



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
MICROESFERAS DE GOMA GUAR RETICULADA COM
EDC**

CLARICE FEDOSSE ZORNIO

Florianópolis, dezembro/2010

Clarice Fedosse Zornio

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROESFERAS DE
GOMA GUAR RETICULADA COM EDC**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Orientador: Prof. Dr. Valdir Soldi

Florianópolis, dezembro/2010

Clarice Fedosse Zornio

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROESFERAS DE
GOMA GUAR RETICULADA COM EDC**

Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente
Coordenadora de Estágios do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Valdir Soldi
Orientador

Prof. Dra. Cristiane Luisa Jost

Prof. Dr. José Roberto Bertolino

Florianópolis, dezembro/2010

Agradecimentos

Ao Professor Valdir Soldi por ter me incentivado e me orientado durante a iniciação científica.

À todos os membros do POLIMAT por fazerem do laboratório um lugar de trabalho, mas também divertido. Em especial à Larrisa e à Samira por terem me iniciado no mundo das microesferas, ao Rodrigo Banegas por sempre ter se mostrado prestativo às minhas dúvidas e à Ledilege por ter me auxiliado muito nessa pesquisa, estando sempre disponível.

A todos os meus amigos e colegas da graduação e também à todos os meus amigos que se encontram espalhados por Florianópolis e pelo Brasil.

À minha família que, principalmente, me faz sempre querer crescer.

Ao Rudiney pelo amor, por sempre buscar me entender e por se mostrar interessado nas minhas pesquisas, mesmo nem sabendo balancear uma reação química.

A todos aqueles que me auxiliaram, de uma forma ou de outra, nesse trabalho .

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	1
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	2
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Biopolímeros	3
2.1.1 <i>Polissacarídeos</i>	3
2.1.1.1 <u>Goma guar</u>	5
2.2 Micropartículas e encapsulação de agentes ativos	5
2.3 Estabilidade de emulsões	6
2.4 Agente reticulante	8
3 OBJETIVOS	10
3.1 Objetivos gerais	10
3.2 Objetivos específicos	10
4 METODOLOGIA	11
4.1 Materiais.....	11
4.2 Purificação da goma guar	11
4.2 Preparação das microesferas	11
4.3 Caracterização das microesferas	12
4.3.1 <i>Análise preliminar</i>	12
4.3.2 <i>Morfologia e diâmetro médio das microesferas</i>	13
4.3.3 <i>Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)</i>	13

4.3.4 Eficiência da encapsulação (EE)	13
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
5.1 Purificação da goma guar	14
5.2 Caracterização das microesferas	14
5.3.1 Análise preliminar	14
5.2.2 Morfologia e diâmetro médio das microesferas	16
5.2.2.1 Morfologia	16
5.2.2.1 Diâmetro médio	17
5.2.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	22
5.2.4 Eficiência da encapsulação (EE)	23
6 CONCLUSÕES	25
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ligações de hidrogênio entre os monômeros da celulose.....	4
Figura 2. Conformação espacial da amilose.....	4
Figura 3. <i>Cyamopsis tetragonolobus</i> e a estrutura do monômero da goma guar	5
Figura 4. Representação de (A) uma microcápsula e de (B) uma microesfera .	6
Figura 5. Fenômenos responsáveis pela desestabilização de uma emulsão	7
Figura 6. Estrutura química do EDC	8
Figura 7. Mecanismo proposto para a reticulação da GG pelo EDC de acordo com o mecanismo proposto por Banegas e colaboradores.....	9
Figura 8. Representação esquemática das etapas utilizadas para a preparação das microesferas de GG utilizando o Ultra-Turrax como dispersor	12
Figura 9. Microscopia eletrônica de varredura para os filmes de GG (A) não purificada e (B) purificada.....	14
Figura 10. Estruturas químicas do (A) Span 80 e do (B) Tween 80	15
Figura 11. Imagens obtidas por TEM da emulsão A/O da solução de GG sem evaporação da água preparadas com agitação a 800 rpm	15
Figura 12. MEV obtidos das microesferas de GG a (A) 1% com aumento de 2000x e (B) 2 % m/v com agitação magnética a 800 rpm, aumento de 35x.....	16
Figura 13. Microscopias das microesferas preparadas com o Ultra-Turrax permitindo observar (A) a coalescência e a floculação e (B) as partículas sem forma definida.....	17
Figura 14. (A) microesfera de GG não reticulada e (B) corte transversal de uma microesfera de GG reticulada.....	17
Figura 15. Comparação do tamanho das microesferas formadas em relação à concentração da GG na solução aquosa: (A) aumento de 200x da amostra 2 (concentração a 2% de GG); (B) aumento de 850x e (C) aumento de 2700x da amostra 1 (1% de GG)	19

Figura 16. Partículas obtidas com dispersão de 4000 rpm com aumento de 35x	19
Figura 17. Gráfico de barras de comparação entre os tamanhos das microesferas preparadas com dispersão de 5000, 6000, 8000 e 11000 rpm...	20
Figura 18. Comparação entre o tamanho das microesferas e a taxa de gotejamento. As microscopias obtidas em (A) mostram a polidispersidade da amostra 4, sendo possível visualizar vários tamanhos para as microesferas, já em (B), relativa à amostra 9, as microesferas apresentam menor polidispersidade	20
Figura 19. Tamanhos obtidos para as microesferas preparadas mudando-se a composição da fase interna.....	21
Figura 20. Curvas de DSC obtidas para microesferas de (A) GG pura, (B) GG + 30% EDC.....	22
Figura 21. Estrutura química da Rodamina B.....	23
Figura 22. Curva por adição de padrão para determinação da Rodamina B encapsulada nas microesferas de GG	23

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros utilizados em cada preparação das microesferas.....	11
Tabela 2. Dados obtidos referente ao diâmetro médio obtido para todas as formulações de microesferas de GG preparadas	18

LISTA DE ABREVIATURAS

GG	Goma guar
AA	Agente ativo
EDC	Hidroclorato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
A/O	Água/Óleo
m/v	Massa/Volume
rpm	Rotações por minuto
m/m	Massa/Massa
UV/Vis	Ultravioleta/Visível
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EE	Eficiência de encapsulação

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi obter e caracterizar microesferas poliméricas de goma guar reticulada utilizando a técnica de emulsificação/evaporação do solvente em diferentes formulações. A análise da morfologia e do diâmetro médio das microesferas, que puderam ser observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), mostrou a influência da concentração do polímero, da velocidade de agitação e da taxa de gotejamento durante a preparação das partículas, principalmente em relação ao tamanho e à polidispersidade. O processo de reticulação pelo hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) foi necessário para diminuir a solubilidade da goma guar, possibilitando sua utilização em sistemas de liberação controlada de agentes ativos, e foi caracterizado como eficiente por calorimetria diferencial exploratória (DSC), em que se observou um aumento da temperatura de transição vítrea obtida para as microesferas reticuladas em relação às microesferas não reticuladas, evidenciando uma maior rigidez do sistema, dada pelo aumento das ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas. O agente ativo modelo utilizado para a encapsulação foi a Rodamina B, escolhido devido à facilidade de ser detectado pela técnica de espectroscopia do Ultravioleta/Visível. A baixa eficiência de encapsulação, 11,6%, pode ser explicada devido a pouca interação entre a Rodamina B e a goma guar e à sua migração do interior da matriz durante o processo de evaporação da água.

Palavras-chave: microesferas, goma guar, reticulação, EDC.

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os sistemas poliméricos para a encapsulação e liberação controlada de agentes ativos têm sido cada vez mais utilizados devido às suas diversas aplicações e funcionalidades. Tais sistemas exibem algumas vantagens em relação aos sistemas convencionais utilizados, como o aumento da estabilidade do agente ativo, a menor frequência de administração e a possibilidade de direcioná-los a um centro específico.

Além disso, como a preocupação com o meio ambiente tem aumentado progressivamente, a substituição de materiais sintéticos por materiais naturais que causem menor impacto ambiental está sendo constantemente pesquisada. Os polímeros naturais têm atraído a atenção justamente por serem materiais de baixa toxicidade, biodegradáveis, de baixo custo e que podem ter algumas das suas propriedades físico-químicas alteradas, satisfazendo as necessidades de aplicação [1]. Os materiais produzidos a partir de biopolímeros possuem uma ampla área de aplicação incluindo indústrias alimentícias, agrícolas e farmacêuticas, principalmente por serem produtos biocompatíveis, que podem ser utilizados no corpo humano sem causar danos ou problemas [2].

