce severamente por conta da hidrólise das ligações éster na cadeia. Em uma segunda fase a contínua diminuição da massa molar e a formação dos produtos de clivagem são responsáveis pela difusão da droga para fora da matriz. A taxa de hidrólise da cadeia decresce nesta segunda fase, devido a um aumento na cristalinidade (Sinha, Bansal et al., 2004).

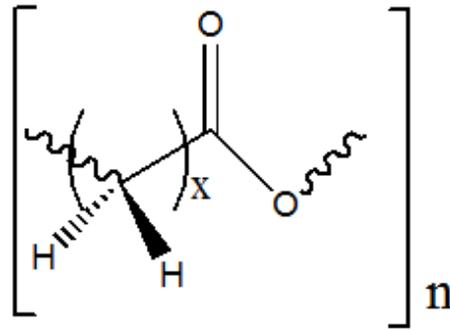


Figura 10. Estrutura química do PCL, onde $n=5$.

As vantagens do uso do PCL incluem a sua alta permeabilidade e a incapacidade de aumentar a acidez do meio durante sua degradação, ao contrário do que ocorre com o polilactato e glicídios (Sinha, Bansal et al., 2004).

1.4.4 Quitosana

A quitosana (Figura 11) é um polímero natural linear biopoliaminosacarídeo, amino catiônico, composto por unidades β -1,4 D-glucosamina ligadas a resíduos de N-acetilglucosamina (Sankararamkrishnan e Sanghi, 2006). Esse polímero é obtido através da desacetilação alcalina da quitina (com taxa da ordem de 50%) (Figura 12), tornando o composto solúvel em solução ácida (Sinha, Singla et al., 2004). A transformação da quitina em quitosana modifica suas propriedades. A quitina possui alta cristalinidade, é altamente hidrofóbica e insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos, sendo que essa baixa solubilidade é o fator limitante para a sua utilização.

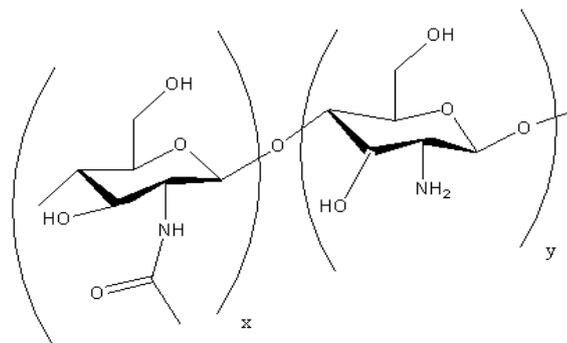


Figura 11. Estrutura química da quitosana ($x < 50\%$) e quitina ($x > 50\%$).

A solubilização da quitosana ocorre devido à protonação do grupamento $-NH_2$ na posição C-2 da unidade de repetição D-glucosamina, convertendo o polissacarídeo em um polieletrólito solúvel em meio ácido (Rinaudo, 2006).

O grau de desacetilação (GD) e a massa molar da quitosana apresentam grande influência em várias propriedades do polímero, assim como na solubilidade, reatividade química, biodegradabilidade (Kittur, Harish Prashanth et al., 2002), biocompatibilidade bioatividade (Varma, Deshpande et al., 2004), propriedades de adsorção de vários substratos, não toxicidade, habilidade de formar filmes (Kumar e Majeti, 2000) e hidrofiliidade (Wu, Tseng et al., 2000).

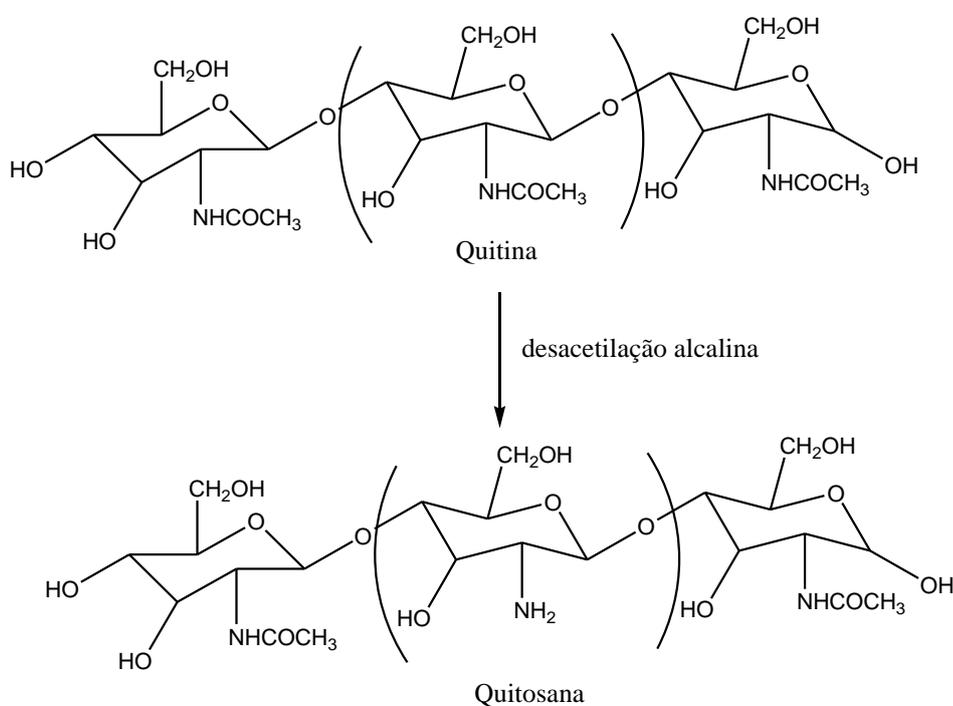


Figura 12. Desacetilação alcalina da quitina.

Propriedades tais como baixa toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade tornam esse polímero adequado para o uso em formulações biomédicas e farmacêuticas (Illum, Jabbal-Gill et al., 2001). Devido a essas propriedades, a quitosana tem sido amplamente utilizada como hipocolesterolêmico, antiácido e antiúlcera (Ito, Ban et al., 2000) para curar feridas e queimaduras (Aoyagi, Onishi et al., 2007) e ainda como imobilizador de enzimas e células vivas (Felt, Furrer et al., 1999).

1.5 Vidros de polifosfatos

Os fosfatos podem ser classificados basicamente em duas grandes categorias: ortofosfatos (apresentam apenas o íon PO_4^{-3}) e fosfatos condensados. Os polifosfatos condensados são, por sua vez, divididos em três categorias: (1) polifosfatos lineares que apresentam estrutura cíclica e fórmula geral $P_n O_{3n+1}^{-(n+2)}$; (2) metafosfatos que possuem estrutura em cadeia e fórmula geral $P_n O_{3n}^{-n}$, e (3) ultrafosfatos que apresentam estrutura em gaiolas bi e tri dimensionais e fórmula geral $P_n O_{3n+m}^{-(n+2m)}$, com $1 > m < n/2$. Os polisfosfatos lineares podem ser divididos em outras categoria de acordo com o tamanho de sua cadeia; os polifosfatos de cadeia curta ($n < 10$); polifosfatos de cadeia intermediária ou oligofosfatos ($10 < n < 50$) e polifosfatos altamente poliméricos $n > 50$ (Dias Filho, 2003).

Os polifosfatos apresentam uma estabilidade baixa na presença de água, ocasionando o rompimento das ligações O-P-O (Figura 13), gerando espécies com tamanho de cadeia menor que a original. Os fatores que influenciam a hidrólise de soluções aquosas de polifosfato são: (1) tamanho da cadeia de polifosfato, (2) temperatura, (3) pH, (4) concentração, (5) presença de íons e (6) enzimas, quando se trata de sistemas biológicos (Dias Filho, 2003).

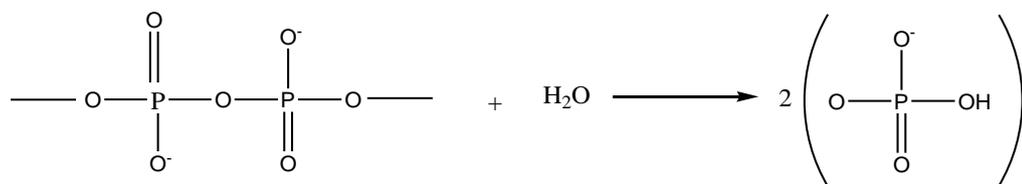


Figura 13. Esquema rompimento da ligação P-O-P nos polifosfatos.

A maioria dos vidros a base de fosfato tem sido obtidos através do método de fusão tradicional, onde os reagentes são fundidos e posteriormente vazados em moldes através de resfriamento controlado. Vidros também podem ser preparados usando a tecnologia sol-gel; no caso dos fosfatos, seus precursores vítreos chamados coacervato são obtidos a partir de soluções aquosas de polifosfato (Aranaha, 2005).

Os vidros a base de polifosfato podem ser usados para diferentes aplicações devidos seu alto coeficiente de expansão térmica (CTE), baixas temperaturas de transição vítrea (T_g), desvitrificação (T_d) e de fusão (T_f) (Willot, Gomez et al., 2002). Um composto vítreo de grande interesse que pode ser utilizado em diversas aplicações é sintetizado a partir da

coacervação entre polifosfato de sódio e cloreto de cálcio a temperatura ambiente. A sua síntese em temperatura ambiente faz com que esse se torne de grande interesse, principalmente como matriz de sistemas de entrega controlada, pois permitem a incorporação de drogas com baixa estabilidade térmica, como compostos orgânicos (de Oliveira, de Oliveira et al., 2005).

2 Técnicas utilizadas

2.1 Espectroscopia Molecular

A espectroscopia molecular estuda a interação entre a radiação eletromagnética e matéria, sendo um dos seus principais objetivos a determinação dos níveis de energia de átomos ou moléculas. Os espectros fornecem as transições (diferença de energia entre os níveis), sendo que a partir dessas medidas pode-se determinar as posições relativas dos níveis energéticos (Sala, 2008). No caso de moléculas, a região espectral onde as transições são realizadas depende do tipo de níveis envolvidos: eletrônico, rotacional ou vibracional. Dessa forma a energia pode ser representada por:

$$E(n, v, J)$$

onde J , n e v representam respectivamente a energia rotacional, eletrônica e vibracional.

Os níveis de energia derivam dessa expressão e são razoavelmente simples para moléculas diatômicas. Entretanto, podem ser extremamente complexos para moléculas que possuem mais átomos. Assim nesse caso devem-se considerar as propriedades de simetria e teoria de grupo, a fim de prever o número de modos normais de vibração correspondentes à molécula. Para isso basta considerar que:

$$V = 3N - 6 \text{ (para moléculas não lineares)}$$

$$V = 3N - 5 \text{ (para moléculas lineares)}$$

onde o número 3 refere-se aos graus de liberdade, ou seja, coordenadas (x , y e z) e N o número de átomos presentes na molécula. Assim numa molécula de N átomos haverá $3N$ graus de liberdade. Para as moléculas não lineares descarta-se 3 graus translacionais e 3 rotacionais, já para moléculas lineares descarta-se 3 graus translacionais e somente 2 rotacionais, pois considerando os núcleos pontuais não ocorrerá rotação no eixo da molécula (Hollas, 2004).

Normalmente as transições vibracionais estão situadas na região do infravermelho e a rotacional na região de microondas. As diferentes regiões espectrais exigem diferentes

espectrômetros com elementos dispersivos e detectores apropriados. Assim cada tipo de espectroscopia tem uma tecnologia própria (Sala, 2008).

No estudo das transições vibracionais duas técnicas se destacam: a espectroscopia de absorção na região do infravermelho e espectroscopia Raman. Através destas é possível obter informações sobre as ligações químicas através das constantes de força e os valores das frequências de vibração, além disto, podem-se obter informações sobre a geometria da molécula investigando o numero de modos vibracionais presentes no infravermelho e Raman.

2.1.1 Espectroscopia de Absorção no infravermelho

A radiação no infravermelho não é suficiente para causar uma transição eletrônica. A absorção no infravermelho está muito restrita às espécies moleculares que têm diferenças de energia pequenas entre os vários níveis vibracionais. Assim, na espectroscopia de absorção no infravermelho radiação policromática com diferentes frequências interage com a amostra (Skoog, 2002). Porém para haver uma absorção do fóton da radiação é necessário que este esteja em ressonância com os diferentes níveis de energia vibracional da molécula, ou seja, para que ocorra a transição vibracional (Figura 14) é necessário que a energia do fóton absorvido seja igual à diferença de energia entre dois estados vibracionais da molécula, como mostra a equação 1.

$$h\nu = E_2 - E_1 \quad (1)$$

A equação 1 envolve uma aproximação estabelecida pelo modelo do oscilador harmônico, situação na qual o tratamento quântico impõem que as transições permitidas em princípio, envolvem níveis de energia vibracionais separados por $\Delta v = \pm 1$.

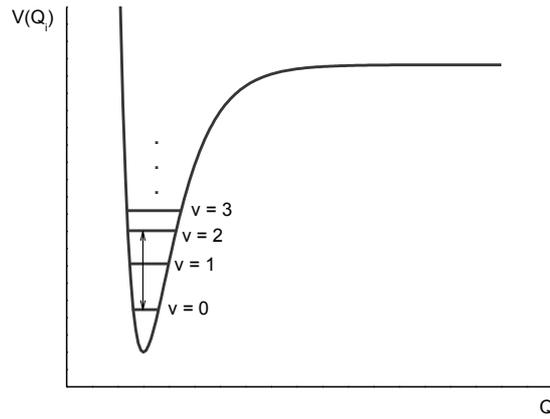


Figura 14. Transição vibracional.

A absorção ou emissão de radiação por um sistema é devido à variação periódica do seu momento de dipolo elétrico. O momento de dipolo elétrico é determinado pela sua configuração nuclear, assim quando uma molécula vibra seu momento de dipolo pode sofrer variações.

As componentes do momento de dipolo ao longo dos eixos de um sistema de coordenadas normais (x, y e z) é, em geral, função das coordenadas normais Q. A utilização das coordenadas normais permite fazer uma expansão em série de Taylor para cada um dos componentes (x, y e z) ou de foram condensada (Equação 2).

$$\mu = \mu_0 + \left(\frac{d\mu}{dq} \right)_0 q + \dots \quad (2)$$

A equação 2 nos fornece a primeira condição para que haja uma absorção no infravermelho. Deve haver uma variação no momento de dipolo em pelo menos um dos eixos das coordenadas (x, y e z), ou seja, $(d\mu/dq) \neq 0$.

A probabilidade de transição entre dois estados depende dos estados vibracionais inicial (Ψ_i) e final (Ψ_f), e do momento de dipolo elétrico (μ); essa relação é descrita pela equação 3:

$$\mu_{mn} = \int \psi_m \mu \psi_n d\tau \quad (3)$$

O valor dessa integral está relacionado com a intensidade no infravermelho, que é proporcional à probabilidade de transição ($|\mu_{nm}|^2$). Assim para que a transição seja permitida

é necessário que a integral da equação 3 seja diferente de zero, pelo menos para uma das dimensões (x, y ou z).

Para um dado nível vibracional existem níveis rotacionais, com separações energéticas muito pequenas. O espectro eletrônico envolve transições entre estados vibracionais e rotacionais do estado eletrônico fundamental para um estado eletrônico excitado. Para algumas moléculas, a banda de absorção eletrônica (geralmente muito larga e sem estrutura) mostra uma estrutura mínima devida às transições vibracionais, e o espectro é denominado vibrônico (Figura 15).

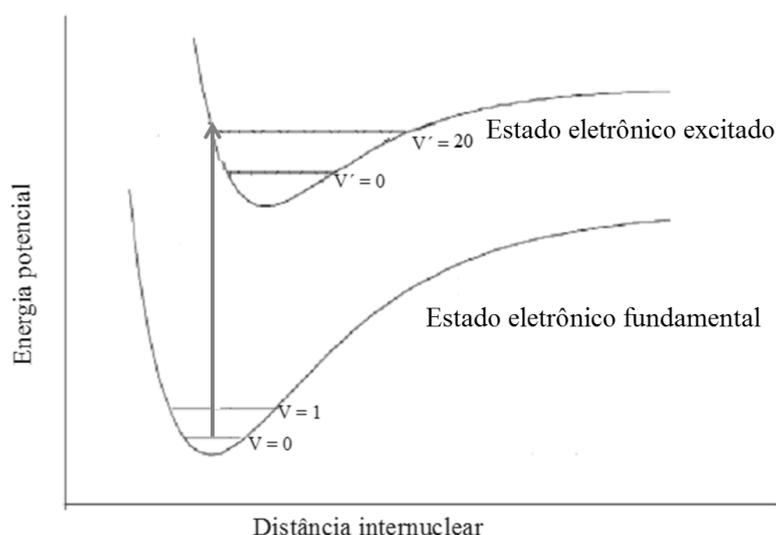


Figura 15. Transição vibrônica.

As transições rotacionais (observadas somente no estado gasoso, devido ao impedimento destes movimentos nos estados líquido ou sólido) em geral têm frequências muito próximas, não resolvidas, só contribuindo para um alargamento dos componentes vibracionais da banda eletrônica (Sala, 2008).

2.1.2 Espectroscopia Raman

Em um espectrômetro Raman, a amostra é irradiada com uma fonte intensa de radiação monocromática, na região do infravermelho próximo ou visível ou ultravioleta. Normalmente a frequência desta radiação é muito maior do que a frequência vibracional,

porém bem menor do que a frequência requerida para ocorrer a transição eletrônica. A radiação espalhada pela amostra é então analisada pelo equipamento (de Oliveira, 2009).

Assim como no espectro de absorção no infravermelho, o espectro Raman também fornece informações vibracionais. A aproximação do oscilador harmônico, utilizada anteriormente na discussão da espectroscopia no infravermelho, é análoga para a espectroscopia Raman (cuja regra de seleção fornece $\Delta v = \pm 1$). A regra de seleção específica para essa técnica pode ser descrita pela equação 4:

$$(d\alpha/dq) \neq 0 \quad (4)$$

No efeito Raman, a atividade está ligada à variação do momento de dipolo induzido na molécula pelo campo elétrico da radiação incidente, diferentemente do infravermelho, onde se considera o momento do dipolo intrínseco. O vetor do momento de dipolo pode ser descrito matematicamente pela equação 5, que é a base do modelo clássico, ou teoria clássica de Placzek:

$$\bar{P} = \alpha \cdot \bar{E} \quad (5)$$

sendo α a polarizabilidade da molécula e \bar{E} o vetor campo elétrico da radiação incidente.

A polarizabilidade é uma propriedade intrínseca da molécula e está relacionada com a facilidade que a molécula tem em deformar sua nuvem eletrônica ao estar em contato com radiação eletromagnética. Em geral \bar{P} e \bar{E} não são paralelos, e como consequência α não é uma quantidade escalar, podendo então ser desenvolvida em uma série de Taylor em função de uma coordenada interna q .

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q + \dots \quad (6)$$

Considerando tanto \bar{E} como q funções periódicas, podemos escrever que:

$$q = q_0 \cos(2\pi\nu_v t) \quad (7)$$

$$E = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (8)$$

onde ν_0 e ν_v são respectivamente as frequências da radiação incidente e da espalhada. Substituindo as equações 7 e 8 na equação 5, o momento de dipolo induzido ficará:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_v t) + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \cos(2\pi\nu_v t) \quad (9)$$

Usando a relação matemática $\cos(a)\cos(b) = \frac{1}{2}[\cos(a+b) + \cos(a-b)]$, temos que:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_v t) + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q_0 E_0 \{\cos[2\pi(\nu_0 + \nu_v)t] + \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_v)t]\} \quad (10)$$

Pode-se observar que a equação 9 pode ser dividida em 2 termos:

$$\begin{aligned} & \checkmark \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_v t) \\ & \checkmark \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q_0 E_0 \{\cos[2\pi(\nu_0 + \nu_v)t] + \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_v)t]\} \end{aligned}$$

O primeiro contém apenas a frequência da radiação incidente e corresponde ao chamado espalhamento Rayleigh (espalhamento elástico). O segundo apresenta radiação espalhada inelasticamente nas frequências $\nu_0 - \nu_v$, denominado espalhamento Raman Stokes e $\nu_0 + \nu_v$, denominado espalhamento anti-Stokes. Os mecânicos dos espalhamentos Raman podem ser representados esquematicamente pela Figura 16.

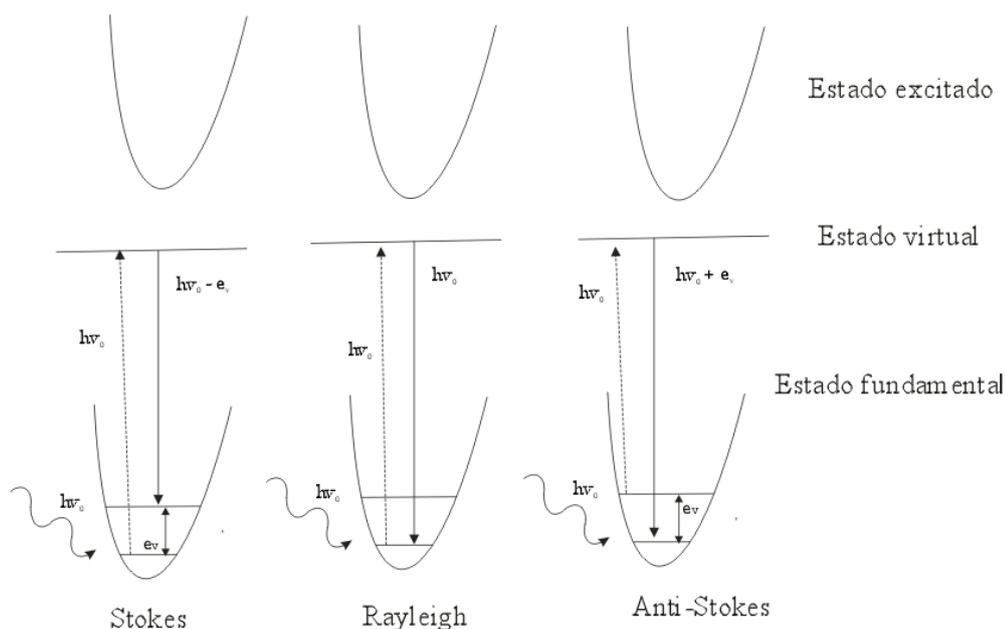


Figura 16. Esquema dos mecanismos de espalhamento.

No espalhamento Raman Stokes a molécula no estado fundamental sofre uma colisão com o fóton de energia $h\nu_0$ passa para um estado virtual, que só existe durante a interação entre a radiação e a molécula, em seguida há o decaimento para um estado excitado de energia $h\nu_0 - e_0$ (fóton espalhado tem uma energia menor do incidente). Já no espalhamento Rayleigh ocorre a interação do fóton com a molécula, então esse volta ao mesmo nível de energia inicial (fóton é espalhado com a mesma frequência que incidiu). No espalhamento Raman anti-Stokes o fóton interage com a molécula que já está num estado excitado, e após a interação com a molécula ocorre o decaimento para o estado fundamental, e o fóton é espalhado com energia $h\nu_0 + e_v$. Os espectros Raman serão simétricos em relação à linha Rayleigh: uma região de menor frequência, relacionada com o espalhamento Stokes, e uma região de maior frequência, referente ao espalhamento anti-Stokes.

O momento de transição induzido pode ser escrito, de modo similar à equação 11:

$$\mathbf{P} = \mathbf{E}(\alpha_{ij})_{mn} \quad (11)$$

onde $(\alpha_{ij})_{Mn}$ são os componentes do tensor polarizabilidade.

Na transição entre os estados vibracionais m e n devem ser considerados os componentes $(\alpha_{ij})_{mn}$, onde i e j representam x , y e z . Assim, para haver atividade no

espalhamento Raman pelo menos um dos componentes das integrais do momento de transição (Equação 12) deve ser diferente de zero, ou seja, $\int \psi_m \alpha_{ij} \psi_n d\tau \neq 0$.

$$(\alpha_{ij})_{mn} = \int \psi_m \alpha_{ij} \psi_n d\tau \quad (12)$$

O efeito Raman, como mencionado anteriormente, está relacionado com os estados vibracionais inicial, final e também com um conjunto de estados virtuais cujas energias não têm qualquer valor limite. Isto inicialmente poderia representar uma dificuldade para a avaliação da intensidade Raman, pois precisaríamos inicialmente expressar a contribuição de infinitos estados virtuais para a polarizabilidade eletrônica durante os cálculos. Essa dificuldade pode ser contornada utilizando uma aproximação que permite reduzir esse problema, que envolve apenas a polarizabilidade do estado eletrônico fundamental. Esta aproximação foi desenvolvida por Placzek em 1934 e passou a ser conhecida como aproximação de Placzek ou teoria da polarizabilidade do efeito Raman. A principal condição imposta por essa aproximação é considerar que a energia do fóton de excitação seja muito menor do que a energia correspondente à energia da transição eletrônica mais baixa da molécula. Essa condição pode ser satisfeita quando é utilizada excitação na região visível, e a transição da molécula em questão está na região do ultravioleta.

Para uma transição Raman entre dois estados inicial ($|i\rangle$) e final ($|f\rangle$), a intensidade Raman pode ser expressa pela equação 13:

$$I_{fi} = \frac{\pi^2}{\varepsilon_0^2} (v_0 \pm v_{fi})^4 E_0 [\alpha_{\rho\sigma}]_{fi} [\alpha_{\rho\sigma}]_{fi}^* \quad (13)$$

onde E_0 é a amplitude do campo elétrico da radiação incidentes, v_0 e v_{fi} são os números de onda das radiações incidente e espalhada, respectivamente, ε_0 é a permissividade do espaço livre e $[\alpha_{\rho\sigma}]_{fi}$ é o $\rho\sigma$ ésimo elemento do tensor polarizabilidade de transição, que pode ser expresso pela equação 14:

$$[\alpha_{\rho\sigma}]_{fi} = \frac{1}{\hbar c} \sum_r \frac{[\mu_\rho]_{fr} [\mu_\rho]_{ri}}{v_{ri} - v_0 + i\Gamma_r} + \frac{[\mu_\rho]_{fr} [\mu_\rho]_{ri}}{v_{ri} + v_0 + i\Gamma_r} \quad (14)$$

onde h é a constante de Planck, c é a velocidade da luz, r refere-se a qualquer nível de um conjunto completo de estados pertencentes à molécula não perturbada, ν_{ri} e ν_{rf} são as frequências correspondentes aos s estados definidos pelos subscritos, e $[\mu_\rho]_{fr}$ e $[\mu_\rho]_{ri}$ são os correspondentes momentos de dipolo de transição caracterizada pelos subscritos e $i\Gamma_r$ é definido como um fator de amortecimento relacionado com o tempo de meia vida do estado virtual $|r\rangle$. A equação 14, conhecida como equação de Kramers-Heisenberg-Dirac, é a teoria fundamental para o entendimento dos efeitos Raman normal e ressonante.

A espectroscopia Raman tem sido amplamente aplicada no estudo de diversos tipos de sistemas. As vantagens dessa técnica incluem a exigência de pequena quantidade de amostra e uma sensibilidade mínima no tocante à interferência da água, que é um péssimo espalhador, pois possui baixa secção de choque de espalhamento. A análise é realizada de forma não destrutiva, conservando e preservando o material a ser analisado, além de que a amostra pode estar em qualquer estado de agregação (líquido, sólido ou gasoso). Pode-se posicionar a amostra em recipientes de vidro, uma vez que estes são virtualmente transparentes à radiação na faixa do visível, ou apresentam sinais em uma região diferente daquelas regiões onde a maioria dos compostos de interesse apresenta.

2.2 Espectroscopia eletrônica

Na transição eletrônica, a energia necessária para alterar a distribuição dos elétrons está na ordem de elétrons-volt, na faixa entre 200 e 700 nm. Consequentemente, os fótons emitidos ou absorvidos nessas alterações estão na região do visível ou do ultravioleta do espectro eletromagnético. Assim, quando a radiação com esse nível de energia entra em contato com uma molécula qualquer, essa provavelmente irá permitir que um elétron fosse promovido para um nível energético superior (Atkins e de Paula, 2008). Para que a molécula possa absorver um fóton para excitar seu elétron, esse fóton deve possuir energia igual à diferença entre dois orbitais moleculares da molécula (Figura 17). Se essa energia não for exatamente igual, a transição não ocorrerá, e isso caracteriza o que se chama de processo de ressonância (de Oliveira, 2001).

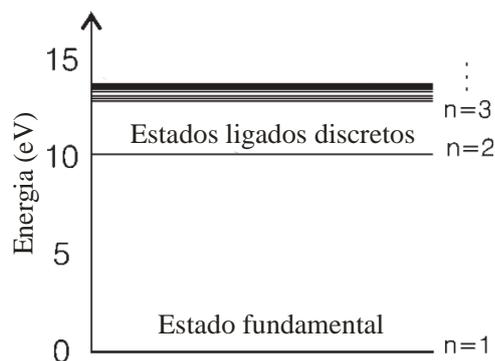


Figura 17. Diagrama de níveis de energia.

A intensidade da absorção eletrônica é descrita basicamente por duas leis empíricas. A primeira delas é a lei de Lambert que diz que a intensidade da luz incidente (I_0) absorvida é independente da fonte utilizada. A segunda lei, conhecida como lei de Beer, diz que a absorção ocorrida é proporcional ao número de moléculas absorvedoras. A junção destas leis nos fornece a relação mostrada na equação 15.

$$\log_{10} \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot l \cdot c \quad (15)$$

onde I é a intensidade de luz transmitida, l é o comprimento do caminho óptico em cm, c é a concentração da amostra em mol/L e ϵ é chamado de coeficiente de extinção molar.

Algumas regras de seleção determinam quais transições entre os estados permitidos de uma molécula serão observados em seus espectros eletrônicos. As regras de seleção relacionadas às mudanças no momento angular são:

$$\Delta\Lambda = 0, \pm 1 \qquad \Delta S = 0 \qquad \Delta\Sigma = 0 \qquad \Delta\Omega = 0, \pm 1$$

onde $\Omega = \Lambda + \Sigma$ é o número quântico para o momento do momento angular (orbital e spin) total em torno do eixo internuclear. Como nos átomos, as origens dessas regras de seleção são a conservação do momento angular durante uma transição e o fato de que um fóton tem um spin com valor 1.

Existem duas regras de seleção relacionadas à simetria. A primeira para o termo Σ , onde somente as transições $\Sigma^+ \leftrightarrow \Sigma^+$ e $\Sigma^- \leftrightarrow \Sigma^-$ são permitidas. A segunda, a regra de seleção de Laporte para moléculas centrossimétricas (que possuem centro de inversão), estabelece que as únicas transições permitidas sejam aquelas que são acompanhadas por uma

mudança da paridade, isto é, as transições $u \rightarrow g$ e $g \rightarrow u$ são permitidas, mas as transições $g \rightarrow g$ e $u \rightarrow u$ são proibidas; porém tais transições podem se tornar permitidas se o centro de simetria da estrutura molecular é eliminado por uma vibração assimétrica.

Essas duas regras de seleção resultam no fato que o momento de dipolo elétrico de transição (equação 16):

$$\mu_{fi} = \int \Psi_f^* \hat{\mu} \Psi_i d\tau \quad (16)$$

onde Ψ_f^* é a função de onda do estado excitado e Ψ_i é a função de onda do estado eletrônico fundamental. O operador momento de dipolo pode ser dividido em duas componentes, sendo que uma é dependente das coordenadas nucleares μ_n e outra coordenada dependente dos elétrons μ_e . É uma aproximação razoável considerar que a função de onda total da molécula seja o seguinte produto de autofunções:

$$\Psi = \Psi_v \Psi_{es} = \Psi_v \Psi_e \Psi_s \quad (17)$$

onde Ψ_v é a função de onda vibracional (nuclear), Ψ_{es} é a função de onda eletrônica total, Ψ_e é função de onda eletrônica orbital e Ψ_s é a autofunção de spin do elétron. Esta separação das funções de onda eletrônica e nuclear é a chamada aproximação de Born-Oppenheimer (McHale, 1999) que considera que os núcleos são muito mais pesados que os elétrons, portanto o movimento nuclear é muito mais lento que o dos elétrons. Assim a Equação 16 toma a seguinte forma:

$$\mu_{fi} = \int \Psi_{vf}^* \hat{\mu}_v \Psi_{vi} d\tau_v \int \Psi_{ef}^* \hat{\mu}_e \Psi_{ei} d\tau_e \int \Psi_{sf}^* \hat{\mu}_s \Psi_{si} d\tau_s \quad (18)$$

I II III

onde o termo I é o chamado fator de Frank-Condon e representa a sobreposição das funções de onda dos estados eletrônicos excitado e fundamental. A magnitude desta integral modula a intensidade da banda de absorção. O termo II é à base da regra de seleção orbital e o termo III é à base da regra de seleção de spin. O operador μ_e não atua na coordenada de spin. Se uma das integrais acima for nula tem-se que a transição é dita formalmente proibida.

2.3 Métodos Térmicos

O termo análise térmica é frequentemente usado para descrever um conjunto de técnicas experimentais que visam investigar o comportamento físico-químico de uma amostra em função da temperatura, sob uma atmosfera específica. As análises térmicas referem-se às técnicas convencionais como calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise térmica diferencial (DTA), termogravimetria (TG), análise termomecânica (TMA) e análise dinâmico-mecânica (DMA) (Hatakeyama e Kenetsuna, 1999).

As vantagens das análises térmicas em relação a outros métodos de análise podem ser resumidas da seguinte forma: (a) a amostra pode ser estudada ao longo de uma ampla faixa de temperatura, usando programas diferentes de temperatura; (b) quase todas as formas físicas da amostra (sólido, líquido ou gel) podem ser acomodadas nos equipamentos comerciais, usando uma variedade de porta amostras; (c) uma pequena quantidade de amostra é necessária; (d) a atmosfera na proximidade da amostra pode ser padronizada; (e) o tempo necessário para concluir uma experiência varia de vários minutos a várias horas, e (f) instrumentos com boa assistência técnica e preços razoáveis. Na ciência de polímeros, a investigação preliminar das temperaturas de transição e as características da amostra em termos de decomposição é realizada rotineiramente, utilizando as análises térmicas antes das análises espectroscópicas (Hatakeyama e Kenetsuna, 1999).

Essas técnicas apresentam aplicações em diversas áreas, tais como: alimentos, catálise, cerâmica, engenharia civil, farmacêutica, inorgânica, orgânica, petroquímica, vidros, polímeros, dentre outras (Skoog, 2004).

2.3.1 Termogravimetria (TG)

Termogravimetria (TG) é o ramo da análise térmica que examina a variação da massa de uma amostra em função da temperatura no modo de varredura ou como uma função do tempo no modo isotérmico. Nem todos os eventos térmicos que ocorrem podem provocar uma mudança na massa da amostra (por exemplo, ponto de fusão, cristalização ou de transição vítrea), mas existem algumas exceções importantes, que incluem dessorção, absorção, sublimação, vaporização, oxidação, redução e decomposição. TG é usada para caracterizar a

decomposição e a estabilidade térmica dos materiais, e também para examinar a cinética de processos físico-químicos que ocorrem na amostra. Fatores como massa da amostra utilizada, volume e forma física da amostra, forma e natureza do suporte da amostra, natureza e pressão da atmosfera na câmara da amostra e a taxa de aquecimento, têm influências importantes sobre as características da curva TG obtida (Hatakeyama e Kenetsuna, 1999).

TG não pode ser considerada como uma técnica onde as curvas de impressões digitais são obtidas, independentemente das condições experimentais. Estabelecer as condições ótimas para a análise TG frequentemente requer muitos testes preliminares (Hatakeyama e Kenetsuna, 1999).

As curvas TG são normalmente apresentadas com a variação da massa (Δm), expressa em percentagem no eixo vertical, e temperatura (T) ou tempo (t) no eixo horizontal. Uma representação é mostrada na Figura 18 (Hatakeyama e Kenetsuna, 1999).

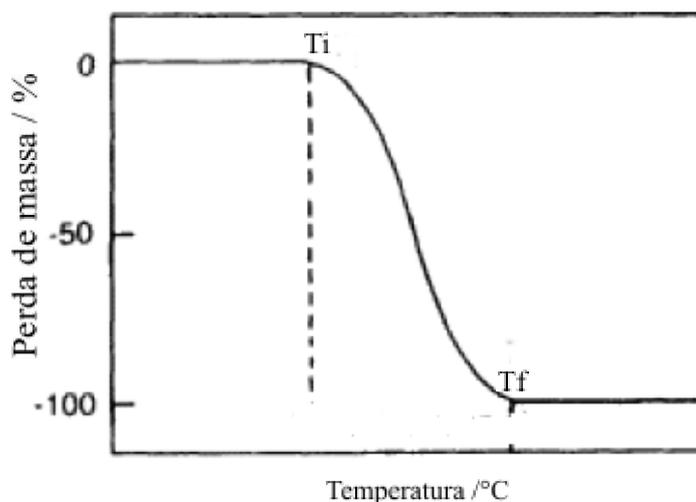


Figura 18. Curva TG.

A curva é caracterizada por duas temperaturas, T_i e T_f , que são chamados à temperatura de decomposição inicial e final, respectivamente. T_i representa a menor temperatura na qual o aparecimento de uma mudança de massa pode ser detectada por um determinado conjunto de condições experimentais. Da mesma forma, T_f representa a menor temperatura em que o processo responsável pela variação da massa foi concluído (Hatakeyama e Kenetsuna, 1999).

2.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Essa é uma técnica na qual se mede a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência, em função da temperatura, enquanto a substância e o material de referência são submetidos a uma programação de variação controlada de temperatura. De acordo com o método de medição utilizado, há duas modalidades: calorimetria exploratória diferencial com compensação de potência e calorimetria exploratória diferencial com fluxo de calor (Giolito, 2004).

Através dessa técnica, acompanham-se os efeitos de calor associados com alterações físicas ou químicas da amostra, tais como transições de fase (fusão, ebulição, sublimação, congelamento e inversões de estruturas cristalinas) ou reações de desidratação, de dissociação, de decomposição, de óxido-redução, etc. Em geral transições de fase, desidratações, reduções e certas reações de decomposição produzem efeitos endotérmicos, enquanto que cristalizações, oxidações e algumas reações de decomposição produzem efeitos exotérmicos (Figura 19) (Giolito, 2004).

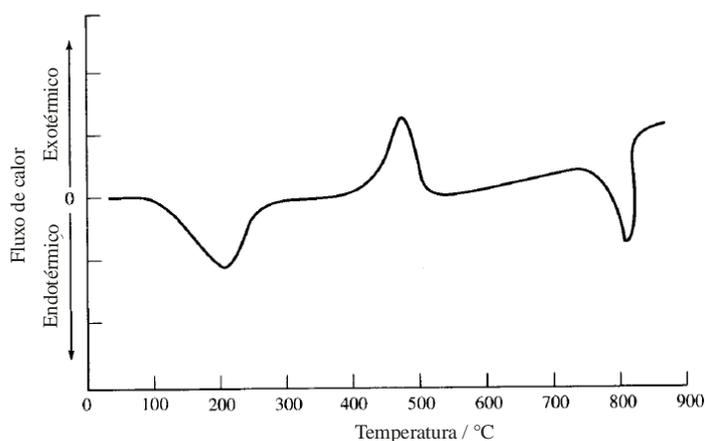


Figura 19. Exemplo de curva DSC.

Essas técnicas permitem também estudar transições que envolvem variações de entropia (que são transições de segunda ordem), dentre as quais as mais comuns são transições vítreas que certos polímeros e materiais vítreos podem sofrer (Giolito, 2004).

3 Parte Experimental

3.1 Extração das enzimas proteolíticas ruminais

Para extração das enzimas foi utilizado 1 litro de líquido ruminal, o qual foi filtrado em dupla camada de gaze, seguido de centrifugação por 30 minutos a 13000 xg (onde g é a gravidade) em 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, com cuidado de manter o sedimento menos denso verificado na interface do precipitado. Adicionou-se 250 mL de butanol (Proquímica[®]) e 250 mL de água a 4 °C ao sedimento obtido e agitou-se nesta temperatura por 1 hora. Em seguida a essa mistura foi adicionado 1 L de acetona (Nuclear[®]) a 4 °C sob fluxo contínuo e agitação durante 45 minutos. Agitou-se por mais 15 minutos mantendo a mesma temperatura, e em seguida realizou-se a filtração em papel filtro sob sucção moderada. O precipitado foi lavado com 500 mL de acetona a 4 °C e armazenado em dessecador sob refrigeração até a secagem. O precipitado seco foi novamente solubilizado em 150 mL de água sob agitação durante 1 hora a 4 °C. A solução foi centrifugada novamente por 30 minutos a 2600 xg e 4 °C e recolhido o sobrenadante (1) juntamente com os sedimentos menos densos. Adicionou-se mais 100 mL de água ao precipitado e novamente agitou-se por 1 hora em 4 °C centrifugou-se e retirou-se o sobrenadante (2). Os sobrenadantes (1) e (2) foram misturados resultando em uma solução enzimática, conservada entre -10 e -5°C.

Antes de ser usada a solução contendo as proteases ruminais, a mesma foi descongelada e centrifugada por 30 minutos a 4 °C. O sedimento mais denso foi utilizado para a incubação *in vitro* (Kohn e Allen, 1995).

3.2 Ensaios de incubação

3.2.1 Incubação ruminal *in vivo*

Para o experimento de incubação *in vivo* as amostras de PCL (Sigma-Aldrich[®]) foram utilizadas sem nenhum pré-tratamento.

A amostra de quitosana de alta e baixa densidade passaram por um tratamento para a produção de partículas: solubilização de 4,5 g da QA (quitosana alta densidade, polymar[®]) em 100 mL de uma solução de ácido clorídrico (0,27mol/L) (Vetec), resultando numa solução com pH 4,0. A mesma solubilização foi feita para a QB (quitosana baixa densidade, polymar[®]), porém utilizando 4,72 g da mesma. As soluções obtidas de quitosana foram gotejadas separadamente, com auxílio de uma pipeta, em uma solução de NaOH (1 mol/L) (Sigma-aldrich[®]) para a precipitação da quitosana e formação das partículas. Na sequência as esferas formadas foram filtradas e lavadas com água destilada (Goy, Assis et al., 2004).

As partículas contendo apenas quitosana em seguida foram acondicionadas em tubos (Eppendorf 3810[®]). Cada tubo possuía 16 furos de aproximadamente 2 mm, para que o líquido ruminal pudesse entrar em contato com os polímeros. Em seguida os tubos foram embalados em sacos de nylon e adicionados no rúmen bovino diariamente até que se completassem seis dias. No sétimo dia as amostras foram retiradas do rúmen bovino, lavadas e secas a temperatura ambiente para análise físico-química (Figura 20).



Figura 20. Esquema para incubação das amostras.

O experimento com os bovinos foi realizado na fazenda experimental da Embrapa Gado de Leite, localizado em Coronel Pacheco-MG (Brasil), utilizando-se seis vacas fistuladas (A, B, C, D, E e F) da raça girolando 7/8 (Figura 21).

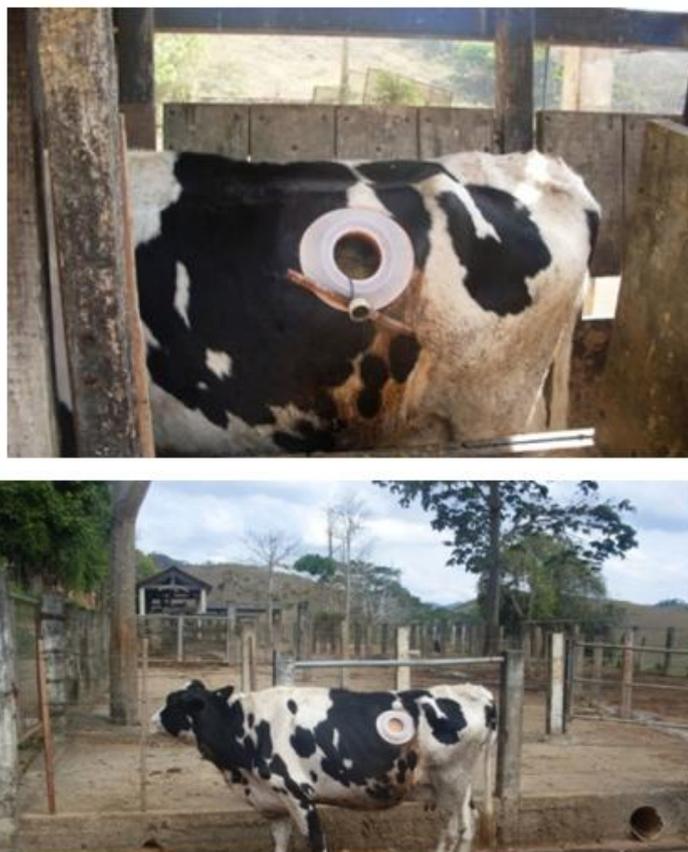


Figura 21. Vaca com fístula ruminal.

Os animais tiveram acesso livre à água, porém com alimentação composta apenas por pastagem de *brachiaria decumbens* para as(vacas A, B e C) e silagem de milho (vacas D, E e F).

3.2.2 Incubação *in vitro*

A incubação *in vitro* foi realizada pesando em béqueres separados 0,400 g para ambas as amostras de quitosana. Essas foram dissolvidas em 10 mL de solução de ácido clorídrico 1 %. Em seguida foi adicionado em cada um dos béqueres 0,04 g das enzimas proteolíticas

extraídas do rúmen (ver item 3.1.) As soluções foram deixadas em repouso por sete dias em temperatura ambiente e armazenadas em dessecador para secagem.

3.3 Construção dos sistemas de liberação

3.3.1 Síntese do coacervato de cálcio

Adicionou-se lentamente com o auxílio de uma bureta uma solução de cloreto de cálcio dihidratado (4 mol/L) (Carlo Erba[®]) a uma solução de polifosfato de sódio (2mol/L) (Merck[®]) (estequiometria 1:2) sob agitação branda e contínua. A solução resultante foi deixada em repouso por 30 minutos para a separação das fases. Em seguida foi retirada a fase inferior da solução, referente ao coacervato de cálcio; o gel foi transferido para uma placa de Petri e mantido em dessecador por 15 dias, seguido de maceração com pistilo (de Oliveira, de Oliveira et al., 2005).

3.3.2 Sistema de liberação composto por PCL e coacervato de cálcio

Em um béquer solubilizou-se 0,8 g de PCL em 10 mL de diclorometano (Vetec[®]). Em seguida foram adicionados 1,2 g do coacervato de cálcio seguido de repouso por 24 horas para a evaporação do solvente. Após esse período o sistema foi retirado do béquer com auxílio de uma pinça e armazenado para a realização do ensaio de liberação controlada. O sistema foi construído em duplicata: blenda A e B.

3.3.3 Sistema de liberação composto por PCL

Em um béquer dissolveu-se 1,6 g de PCL em 10 mL diclorometano; em seguida foi incorporado 0,1 g do extrato enzimático com o auxílio de um homogeneizador tipo Turrax Modelo TE 103 (Tecal). A mistura foi transferida para uma forma de aço inox e deixada em

repouso por 24 horas para evaporação do solvente. Após esse período o dispositivo foi retirado da forma e armazenada para o ensaio de entrega controlada. Os sistemas foram construídos em duplicatas: dispositivo C (formato cilíndrico 3,0 cm de diâmetro; 0,5 cm de altura e 1,668 g de peso final) e dispositivo D (formato cilíndrico 3,0 cm de diâmetro, 0,5 cm de altura e 1,689 g de peso final).

3.4 Ensaios de liberação controlada

Os ensaios foram realizados para o sistema de liberação composto pelo extrato fúngico e o PCL foi realizado utilizando o equipamento Incubador Shaker 25 (New Brunswick-Edison, USA) numa agitação de 100 rpm e temperatura de 38 °C (temperatura ruminal). Já os ensaios de entrega controlada dos sistemas contendo PCL e coacervato de cálcio foram realizados em agitadores a temperatura ambiente. Os ensaios utilizando as blendas PCL/Coacervato foram realizados em 100 mL de água destilada retirando uma alíquota de 0,8 mL para análise a cada hora. Já os ensaios envolvendo os dispositivos PCL e o extrato fúngico foram realizados em 20 mL de água destilada retirando uma alíquota de 0,1 mL para a análise. Em todos os casos para cada alíquota retirada foi re-adicionado um volume igual de água destilada.

3.5 Métodos para análise de liberação controlada

3.5.1 Descolorimetria

Para analisar a liberação do fosfato nos ensaios envolvendo os dispositivos A e B foi utilizado o método de descolorimetria. Esse método consiste em reagir tiosulfato de amônio (5 mL em 0,24 mol/L) (Sigma-aldrich[®]) e sulfato de ferro III (5 mL a 0,004 mol/L) (Sigma-aldrich[®]), formando o complexo tiosulfato de ferro III (coloração marrom tijolo) (Equação 19).



Em seguida adicionou-se à alíquota da solução do ensaio de liberação contendo íons fosfato que reagem com o complexo formado, diminuindo a coloração da solução. A diminuição na coloração é avaliada através de espectroscopia eletrônica com leitura em 450 nm (Cavalcante, Lage et al., 2008).

3.5.2 Método de Miller

Para analisar a cinética de liberação do extrato fúngico no decorrer do tempo foi utilizada uma metodologia que quantifica a atividade da enzima xilanase. Esse método baseia-se na degradação da xilana pelo extrato enzimático resultando na formação de seus monômeros (açúcares redutores). Os açúcares redutores em meio alcalino e a quente formam enedióis (Figura 22), que doam seus elétrons para reduzir o reagente 3,5-dinitro-salicílico até 3-amino-5-nitrosalicilato (Figura 22), produzindo uma coloração alaranjada, cuja intensidade é proporcional à concentração de açúcar redutor presente no meio reacional (MILLER, 1959).

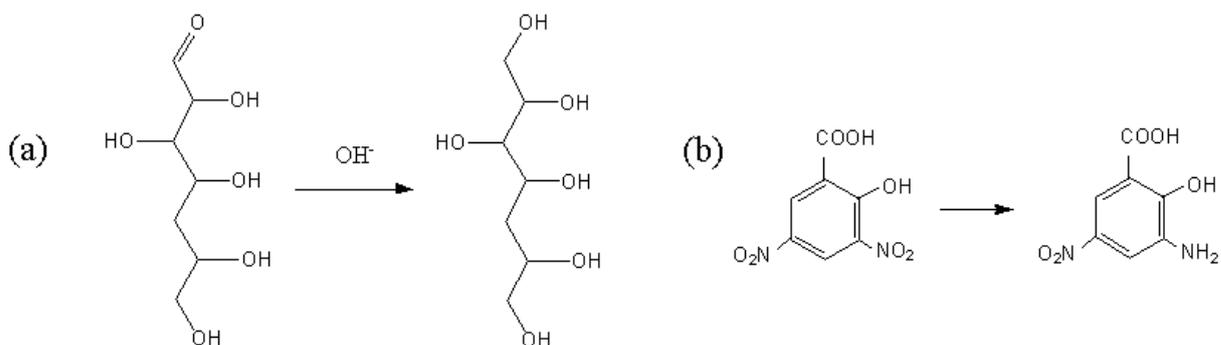


Figura 22. Formação de enedióis (a) redução do 3,5-dinitro-salicílico (b).

A determinação da atividade das enzimas presentes no extrato foi realizada com a construção de uma curva de calibração utilizando como padrão o ácido galacturônico (Fluka[®]). Para isso preparou-se uma solução deste ácido (1,0 mg/mL) e realizou-se a preparação dos padrões conforme a tabela 1.

Tabela 1. Curva de calibração.

Tubos	Solução Padrão de ácido galacturônico /mL	H₂O destilada /mL	Solução DNS /mL	Solução de tartarato duplo de sódio e potássio a 15,1 g.L⁻¹ /mL
Branco	0	1,0	1	8
1	0,3	0,7	1	8
2	0,5	0,5	1	8
3	0,8	0,2	1	8
4	1,0	0	1	8

A preparação das soluções de DNS pesou-se 10,6 g do ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS) (SIGMA[®]), 18,9 g de NaOH e solubilizou-se em 1416 mL de água destilada. Após a dissolução foram adicionados 7,6 mL de fenol (fundido a 50°C) e 8,6 g de metabissulfito de sódio. Após a preparação de cada tubo eles foram dispostos em um banho maria a 60 °C por 10 minutos; passado esse período, os tubos foram imersos em um banho de gelo para a realização da medida no UV-vis no comprimento de onda de 540 nm.

Para a análise das amostras foi utilizado 0,1 mL das alíquotas proveniente dos testes de liberação; a estas alíquotas foram adicionados então 0,9 mL de solução de xilana (SIGMA[®]), 1,0 mL da solução DNS e 8,0 mL da solução de tartarato duplo de sódio e potássio. Realizado esse procedimento os tubos contendo essas soluções foram levados ao banho maria a 60 °C por 50 minutos; passado esse período os tubos foram imersos em um banho de gelo para a realização da medida no UV-vis no comprimento de onda de 540 nm.

3.6 Instrumentação

3.6.1 Espectroscopia vibracional

Os espectros no infravermelho dos polímeros foram obtidos em um espectrômetro Bomem FTIR 102, na região de 4000-400 cm⁻¹. As amostras de quitosana foram preparadas utilizando KBr como suporte e as de PCL em emulsão com diclorometano em janela de CsI,

com resolução de 4 cm^{-1} e média de 64 acumulações. As medidas Raman foram realizadas em um equipamento Brucker RFS 100 equipado com um laser $\text{Nd}^{+3}/\text{YAG}$ operando em 1064 nm, no infravermelho próximo e um detector CCD resfriado com nitrogênio líquido, resolução espectral de 4 cm^{-1} , média de 2000 acumulações e com potência variando de 200 a 300 mW.