A goma guar é um polissacarídeo extraído de uma leguminosa asiática altamente solúvel em água, o que dificulta muito sua aplicabilidade em sistemas de encapsulação que visam o uso em humanos. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo preparar microesferas de goma guar modificada e avaliar algumas de suas propriedades físico-químicas, com o intuito de utilizar estes sistemas como matrizes para liberação controlada de princípios ativos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biopolímeros

Polímeros são macromoléculas de origem natural ou sintética com massa molar da ordem de 10^4 a 10^6 g/mol, formados pela repetição de um grande número de unidades químicas, chamadas de monômeros, unidas por ligações covalentes [3]. Os biopolímeros, ou polímeros naturais, são materiais poliméricos cuja síntese ocorre durante o ciclo de crescimento dos organismos vivos. Desse modo, a matéria-prima principal para a extração de biopolímeros é uma fonte de carbono renovável e, pelo custo-benefício, geralmente proveniente de produtos naturais que têm plantios comerciais de grande escala, como a cana-de-açúcar, o milho e o trigo [4].

Os polímeros naturais são, principalmente, a borracha, os polissacarídeos e as proteínas. A borracha natural é um polímero de adição, enquanto que os polissacarídeos e as proteínas são polímeros de condensação, obtidos, respectivamente, a partir de monossacarídeos e aminoácidos [5]. De acordo com a classificação de Carothers quanto ao tipo de reação de polimerização, os polímeros de condensação são aqueles formados a partir de reações de condensação com a eliminação de pequenas moléculas (por exemplo, H_2O , HCl e CH_3OH); já os polímeros de adição reagem se adicionando, sendo sua estrutura uma repetição do monômero [3].

A principal aplicação mencionada na literatura de biopolímeros ocorre na área médico-farmacêutica; isso porque são materiais biocompatíveis e facilmente absorvidos pelo organismo humano, prestando-se à fabricação de fios de sutura, próteses ósseas e cápsulas que liberam gradualmente medicamentos na corrente sanguínea. As pesquisas também incluem a utilização de biopolímeros na fabricação de embalagens (para produtos de limpeza e de higiene) e de cosméticos e a formação de blendas (mistura de polímeros naturais e sintéticos) [4].

2.1.1 Polissacarídeos

A classe mais abundante de compostos bioorgânicos é a dos carboidratos, também chamados de sacarídeos ou de açúcares, que

representam mais de 50% da massa seca da biomassa terrestre, sendo importantes constituintes dos organismos vivos, onde exercem diversas funções.

Existem duas classes principais de carboidratos: os carboidratos simples e os complexos. Os carboidratos simples são chamados de monossacarídeos, com cadeia carbônica variando de três a oito carbonos e que não podem sofrer hidrólise; já os carboidratos complexos podem sofrer hidrólise, pois contém duas ou mais unidades de sacarídeos unidas entre si por ligações glicosídicas, sendo classificados de polissacarídeos quando existem milhares dessas unidades monossacarídicas formando sua estrutura [6].

Essas ligações glicosídicas podem se apresentar na forma α ou β , o que acaba influenciando significativamente as propriedades físico-químicas de tais polímeros. Como exemplo pode-se analisar a estrutura da celulose, que apresenta ligações do tipo β -1,4, que acabam por promover a formação de ligações de hidrogênio entre seus próprios monômeros (Figura 1), responsáveis diretamente pela insolubilidade em água desse polissacarídeo.

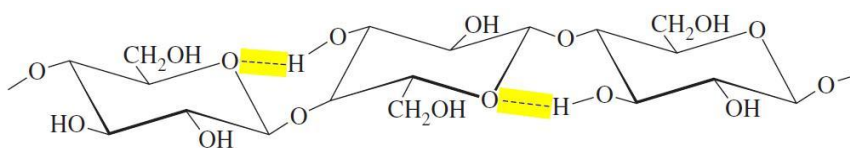


Figura 1. Ligações de hidrogênio entre os monômeros da celulose

Já em outros sistemas como o da amilose, as ligações do tipo α inferem uma estrutura em forma de alfa hélice (Figura 2); essa conformação espacial possibilita aos grupos OH do polissacarídeo interagir com as moléculas de água, fazendo com que a amilose seja solúvel em meios aquosos [7].

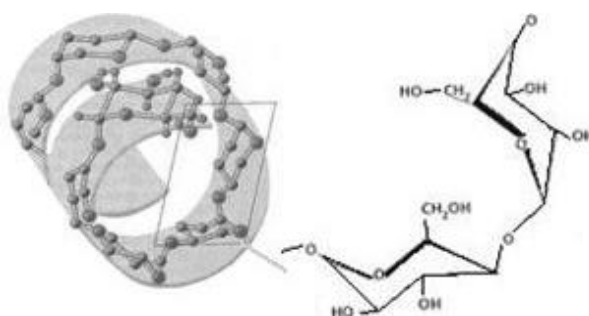


Figura 2. Conformação espacial da amilose

2.1.1.1 Goma guar

A goma guar (GG) é um polissacarídeo isolado das sementes da leguminosa *Cyamopsis tetragonolobus*, um arbusto originário da Índia. Sua molécula consiste em uma cadeia longa linear de β -1,4 manose com subunidades de α -1,6 galactopiranosídeos ligados, formando um polissacarídeo altamente ramificado [1].

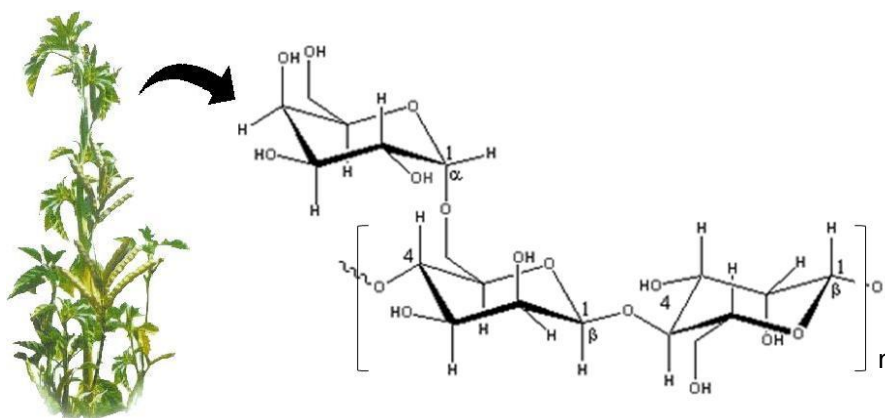


Figura 3. *Cyamopsis tetragonolobus* e a estrutura do monômero da goma guar

Devido à possibilidade de formar filmes homogêneos, ser bem solúvel em água, possuir alta viscosidade, ser comestível e de baixo custo a goma guar apresenta-se como um biopolímero interessante para diversas aplicações. É comumente utilizada na indústria alimentícia como agente espessante e na indústria farmacêutica como aglutinante, agente suspensor e estabilizante, principalmente por ser um polímero biodegradável e que não produz resíduos tóxicos [8].

2.2 Micropartículas e encapsulação de agentes ativos

Micropartículas são, por definição, espécies cujos diâmetros médios variam entre 1 μ m e 1 mm, que podem ser obtidas a partir de diversos tipos de materiais, como polímeros, compósitos cerâmicos e metais. Por apresentar tamanho e volume pequenos, grande área superficial relativa, estabilidade e permeabilidade superficial, as micropartículas têm grande aplicabilidade em setores científicos e tecnológicos [9], sendo os estudos, principalmente, direcionados à área de encapsulação de agentes ativos.

A microencapsulação de agentes ativos (AA) tem como objetivo encapsular partículas sólidas ou líquidas através da formação de matrizes. Esta

técnica é fundamentalmente importante por proteger o agente ativo (contra o oxigênio, água e a luz, por exemplo), conferindo uma maior durabilidade e estabilidade, assim como proporcionar uma liberação controlada da substância ou vetorizá-la a um local específico de ação [10].

Essas micropartículas formadas podem ser classificadas em duas classes principais, sendo chamadas de microcápsulas quando um agente ativo está envolto por uma casca polimérica de espessura variável, e de microesferas quando são compactas, onde o agente ativo pode se encontrar disperso no meio polimérico [11] (Figura 4).

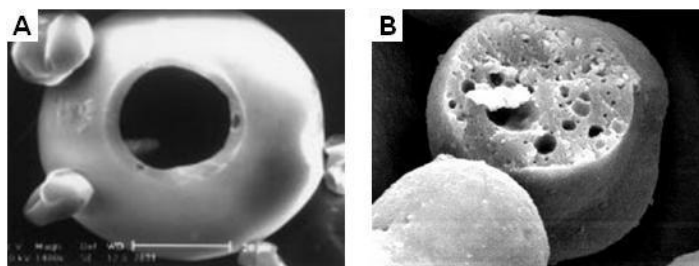


Figura 4. Representação de (A) uma microcápsula e de (B) uma microesfera

Existem algumas técnicas descritas na literatura para a formação das microesferas e, conseqüentemente, para a microencapsulação de agentes ativos. A mais utilizada é a emulsificação/evaporação do solvente devido à simplicidade do procedimento e à possibilidade de modulação das características físico-químicas das microesferas, por permitir a escolha da formulação e das condições de preparação [12,13]. Tal técnica consiste em basicamente quatro passos: (i) dissolução ou dispersão do AA no solvente em que o polímero já se encontra em solução, formando a fase interna; (ii) emulsificação da fase interna em uma segunda fase (fase externa) imiscível na primeira (nessa etapa, se torna necessário o uso de algum estabilizante, que tem a finalidade de evitar a separação das fases); (iii) extração do solvente da fase interna, promovendo a “solidificação” das microesferas e a quebra da emulsão e (iv) centrifugação, coleta e secagem das microesferas [14].