3.6.2 Espectroscopia Eletrônica

Os espectros eletrônicos foram obtidos em um espectrofotômetro Shimadzu UVPC 1601, com lâmpada de halogênio (infravermelho próximo e visível) e de deutério (UV), com detector do tipo fotomultiplicadora (UV-vis). Para obtenção dos espectros foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 10 nm.

3.6.3 Termogravimetria e análise diferencial termogravimétrica

As análises térmicas (TD e DTA) foram realizadas em um TG-60 Shimadzu, em atmosfera de nitrogênio, num fluxo de 50 mL/min com taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, de 25 a $900\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.6.4 Calorimetria Diferencial Exploratória

As análises de DSC foram realizadas em um equipamento DSC-60 Shimadzu em atmosfera de nitrogênio num fluxo de 50 mL/min com taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, de 25 a $450/180\text{ }^{\circ}\text{C}$ para as amostras de quitosana e de PCL, respectivamente.

4 Resultados e Discussões

4.1 Incubação in vivo das amostras de quitosana de alta e baixa densidade

Os espectros de absorção no infravermelho das amostras de QA e QB são apresentados na Figura 23. As principais bandas observadas são descritas na Tabela 2 (Tian, Liu et al., 2004; López, Mercê et al., 2008).

Tabela 2. Principais valores de números de onda (cm^{-1}) obtidos no espectro de absorção no infravermelho para as amostras de QA e QB, com as respectivas atribuições.

IV		Atribuição
QA	QB	
3700-2990	3600-2990	$\nu(\text{OH})$ sobrepostas à banda $\nu(\text{NH}_2)$
2921 e 2877	2922 e 2880	$\nu(\text{CH}_2)$ simétrico e assimétrico
1649	1649	$\nu(\text{C}=\text{O})$ de amida
1597	1597	$\delta(\text{NH}_2)$
1422	1422	$\nu(\text{CN})$ de amida
1318	1324	$\nu(\text{CN})$ de amina
1379	1384	$\delta(\text{CH}_3)$ simétrica em amida
1262	1262	$\delta(\text{OH})$ fora do plano
1085	1085	$\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ do anel glicosídico
1153 e 895	1153 e 895	$\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ referente à ligação $\beta(1-4)$

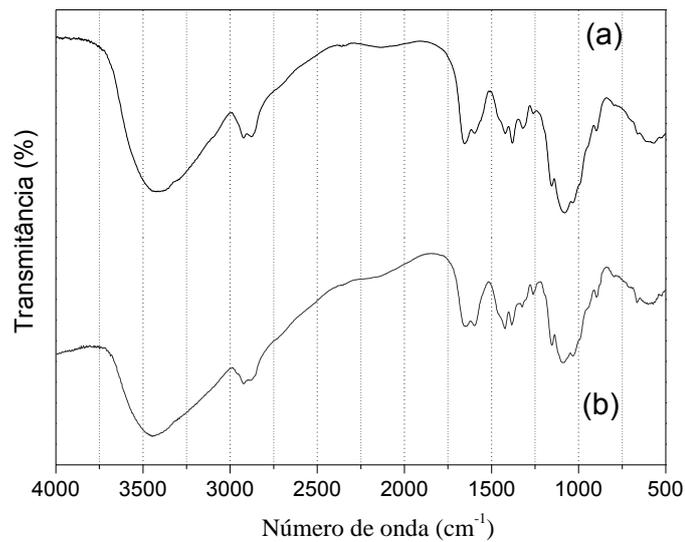


Figura 23. Espectro na região do infravermelho de QA (a) e QB (b).

Os espectros na região do infravermelho das amostras de quitosana de alta e baixa densidade após serem incubadas no rúmen bovino em diferentes tempos e com os dois tipos de alimentação são apresentados nas Figuras 24 a 35.

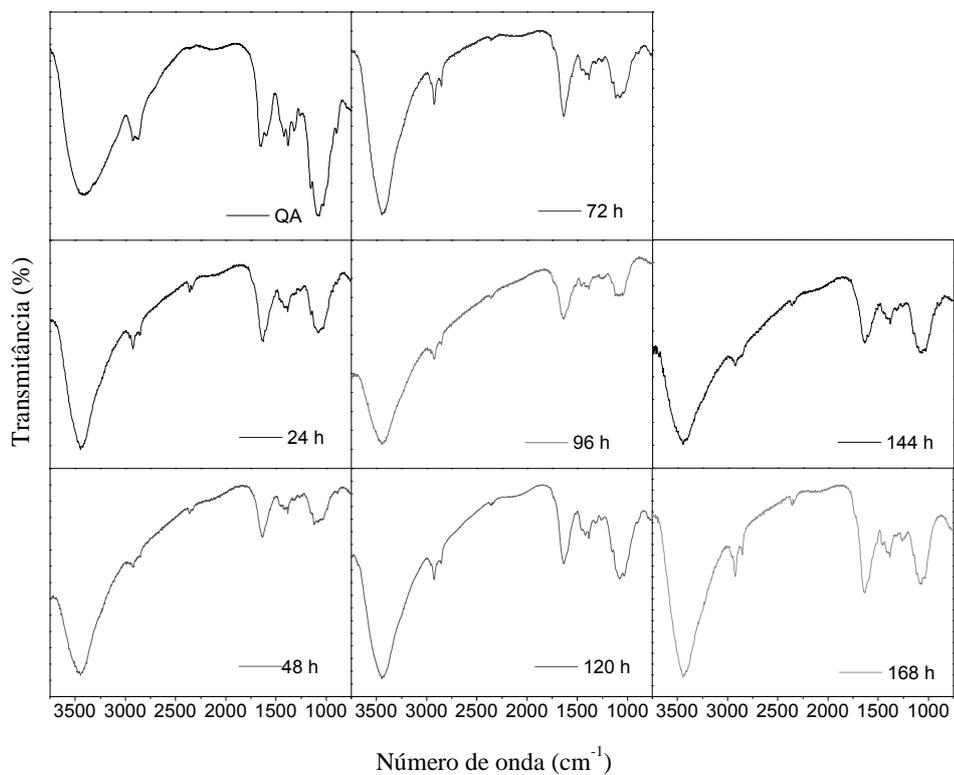


Figura 24. Espectro na região do infravermelho da amostra de QA incubada na vaca A com alimentação exclusiva a *brachiaria decumbens* nos respectivos tempos de incubação.

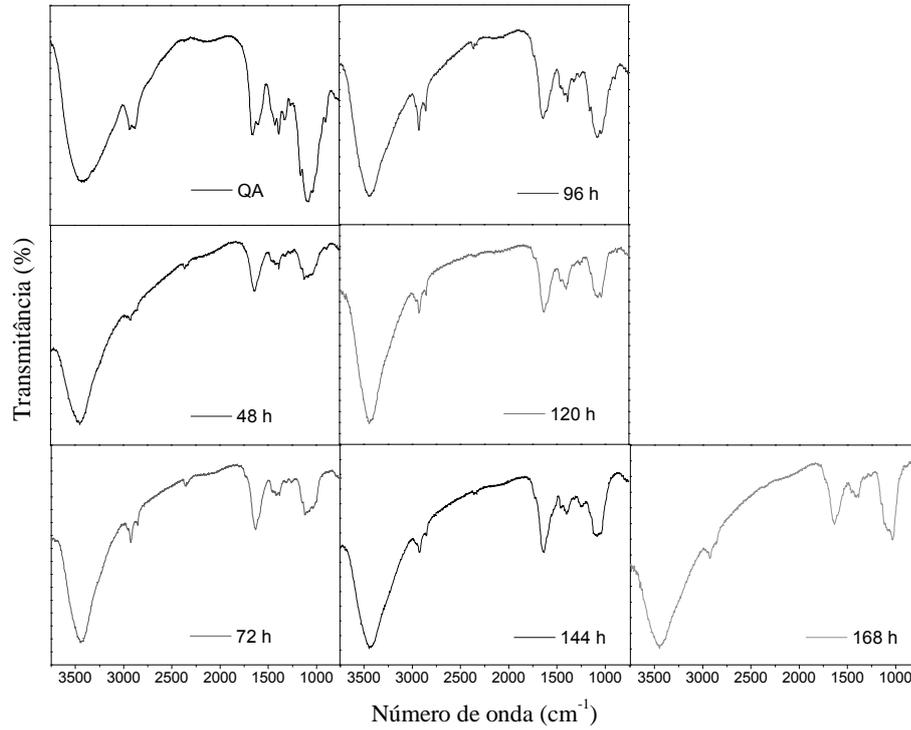


Figura 25. Espectro na região do infravermelho da amostra de QA incubada na vaca B com alimentação exclusiva a *brachiaria decumbens* nos respectivos tempos de incubação.

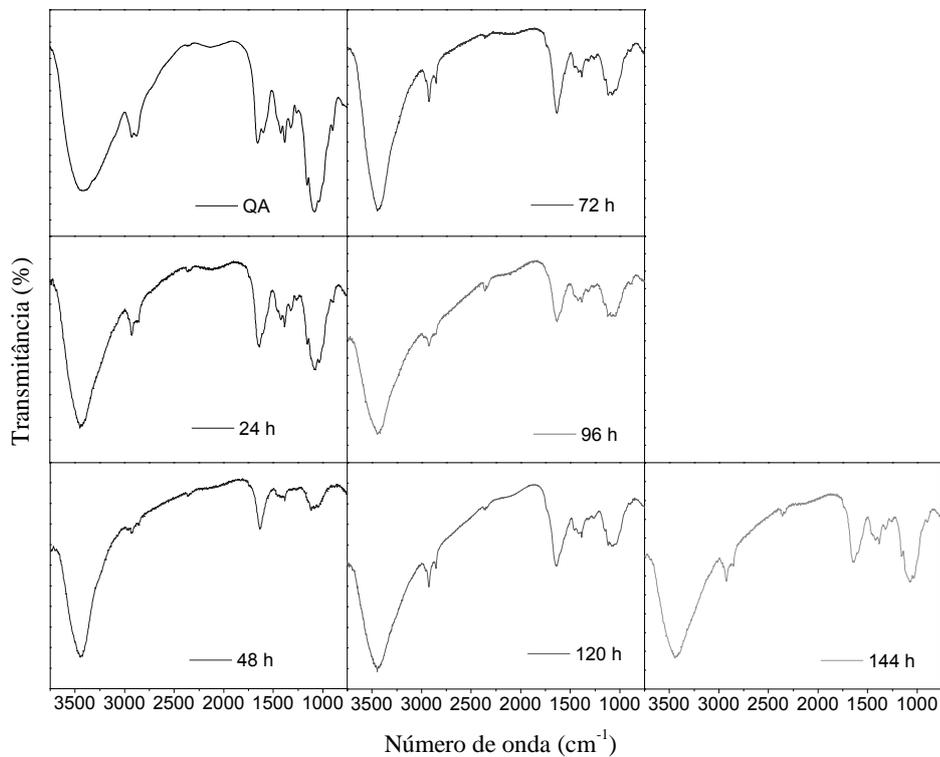


Figura 26. Espectro na região do infravermelho da amostra de QA incubada na vaca C com alimentação exclusiva a *brachiaria decumbens* nos respectivos tempos de incubação.

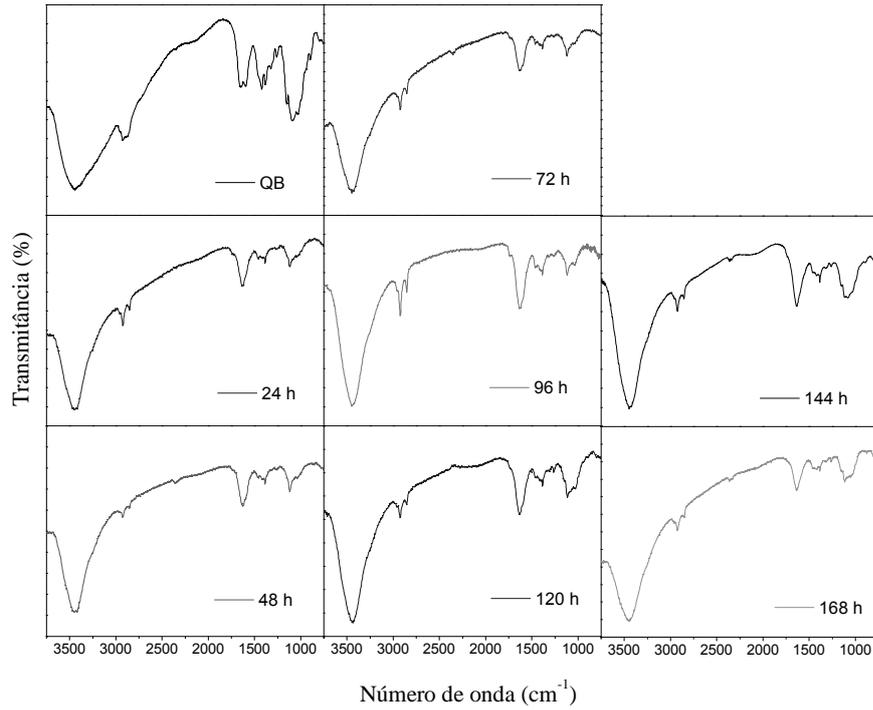


Figura 27. Espectro na região do infravermelho da amostra de QB incubada na vaca A com alimentação exclusiva a *brachiaria decumbens* nos respectivos tempos de incubação.

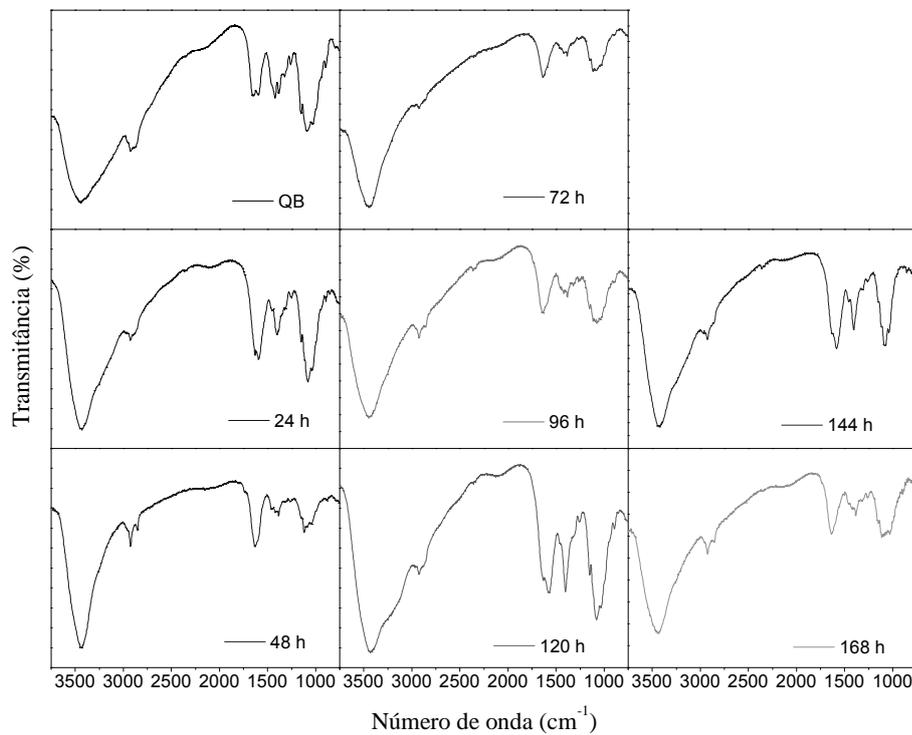


Figura 28. Espectro na região do infravermelho da amostra de QB incubada na vaca B com alimentação exclusiva a *brachiaria decumbens* nos respectivos tempos de incubação.

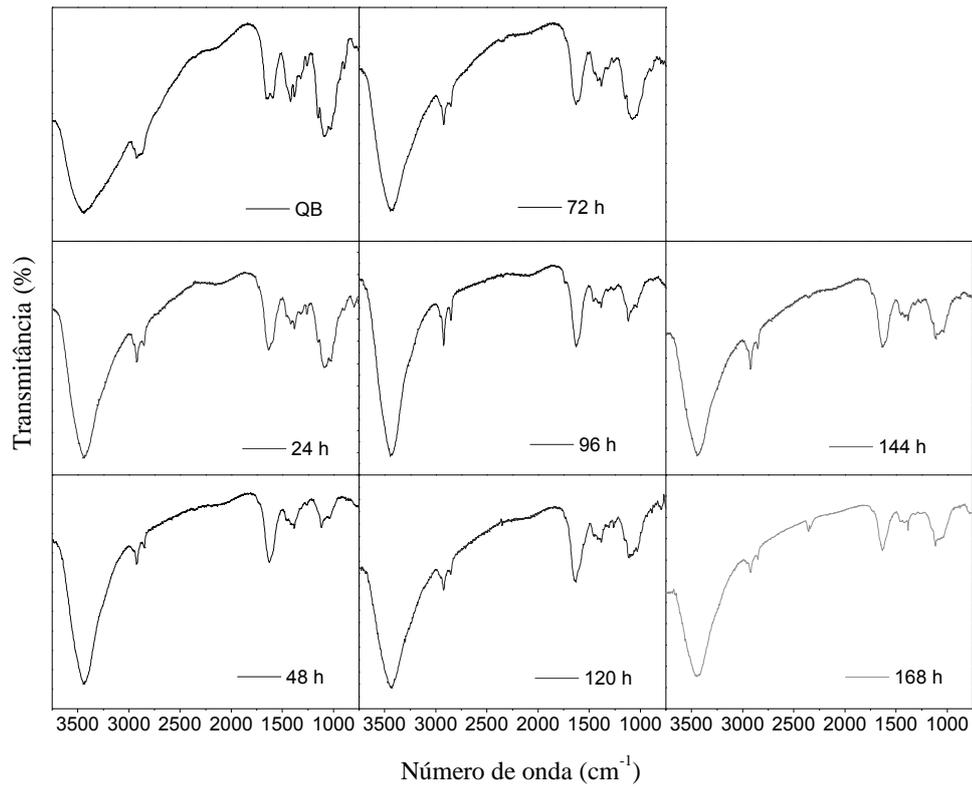


Figura 29. Espectro na região do infravermelho da amostra de QB incubada na vaca C com alimentação exclusiva a *brachiaria decumbens* nos respectivos tempos de incubação.

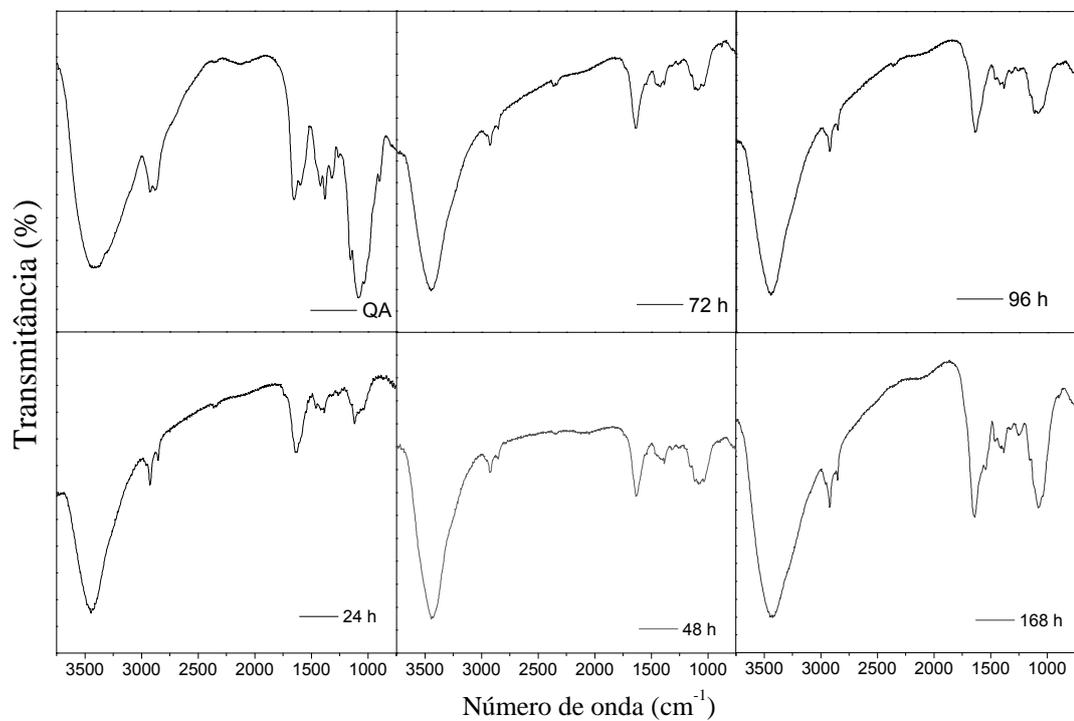


Figura 30. Espectro na região do infravermelho da amostra de QA incubada na vaca D com alimentação exclusiva a silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.

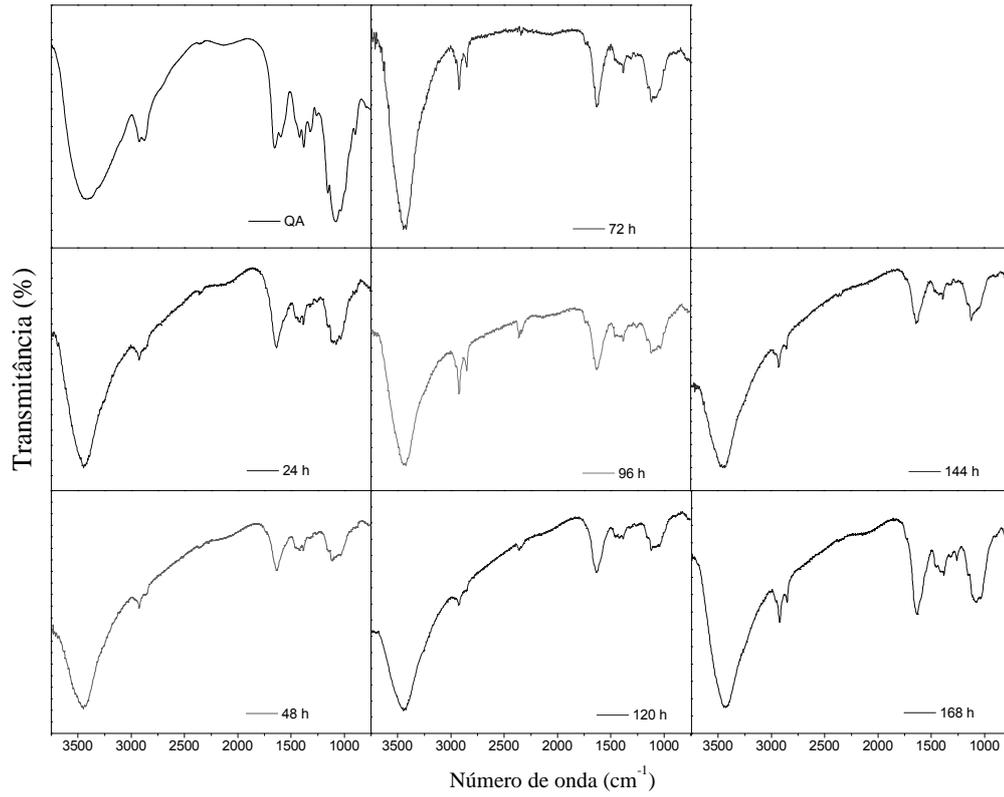


Figura 31. Espectro na região do infravermelho da amostra de QA incubada na vaca E com alimentação exclusiva a silagem milho nos respectivos tempos de incubação.

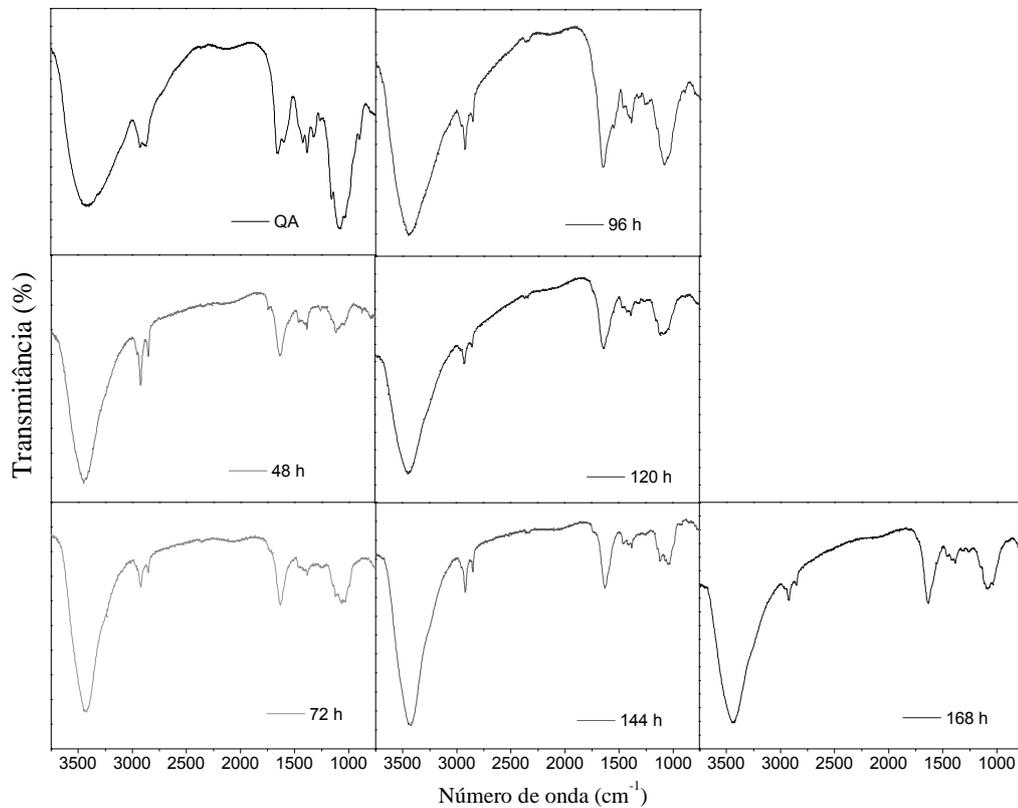


Figura 32. Espectro na região do infravermelho da amostra de QA incubada na vaca F com alimentação exclusiva a silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.

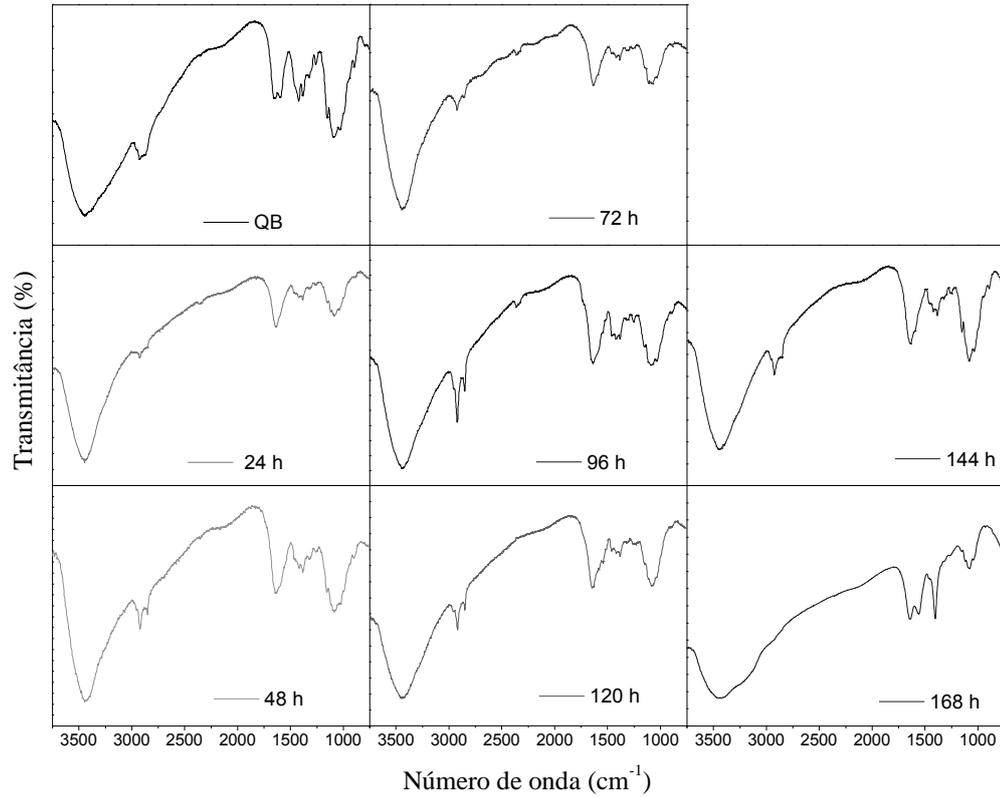


Figura 33. Espectro na região do infravermelho da amostra de QB incubada na vaca D com alimentação exclusiva a silagem milho nos respectivos tempos de incubação.

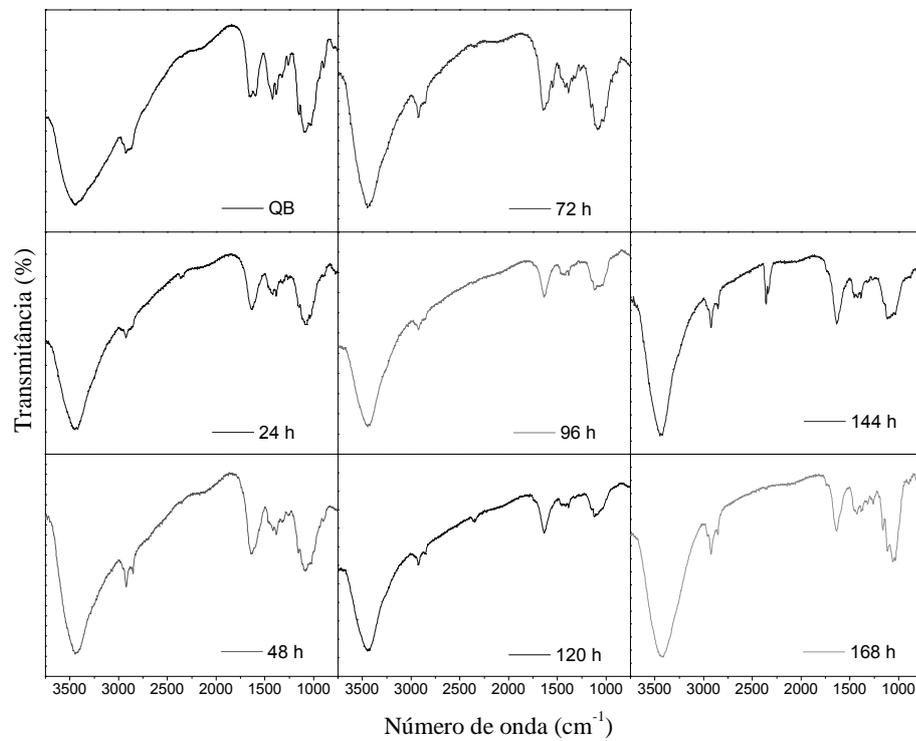


Figura 34. Espectro na região do infravermelho da amostra de QB incubada na vaca E com alimentação exclusiva a silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.

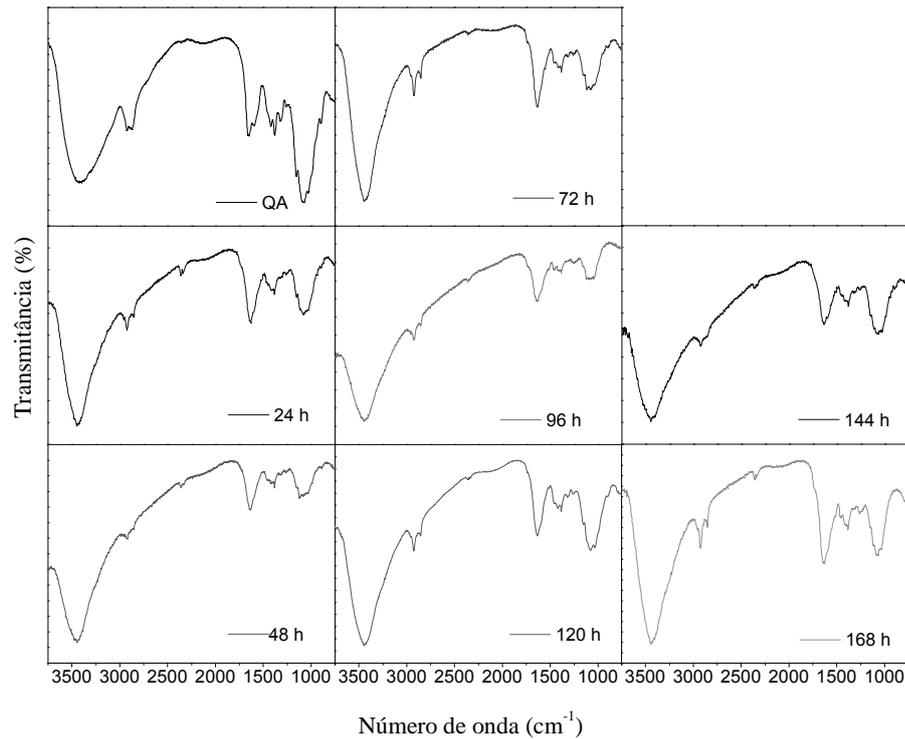


Figura 35. Espectro na região do infravermelho da amostra de QB incubada na vaca F com alimentação exclusiva a silagem milho nos respectivos tempos de incubação.

Estes espectros vibracionais mostram algumas alterações nos seus perfis devido à interação das amostras com o ambiente ruminal, no entanto essas alterações podem ser mais bem visualizadas na Figura 36.

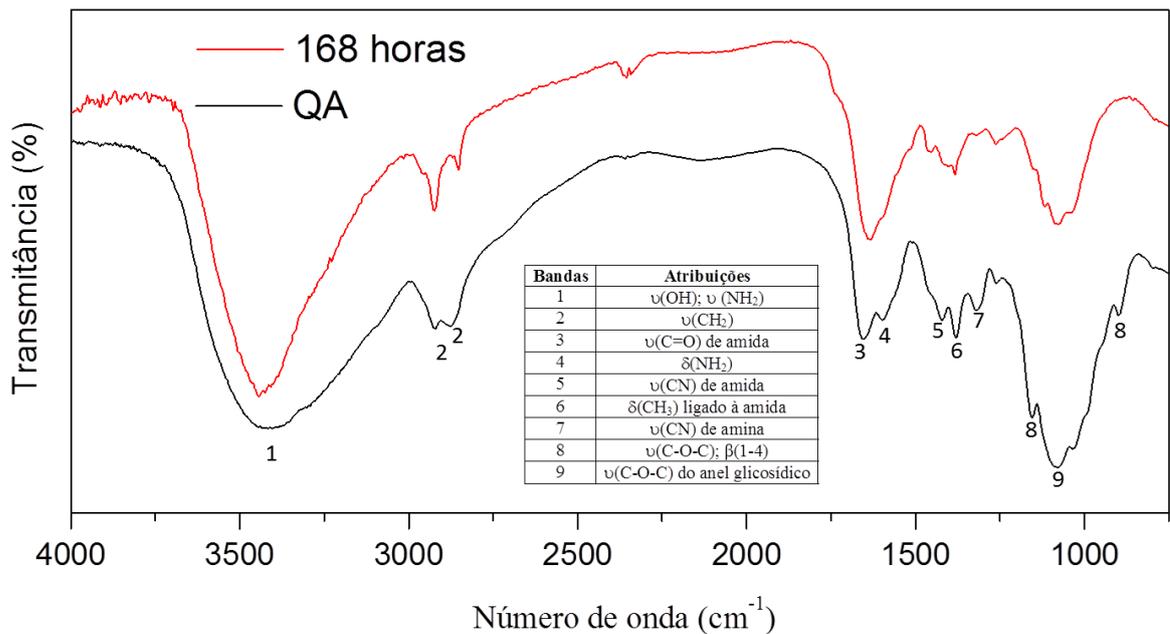


Figura 36. Espectro na região do infravermelho da amostra de QA incubada na vaca A com alimentação exclusiva a *brachiaria decumbens* incubada no rúmen por 168 h.

Entres estas modificações pode-se mencionar: uma significativa diminuição ou desaparecimento da banda em 1597 cm^{-1} e o estreitamento da banda entre $3700\text{-}2990\text{ cm}^{-1}$, o que pode estar relacionado à perda do grupamento -NH_2 ligado ao anel glicosídico e do grupamento amida; diminuição da intensidade das bandas em 1153 e 897 cm^{-1} , fato que pode ser relacionado à quebra da ligação C-O-C da ligação $\beta(1\text{-}4)$ e despolimerização da amostras (diminuição da cadeia). Além destes, foi observado também o deslocamento da banda em 1658 para 1635 cm^{-1} ; tal deslocamento, referente a uma diminuição em número de onda da vibração, provavelmente está relacionado à perda do grupamento C=O da amida e a formação de um novo grupo C=O devido à despolimerização da cadeia polimérica. Outras mudanças observadas nos espectros: diminuição da intensidade das bandas em 1384 e 1422 cm^{-1} , que pode ser atribuído à perda do grupamento amida ligado ao anel glicosídico; alteração nas bandas em 2922 e 2880 cm^{-1} (para QB) e 2921 e 2877 cm^{-1} (para QA), que pode ser relacionado à decomposição das amostras e, por fim, uma significativa diminuição da intensidade das bandas em 1318 (QA) e 1324 cm^{-1} (QB), que pode estar relacionada à perda do grupamento -NH_2 ligado ao anel glicosídico.

As alterações espectroscópicas citadas foram observadas para todas as amostras, independentemente do tipo de alimentação oferecida à vaca ou do tempo de incubação. O resultado também foi reprodutivo para as três vacas com o mesmo tipo de alimentação, sendo a única alteração o aparecimento de uma banda em torno de 1740 cm^{-1} (Figura 37) referente ao modo de vibração do grupamento (COOH) livre, resultante da abertura do anel glicosídico (Sun, Qu et al., 2008). Porém esta alteração só pode ser observada em alguns dos espectros mostrados. Isso indica que o processo de decomposição relacionado à presença desse modo vibracional não ocorre em todas as amostras.

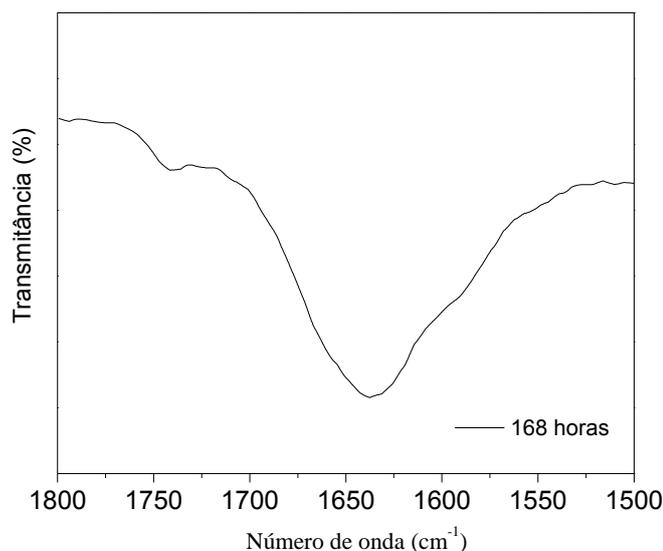


Figura 37. Espectro na região do infravermelho ampliado da amostra de QB encubada na vaca E por 168 horas com alimentação restrita a silagem de milho.

As Figuras de 38 a 49 mostram os espectros eletrônicos obtidos para as diferentes condições realizadas no experimento. Nestes espectros observa-se o aparecimento de uma banda entre 250 e 300 nm, referente à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ centrada nos grupos carbonila e carboxila (Czechowska-Biskup, Rokita et al., 2005). O aparecimento desta nova banda e o aumento da sua intensidade pode ser atribuído à despolimerização da cadeia polimérica que resulta na formação do grupamento carbonila e/ou a abertura do anel glicosídico, que promove a formação do grupamento carboxila (Kang, Dai et al., 2007).

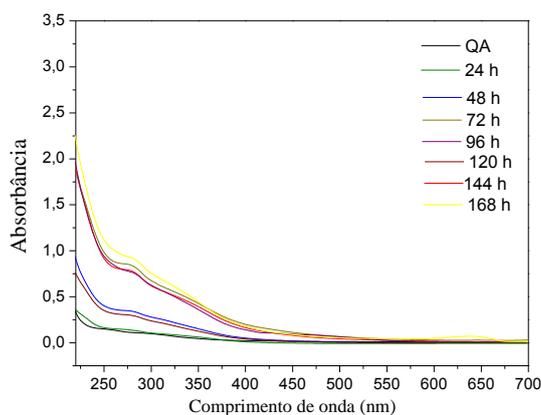


Figura 38. Espectro eletrônico das amostras de QA incubadas na vaca A com alimentação exclusiva de *brachiaria decumbens* nos respectivos tempos de incubação.

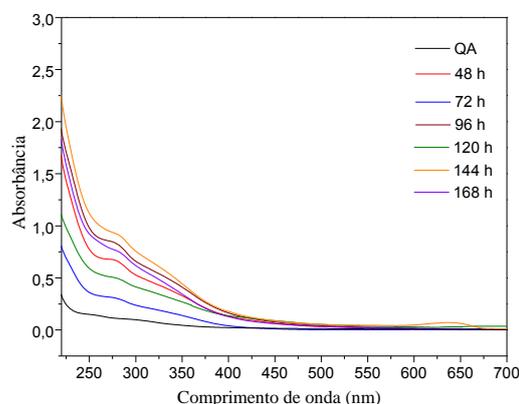


Figura 39. Espectro eletrônico das amostras de QA incubadas na vaca B com alimentação exclusiva de *brachiaria decumbens* nos respectivos tempos de incubação.

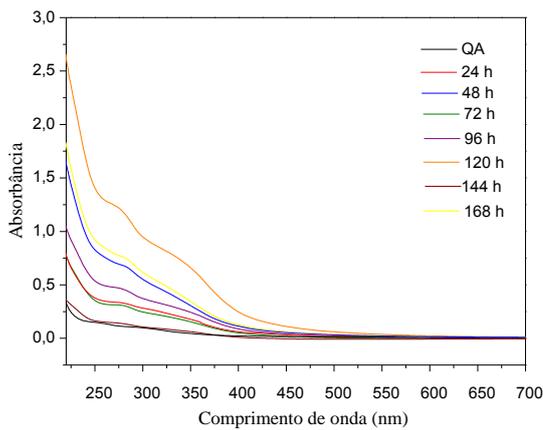


Figura 40. Espectro eletrônico das amostras de QA incubadas na vaca C com alimentação exclusiva de *brachiaria decumbens* nos respectivos tempos de incubação.

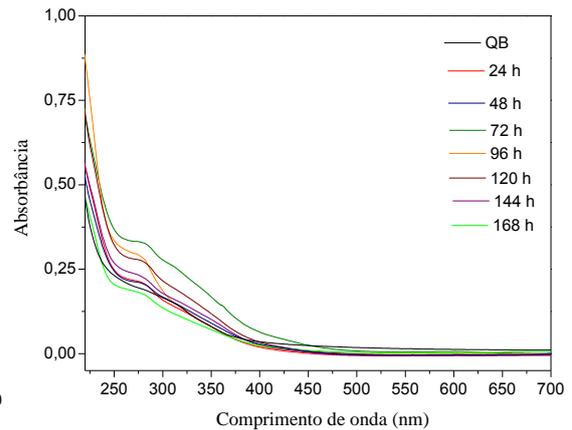


Figura 41. Espectro eletrônico das amostras de QB incubadas na vaca A com alimentação exclusiva de *brachiaria decumbens* nos respectivos tempos de incubação.

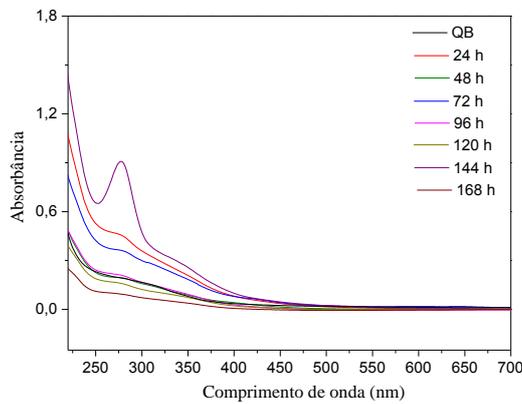


Figura 42. Espectro eletrônico das amostras de QB incubadas na vaca B com alimentação exclusiva de *brachiaria decumbens* nos respectivos tempos de incubação.

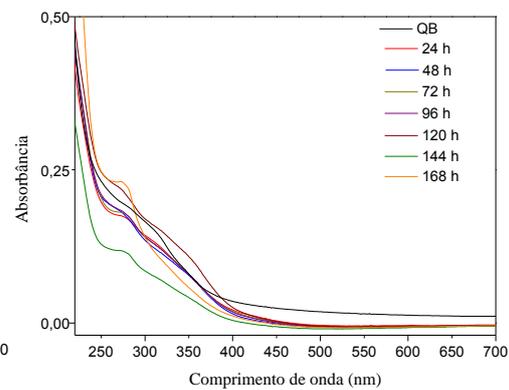


Figura 43. Espectro eletrônico das amostras de QB incubadas na vaca C com alimentação exclusiva de *brachiaria decumbens* nos respectivos tempos de incubação.

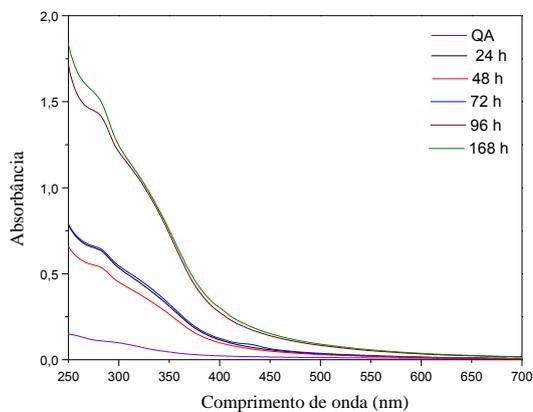


Figura 44. Espectro eletrônico das amostras de QA incubadas na vaca D com alimentação exclusiva de silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.

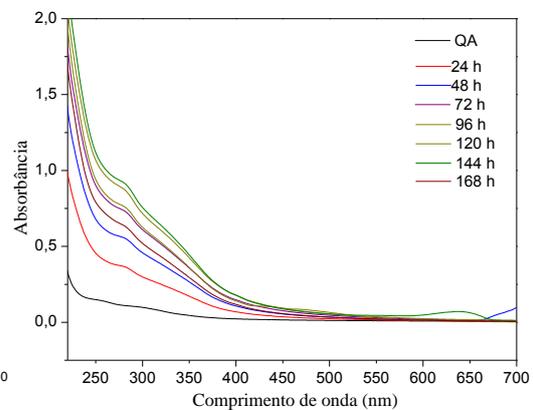


Figura 45. Espectro eletrônico das amostras de QA incubadas na vaca com alimentação exclusiva de silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.

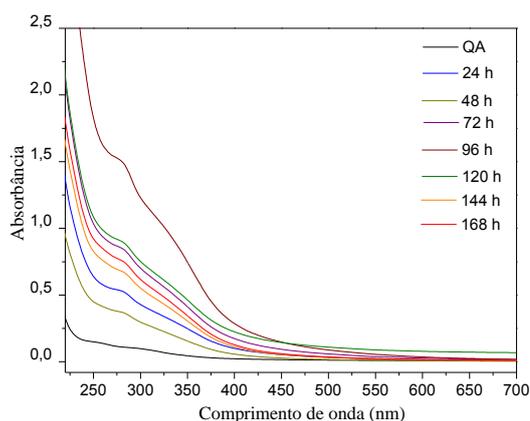


Figura 46. Espectro eletrônico das amostras de QA incubadas na vaca com alimentação exclusiva de silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.

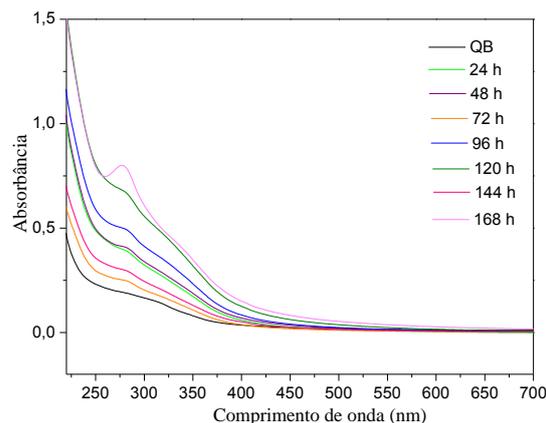


Figura 47. Espectro eletrônico das amostras de QB incubadas na vaca D com alimentação exclusiva de silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.

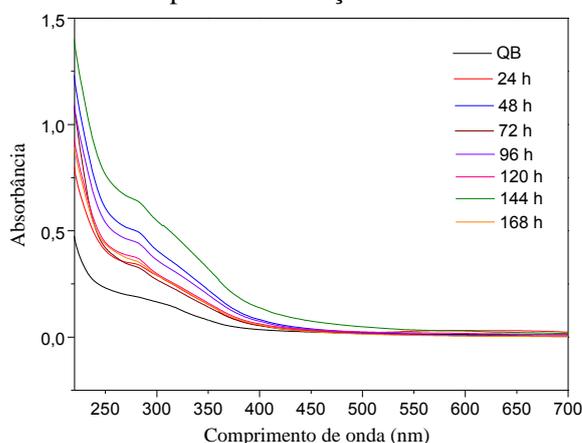


Figura 48. Espectro eletrônico das amostras de QB incubadas na vaca E com alimentação exclusiva de silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.

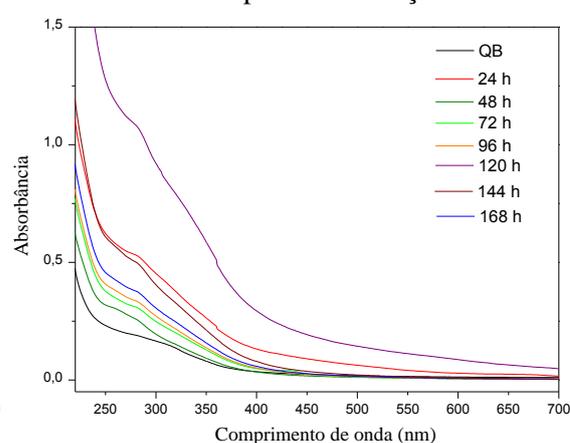


Figura 49. Espectro eletrônico das amostras de QB incubadas na vaca F com alimentação exclusiva de silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.

Apesar da ocorrência desta nova transição eletrônica não se observa uma correlação entre a intensidade da mesma e o tempo de incubação no rúmen bovino. Isso porque ao mesmo tempo em que há a formação do grupamento carbonila, devido à despolimerização da cadeia polimérica, e a formação da função carboxila, devido à abertura do anel glicosídico, há a perda do grupamento carbonila de amida. Assim existem dois processos que influem no aumento da intensidade da banda, e um processo que influencia a diminuição de sua intensidade. Como se trata de um processo geral de decomposição em sistema biológico, em que não se sabe qual processo específico pode estar ocorrendo com maior ou menor intensidade, existindo assim diversas variáveis que podem influenciar na degradação,

torna-se difícil tentar obter uma relação da variação da intensidade da banda eletrônica com o tempo.

Os espectros Raman das amostras de QA e QB são apresentados na Figura 50. As principais bandas observadas e suas respectivas atribuições são descritas na Tabela 3 (Schenzel e Fischer, 2001).

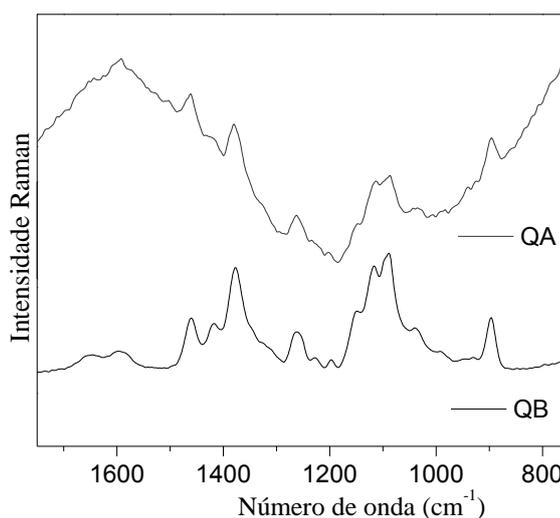


Figura 50. Espectro Raman das amostras de quitosana.

Tabela 3. Principais valores de números de onda (cm^{-1}) dos espectros Raman obtidos das amostras de quitosana, e respectivas atribuições.