2.3 Estabilidade de emulsões

Emulsão é uma mistura entre dois líquidos imiscíveis em que um deles (a fase interna) encontra-se disperso na forma de pequenos glóbulos no outro

líquido (a fase externa), formando uma mistura relativamente estável devido à presença de um emulsificante [15].

A formação desses glóbulos da fase interna se dá devido à tensão interfacial entre os líquidos, que faz com que o maior número de moléculas se desloque da superfície para o interior do líquido, fazendo com que a superfície se contraia espontaneamente. Para um volume fixo (a quantidade de líquido na gota), a forma geométrica com superfície de menor área que existe é a esfera [16].

A estabilidade de uma emulsão é uma propriedade física muito importante desse sistema; a completa separação de fases pode ocorrer devido a três principais fenômenos: a sedimentação (deposição da fase interna), a floculação (formação de agregados da fase interna) e a coalescência (colisões que levam a formação de glóbulos maiores) [17].

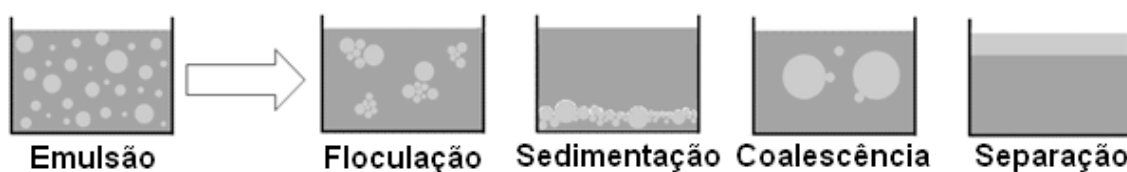


Figura 5. Fenômenos responsáveis pela desestabilização de uma emulsão

Para se evitar essa separação de fases e a desestabilização da emulsão é utilizado nessas formulações um agente emulsificante. Dentre eles, destacam-se os surfactantes, que são moléculas anfifílicas – apresentam, no mínimo, uma região hidrofílica e outra hidrofóbica – que tendem a se adsorver nas regiões interfaciais dos líquidos, reduzindo a tensão interfacial [17,18].

Andreani [13] preparou microesferas de glúten de trigo a partir da técnica de emulsificação/evaporação do solvente utilizando uma solução aquosa como fase interna e uma oleosa como externa, verificando que foi necessário o uso de dois surfactantes para manter a estabilidade da emulsão: o Span 80 (um tensoativo lipofílico) e o Tween 80 (um tensoativo hidrofílico).

Do mesmo modo, tem-se estudado as aplicações da goma guar como matriz em sistemas de liberação controlada de agentes ativos, porém o maior problema encontrado de sua aplicabilidade se deve à elevada hidrossolubilidade da GG, o que pode desencadear uma liberação precoce do fármaco; como alternativa, têm sido estudadas modificações na sua estrutura

com a finalidade de diminuir essa solubilidade [19]. Chaurasia e colaboradores prepararam microesferas de goma guar reticulada com glutaraldeído, comprovando que a solubilidade em água das microesferas formadas era inversamente dependente da concentração de glutaraldeído. Nesse mesmo trabalho, também se evidenciou que o tamanho das esferas depende da concentração do polímero, da velocidade de dispersão da solução, da concentração do surfactante e da temperatura [12].

2.4 Agente reticulante

Uma das formas de se diminuir a solubilidade em água de um biopolímero é realizar ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas, que podem ser obtidas através de um processo de reticulação. Dessa forma, são alteradas propriedades inerentes ao material, como estabilidades térmica e mecânica e a taxa de degradação (que está diretamente relacionada à solubilidade) [20].

O hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) é um agente reticulante muito utilizado, já que é bastante eficiente nas reticulações de proteínas e polissacarídeos, além de apresentar a vantagem de não ser tóxico, quando comparado a reticulantes como o formaldeído e o glutaraldeído [21].

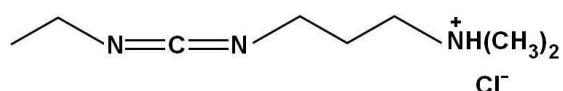


Figura 6. Estrutura química do EDC

Outra vantagem do uso do EDC como agente reticulante está no fato de que ele não é incorporado na estrutura do polímero reticulado, formando um derivado de uréia, que, por ser iônico, pode ser facilmente retirado com sucessivas lavagens com água [21]. Banegas e colaboradores sugerem um mecanismo de reticulação (Figura 6) que está associado à diminuição dos grupos hidroxilas da GG, através do aumento do número de ligações éter; esse processo é responsável pela menor interação da GG com a água, diminuindo, conseqüentemente, sua solubilidade [22].

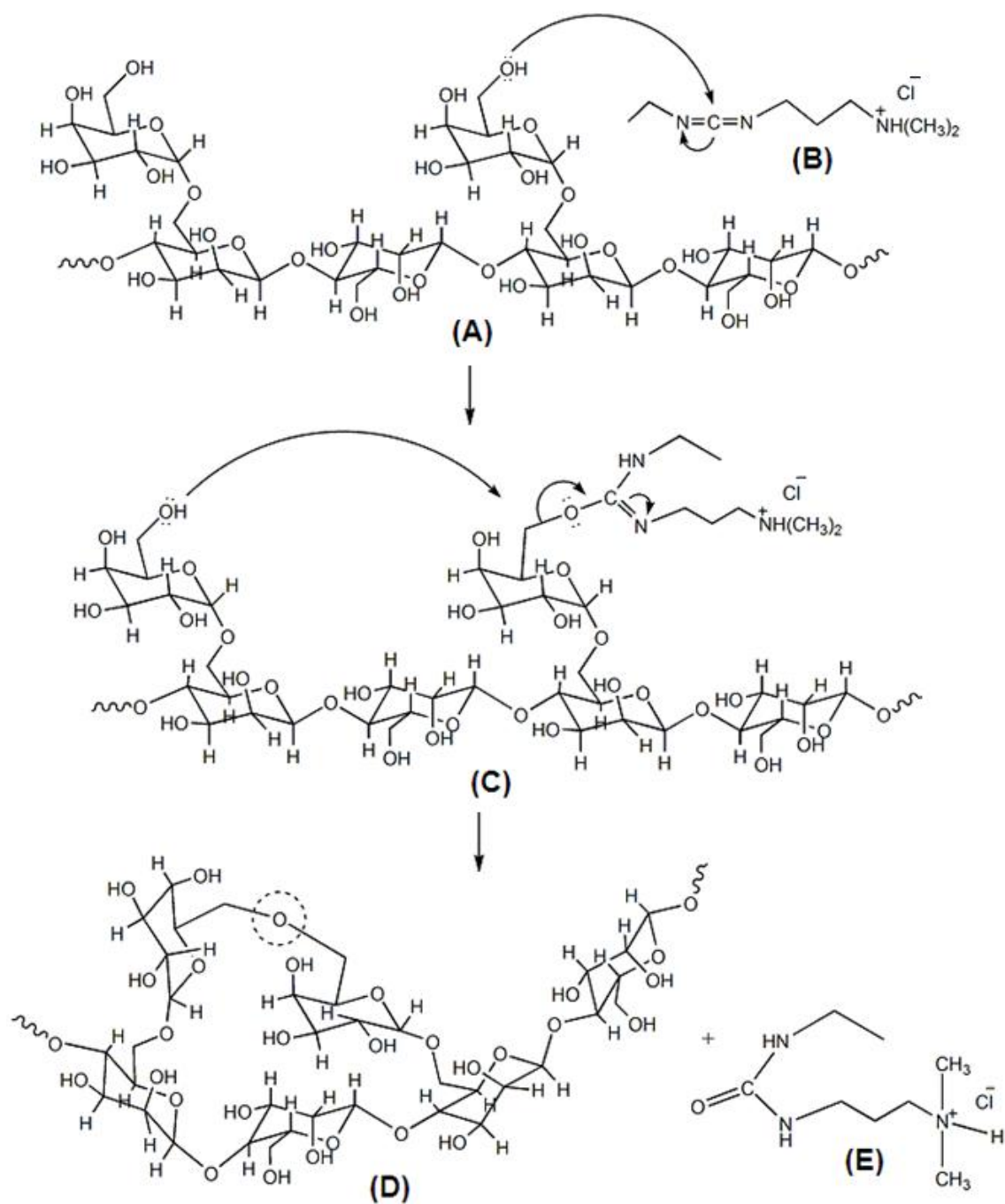


Figura 7. Mecanismo proposto para a reticulação da GG pelo EDC de acordo com o mecanismo proposto por Banegas e colaboradores

Pelo mecanismo proposto um grupo OH da GG (A) ataca nucleofílicamente a carbodiimida eletrofílica do EDC (B), formando o intermediário C. Ocorre, então, novamente um ataque nucleofílico de outro grupo hidroxila no carbono eletrofílico de C, liberando o derivado de uréia como grupo de saída (E) e formando uma nova ligação éter na cadeia da GG (D).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Preparar e caracterizar microesferas formadas por goma guar reticulada com o hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida através da técnica de emulsificação/evaporação do solvente para posterior encapsulação de um agente ativo.