Raman		Atribuição
QA	QB	
1461	1461	$\delta(\text{CH}_2)$
1420	1418	$\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{HCC})$, $\delta(\text{HCO})$, $\delta(\text{COH})$
1380	1376	$\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{HCC})$, $\delta(\text{HCO})$, $\delta(\text{COH})$
1326	1328	$\delta(\text{N-H})$, $\nu(\text{C-N})$
1262	1260	$\tau(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{HCC})$, $\delta(\text{HOC})$, $\delta(\text{COH})$
1146	1150	$\nu(\text{CC})$, $\nu(\text{CO})$, respiração assimétrica do anel
1112	1117	$\nu(\text{C-O-C})$, ligação glicosídica; respiração simétrica do anel
1087	1089	$\nu(\text{C-O-C})$, ligação glicosídica; respiração simétrica do anel
1034	1040	$\nu(\text{C-C})$, $\nu(\text{C-O})$
899	896	$\delta(\text{CH})$

Os espectros Raman das amostras de quitosana de alta e de baixa densidade após serem incubadas no rúmen bovino em diferentes tempos e com os dois tipos de alimentação são apresentados nas Figuras de 51 a 54.

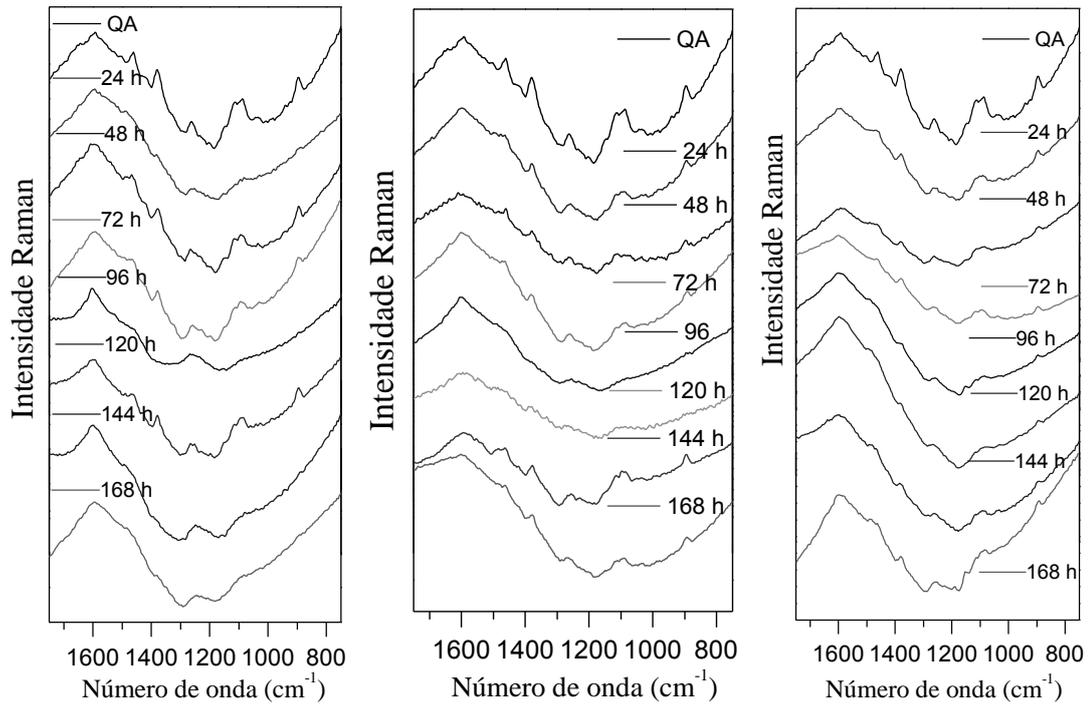


Figura 51. Espectros na Raman das amostras de QA incubadas na vaca A, B e C com alimentação exclusiva de *brachiaria decumbens* nos respectivos tempos de incubação.

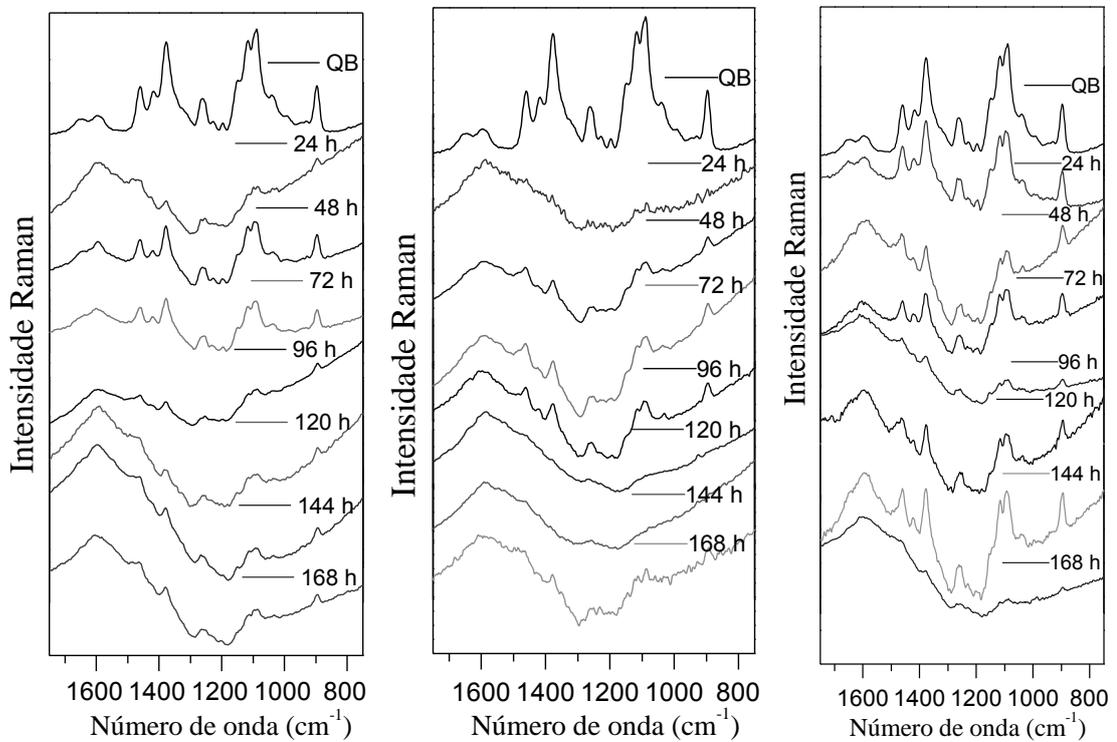


Figura 52. Espectros na Raman das amostras de QB incubadas na vaca A, B e C com alimentação exclusiva de silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.

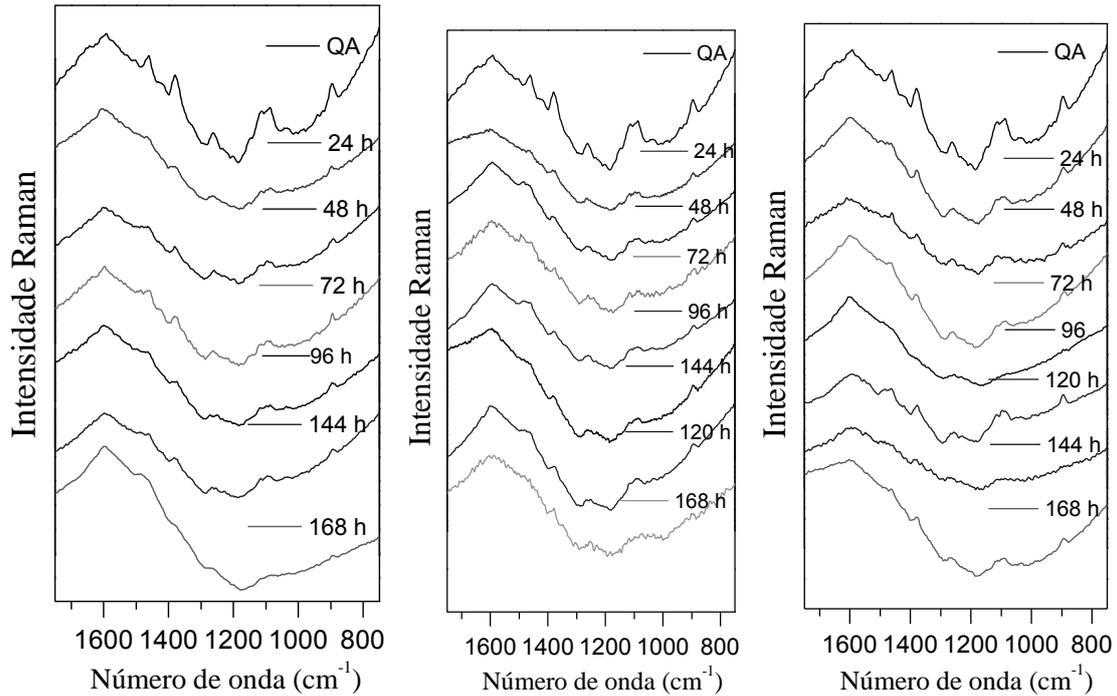


Figura 53. Espectros na Raman das amostras de QA incubadas na vaca D, E e F com alimentação exclusiva de silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.

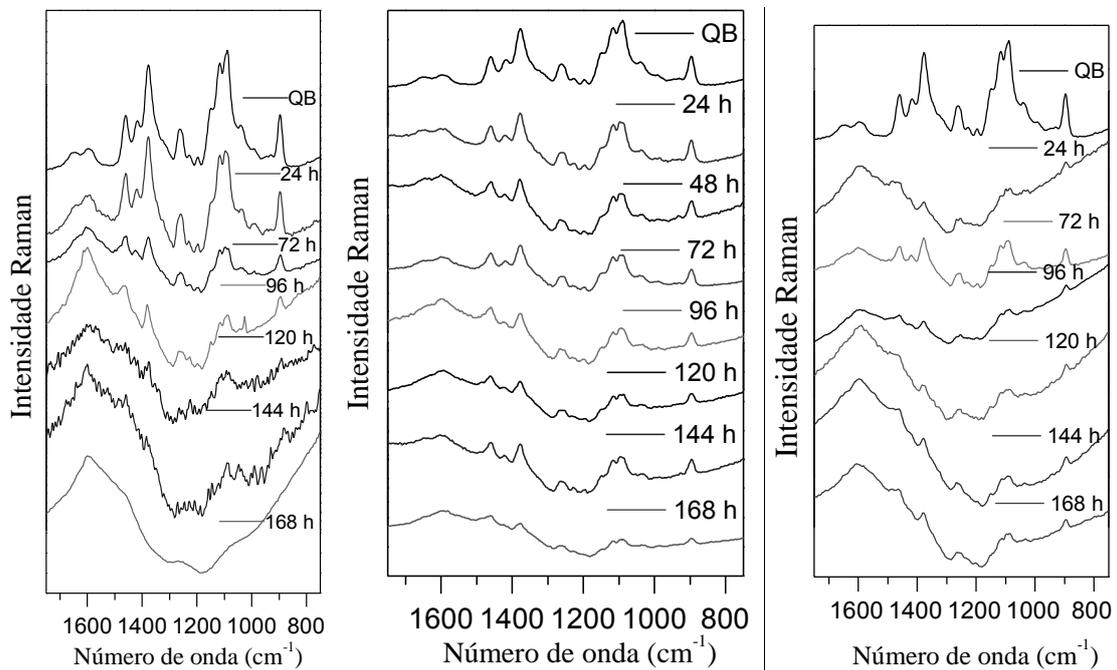


Figura 54. Espectros na Raman das amostras de QB incubadas nas vacas D, E e F com alimentação exclusiva de *brachiaria decumbens* nos respectivos tempos de incubação.

Ao analisar os espectros Raman das amostras que quitosana após a incubação é difícil obter alguma informação significativa sobre quais modificações estruturais que as QA e QB podem ter sofrido ao entrar em contato com o ambiente ruminal. Pode-se apenas verificar

diminuição na intensidade das bandas e esse efeito pode ser relacionado ao processo de decomposição das mesmas. Essa dificuldade em se obter um bom sinal dos espectros Raman pode estar relacionado com as propriedades intrínsecas da amostra (baixa polarizabilidade), o que faz que essa não tenha um bom sinal nas condições em que a medida foi realizada.

As curvas TG das amostras de QA e QB estão representadas na Figura 55, onde se pode observar o primeiro processo entre 32 e 160 °C com perda de massa de 13,5% para a amostra QA e entre 29 e 165 °C com perda de massa de 12 % para QB. Este primeiro evento refere-se à perda de água absorvida no interior do polímero. Um segundo processo é verificado entre 209 e 335 °C com perda de massa de 34 % para QA e entre 212 e 346 °C com perda de 39 % de massa para QB. O segundo evento é característico da degradação térmica da quitosana e a perda de material volátil (López, Mercê et al., 2008). Esta pirólise inicia-se com a quebra da cadeia polimérica de forma aleatória, formando as unidades monoméricas que em seguida se decompõem, originando ácido acético, butírico e uma série de ácidos graxos inferiores (com cadeias menores). Por fim, observa-se o terceiro processo entre 346 e 900 °C com perda de 28% de massa para QB e entre 335 e 900 °C com uma perda de massa de 29% para QA. Este terceiro evento refere-se à degradação dos produtos gerados no segundo evento de decomposição térmica, e se estende a temperaturas superiores a 900 °C (López, Mercê et al., 2008).

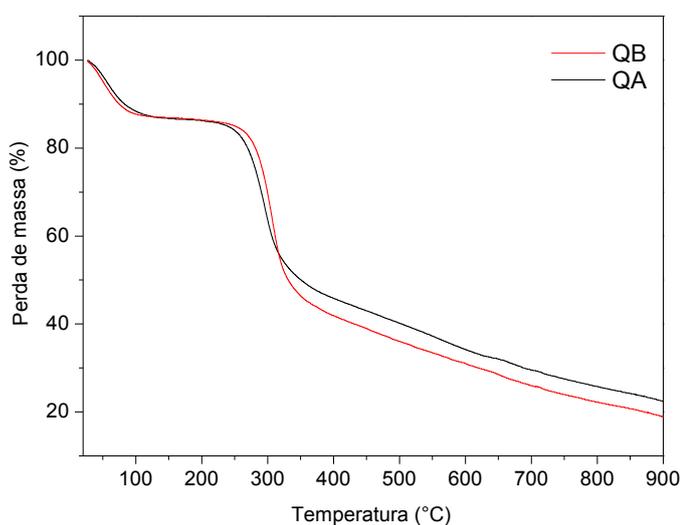


Figura 55. Curva TG das amostras de QA e QB.

Os dados termogravimétricos das amostras de quitosanas de alta e baixa densidade incubadas por 168 horas nos animais com os dois diferentes tipos de alimentação são mostrados na Figura 56, e os dados de perda de massa e intervalos de temperatura para cada

evento térmico estão expostos na Tabela 4. Analisando os termogramas é possível verificar duas alterações: (1) a perda do primeiro patamar que separa o processo de perda de água e de pirólise das amostras e (2) a diminuição da porcentagem de perda de massa relacionada ao processo de pirólise. A primeira alteração indica que o processo de pirólise começa a ocorrer a uma temperatura mais baixa para as amostras após a incubação do que para a de QA e QB não incubadas no rúmen. A segunda alteração citada indica que as amostras dos polímeros já possuem um grau de despolimerização, já que a segunda perda de massa está relacionada com a quebra da cadeia e a formação dos monômeros.

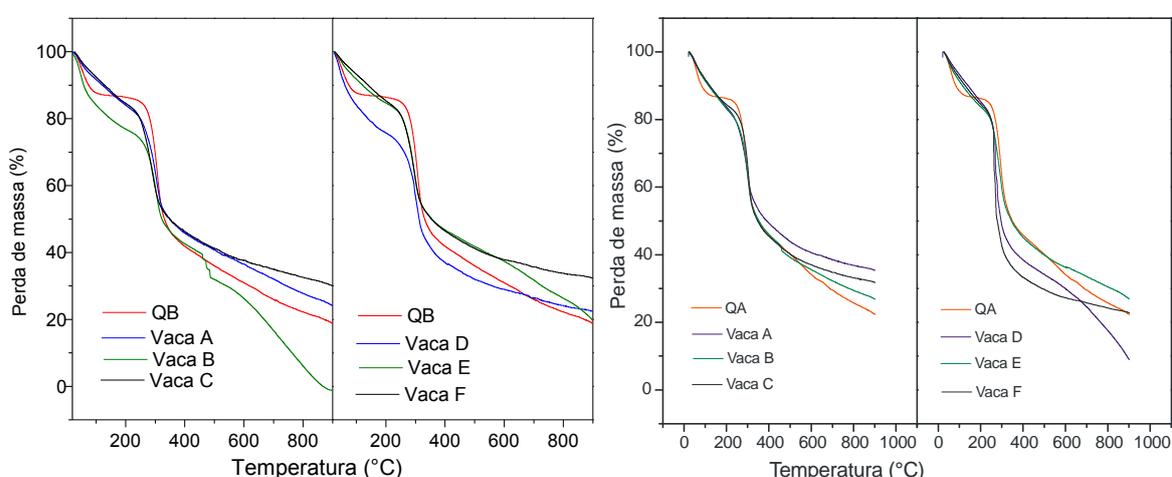


Figura 56. Curvas TG das amostras de QA, QB e das amostras incubadas por 168 h no rúmen.

Tabela 4. Dados termogravimétricos das amostras incubadas no rúmen bovino por 168 h.

		Pirólise		Degradação dos resíduos		
		Intervalo de temperatura/°C	Perda de massa/%	Intervalo de temperatura/°C	Perda de massa/%	
<i>brachiaria decumbens</i>	QA	Vaca A	244 – 346	30	346 – 900	21
		Vaca B	240 – 347	29	347 – 900	23
		Vaca C	268 – 339	27	339 – 900	19
	QB	Vaca A	262 – 346	26	346 – 900	27
		Vaca B	222 – 332	27	332 – 900	49
		Vaca C	258 – 333	26	333 – 900	21
Silagem de milho	QA	Vaca D	265 – 330	32	330 – 900	35
		Vaca E	239 – 343	30	343 – 900	22
		Vaca F	268 – 337	23	337 – 900	14
	QB	Vaca D	226 – 359	34	359 – 900	18
		Vaca E	218 – 330	31	330 – 900	33
		Vaca F	264 – 340	26	340 – 900	19

A Figura 57 mostra as curvas de DSC das amostras de quitosanas de alta e baixa densidade entre 20 e 450 °C. Observam-se três eventos: (1) evento referente ao processo de transição vítrea do polímero; (2) evento endotérmico referente à desidratação, cuja área

depende do histórico de secagem da amostra e (3) um evento exotérmico referente ao processo de decomposição da amostra, que continua além do limite de temperatura do experimento. Os dois últimos processos estão coerentes com o observado na análise termogravimétrica (Santos, Soares et al., 2003; López, Mercê et al., 2008). O primeiro, apesar de ocorrer com pouca definição, pode ser observado em 32 °C para ambas as amostras, entretanto tal fenômeno é de difícil visualização por DSC, uma vez que depende do teor de água presente na amostra. O segundo processo ocorre na faixa de 47-126 °C para a amostra QA e de 44-117 °C para QB e, por fim, o terceiro processo ocorre entre 268- 318 °C para a amostra QA e entre 280-328 °C para amostra QB.

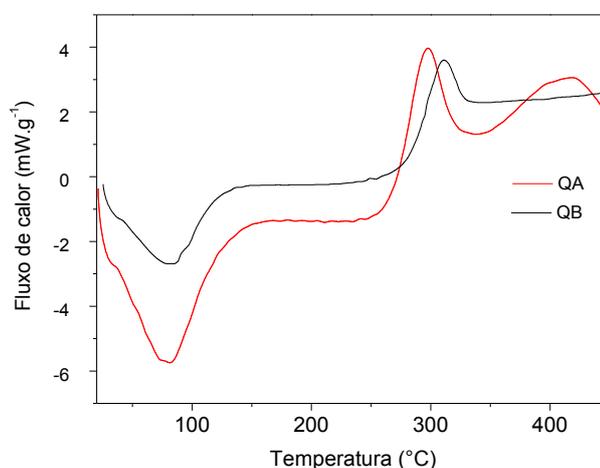


Figura 57. Curvas DSC das amostras QA e QB.

Os dados de calorimetria exploratória diferencial das amostras de quitosanas de altas e baixa densidades, incubadas por 168 h nos animais com os dois diferentes tipos de alimentação, são mostrados nas Figuras 58 e 59, e os dados referentes às temperaturas de cada processo estão expostos na Tabela 5.

Uma importante propriedade dos materiais poliméricos que deve ser considerado no estudo da sua degradação é o grau de cristalinidade. Diferentemente de moléculas de baixa massa molar ou de metais, os polímeros não formam sólidos cristalinos ou amorfos, mas sim formam sólidos com uma fase cristalina e outra amorfa. A alteração deste grau de cristalinidade pode ser detectada analisando a temperatura de transição vítrea. Algumas das curvas DSC das amostras após serem incubadas apresentam uma maior definição do evento relativo à transição vítrea quando comparados com as amostras antes da incubação, indicando certo aumento na cristalinidade das amostras. Este aumento da cristalinidade ocorre devido à

despolimerização da cadeia polimérica que permite que as cadeias se aproximem e se interajam mais efetivamente (Souza, Silva et al., 2004).

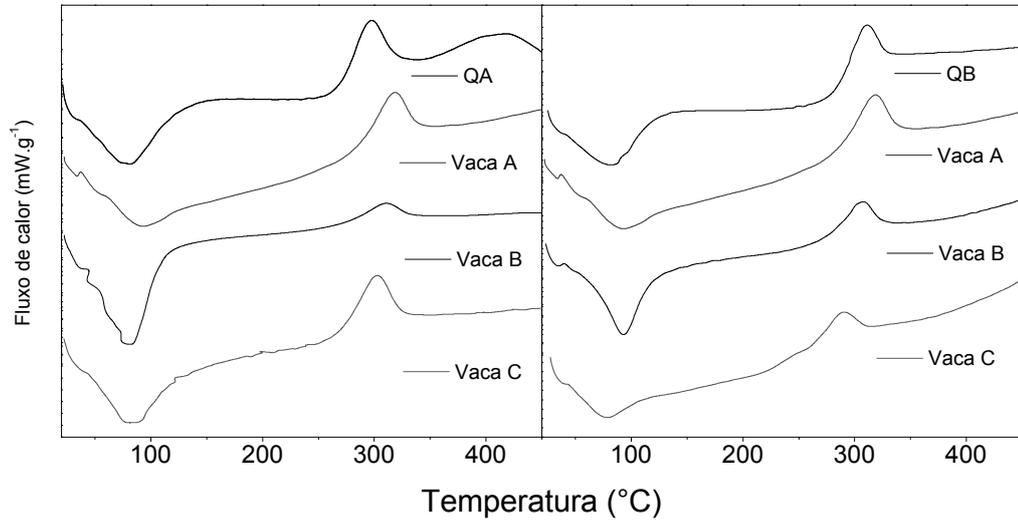


Figura 58. Curvas DSC das amostras de QA e QB antes e após serem incubadas nas vacas com alimentação exclusiva de *brachiaria decumbens* por 168 horas.

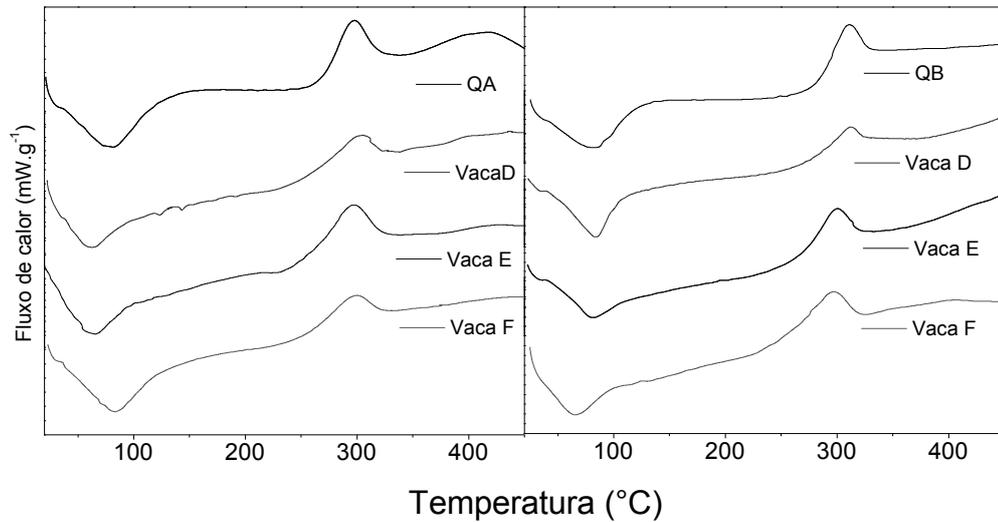


Figura 59. Curvas DSC das amostras de QA e QB antes e após serem incubadas nas vacas com alimentação exclusiva de silagem de milho por 168 horas.

Tabela 5. Resultados de DSC das amostras incubadas no rúmen bovino por 168 h.

		Desidratação (endotérmico)	Decomposição (exotérmico)	
		Intervalo de temperatura/°C	Intervalo de temperatura/°C	
<i>brachiaria decumbens</i>	QA	Vaca A	47 – 113	264 – 323
		Vaca B	43 – 109	284 – 332
		Vaca C	52 – 112	269 – 325
	QB	Vaca A	63 – 116	285 – 336
		Vaca B	65 – 112	289 – 326
		Vaca C	44 – 98	265 – 308
Silagem de milho	QA	Vaca D	33 – 98	251 – 327
		Vaca E	37 – 88	254 – 320
		Vaca F	45 – 120	258 – 322
	QB	Vaca D	50 – 101	281 – 324
		Vaca E	52 – 98	268 – 315
		Vaca F	41 – 95	260 – 317

Em relação ao terceiro evento observado nas curvas DSC, observa-se que os processos referentes às amostras após a incubação apresentam um formato diferente em comparação as amostras antes da incubação. Apesar de não se observar nenhum padrão, tal alteração pode estar relacionada também ao processo de despolimerização das amostras.

4.2 Incubação *in vitro* das amostras de quitosana de alta e baixa densidade

Alguns estudos sobre a degradação da quitosana são descritos na literatura avaliando a degradação deste polímero em diferentes condições: em peróxido de hidrogênio em meio ácido (Huang, Zhuo et al., 2008); utilizando ultrassom. (Czechowska-Biskup, Rokita et al., 2005); estudando sua oxidação em presença de ozônio e peróxido de hidrogênio (Kabal'Nova, Murinov et al., 2001) e ainda utilizando enzimas como a hemicelulase (Qin, Du et al., 2003).

Com o objetivo de avaliar qual o processo presente no rúmen relacionado com a degradação do polímero, foi realizada a extração das enzimas proteolíticas e a incubação da quitosana *in vitro*. Após a incubação, foram efetuadas as mesmas análises físico-químicas empregadas para as amostras incubadas *in vivo*. As Figuras 60 e 61 mostram os espectros vibracionais para as amostras de quitosanas de alta e baixa densidade incubadas *in vitro*.