3.2 Objetivos específicos

- Preparar microesferas de GG reticulada com EDC em diferentes concentrações, velocidades de agitação e taxas de gotejamento através da técnica de emulsão/evaporação do solvente.
- Verificar se os parâmetros utilizados na preparação da emulsão são eficientes para que ocorra a formação dos glóbulos da fase interna por microscopia eletrônica de transmissão (TEM).
- Determinar o tamanho e a morfologia das partículas formadas através da microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Avaliar a ocorrência da reticulação da GG pelo EDC por calorimetria exploratória diferencial (DSC).
- Determinar a eficiência de encapsulação do agente ativo modelo.

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais

A GG, o EDC e a Rodamina B foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (EUA). A acetona, o etanol e o éter etílico foram provenientes da Nuclear (Brasil) e o Span 80, o Tween 80 e o óleo mineral foram comprados da VETEC Química Fina (Brasil).

Com exceção da goma guar, os outros materiais foram utilizados sem purificação prévia.

4.2 Purificação da goma guar

A goma guar comercial foi purificada segundo o método descrito por Feitosa e colaboradores com algumas modificações [22, 23]. Primeiramente, cerca de 3 g do polissacarídeo foram fervidos em solução de etanol a 80% (v/v) por aproximadamente 10 min e filtrados em funil de Büchner. O resíduo foi lavado com etanol, acetona e éter etílico e deixado em agitação por 1h para hidratação completa em 300 mL de água destilada. Essa solução foi centrifugada em 4000 rpm por 1h30min e o sobrenadante foi precipitado com etanol, lavado com acetona e seco com ar quente.

4.2 Preparação das microesferas

As microesferas de goma guar foram preparadas pela técnica de emulsificação/evaporação do solvente em diferentes formulações, descritas na tabela abaixo:

Tabela 1. Parâmetros utilizados em cada preparação das microesferas

Amostra	Concentração de goma guar (m/v)	Concentração de EDC (m/m)	Concentração de Rodamina (m/m)	Velocidade de agitação (rpm)	Taxa de gotejamento (mL/h)
1	1%	30%	-	800 ^a	20
2	2%	30%	-	800 ^a	20
3	2%	30%	-	4000 ^b	20
4	2%	30%	-	5000 ^b	20
5	2%	30%	-	6000 ^b	20
6	2%	30%	-	8000 ^b	20
7	2%	30%	-	11000 ^b	20
8	2%	-	-	5000 ^b	5
9	2%	30%	-	5000 ^b	5
10	2%	30%	1%	5000 ^b	5

^a agitador magnético convencional; ^b Ultra-Turrax

Cada uma dessas formulações seguiu o seguinte esquema (dado pela Figura 8): para a formação da fase interna preparou-se uma solução aquosa de goma guar purificada, deixando-a em agitação por 24h. Após esse período, e quando necessário, foram adicionados o Tween 80 (a 1% m/v), o EDC e o agente ativo (AA) (Rodamina B), agitando-se a solução por mais 30 min.

Paralelamente foi preparada a fase externa, uma solução de óleo mineral contendo 3 g de Spam 80. Com isso, 10 mL da fase interna foram dispersos por gotejamento nessa solução oleosa a fim de formar uma emulsão água em óleo (A/O), que foi deixada em agitação por cerca de 5h a uma temperatura de 60°C (com a finalidade de evaporar toda água da fase interna). Por fim, as microesferas foram filtradas, lavadas com etanol e secas em estufa a vácuo para posterior caracterização.

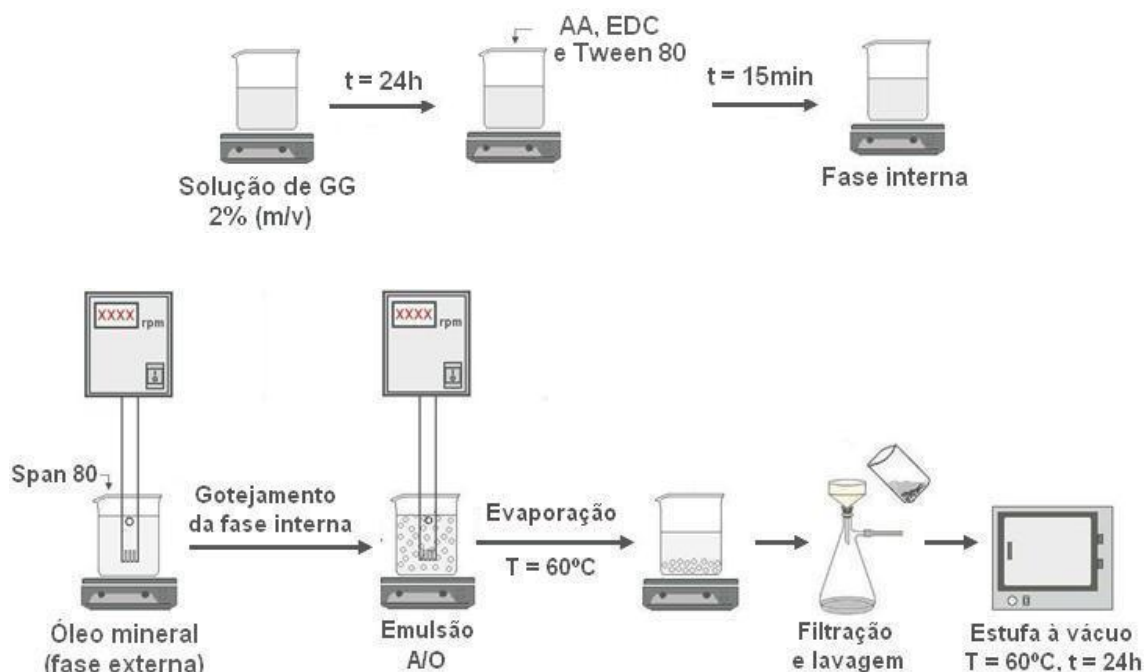


Figura 8. Representação esquemática das etapas utilizadas para a preparação das microesferas de GG utilizando o Ultra-Turrax como dispersor

4.3 Caracterização das microesferas

4.3.1 Análise preliminar

Com o objetivo de verificar se os parâmetros utilizados para a preparação da emulsão A/O eram eficientes para que houvesse a formação de glóbulos da fase interna, preparou-se amostra à temperatura ambiente (para que não ocorresse a evaporação da água da fase interna) e a analisou por

microscopia eletrônica de transmissão (TEM) em um microscópio JEM-1011 TEM.

4.3.2 Morfologia e diâmetro médio das microesferas

A morfologia das microesferas foi analisada observando-se suas propriedades de superfície e sua porosidade. Para a visualização do interior das microesferas, seccionou-as transversalmente.

O diâmetro médio das esferas foi determinado levando-se em conta o diâmetro médio de Ferret (distância máxima entre dois pontos pertencentes à partícula), utilizando-se entre 30 e 40 microesferas.

As microscopias foram obtidas por um microscópio JEOL JSM-6390LV.

4.3.3 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

A temperatura de transição vítrea (T_g) das micropartículas formadas foi determinada utilizando-se um equipamento modelo DSC-50 Shimadzu. As amostras foram inicialmente resfriadas até $-50\text{ }^\circ\text{C}$ com nitrogênio líquido e em seguida foi realizada a varredura na taxa de $5\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até $150\text{ }^\circ\text{C}$ sob atmosfera de nitrogênio (fluxo de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$).

4.3.4 Eficiência da encapsulação (EE)

Para se determinar a quantidade de agente ativo contido nas microesferas foi utilizada a espectroscopia no UV/Vis. Para tanto, exatamente 5 mg de microesferas com o AA (Rodamina B) foram dissolvidos em NaOH 0,1M, deixando-se a solução sob agitação com temperatura de $36\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24h. Após esse período, quando todas as microesferas se degradaram, transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 50 mL (solução mãe).

Com isso, preparou-se uma curva de calibração com adição de padrão adicionando-se 1 mL da solução mãe a balões volumétrico de 10 mL contendo as seguintes concentrações de Rodamina B: 0, 0,025, 0,050, 0,075, 0,100, 0,125, 0,150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. As medidas de absorvância foram feitas no comprimento de onda de 554 nm em um espectrofotômetro HP 8452A Diode Array. Foi construído o gráfico de absorvância *versus* concentração e extrapolou-se a curva para $y = 0$, achando-se a concentração do AA na amostra.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Purificação da goma guar

Para obtenção da goma guar comercial, o endosperma da leguminosa é separado do germe por vários processos de moagem, fazendo com que o produto comercial contenha, além da GG, fibra bruta, umidade, proteínas e cinzas, o que exige a purificação do produto comercial [23].

A goma guar bruta apresenta uma coloração levemente amarelada e com grânulos maiores, provenientes de materiais insolúveis em água, que são retirados pela solução quente de etanol. Após a purificação, a goma guar se apresenta como um sólido branco e menos áspero.

Além da análise visual, foram obtidas micrografias de MEV de filmes formados pela goma guar purificada e não purificada (Figura 9).

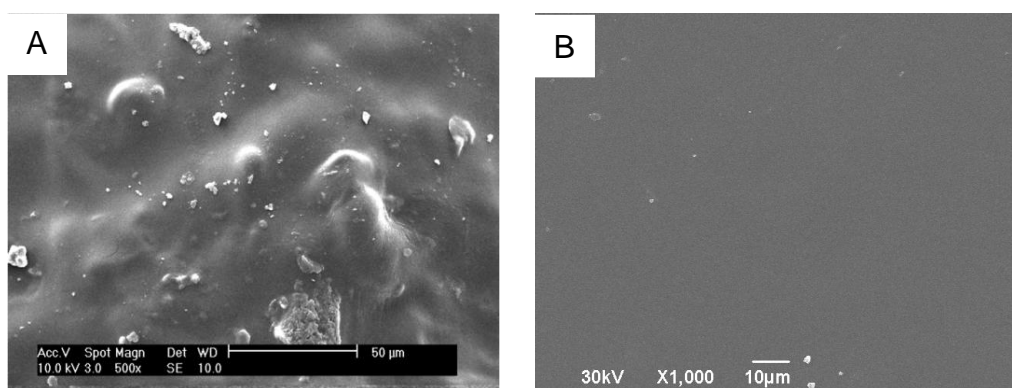


Figura 9. Microscopia eletrônica de varredura para os filmes de GG (A) não purificada e (B) purificada

A observação das figuras permite dizer que a superfície dos filmes formados pela goma guar bruta é extremamente rugosa e heterogênea devido à presença de compostos não solúveis em água. Já a superfície dos filmes de goma guar pura é mais lisa e homogênea, significando que as impurezas insolúveis foram retiradas pelo processo de purificação.

5.2 Caracterização das microesferas

5.3.1 Análise preliminar

As concentrações dos surfactantes Tween 80 e Span 80 (Figura 10) utilizadas por Andriani [13] se mostraram eficientes para a preparação das

microesferas a partir de uma emulsão A/O (solução aquosa de glúten de trigo/óleo mineral), pois as microesferas obtidas foram realmente esféricas e com um diâmetro médio de $13,9 \pm 1,7 \mu\text{m}$ [13].

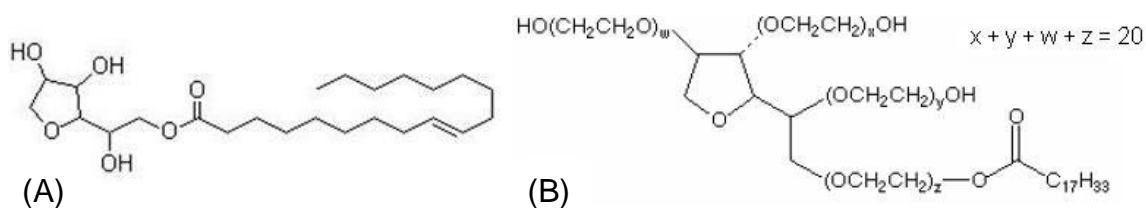


Figura 10. Estruturas químicas do (A) Span 80 e do (B) Tween 80

Desse modo, a fim de verificar se as mesmas condições poderiam se aplicar em uma solução aquosa com outro polímero (a goma guar) fez-se uma análise preliminar preparando-se uma emulsão A/O da solução aquosa da goma guar reticulada (a 2% m/v), contendo 1% de Tween 80, dispersa no meio de óleo mineral, contendo 3% de Span 80.

Por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) obtiveram-se imagens que comprovaram que os glóbulos que estavam sendo formados eram esféricos, com tamanhos da ordem de 10^{-6} m e estavam relativamente dispersos na emulsão, conforme a Figura 11.A, significando que a adição de tais concentrações de ambos os surfactantes reduziram a tensão interfacial entre a solução aquosa e a oleosa.

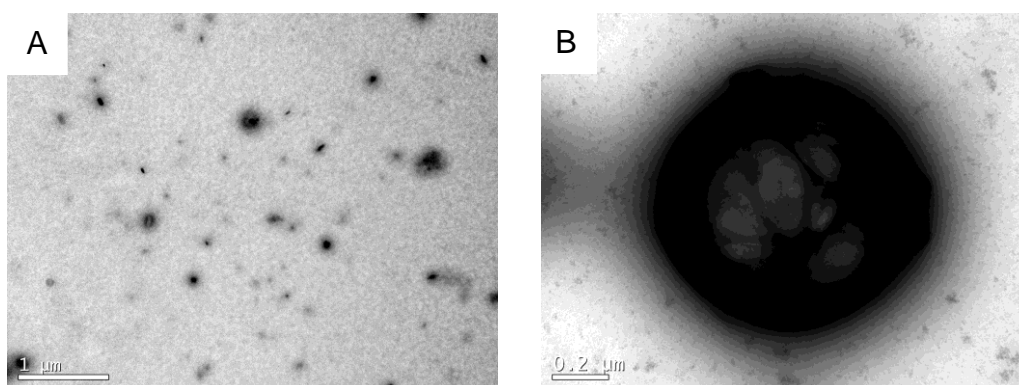


Figura 11. Imagens obtidas por TEM da emulsão A/O da solução de GG sem evaporação da água preparadas com agitação a 800 rpm

Pela microscopia obtida por TEM também é possível analisar o interior das partículas formadas. A Figura 11.B mostra que grande parte do volume da glóbulo é composto pelo solvente (a água), esperando-se que as microesferas

poliméricas obtidas após a evaporação sejam muito menores que esses glóbulos.

5.2.2 Morfologia e diâmetro médio das microesferas

5.2.2.1 Morfologia

A técnica de emulsificação/evaporação do solvente se mostrou realmente eficiente apenas para as amostras preparadas a 800 rpm (amostras 1 e 2), em que foi utilizado um agitador magnético convencional, como pode ser observado pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrada na Figura 12. Para as amostras (3 a 10) preparadas utilizando-se como dispersor um homogeneizador de alta potência (Ultra-Turrax) observou-se que as micropartículas formadas não eram na sua maioria esféricas, se apresentando tanto como um conglomerado de microesferas de diversos tamanhos (possivelmente devido à floculação e à coalescência) (Figura 13.A), quanto como partículas sem forma definida (Figura 13.B); tal fato está de acordo com o descrito por Landfester [24], que afirma que o uso do Ultra-Turrax como homogeneizador não é suficiente para a obtenção de partículas com boa dispersão de tamanho, devido, basicamente, à alta energia empregada no processo. Essa energia não é totalmente utilizada para o cisalhamento da amostra, tendo uma parte dispersa na forma de calor, o que aquece as partículas formadas de tal forma que a água é evaporada sem antes permitir a estabilização das gotas na emulsão.

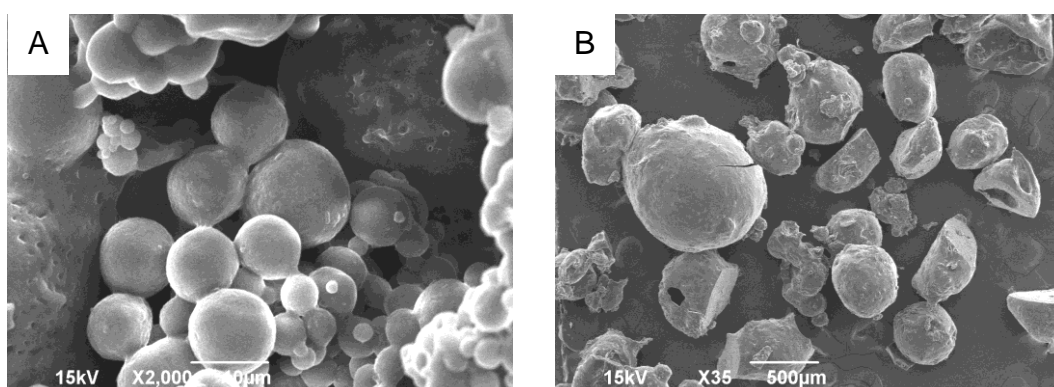


Figura 12. MEV obtidos das microesferas de GG a (A) 1% com aumento de 2000x e (B) 2 % m/v com agitação magnética a 800 rpm, aumento de 35x