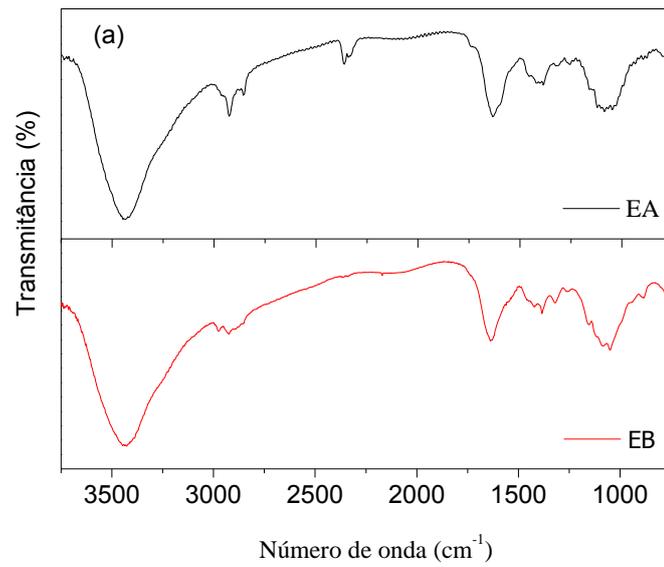


Figura 60. Espectros de absorção no infravermelho das amostras indicadas.

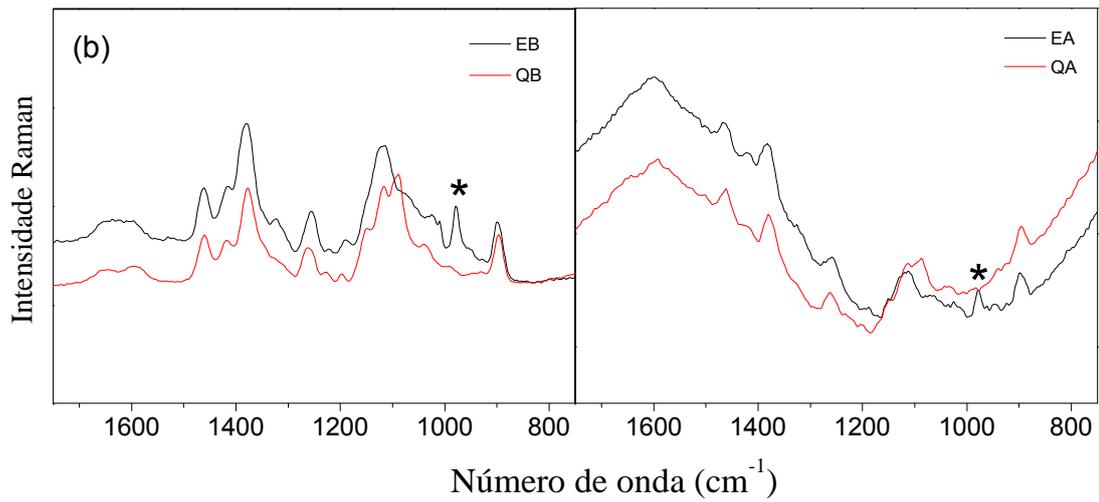


Figura 61. Espectros Raman das amostras indicadas.

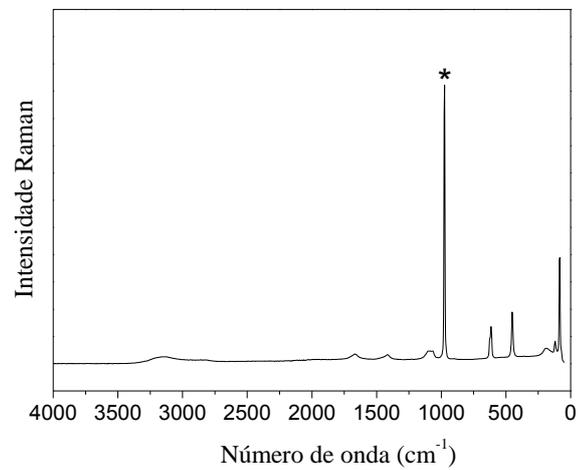


Figura 62. Espectro Raman das enzimas proteolíticas do rúmen.

Foram observadas na incubação *in vitro* alterações equivalentes às observadas no espectro infravermelho, e discutidas anteriormente. No espectro Raman pode ser observado a ausência das bandas em 1088 cm^{-1} , referentes ao $\nu(\text{C-O-C})$ da ligação glicosídica e em 1150 cm^{-1} atribuído ao $\nu(\text{CC})$, $\nu(\text{CO})$ da respiração do anel. Essas alterações espectrais indicam respectivamente o processo de quebra da cadeia polimérica e a abertura do anel glicosídico (Jenkins, Larsen et al., 2005). A última modificação observada é o aparecimento da banda em 978 cm^{-1} referente à presença do extrato proteolítico oriundo do rúmen bovino (Figura 62). Tal banda pode ser atribuída ao modo de respiração do anel aromático presente em alguns aminoácidos (Schenzel e Fischer, 2001). Diferentemente dos espectros Raman das amostras de quitosana incubadas *in vivo* os espectros Raman das amostras incubadas *in vitro* apresentaram modificações espectrais que forneceram dados sobre as mudanças estruturais que ocorreram nas amostras de quitosana. Essa diferença pode estar relacionada com a intensidade do processo de decomposição. No rúmen bovino a quitosana não é o único substrato onde as enzimas podem atuar já na incubação *in vitro* só havia a quitosana como substrato para as enzimas proteolíticas do rúmen. Além que no rúmen outras substâncias que são substrato mais específico para as enzimas proteolíticas estão presentes. Dessa forma a intensidade de decomposição na incubação *in vitro* seria maior o que se refletiria nas mudanças espectrais mais nítidas nos espectros Raman.

O espectro eletrônico das amostras EA e EB é mostrado na Figura 63. É observado para as amostras incubadas *in vivo* o aparecimento de uma banda eletrônica referente a uma transição centrada no grupo C=O , que pode estar relacionado com a despolimerização da cadeia.

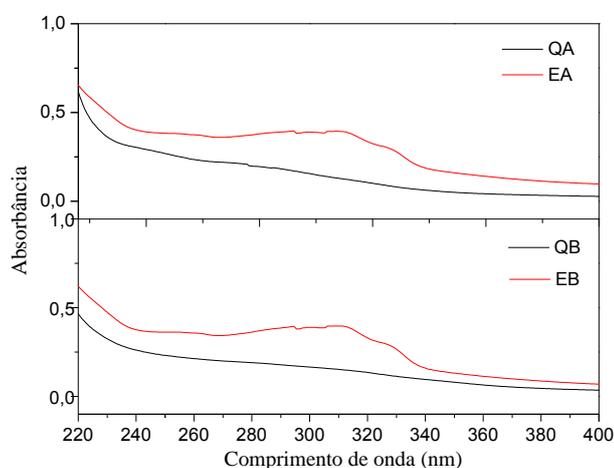


Figura 63. Espectros eletrônicos dos compostos indicados.

As curvas TG das amostras após a incubação *in vitro* estão apresentadas na Figura 64. Nelas se verifica uma diminuição da perda de massa referente ao segundo processo (despolimerização), e no terceiro processo verifica-se um aumento da perda de massa associado ao aumento dos resíduos do processo de degradação ocorrido *in vitro*. Os dados da perda de massa estão dispostos na Tabela 6.

Tabela 6. Dados termogravimétricos das amostras incubadas no rúmen bovino por 168 h.

	Pirólise		Degradação dos resíduos	
	Intervalo de temperatura/°C	Perda de massa/%	Intervalo de temperatura/°C	Perda de massa/%
QA	209 – 335	33	335 – 700	23
EA	150 – 222	15	222 – 700	39
QB	212 – 346	39	346 – 900	28
EB	169 – 237	16	237 – 900	39

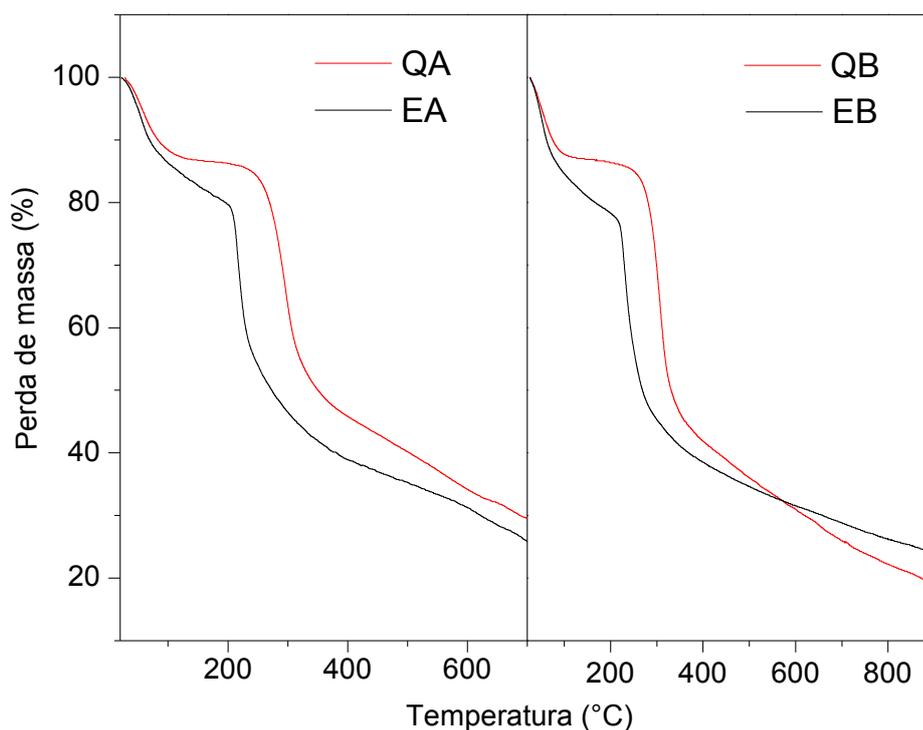


Figura 64. Curvas TG das amostras de QA, QB, EA e EB.

Os dados de calorimetria exploratória diferencial (DSC) referentes às amostras de quitosana incubadas utilizando as enzimas proteolíticas são mostrados na Figura 65. Os resultados indicam a ausência de evento exotérmico relacionado ao processo de decomposição, sugerindo assim a despolimerização das amostras.

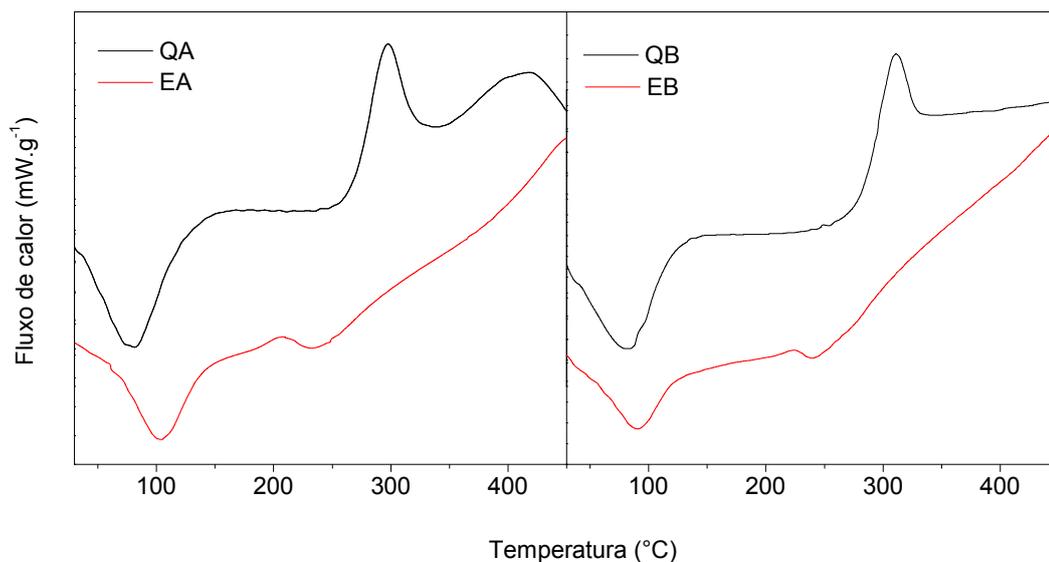


Figura 65. Curva da DSC das amostras indicadas.

Verifica-se ainda que diferentes mudanças estruturais na quitosana que são passíveis de ocorrer e podem estar relacionadas à interação da amostra com o ambiente ruminal. Estas mudanças são esquematizadas na Figura 66. A primeira delas representa a quebra da ligação $\beta(1-4)$, que é a ligação química existente entre as unidades monoméricas responsável pela formação da cadeia polimérica, o que ocasiona a formação de um novo grupamento carbonila. Na sequência observa-se a perda dos grupamentos contendo nitrogênio (grupos amida e amina), sendo que a perda do grupamento amida também ocasiona a perda de grupos metila. Por fim, apresenta-se esquematizado o processo de abertura do anel glicosídico da unidade monomérica, que promove a formação de um grupamento carboxila.

Essa similaridade de resultados obtidos tanto no processo de degradação *in vitro* quando *in vivo* pode indicar que o procedimento utilizado para o estudo *in vitro* pode ser utilizado como modelo preditivo para o estudo de degradação ruminal.

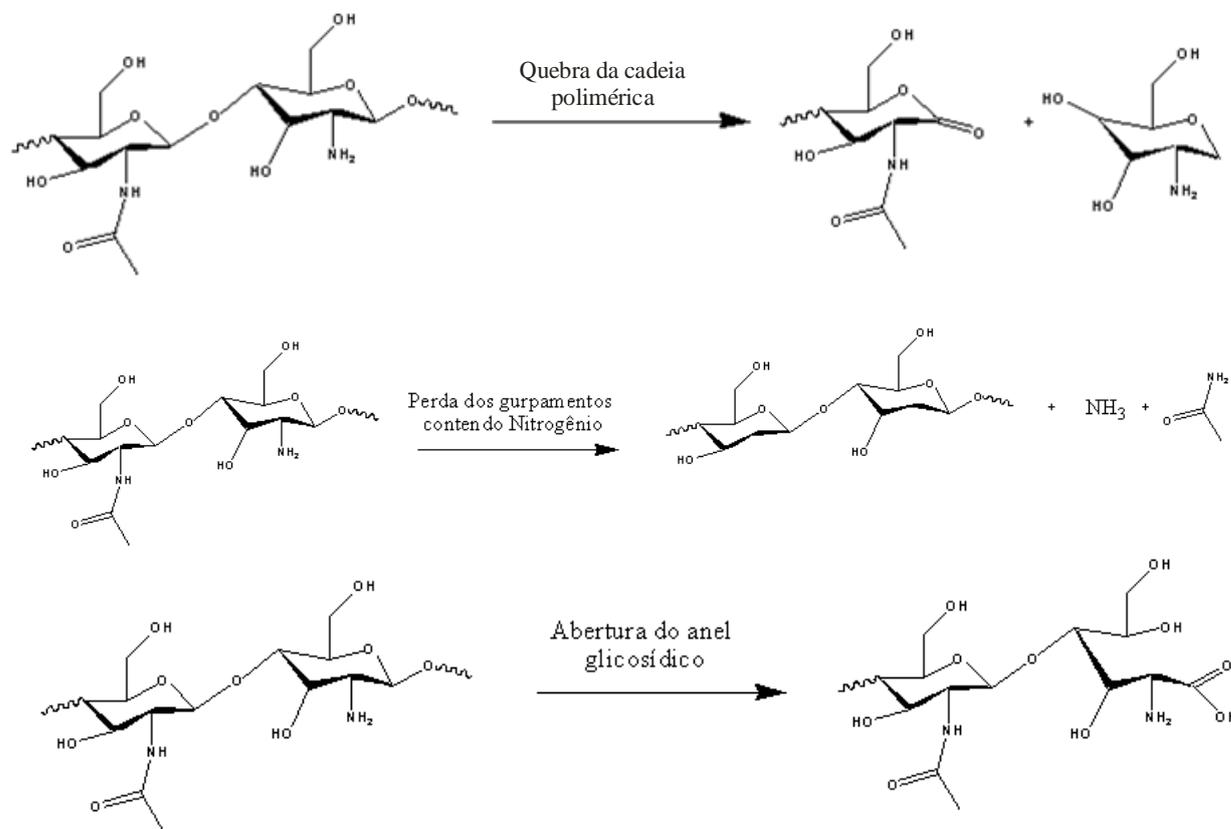


Figura 66. Esquema dos processos de decomposição que ocorre na QA e QB ao entrar no ambiente ruminal.

4.3 Incubação in vivo das amostras de PCL

O espectro no infravermelho da amostra de PCL antes da incubação no rúmen bovino está representado na Figura 67. Algumas bandas importantes podem ser discutidas, principalmente em termos da fase cristalina ou amorfa do PCL. Por exemplo, pode-se observar a banda em 1726 cm^{-1} , atribuída a $\nu(\text{C}=\text{O})$ da fase cristalina do PCL; em 1295 cm^{-1} tem-se a banda relacionada aos modos de estiramento (C-C) e (C-O) da fase cristalina, totalmente isenta da fase amorfa. A banda em 1173 cm^{-1} refere-se ao estado amorfo do PCL, porém, com menor intensidade em relação à banda em 1192 cm^{-1} , atribuída ao estado cristalino (Yu e Wu, 2007); estes dados mostram que a fase cristalina é preferencial em relação à fase amorfa no PCL estudado.

Os espectros na região do infravermelho das amostras de PCL após serem incubadas no rúmen bovino em diferentes tempos e com os dois tipos de alimentação estão apresentados nas Figuras de 67 a 72.

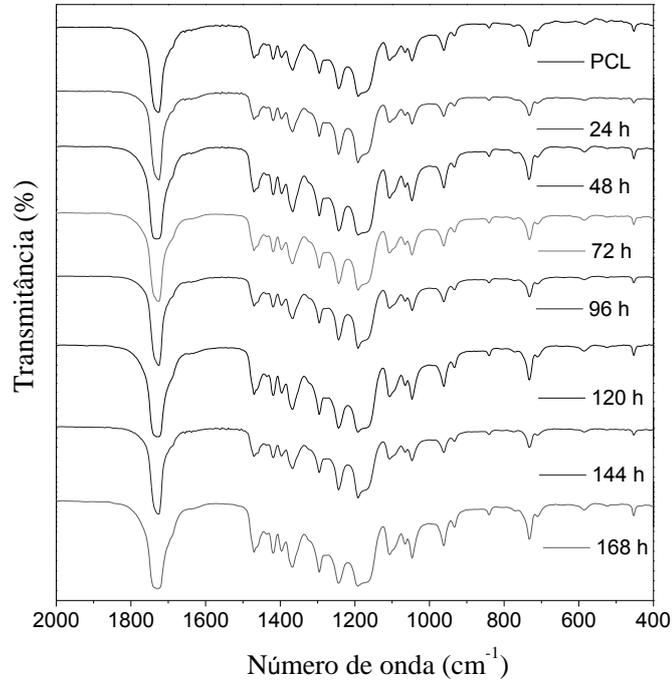


Figura 67. Espectros na região do infravermelho para amostras de PCL incubadas na vaca A com alimentação exclusiva de *brachiaria decumbens* nos respectivos tempos de incubação.

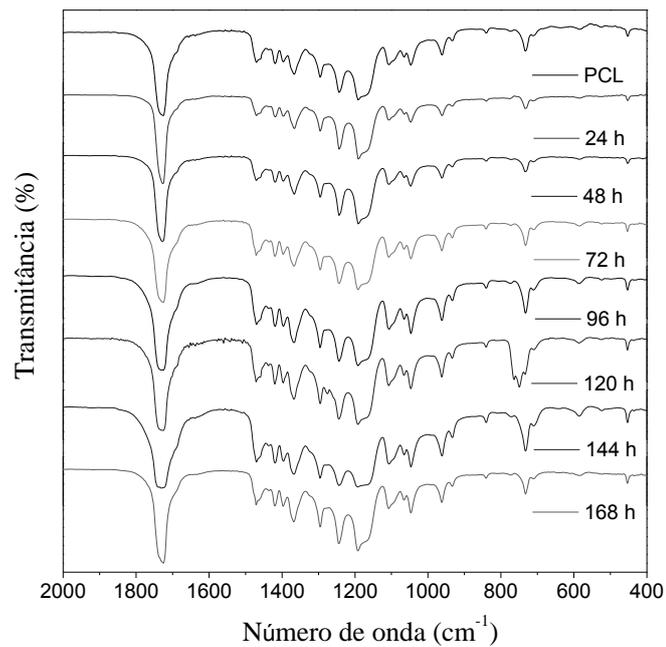


Figura 68. Espectros na região do infravermelho para amostras de PCL incubadas na vaca B com alimentação exclusiva de *brachiaria decumbens* nos respectivos tempos de incubação.

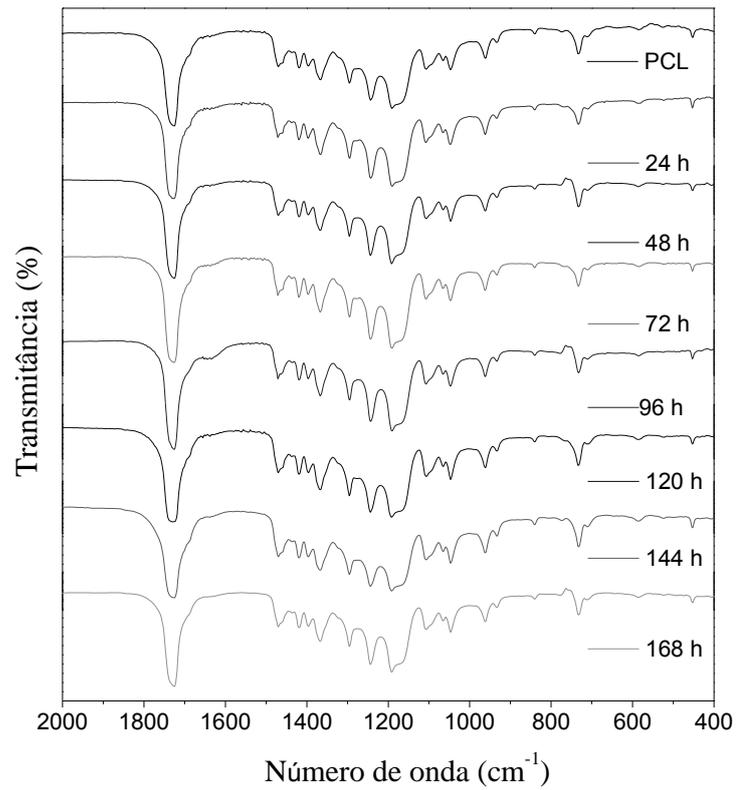


Figura 69. Espectros na região do infravermelho para amostras de PCL incubadas na vaca C com alimentação exclusiva de *brachiaria decumbens* nos respectivos tempos de incubação.

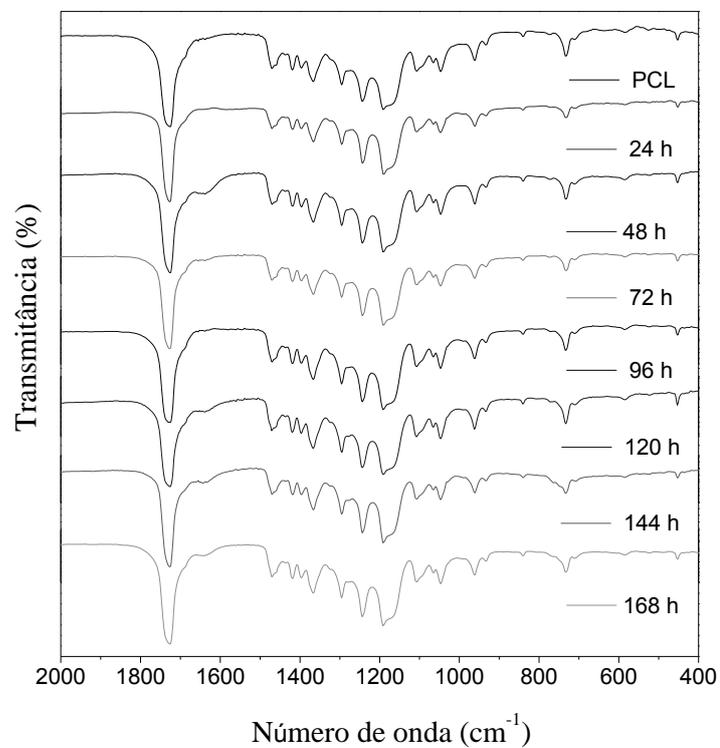


Figura 70. Espectros na região do infravermelho para amostras de PCL incubadas na vaca D com alimentação exclusiva de Silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.

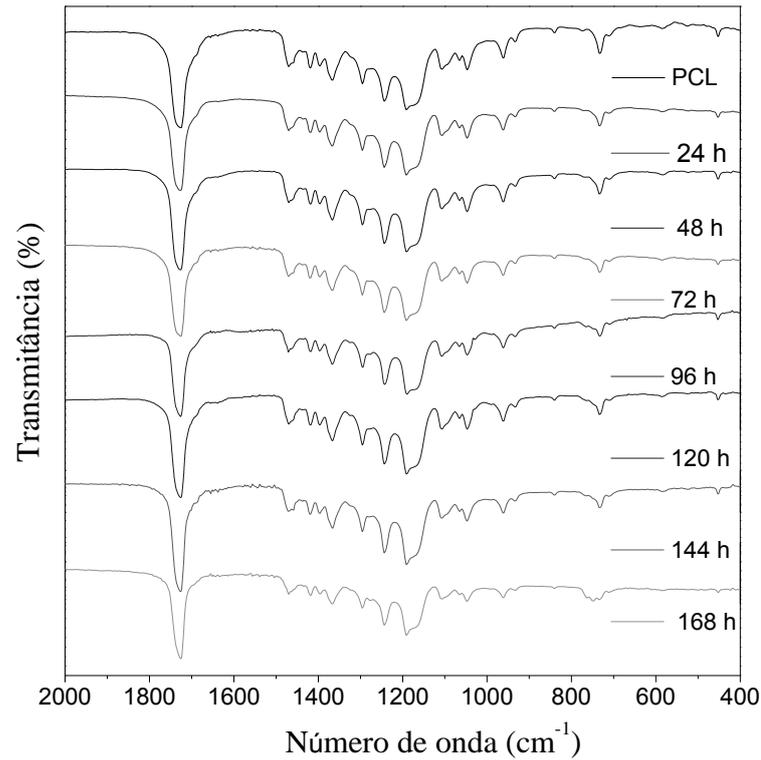


Figura 71. Espectros na região do infravermelho para amostras de PCL incubadas na vaca E com alimentação exclusiva de Silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.