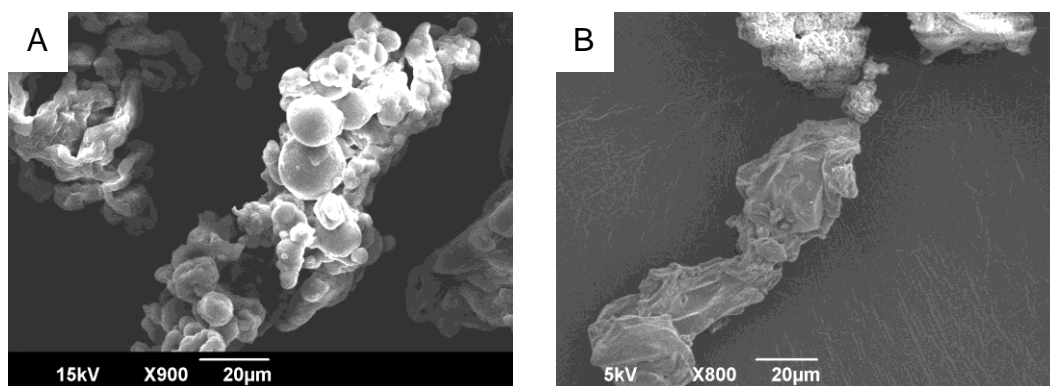


Figura 13. Microscopias das microesferas preparadas com o Ultra-Turrax permitindo observar (A) a coalescência e a floculação e (B) as partículas sem forma definida

Pelas figuras anteriores (12 e 13) pode-se observar que as superfícies das microesferas de GG reticulada formadas se mostram lisas, homogêneas e sem porosidades. Já a Figura 14.A, que mostra uma microesfera de goma guar não reticulada, permite dizer que tal partícula tem uma superfície altamente rugosa, que pode ser característica do intumescimento gerado pela própria umidade relativa do meio. Pela Figura 14.B, que mostra um corte transversal de uma microesfera de GG reticulada, é possível dizer que o interior das microesferas é compacto, com pouca porosidade.

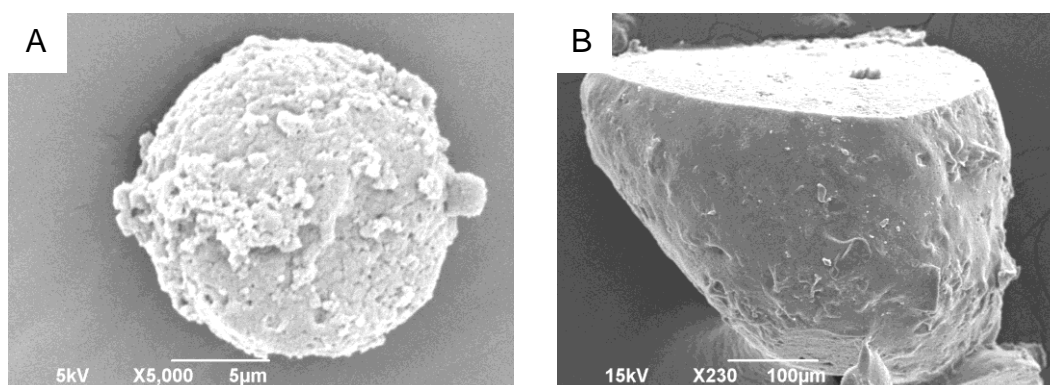


Figura 14. (A) microesfera de GG não reticulada e (B) corte transversal de uma microesfera de GG reticulada

5.2.2.1 Diâmetro médio

Como descrito por Chaurasia e colaboradores, que evidenciaram que o tamanho das esferas depende de diversos fatores, tentou-se nesse trabalho variar três parâmetros – a concentração da goma guar na solução aquosa, a velocidade de dispersão da fase interna e a taxa de gotejamento da fase

interna – a fim de verificar suas dependências em relação ao diâmetro médio das microesferas de GG reticuladas com EDC formadas. As várias formulações estão descritas na Tabela 1, enquanto que na Tabela 2 estão apresentados todos os dados obtidos das diversas formulações em relação ao tamanho médio das microesferas que se formaram:

Tabela 2. Dados obtidos referente ao diâmetro médio obtido para todas as formulações de microesferas de GG preparadas

Amostra	Concentração de goma guar (m/v)	Velocidade de agitação (rpm)	Taxa de gotejamento (mL/h)	Diâmetro médio (μm)	Desvio-padrão (μm)
1	1%	800	20	6,9	$\pm 3,2$
2	2%	800	20	500,4	$\pm 60,1$
3	2%	4000	20	-	-
4	2%	5000	20	10,4	$\pm 5,2$
5	2%	6000	20	10,9	$\pm 4,3$
6	2%	8000	20	10,5	$\pm 4,9$
7	2%	11000	20	8,9	$\pm 4,6$
8	2%	5000	5	14,7	$\pm 1,3$
9	2%	5000	5	18,6	$\pm 1,9$
10	2%	5000	5	18,7	$\pm 1,9$

Primeiramente, com relação à concentração do polímero para a preparação da fase interna, verificou-se uma total dependência no tamanho das microesferas obtidas (observados na Figura 15). Para a concentração da GG a 1% o diâmetro médio das microesferas foi de $6,9 \pm 3,2 \mu\text{m}$ e para a GG a 2% esse valor passou a $500,4 \pm 60,1 \mu\text{m}$, mais de 70 vezes maior. Essa diferença pode ser explicada por dois fatores principais: (i) como a concentração da goma guar utilizada na formulação 1 é menor do que a formulação 2, espera-se que a quantidade de polímero presente em cada glóbulo formado na emulsão seja menor e, com a evaporação da água, a microesfera formada se torne menor; (ii) soluções aquosas de GG são muito viscosas e o aumento dessa viscosidade é proporcional à concentração da solução preparada. Considerando a viscosidade como a propriedade associada à resistência que o fluido oferece a deformação por cisalhamento, pode-se dizer que uma maior viscosidade torna a solução polimérica mais resistente à fragmentação e leva à formação de microesferas de maior diâmetro médio.

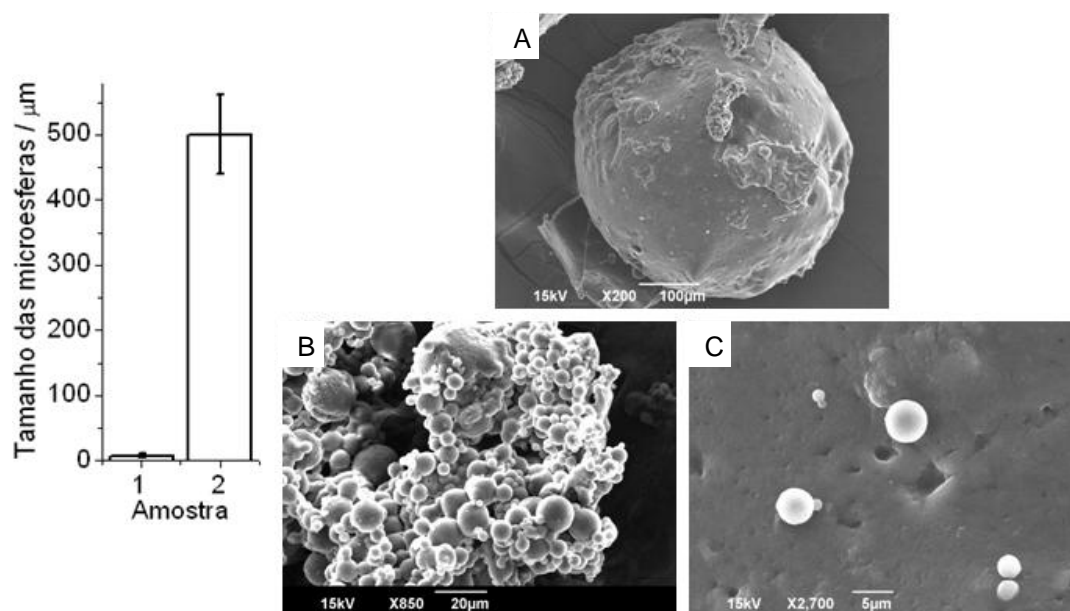


Figura 15. Comparação do tamanho das microesferas formadas em relação à concentração da GG na solução aquosa: (A) aumento de 200x da amostra 2 (concentração a 2% de GG); (B) aumento de 850x e (C) aumento de 2700x da amostra 1 (1% de GG)

Também foi realizado o estudo da influência da velocidade de agitação, pois este é um dos fatores mais importantes que podem afetar o tamanho das partículas obtidas [12, 25]. Para a amostra 3 (dispersão de 4000 rpm) não foi possível a determinação do diâmetro médio pois as partículas formadas não apresentaram forma esférica (Figura 16). Desse modo, construiu-se um gráfico comparando os tamanhos das microesferas preparadas com velocidades de 5000 a 11000 rpm (Figura 17), onde se vê que a influência da velocidade não foi tão significativa, já que o tamanho médio medido para todas essas formulações foi em torno de 10 μm (Figura 17).

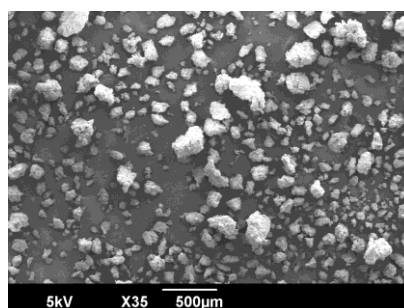


Figura 16. Partículas obtidas com dispersão de 4000 rpm com aumento de 35x

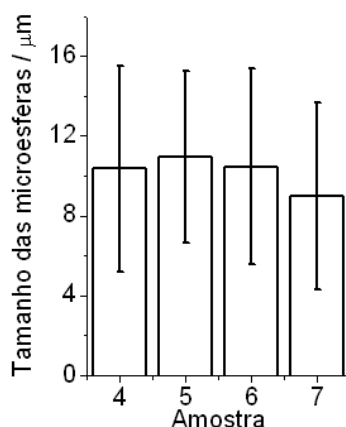


Figura 17. Gráfico de barras de comparação entre os tamanhos das microesferas preparadas com dispersão de 5000, 6000, 8000 e 11000 rpm

Tal fator pode ser resultado da viscosidade da fase interna, significando que as dispersões escolhidas não foram suficientes para que houvesse quebras maiores dos glóbulos durante a formação da emulsão.

A Figura 18 mostra a comparação entre as amostras 4 e 9, ambas foram preparadas com dispersão de 5000 rpm mas com taxas de gotejamento da fase interna na fase externa diferentes, sendo de 20 e de 5 mL.h⁻¹ respectivamente.

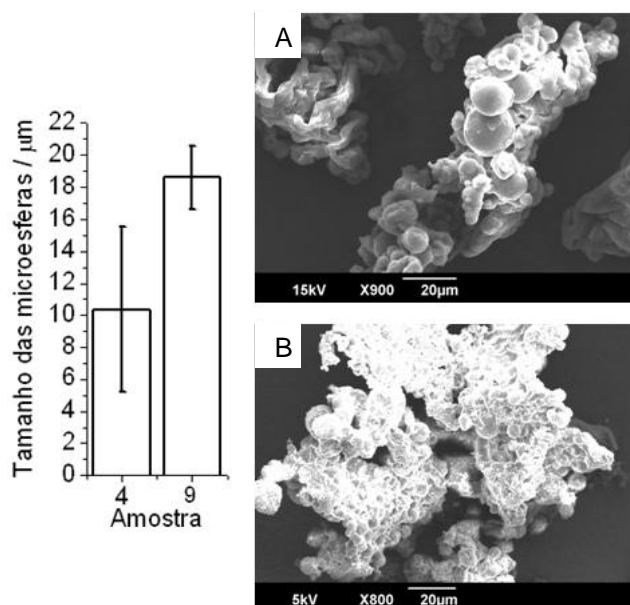


Figura 18. Comparação entre o tamanho das microesferas e a taxa de gotejamento. As microscopias obtidas em (A) mostram a polidispersidade da amostra 4, sendo possível visualizar vários tamanhos para as microesferas, já em (B), relativa à amostra 9, as microesferas apresentam menor polidispersidade

A primeira informação obtida é de que as microesferas formadas foram relativamente menores na amostra 4, porém foram mais polidispersas, isto é,

apresentaram maior variação de tamanho em relação às microesferas obtidas na amostra 9: o desvio-padrão calculado para a amostra 4 foi de $\pm 5,2 \mu\text{m}$ e para a 9 foi de $\pm 1,8 \mu\text{m}$. Essas informações podem ser visualizadas pelas microscopias apresentadas na Figura 18.A e 18.B. Dessa forma, observa-se que a taxa de gotejamento influencia na polidispersidade das microesferas, no sentido de que uma taxa de gotejamento menor é capaz de permitir a formação mais homogênea dos glóbulos (em relação ao tamanho) da fase interna ao permitir um maior tempo de estabilização.

Por fim, foi ainda possível visualizar diferenças nos tamanhos médios das microesferas em relação à composição da fase interna. As amostras 8, 9 e 10 se referem à GG pura, à GG reticulada e à GG reticulada com o AA, respectivamente. As microesferas reticuladas apresentaram um valor bem próximo, de $18,6 \pm 1,9 \mu\text{m}$ para as sem o AA e de $18,7 \pm 1,8 \mu\text{m}$ para as com o AA, porém para as microesferas da GG não reticulada esse valor se mostrou menor, $14,7 \pm 1,3 \mu\text{m}$. Pode-se explicar essa diferença no diâmetro médio considerando a estrutura química da goma guar, que contém vários agrupamentos OH capazes de interagir por ligações de hidrogênio entre si, essa forte interação é capaz de fazer com que a matriz polimérica (no caso, as microesferas) se contraia; já as microesferas de GG reticulada apresentam menores agrupamentos hidroxilas e um maior impedimento estérico para essas ligações de hidrogênio, se apresentando maiores.

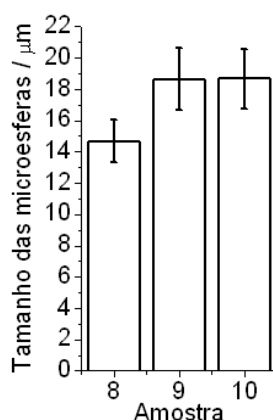


Figura 19. Tamanhos obtidos para as microesferas preparadas mudando-se a composição da fase interna

5.2.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Pela análise por calorimetria diferencial de varredura (DSC) é possível determinar valores das propriedades térmicas do material, como as temperaturas de fusão (T_f) e de transição vítrea (T_g). A T_g é característica de materiais amorfos ou semicristalinos (como muitos polímeros), sendo definida como uma transição de um estado desordenado rígido (vítreo) para um estado desordenado com uma mobilidade maior. Sua determinação é uma das formas de avaliar possíveis mudanças estruturais em sistemas poliméricos.

Na Figura 20 são apresentadas as curvas de DSC obtidas para as microesferas de GG pura e de GG reticulada. Observa-se que a temperatura de transição vítrea aumentou de 68,3 °C para as microesferas de goma guar não reticulada, para 81,6 °C para as microesferas com o EDC, sugerindo a ocorrência de uma mudança estrutural do sistema (aumento na rigidez). Tal fato está de acordo com a literatura, pois se admite que a T_g aumente quando ligações cruzadas são formadas em um sistema, o que acaba por restringir a mobilidade, aumentando a rigidez das cadeias poliméricas [3]. Desta forma, pode-se mostrar que as microesferas de GG com adição do EDC sofreram um processo de reticulação.

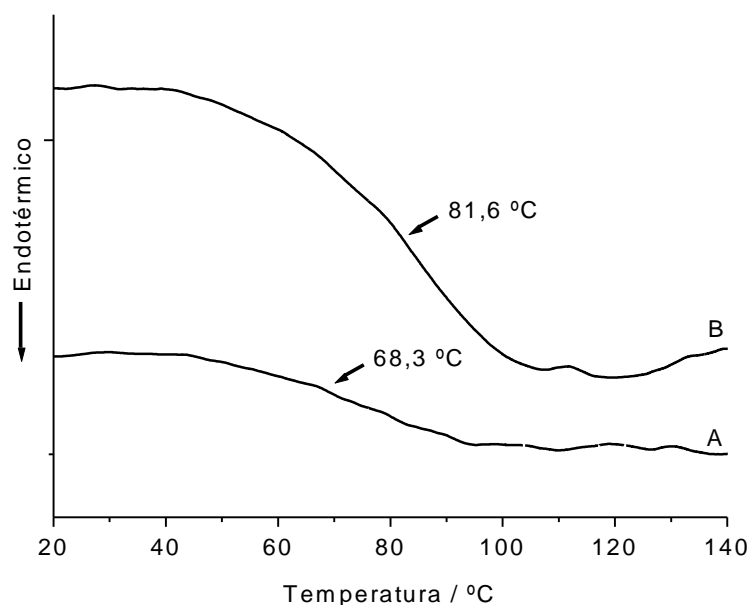


Figura 20. Curvas de DSC obtidas para microesferas de (A) GG pura, (B) GG + 30% EDC

5.2.4 Eficiência da encapsulação (EE)

A Rodamina B (Figura 21) foi escolhida como agente ativo modelo por apresentar elevada hidrossolubilidade, podendo ser facilmente dispersa na fase interna, e fácil detecção pela técnica de espectroscopia no ultravioleta visível (UV/VIS), com um máximo de absorção em 554 nm.

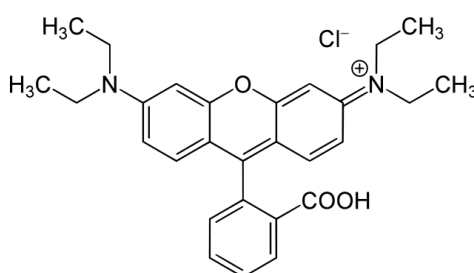


Figura 21. Estrutura química da Rodamina B

A eficiência de encapsulação (EE) é definida como a diferença percentual entre a concentração de agente ativo inicialmente adicionado na formulação e a concentração retida no interior das partículas. Nesse trabalho escolheu-se determinar a EE com o auxílio de uma curva de calibração com adição de padrão (Figura 22) a fim de compensar possíveis influências da matriz no sinal de absorbância.