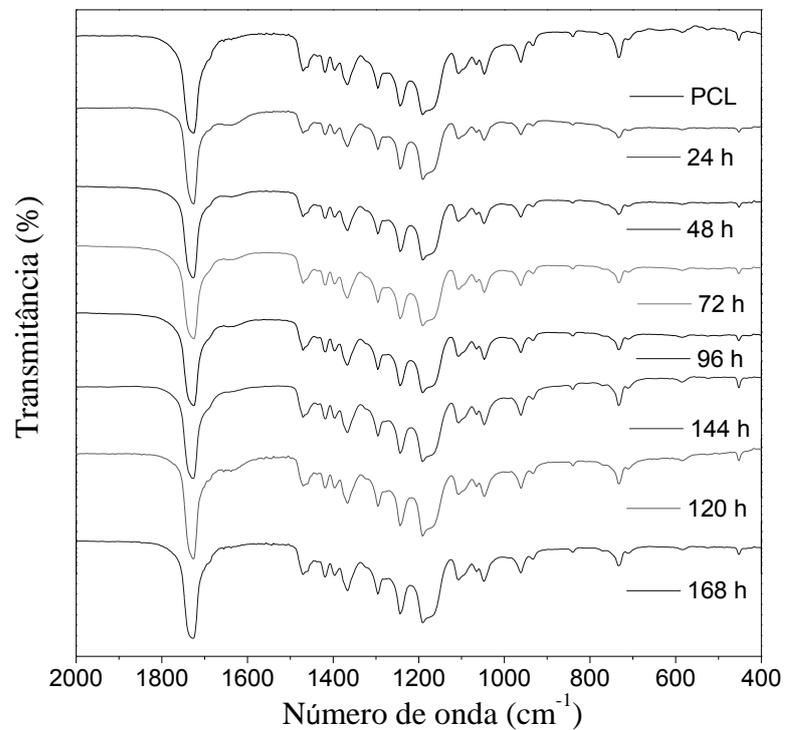


Figura 72. Espectros na região do infravermelho para amostras de PCL incubadas na vaca F com alimentação exclusiva de Silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.

Os espectros de absorção no infravermelho das amostras antes e após a incubação nas vacas com as duas alimentações empregadas e no decorrer do tempo não se alteram; a equivalência sugere que o processo de interação entre o PCL e o sistema ruminal não interfere na estrutura química e na conformação do polímero. A amostra de PCL se mantém predominantemente na fase cristalina, devido à prevalência das bandas características desta fase.

O espectro Raman do polímero PCL está apresentado na Figura 73. As principais bandas observadas são: em 1725 cm^{-1} , referente ao $\nu(\text{C}=\text{O})$ e em $1470\text{-}1415$, $1310\text{-}1281$ e $1110\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$, atribuídas a $\delta(\text{CH}_2)$ no plano, fora do plano e ao estiramento (C-COO), respectivamente. Outra observação relevante é a presença das bandas em 866 e 917 cm^{-1} , referentes à dominância da forma cristalina do polímero (Kister, Cassanas et al., 2000).

Os espectros Raman das amostras de PCL após serem incubadas no rúmen bovino em diferentes tempos e com os dois tipos de alimentação são apresentados nas Figuras 73 e 78.

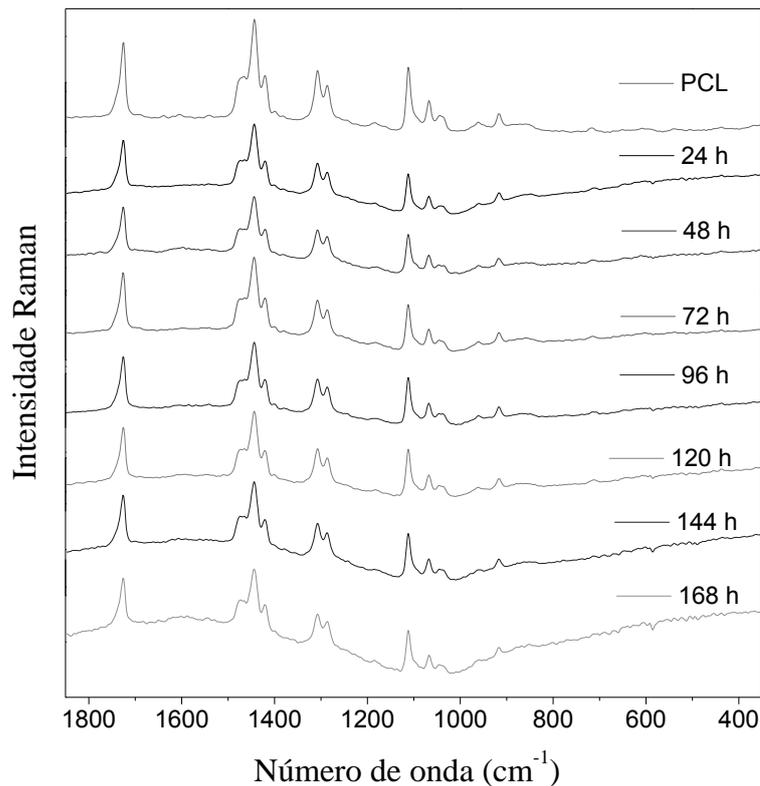


Figura 73. Espectros Raman das amostras de PCL incubadas na vaca A com alimentação exclusiva de *brachiaria decumbens* nos respectivos tempos de incubação.

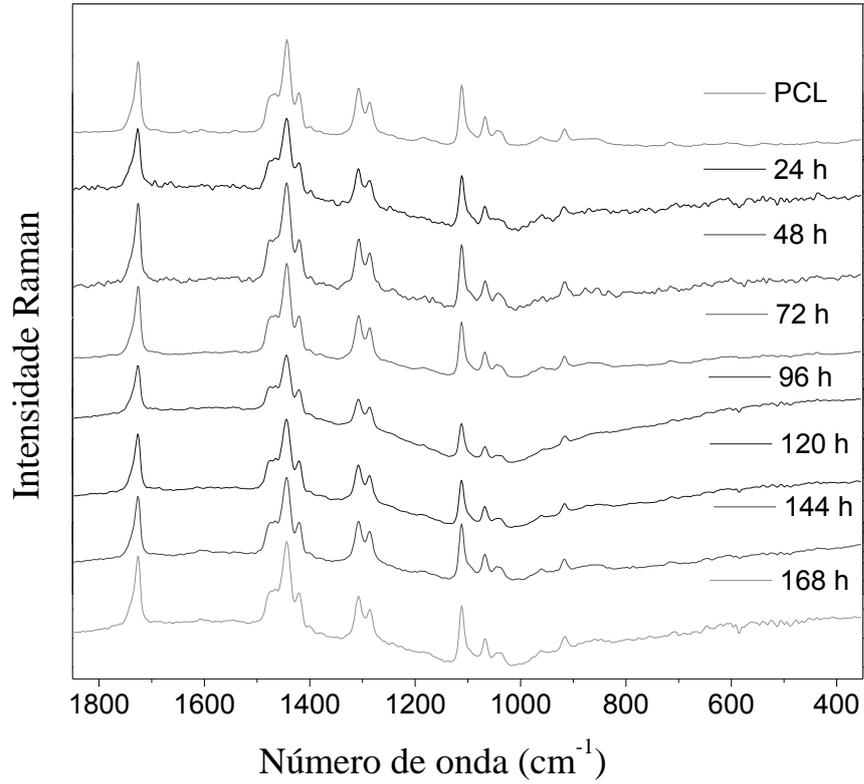


Figura 74. Espectros Raman das amostras de PCL incubadas na vaca B com alimentação exclusiva de *brachiaria decumbens* nos respectivos tempos de incubação.

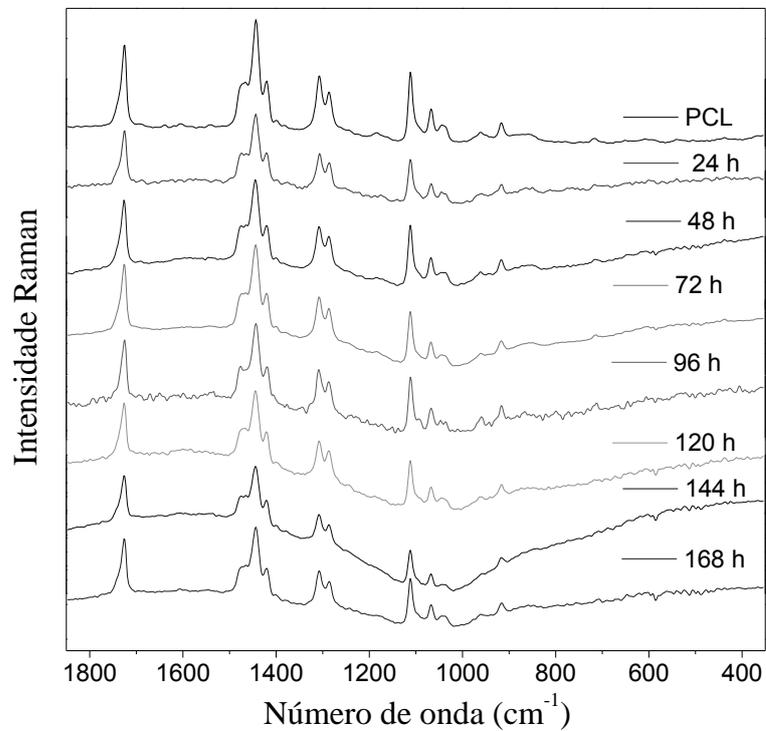


Figura 75. Espectros Raman das amostras de PCL incubadas na vaca C com alimentação exclusiva de *brachiaria decumbens* nos respectivos tempos de incubação.

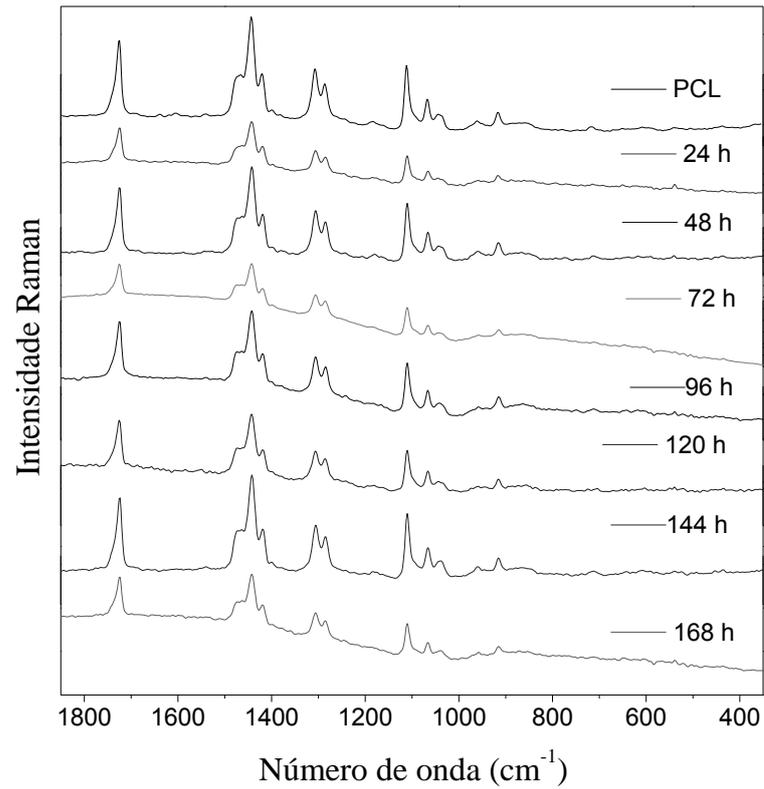


Figura 76. Espectros Raman das amostras de PCL incubadas na vaca D com alimentação exclusiva de silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.

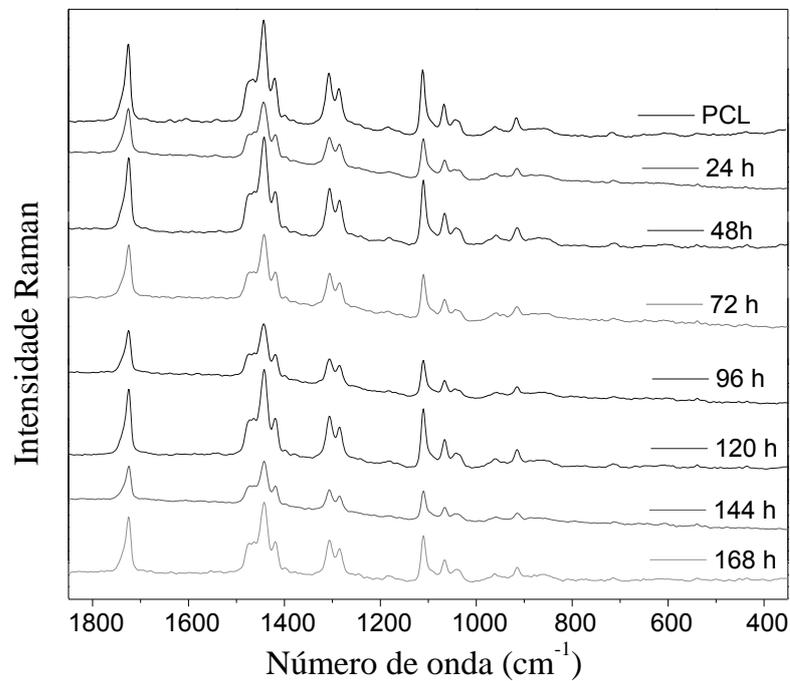


Figura 77. Espectros Raman das amostras de PCL incubadas na vaca E com alimentação exclusiva de Silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.

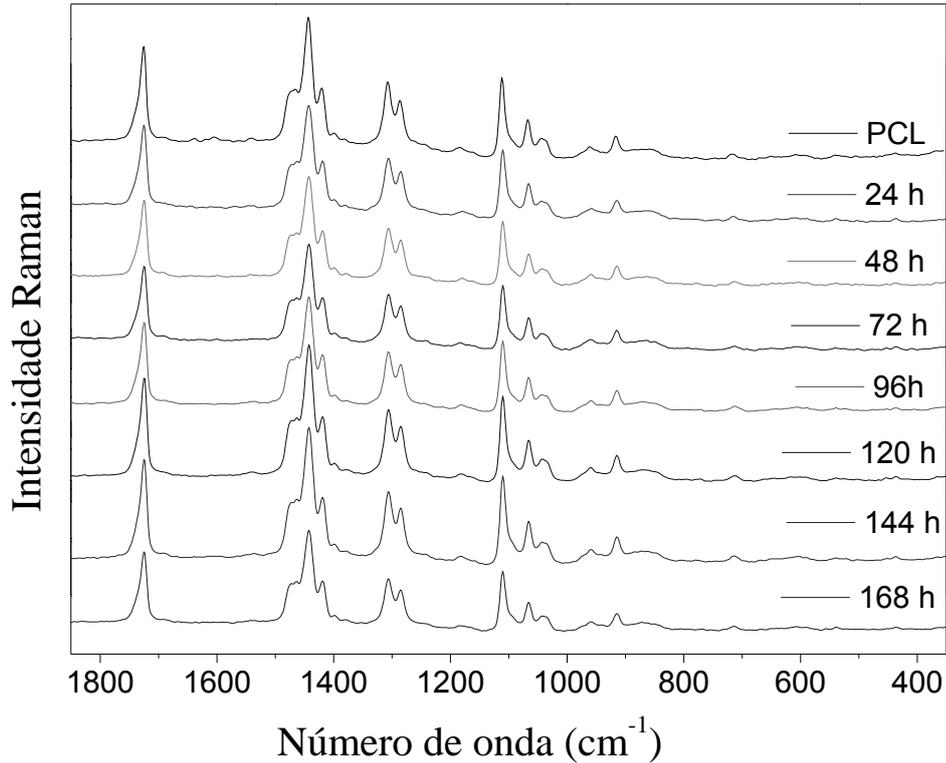


Figura 78. Espectros Raman das amostras de PCL incubadas na vaca F com alimentação exclusiva de Silagem de milho nos respectivos tempos de incubação.

Como observado na espectroscopia de absorção no infravermelho, não se observam alterações significativas nos espectros Raman para as diferentes amostras. Este resultado indica que o polímero PCL é resistente ao ambiente ruminal durante o período que foi exposto, pois não se observa nenhuma possível alteração na sua estrutura (com maior quantidade da fase cristalina).

A curva TG da amostra de PCL é apresentada na Figura 79, onde pode se observar uma única etapa de decomposição típica desse composto, referente a dois tipos de reações. Primeiro, a cisão aleatória da cadeia e, depois, a formação de CO_2 , H_2O e do ácido 5-hexenóico, seguido da formação da ϵ -caprolactona (Persenaire, Alexandre et al., 2001).

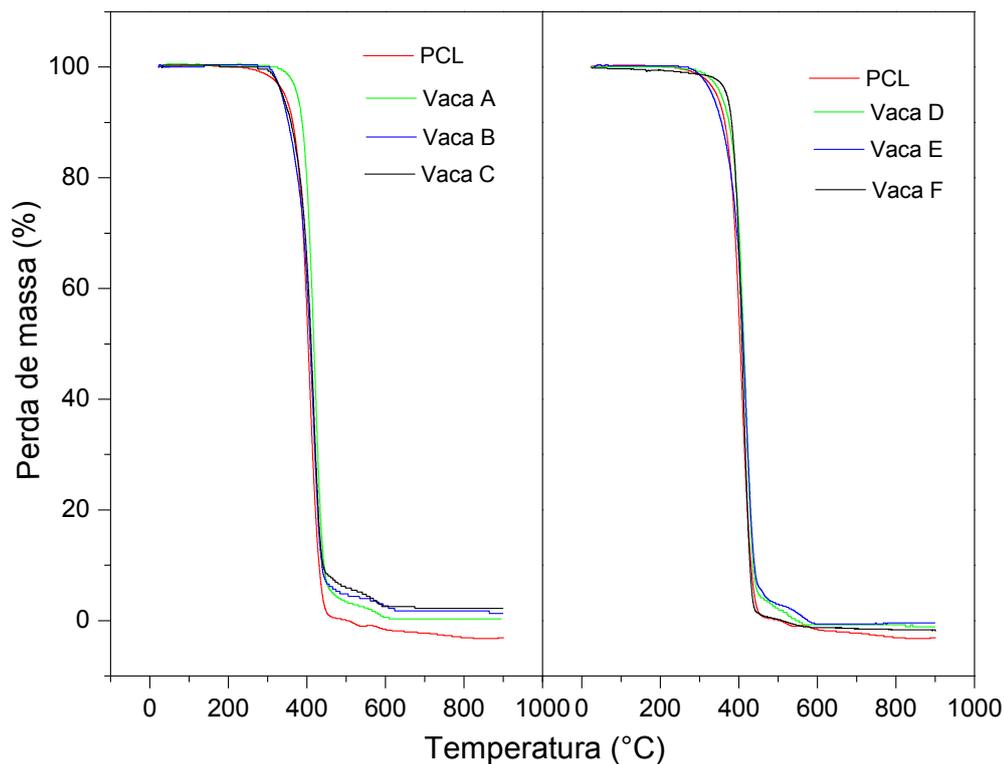


Figura 79. Curvas TG das amostras de PCL e das incubadas por 168 h no rúmen para alimentação exclusiva de silagem de milho (vacas D, E e F) e *a brachiaria decumbens*. (vacas A, B e C).

A análise das curvas térmicas de PCL indica uma diminuição na perda de massa relativa à única etapa de decomposição, podendo estar correlacionado com uma pequena quebra da cadeia polimérica do PCL ao entrar em contato com o ambiente ruminal.

As curvas DSC do PCL e das amostras do polímero após serem incubadas por 168 horas estão representadas na Figura 80. É possível observar o evento endotérmico em 60 °C referente à temperatura de transição vítrea do polímero; nesta temperatura o polímero passa de um estado desordenado rígido (vítreo) para um estado desordenado não vítreo (as cadeias poliméricas possuem uma mobilidade maior). Analisando as curvas DSC das amostras, observa-se também um aumento na temperatura de transição, que é resultante do aumento da cristalinidade do polímero. Tal aumento na cristalinidade pode estar relacionado com a quebra da cadeia, possibilitando uma maior interação o que ocasiona uma maior organização molecular e, conseqüentemente, maior cristalinidade (Gordin, Delaite et al., 2009).

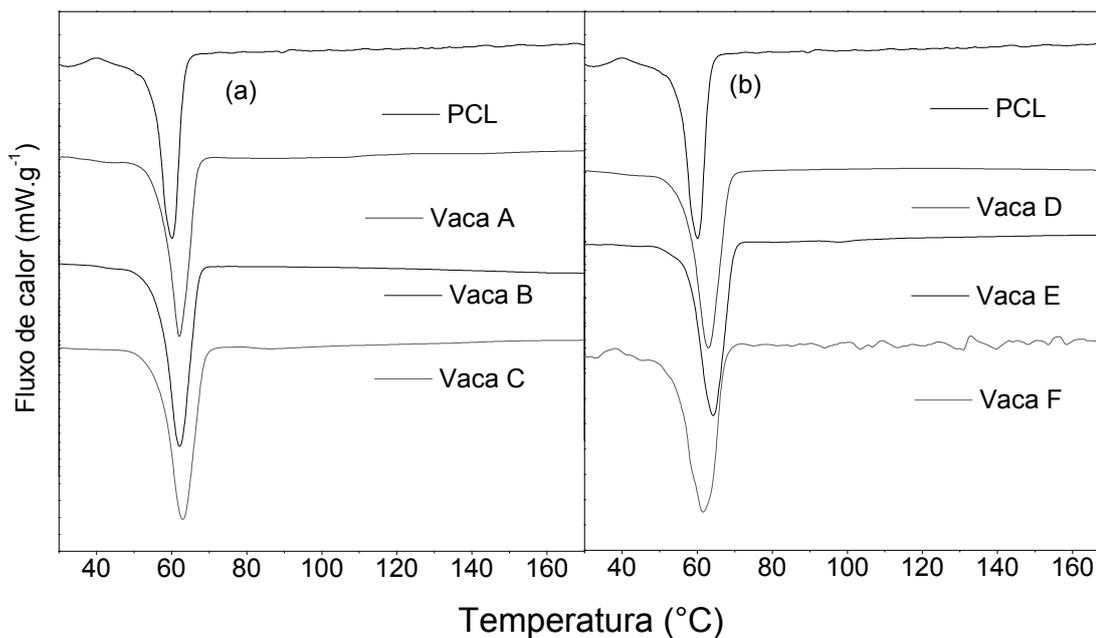


Figura 80. Curvas DSC das amostras de PCL incubadas nas vacas por 168 horas com alimentação restrita a *brachiaria decumbens* (a) e a silagem (b).

4.4 Sistemas de liberação

Os sistemas de liberação foram formulados a partir do coacervato de cálcio que apresenta uma alta solubilidade em água (em torno de 1 hora) e o PCL que apresentou uma alta estabilidade ao entrar em contato com o ambiente ruminal de bovinos. Já nenhum sistema de liberação formulado a base de quitosana será construído devido a sua alta degradação no ambiente ruminal, que dificulta uma comparação da cinética de liberação *in vivo* e *in vitro*. A Figura 81 apresenta a curva de liberação do sistema construído apenas com o polímero PCL contendo o extrato enzimático fúngico.

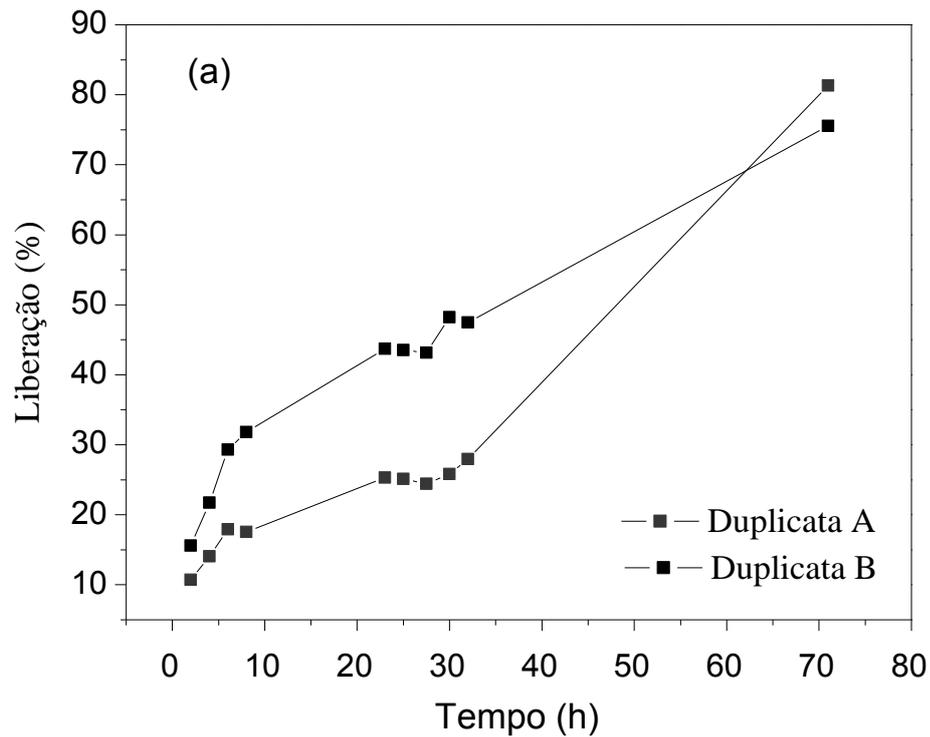


Figura 81. Curva de liberação do sistema composto por PCL e o extrato enzimático fúngico.

A partir desta curva de liberação percebe-se que a liberação de cerca de 80% do extrato fúngico só ocorre após 72 horas de início do processo, um tempo bem maior do que o desejado; além disto, tem-se apenas cerca de 20 – 30 % do extrato fúngico liberado após o tempo desejado, entre 8 e 12 horas.

Como o composto coacervato de cálcio apresentou uma alta solubilidade em água e o sistema de liberação formado apenas pelo PCL apresentou uma taxa de liberação muito lenta, então uma possível solução para a obtenção do sistema proposto seria a formulação de uma blenda a partir desses dois materiais.

A Figura 82 mostra a curva de liberação de um sistema formado com 60% de coacervato e 40 % de PCL, apresentando formato cilíndrico (3,20 cm de diâmetro e 0,45 cm de altura).

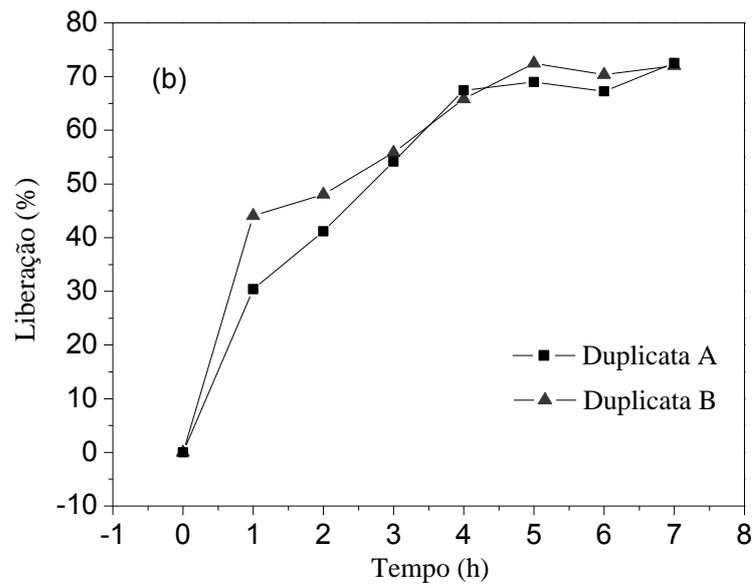


Figura 82. Curva de liberação do sistema composto por 40 %PCL e 60% de coacervato.

O sistema de liberação apresentado na Figura 82 apresenta uma liberação de cerca de 70 % em torno de 4 horas e a maior parte da liberação já ocorre em torno de 1 hora. Apesar do resultado promissor, são necessários ainda ajustes para a obtenção do sistema desejado. Uma maneira prática de se manipular a taxa de liberação dos sistemas é a alteração da sua área superficial, bem como a proporção entre seus componentes.

As Figuras 83, 84 e 85 mostram as curvas de liberação de sistemas compostos por coacervato de cálcio e PCL e diferentes proporções.

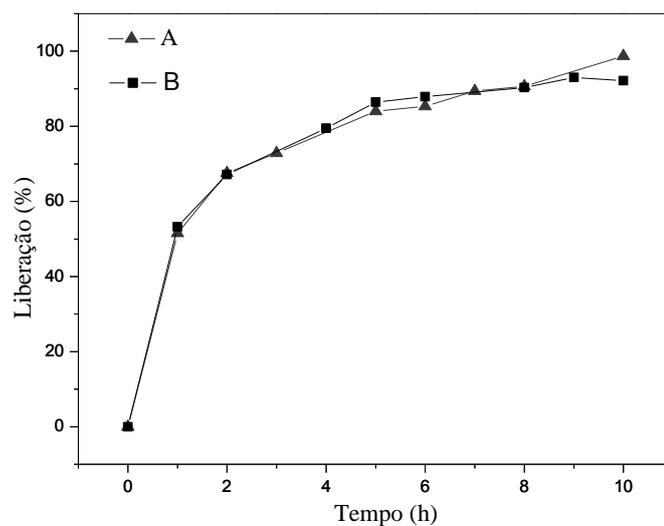


Figura 83. Curva de liberação do sistema composto por 70 % de PCL e 30 % de coacervato de cálcio.

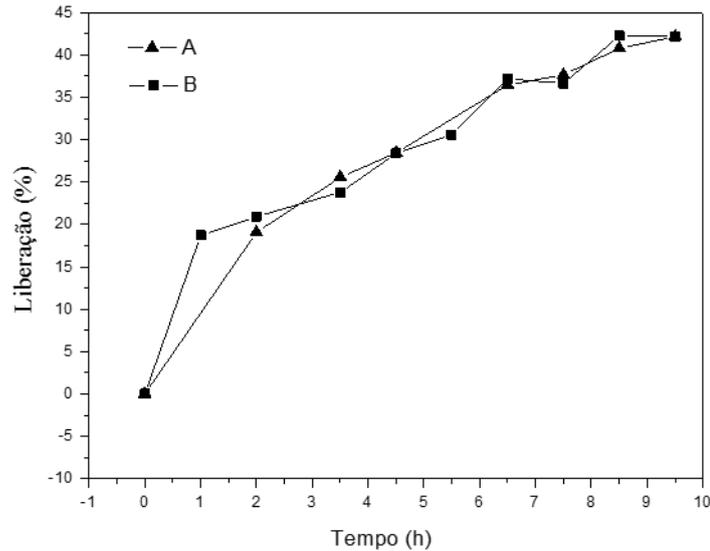


Figura 84. Curva de liberação do sistema composto por 30 % de PCL e 70 % de coacervato de cálcio.

A curva de liberação representada na Figura 83 apresenta uma taxa de liberação muito alta (cerca de 80 % liberado em 4 horas), ao passo que a curva de liberação demonstrada na Figura 84 possui uma cinética de liberação muito lenta (apenas cerca de 40 % liberado no tempo desejado). Desta forma o sistema de entrega controlada com a taxa de liberação desejada deverá estar com uma proporção entre seus componentes entre as utilizadas nos sistemas de liberação representados nas Figuras 83 e 84.

A Figura 85 mostra a curva de liberação do sistema formado entre o PCL e o coacervato numa proporção de 50 % para cada composto.

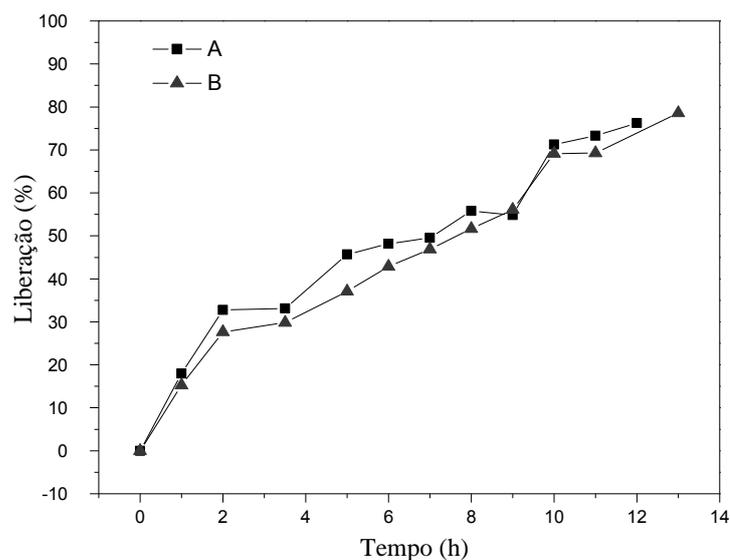


Figura 85. Curva de liberação do sistema composto por 50 % de PCL e 50 % de coacervato de cálcio.

A curva representada pela Figura 85 apresenta uma taxa de liberação de um sistema bem próximo ao desejado, tendo uma liberação de cerca de 80 % de íons fosfato em 12 horas, com certa linearidade. Assim, tal sistema seria o desejado para se inserir o extrato fúngico, e se construir o sistema ideal para a sua liberação controlada do estrato proposto.

Além da obtenção do sistema de liberação desejado, a construção de dispositivos a partir do coacervato e do polímero poli(ϵ -caprolactona) se mostrou bastante versátil podendo-se obter diferentes taxas de liberação de acordo com a proporção entre os constituintes, o seu formato e a área superficial. Assim, a utilização destes compostos em conjunto para a formulação de blendas para sistemas de entrega controlada pode ser perfeitamente feita para a inserção de outros medicamentos que necessitem variados tipos de cinéticas de liberação, abrangendo assim sua aplicação.

5 Conclusões

Os dados obtidos neste estudo permitiram analisar a estabilidade de dois polímeros quando expostos ao ambiente ruminal. Os polímeros de quitosanas de alta e baixa densidade foram os que apresentaram menor estabilidade ao entrar em contato com o rúmen. Os dados térmicos, vibracionais e eletrônicos permitiram a verificação da despolimerização da cadeia, bem como a perda dos grupamentos amino e amida e, em alguns casos, a abertura do anel glicosídico.

A análise da biodegradabilidade deste tipo de polímero foi reprodutiva (triplicatas) apesar de não se conseguir correlacionar o tempo de incubação com o nível de degradação. O tipo de alimentação fornecida aos bovinos não parece influenciar o processo de degradação, visto que os resultados foram semelhantes para as duas alimentações. A incubação *in vitro* dos polímeros de quitosanas utilizando as enzimas proteolíticas do rúmen forneceu os mesmos resultados (comparado com a incubação *in vivo*), indicando que a fermentação bacteriana e a produção das enzimas proteolíticas são processos que ocorrem no rúmen e que se relacionam com a degradação da quitosana.

A degradação da quitosana observada neste trabalho faz com que seja difícil a construção de um sistema de liberação baseado neste polímero. Sua deterioração faz com que a taxa de liberação *in vivo* seja mais rápida e totalmente diferente quando comparada a um ensaio feito utilizando água ou alguma solução tampão. Assim, para a construção de um sistema de liberação ruminal a partir da quitosana é necessário avaliar sua liberação *in vivo* ou no líquido ruminal.

De acordo com os dados de espectroscopia vibracional, a perda dos grupamentos contendo nitrogênio da estrutura da quitosana indica que esta pode estar sendo utilizada como fonte de nitrogênio não proteico para a síntese de proteínas pelo bovino, como observado anteriormente por Fadel El-Seed e colaboradores (Fadel El-Seed, Kamel et al., 2003).

O polímero poli(ϵ -caprolactona) foi o que apresentou maior estabilidade ao entrar em contato com o ambiente ruminal. Esta característica foi possível de ser observada através das análises vibracionais e das técnicas de análise térmica; devido a sua maior estabilidade espera-se que a cinética de liberação *in vivo* seja semelhante à *in vitro*, sendo mais fácil sua utilização para a construção dos sistemas de liberação em rúmen.

O sistema de entrega controlada composto apenas pelo PCL apresentou uma baixa taxa de liberação, porém os sistemas formados pela junção do mesmo com o coacervato de cálcio se mostraram mais versáteis, podendo ser formulados de forma a se obter diferentes padrões de liberação. O dispositivo composto por 50% de coacervato e 50% de PCL foi o que apresentou um padrão de liberação compatível com o desejado e, portanto seria o ideal para a liberação do extrato fúngico. A Taxa com qual a liberação será feita dependerá basicamente da proporção entre os compostos, à forma e área superficial do dispositivo. Este dispositivo torna-se ainda mais interessante por se utilizar um vidro que é sintetizado sem necessidade de se uso de altas temperaturas, possibilitando assim sua utilização para a liberação controlada de compostos orgânicos que possuem baixa resistência térmica.

Referências

ABREU, A.; CARULLA, J. E.; LASCANO, C. E.; DIAZ, T. E.; KREUZER, M.; HESS, H. D. Effects of *Sapindus saponaria* fruits on ruminal fermentation and duodenal nitrogen flow of sheep fed a tropical grass diet with and without legume. **J. Anim Sci.**, v.82, n.5, p.1392-1400, 2004.

ALLEN, W. M.; SANSOM, B. F.; GLEED, P. T.; MALLINSON, C. B.; DRAKE, C. F. Boluses of controlled release glass for supplementing ruminants with copper. **Vet Rec**, v.115, n.3, p.55-57, 1984.

AOYAGI, S.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Novel chitosan wound dressing loaded with minocycline for the treatment of severe burn wounds. **International Journal of Pharmaceutics**, v.330, n.1-2, p.138-145, 2007.

ARANAHA, N. Vidros fosfatos e a técnica de coacervação. **Revista Científica do IMAPES**, v.3, n.3, p.45-50, 2005.

ARSHADY, R. Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules: 2. Polyactides and related polyesters. **Journal of Controlled Release**, v.17, n.1, p.1-21, 1991.

ATIKINS, Peter; DE PAULA, Julio. **Físico-Química**. 8. Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

CARDINAL, J. R. Intraruminal devices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.28, n.3, p.303-322, 1997.

CARDINAL, J. R. Intraruminal controlled release boluses. **Controlled Release Veterinary Drug Delivery**, p.51-82, 2000.

CAVALCANTE, L. C. D.; LAGE, M. C. S. M.; FABRIS, J. D. Análise química de pigmento vermelho em osso humano. **Química Nova**, v.31, p.1117-1120, 2008.

COELHO, J. F.; FERREIRA, P. C.; ALVES, P.; CORDEIRO, R.; FONSECA, A. C.; GÓIS, J. R.; GIL, M. H. Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. **EPMA Journal**, v.1, p.164–209, 2010.

CZECHOWSKA-BISKUP, R.; ROKITA, B.; LOTFY, S.; ULANSKI, P.; ROSIAK, J. M. Degradation of chitosan and starch by 360-kHz ultrasound. **Carbohydrate Polymers**, v.60, n.2, p.175-184, 2005.

DE OLIVEIRA, C. I. R.; DE OLIVEIRA, L. F. C.; DIAS FILHO, F. A.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Spectroscopic investigation of a new hybrid glass formed by the interaction between croconate ion and calcium polyphosphate. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.61, n.9, p.2023-2028, 2005.

DE OLIVEIRA, Gelson Manzoni. **Simetria de moléculas e cristais fundamentos da espectroscopia vibracional**. 1. Ed. São Paulo: bookman, 2009.

DE OLIVEIRA, L. F. C. Espectroscopia molecular. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v.4, p.24-30, 2001.

DE PAOLI, Marco. **Degradação e estabilização de polímeros**, 2008. 221p.

DE ZEN, S.; BARIONI, L.G.; BONATO, D.B.B.; ALMEIDA, M.H.S.P.; RITTIL, T.F. **Pecuária de corte brasileira: impactos ambientais e emissões de gases do efeito estufa (GGE)**, Piracicaba, 2008. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/pdf/Cepea_Carbono_pecuaria_SumExec.pdf>. Acessado em 12/06/2010.

FADEL EL-SEED, A. N. M. A.; KAMEL, H. E. M.; SEKINE, J.; HISHINUMA, M.; HAMANA, K. Chitin and chitosan as possible novel nitrogen sources for ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, v.83, n.1, p.161-163, 2003.

FELT, O.; FURRER, P.; MAYER, J. M.; PLAZONNET, B.; BURI, P.; GURNY, R. Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of precorneal retention. **International Journal of Pharmaceutics**, v.180, n.2, p.185-193, 1999.

FILHO, Francisco Audisio Dias. **Preparação e caracterização de Coacervatos e vidros a base de fosfato**. 2003. Tese (doutorado em química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

GIOLITO, Ivo. **Fundamento da análise térmica análise térmica diferencial Calorimetria exploratória diferencial**. 1. ed. Araraquara: Giz, 2004.

GORDIN, C.; DELAITE, C.; BISTAC, S.; RUSU, D.; RUSU, M. DSC studies of poly(vinyl chloride)/poly(ϵ -caprolactone)/poly(ϵ -caprolactone)-b-poly(dimethylsiloxane) blends. **Polymer Bulletin**, v.63, n.4, p.517-529, 2009.

GOY, R. C.; ASSIS, O. B. G.; CAMPANA-FILHO, S. P. Produção de Esferas de quitosana. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.33, p.30-34, 2004.

HATFIELD, R. D.; RALPH, J.; GRABBER, J. H. Cell Wall Structural Foundations: Molecular Basis for Improving Forage Digestibilities. **Crop Sci.**, v.39, n.1, p.27-37, 1999.

HOLLAS, Michael. **Modern spectroscopy**. 4.ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2004.

HUANG, Q. Z.; ZHUO, L. H.; GUO, Y. C. Heterogeneous degradation of chitosan with H₂O₂ catalysed by phosphotungstate. **Carbohydrate Polymers**, v.72, n.3, p.500-505, 2008.

ILLUM, L.; JABBAL-GILL, I.; HINCHCLIFFE, M.; FISHER, A. N.; DAVIS, S. S. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.51, n.1-3, p.81-96, 2001.

ITO, M.; BAN, A.; ISHIHARA, M. Anti-ulcer Effects of Chitin and Chitosan, Healthy Foods, in Rats. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v.82, n.3, p.218-225, 2000.

KABAL'NOVA, N. N.; MURINOV, K. Y.; MULLAGALIEV, I. R.; KRASNOGORSKAYA, N. N.; SHERESHOVETS, V. V.; MONAKOV, Y. B.; ZAIKOV, G. E. Oxidative destruction of chitosan under the effect of ozone and hydrogen peroxide. **Journal of Applied Polymer Science**, v.81, n.4, p.875-881, 2001.

KANG, B.; DAI, Y.-D.; ZHANG, H.-Q.; CHEN, D. Synergetic degradation of chitosan with gamma radiation and hydrogen peroxide. **Polymer Degradation and Stability**, v.92, n.3, p.359-362, 2007.

KIM, Y. D.; KIM, S. C. Effect of chemical structure on the biodegradation of polyurethanes under composting conditions. **Polymer Degradation and Stability**, v.62, n.2, p.343-352, 1998.

KISTER, G.; CASSANAS, G.; BERGOUNHON, M.; HOARAU, D.; VERT, M. Structural characterization and hydrolytic degradation of solid copolymers of d,l-lactide-co-ε-caprolactone by Raman spectroscopy. **Polymer**, v.41, n.3, p.925-932, 2000.

KITTUR, F. S.; HARISH PRASHANTH, K. V.; UDAYA SANKAR, K.; THARANATHAN, R. N. Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. **Carbohydrate Polymers**, v.49, n.2, p.185-193, 2002.

KOHN, R. A.; ALLEN, M. S. In vitro protein degradation of feeds using concentrated enzymes extracted from rumen contents. **Animal Feed Science and Technology**, v.52, n.1-2, p.15-28, 1995.

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

LAKSHMI, S. N.; CATO, T. L. Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v.102, p.47-90, 2006.

LÓPEZ, F.; MERCÊ, A.; ALGUACIL, F.; LÓPEZ-DELGADO, A. A kinetic study on the thermal behaviour of chitosan. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.91, n.2, p.633-639, 2008.

MANO, Eloisa; MENDES, Luís. **Introdução a polímeros**. 2.ed edição. São Paulo: Edgar Blücher, 1999. 208p.

MASSON, M. J.; PHILLIPSON, A. T. The absorption of acetate, propionate and butyrate from the rumen of sheep. **The Journal of Physiology**, v.113, p.189-206, 1951.

MCSWEENEY, C. S.; DALRYMPLE, B. P.; GOBIUS, K. S.; KENNEDY, P. M.; KRAUSE, D. O.; MACKIE, R. I.; XUE, G. P. The application of rumen biotechnology to improve the nutritive value of fibrous feedstuffs: pre- and post-ingestion. **Livestock Production Science**, v.59, n.2-3, p.265-283, 1999.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.

OSWALDO, sala. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no infravermelho**. 2. ed. São Paulo: Unesp, 2008.

PACIULLO, D. S. C. Características Anatômicas Relacionadas Ao Valor Nutritivo De Gramíneas Forrageiras. **Ciência Rural**, v.22, n.2, p.357-364, 2002.

PEREIRA, A.C.. **Relação entre Problemas Reprodutivos e Eficiência Reprodutiva comparada por diferentes Métodos em Rebanhos Bovinos Leiteiros**. 2009. 35f. Dissertação (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

PERSENAIRE, O.; ALEXANDRE, M.; DEGÉE, P.; DUBOIS, P. Mechanisms and Kinetics of Thermal Degradation of Poly(ϵ -caprolactone). **Biomacromolecules**, v.2, n.1, p.288-294, 2001.

PILAU, A. **Alternativas de utilização de suplementação energética para recria de novilhas de corte em pastagem cultivada de inverno**. 2003. 81f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

QIN, C.; DU, Y.; ZONG, L.; ZENG, F.; LIU, Y.; ZHOU, B. Effect of hemicellulase on the molecular weight and structure of chitosan. **Polymer Degradation and Stability**, v.80, n.3, p.435-441, 2003.

QUENTAL, A. C.; HANAMOTO, L. S.; FELISBERTI, M. I. Caracterização de polietilenos lineares de baixa densidade I.: determinação do teor de ramificação por métodos espectroscópicos. **Polímeros**, v.15, p.274-280, 2005.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v.31, n.7, p.603-632, 2006.

ROCHA, Alexandre, IBGE: Brasil Tem o Maior Rebanho Bovino do Mundo. Fala, Brasil! , 3 dezembro 2004. Disponível em: <http://www.brazilbrasil.com/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=241>. Acessado em 11/06/2010.

ROSA, D. S.; CHUI, Q. S. H.; PANTANO FILHO, R.; AGNELLI, J. A. M. Avaliação da Biodegradação de Poli-b-(Hidroxibutirato), Poli-b-(Hidroxibutirato-co-valerato) e Poli-e-(caprolactona) em Solo Compostado. **Polímeros**, v.12, p.311-317, 2002.

SAHOO, S.; SASMAL, A.; NANDA, R.; PHANI, A. R.; NAYAK, P. L. Synthesis of chitosan-polycaprolactone blend for control delivery of ofloxacin drug. **Carbohydrate Polymers**, v.79, n.1, p.106-113, 2010.

SALA, O. I₂: uma molécula didática. **Química Nova**, v.31, p.914-920, 2008.

SANKARARAMAKRISHNAN, N.; SANGHI, R. Preparation and characterization of a novel xanthated chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v.66, n.2, p.160-167, 2006.

SANTOS, J. E. D.; SOARES, J. D. P.; DOCKAL, E. R.; CAMPANA FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, É. T. G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros**, v.13, p.242-249, 2003.

SCHENZEL, K.; FISCHER, S. NIR FT Raman Spectroscopy—a Rapid Analytical Tool for Detecting the Transformation of Cellulose Polymorphs. **Chemistry and Materials Science**, v.8, n.1, p.49-57, 2001.

SINHA, V. R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, A. Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v.278, n.1, p.1-23, 2004.

SINHA, V. R.; SINGLA, A. K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; BANSAL, K.; DHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.274, n.1-2, p.1-33, 2004.

SKOOG, Douglas; HOLLER, James; NIEMAN, Timothy. **Princípios da análise instrumental**. 5.ed. São Paulo: Bookman, 2002.

SOUZA, P. D. S.; SILVA, G. G.; AMARAL, L. O. F. O Cotidiano é Meio Amorfo: Transição Vítrea - uma Abordagem Para o Ensino Médio **Química Nova na Escola**, v.20, p.21-25, 2004.

SUN, C.; QU, R.; CHEN, H.; JI, C.; WANG, C.; SUN, Y.; WANG, B. Degradation behavior of chitosan chains in the 'green' synthesis of gold nanoparticles. **Carbohydrate Research**, v.343, n.15, p.2595-2599, 2008.

TIAN, F.; LIU, Y.; HU, K.; ZHAO, B. Study of the depolymerization behavior of chitosan by hydrogen peroxide. **Carbohydrate Polymers**, v.57, n.1, p.31-37, 2004.

VANDAMME, T. F.; ELLIS, K. J. Issues and challenges in developing ruminal drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, n.10, p.1415-1436, 2004.

VANDAMME, T. F.; LEGRAS, R. Physico-mechanical properties of poly(ϵ -caprolactone) for the construction of rumino-reticulum devices for grazing animals. **Biomaterials**, v.16, n.18, p.1395-1400, 1995.

VARMA, A. J.; DESHPANDE, S. V.; KENNEDY, J. F. Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review. **Carbohydrate Polymers**, v.55, n.1, p.77-93, 2004.

WILLOT, G.; GOMEZ, F.; VAST, P.; ANDRIES, V.; MARTINES, M.; MESSADDEQ, Y.; POULAIN, M. Preparation of zinc sodium polyphosphates glasses from coacervates precursors. Characterisation of the obtained glasses, and their applications. **Comptes Rendus Chimie**, v.5, n.12, p.899-906, 2002.

WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N. Multiplicity of 3-1,4-Xylanase in Microorganisms: Functions and Applications. **Microbiological Reviews**, v.52, n.3, p.305-317, 1988.

WU, F.-C.; TSENG, R.-L.; JUANG, R.-S. Comparative adsorption of metal and dye on flake- and bead-types of chitosans prepared from fishery wastes. **Journal of Hazardous Materials**, v.73, n.1, p.63-75, 2000.

WU, S. H. W.; PAPAS, A. Rumen-stable delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.28, n.3, p.323-334, 1997.

YU, J.; WU, P. Crystallization process of poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene oxide)-poly(ϵ -caprolactone) investigated by infrared and two-dimensional infrared correlation spectroscopy. **Polymer**, v.48, n.12, p.3477-3485, 2007.

Anexo

Dados Pessoais

Nome: Nelson Luis Gonçalves Dias de Souza

Sexo: Masculino

Nascimento: 13/05/1985 - Juiz de Fora/MG - Brasil

E-mail: nelson.luis@ice.ufjf.br

Nome em citação: Souza, N.L.G.D.

Formação Acadêmica/Titulação

- 2009 - 2011** Mestrado em Química.
Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Juiz De Fora, Brasil
Título: DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE UM EXTRATO FUNGICO A PARTIR DE VARIADOS POLIMEROS E APLICAÇÕES EM MEDICINA VETERINÁRIA, Ano de obtenção: 2011
Orientador: Luiz Fernando Cappa de Oliveira
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2005 - 2008** Graduação em Bacharel em química.
Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Juiz De Fora, Brasil
Título: Avaliação do nível de maturação do queijo Reino utilizando espectroscopia vibracional
Orientador: Renata Diniz
- 2005 - 2008** Graduação em Licenciatura em química.
Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Juiz De Fora, Brasil

2000 - 2003 Ensino Profissional de nível técnico.
Instituto de Laticínios Cândido Tostes, ILCT, Brasil.

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. SOUZA, N. L. G. D., CARNEIRO, C.C., DUQUE, A.C.A., BRANDÃO, H.M, OLIVEIRA, L.F.C

Análise da biodegradabilidade do polímero poli(ϵ -caprolactona) por espectroscopia vibracional após sua inserção no rúmen bovino In: **33º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2010, Águas de Lindóia.

2. SOUZA, N. L. G. D., DUQUE, A.C.A., CARNEIRO, C.C., BRANDÃO, H.M, OLIVEIRA, L.F.C

Studying the possible application of chitosan in the formulation of bovine rumen delivery systems In: **International Conference on Food and Agriculture Applications of Nanotechnologies**, 2010, São Pedro.

3. SOUZA, N. L. G. D., DINIZ, R.

Avaliação do nível de maturação do queijo Reino utilizando espectroscopia vibracional In: **26º Congresso Nacional de Laticínios Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, 2009, Juiz de Fora.

4. SOUZA, N. L. G. D., BRANDÃO, H.M, OLIVEIRA, L.F.C, CARNEIRO, C.C., DUQUE, A.C.A.

Caracterização e avaliação do polímero poli(ϵ -caprolactona) através da espectroscopia Raman após a inserção no sistema digestivo bovino In: **I Encontro Nacional de Espectroscopia Raman**, 2009, São Pedro.

5. SOUZA, N. L. G. D., BRANDÃO, H.M, OLIVEIRA, L.F.C

Construção e avaliação de um sistema de liberação controlada formado por coacervato de

polifosfato de cálcio e poli(ϵ -caprolactona) para fins veterinários In: **23º Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2009**, Juiz de Fora.

Artigos submetidos

Souza, N.LG.D.; Brandão, H.M.; de Oliveria, L.F.C. Spectroscopic and Thermogravimetric Study of Chitosan after Incubation in Bovine Rumen. **Journal of Molecular Structure.**