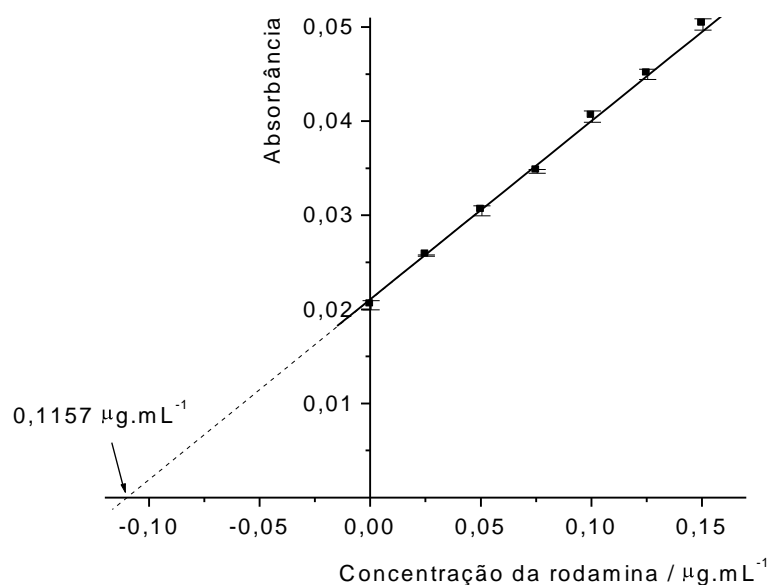


Figura 22. Curva por adição de padrão para determinação da Rodamina B encapsulada nas microesferas de GG

Para as microesferas de goma guar reticulada a eficiência de encapsulação foi de 11,6%. Esse valor é baixo, mas está em concordância com outros valores apresentados na literatura referentes à encapsulação da Rodamina B, que variaram de 19 a 30% de EE [13, 26].

Essa baixa eficiência de encapsulação da Rodamina B em microesferas de GG reticulada pode ser devido à alta solubilidade do AA em água, que tende a migrar do interior da matriz para o exterior à medida que a água vai sendo evaporada durante a formação das microesferas. Como esse processo de evaporação é lento, cerca de 5 h, pode contribuir também para que essa migração seja mais evidente a pouca interação entre a Rodamina B e a GG reticulada.

6 CONCLUSÕES

A técnica de emulsificação/evaporação do solvente se mostrou eficiente para a obtenção de micropartículas de goma guar, pois houve a formação de partículas esféricas, de superfície lisa e homogênea, devido à estabilização da emulsão A/O pelo uso dos dois surfactantes (Span 80 e Tween 80). Porém, a utilização de um dispersor de alta potência (Ultra-Turrax) apresentou resultados insatisfatórios, pois muitas das partículas formadas apresentaram forma indefinida.

Os efeitos da concentração do polímero, da velocidade de agitação e da taxa de gotejamento da solução interna foram determinantes para os diâmetros médios obtidos para as microesferas em cada formulação. De forma geral, pode-se concluir que quanto menor a viscosidade da solução interna, maior a velocidade de agitação e menor a taxa de gotejamento, menor e menos disperso será o tamanho das partículas obtidas.

A reticulação da goma guar pelo EDC foi confirmada por DSC, que mostrou um aumento da T_g para as microesferas reticuladas, significando que houve um aumento da rigidez do sistema devido à formação de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas.

O valor baixo encontrado para a eficiência de encapsulação da Rodamina B nas microesferas de goma guar reticulada é um resultado da migração do agente ativo do interior da matriz juntamente com a evaporação da água, sendo um indicativo da pouca interação entre a Rodamina B e a goma guar.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] CODAGNONE, A.; HECHENLEITNER, A. W.; PINEDA, E.; CAVALCANTI O. Goma Guar Fosfatada: Potencial Excipiente no Desenvolvimento de Filmes Isolados de Etilcelulose. **Acta Farm. Bonaerense**. V. 23, n. 4, p. 448-52. 2004.

[2] M. KOLYBABA, M.; TABIL L.G.; PANIGRAHI S.; CRERAR W. J.; POWELL T.; WANG B. Biodegradable Polymers: Past, Present, and Future. **Trends in Food Science & Technology**. V.14, p.71-78.2007.

[3] AKCELRUD, L. **Fundamentos da ciência dos polímeros**. 1ª Ed. Barueri: Manole, 2007. 288 p.

[4] BORSCHIVER, S.; ALMEIDA, L. F. M. e ROITMAN, T. Monitoramento tecnológico e mercadológico de biopolímeros. **Polímeros**. V.18, n.3, p. 256-261. 2008

[5] UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Programa Educ@r. **Instrumentação para o ensino**. Página desenvolvida por alunos e professores. Disponível em <http://educar.sc.usp.br/licenciatura/2003/quimica/paginahtml/polimeros5.htm>. Acesso em: 1 de maio de 2010.

[6] Bruice, P. **Organic Chemistry**. 4ª Ed. Upper Saddle River: Pearson Education International, 2004. 1228 p.

[7] UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. **Experimentos de bioquímica**. Disponível em http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/praticas_ch/teste_amido.htm. Acesso em: 25 de agosto de 2010.

[8] GLIKO-KABIR, I.; PENHASI, A.; RUBINSTEIN, A. Phosphated crosslinked guar for colon-specific drug delivery I: preparation and physicochemical characterization. **Journal of Controlled Release**. V. 63, p. 121-127. 2000

[9] KAWAGUSHI, H. Funcional polymer microspheres. **Progress in polymer sciences**. V. 25, n. 8, p. 1171-1210. 2000.

[10] PIMENTEL, L.F.; JÁCOME, A.T.; MOSQUEIRA V.C.F.; SANTOS-MAGALHAES N.S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. V.43, n. 4, p. 503-514.2007.

- [11] BATYCKY, R. P. e colaboradores. A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres. **Journal Pharmaceutical Sciences**. V. 86, n. 2, p. 1464-1477. 1997.
- [12] CHAURASIA, M.; CHOURASIA M.K; JAIN N.K.; JAIN A.; SONI V.; GUPTA Y.; JAIN S.K.; Cross-linked guar gum microspheres: a viable approach for improved delivery of anticancer drugs for the treatment of colorectal cancer. **AAPS PharmSciTech**. V.7, n.3, p. 74-82.2006.
- [13] ANDREANI, L. **Desenvolvimento e caracterização de microesferas de glúten de trigo para utilização em sistemas de liberação controlada**. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.
- [14] FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. **Journal of Controlled Release**. V 102, p. 313-332. 2005.
- [15] Weiss, J. Emulsion Stability Determination. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. 2002
- [16] GLEISER, M. Sobre gotas e esferas. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 05/10/2003, Folha Ciência. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/folha/ciencia/ult306u10237.shtml>. Acesso em: 22 de outubro de 2010.
- [17] SHAW, D. J. **Introduction to Colloid and Surface Chemistry**. 4 ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1992.
- [18] FAYAD, S.J. **Obtenção e caracterização de micro e nanopartículas a base de proteína isolada de soja**. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.
- [19] FREITAS, A. B. R.; CAVALCANTI, O. A goma guar como excipiente em matrizes hidrofílicas: avaliação do índice de hidratação. **Acta Farm. Bonaerense**. V 23, n. 3, p. 334-338. 2004.
- [20] YOUNG, S.; WONG M.; TABATA, Y.; MIKOS, A. G.; Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. **Journal of Controlled Release**. V. 109, p. 256-274. 2005

[21] TOMIHATA, K. Cross-linking and biodegradation of native and denatured collagen. **Polymers of Biological and Biomedical Significance**. V. 24,p. 275-286. 1993

[22] BANEGAS, R.S.; **Filmes formados por goma guar: efeito do plastificante e agente reticulante nas propriedades térmicas, mecânicas e absorção de água**. UFSC. 2008.

[23] CUNHA, P.L.R.; PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.P.A. Purification of guar gum for biological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 41, p.324-331. 2007.

[24] LANDFESTER, K. The generation of nanoparticles in miniemulsion. **Advanced Materials**. V. 13, p. 765-768. 2001.

[25] ZANETTI-RAMOS, B. G. Z. **Avaliação do potencial de utilização de um poliuretano obtido a partir de um poliálcool de origem natural como material polimérico para a micro e nanoencapsulação de fármacos**. Tese (Doutorado) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

[26] BERKLAND, C. e colaboradores. Microsphere size, precipitation kinetics and drug distribution control drug release from biodegradable polyanhydride microspheres. **Journal of Controlled Release**. V. 94, p. 129-141. 2004.