

Matrizes de quitosana/gelatina para liberação de Etonogestrel

P.B. Araújo¹; T.G.C. Garcia¹; A.G. Bezerra Junior¹; R.M.R. Colaço¹; W.J.B. Sousa¹; R.C. Barbosa¹; M.V.L. Fook¹

¹ Programa de Pós-Graduando em Ciência e Engenharia de Materiais, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Av. Aprígio Veloso, 882, Bodocongó, Campina Grande – PB, CEP 58429-900.

(Recebido em 06/10/2017; revisado em 09/11/2017; aceito em 16/02/2018)
(Todas as informações contidas neste artigo são de responsabilidade dos autores)

Resumo:

Os usos de métodos anticoncepcionais trouxeram a sociedade um avanço incontestável a mulher, porém, resultou em uma modificação da visão sexual feminina, fazendo com que o início da atividade sexual ocorresse cada vez mais precoce, entretanto a falta do uso dos métodos anticoncepcionais pode acarretar uma da gravidez indesejada. Entre os métodos contraceptivos, tais como os métodos de barreira, uso de fármacos, pode-se destacar os de longa duração, destacando os implantes subdérmico de etonogestrel, onde este fármaco é considerado altamente eficaz no qual possui uma ação de longa duração e uma rápida reversibilidade quando retirado do organismo. Buscando a fabricação de um sistema fármaco de curta duração e menos invasivo, este trabalho teve como objetivo desenvolvimento de membranas biodegradáveis de quitosana e gelatina para liberação do etonogestrel. As membranas foram preparadas pelo método de evaporação de solvente. Soluções de quitosana foram preparadas através da dissolução da quitosana em ácido acético 1% (v/v), sendo acrescentada a gelatina nas proporções de 5 e 10% em relação a massa da quitosana, e posterior a incorporação do fármaco. Para neutralização, as membranas foram submetidas a uma atmosfera de hidróxido de amônio a 2% (v/v) por 48hs. Todas as amostras foram caracterizadas por Difração de raios-X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Citotoxicidade e Molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato. A análise de DRX demonstrou que após a adição do etonogestrel ocorreu um aumento da cristalinidade dos filmes. O ensaio de MEV demonstrou que as membranas com incorporação do fármaco apresentaram superfície homogênea indicando que a incorporação do fármaco ocorreu de forma homogênea. Os espectros de FTIR comprovaram que houve interação entre o Etonogestrel e a matriz polimérica nos grupos amina e amidas do polímero. No ensaio de Citotoxicidade as membranas apresentaram viabilidade celular. A Molhabilidade denotou um caráter hidrofílico. Sendo assim, os resultados sugerem a possibilidade de utilização dos filmes de quitosana e gelatina para liberação de etonogestrel, entretanto ainda são necessários estudos pré-clínicos.

Palavras-chave: Etonogestrel; Bioabsorção; Liberação de Fármaco; Biomateriais.

Abstract:

The use of contraceptive methods has brought society an undeniable advance to women, but has resulted in a change in the female sexual vision, causing the onset of sexual activity to occur more and more precocious, however the lack of use of contraceptive methods can lead to a of unwanted pregnancy. Among contraceptive methods, such as barrier methods, drug use, can be disregarded the long-lasting, highlighting the subdermal implants of etonogestrel, where this drug is considered highly effective in that it has a long-lasting action and a rapid reversibility when withdrawn from the body. The aim of this study was to develop a biodegradable chitosan and gelatin membranes for the release of etonogestrel. The membranes were prepared by the solvent evaporation method. Chitosan solutions were prepared by dissolving chitosan in 1% (v / v) acetic acid, gelatin being added in the proportions of 5 and 10% relative to the chitosan mass, and subsequent to incorporation of the drug. For neutralization, the membranes were submitted to an atmosphere of 2% (v / v) ammonium hydroxide for 48hs. All samples were characterized by X-ray diffraction (XRD), Scanning Electron Microscopy (SEM), Infrared Spectroscopy with Fourier Transform (FTIR), Cytotoxicity and Wettability by Contact Angle Measurement. The DXX analysis showed that after the addition of etonogestrel an increase in the crystallinity of the films occurred. The MEV assay demonstrated that the membranes incorporating the drug had a homogeneous surface indicating that the drug incorporation occurred homogeneously. The FTIR spectra showed that there was interaction between the Etonogestrel and the polymer matrix in the amine and amide groups of the polymer. In the cytotoxicity assay the membranes presented cell viability. Wettability indicated a hydrophilic character. Thus, the results suggest the possibility of using the chitosan and gelatin films to release etonogestrel, however preclinical studies are still necessary.

Keywords: Etonogestrel; Bioabsorption; Controlled Release; Regulation of the estrous cycle.

1. Introdução

Os métodos contraceptivos ao longo dos tempos passaram a ser uma preocupação constante na vida das mulheres com idade fértil em todo o mundo, através da revolução humana no que diz respeito à forma de encarar a sexualidade e a procriação [1].

No Brasil, assim como nos países do terceiro mundo, a divulgação dos Métodos Anticonceptivos (MAC) constituiu e estabelece parte de políticas internacionais, voltadas para a redução da população, garantindo mais eficácia através da taxa de continuidade da medicação hormonal. Porém, nas últimas décadas verifica-se uma alta taxa de gestações, onde esta encontra-se relacionada aos efeitos adversos provocados por parte dos MAC disponível no mercado, levando as usuárias a descontinuar o seu uso [2,3,4].

Existem vários tipos de MAC dentre eles os implantes contraceptivos subcutâneos que podemos destacar o a base do fármaco etonogestrel, que é utilizado num período de tempo de até 3 anos, o mesmo tem rápida reversibilidade do organismo quando retirado do organismo, é aplicado na parte interna do antebraço e liberado continuamente na corrente sanguínea, tendo uma taxa de absorção em torno de 60 mcg/dia, possui mais comodidade e praticidade, não afeta na densidade mineral óssea e atua como coadjuvante no tratamento da dismenorria, o mesmo é vinte vezes mais eficaz do que as tradicionais pílulas anticoncepcionais (taxa de falha <0,1%) [5,6].

Buscando a fabricação sistema de fármaco de curta duração e menos invasivo, buscou-se uma matriz biodegradável. Dentre eles a quitosana apresenta diversas vantagens em relação ao seu uso como biomaterial, por ser um polissacarídeo que estimula o sistema imune *in vitro* e *in vivo* a favorecer o processo cicatricial e também vêm sendo utilizado com fins terapêuticos, pois atua como agente cicatrizante, antimicrobiano e hemostático, além de possuir efeito analgésico [7].

Outro biomaterial que apresenta potencial nas aplicações biomédicas é a gelatina, que é um biopolímero derivado do colágeno uma proteína presente na grande maioria dos seres vivos. A gelatina reage com ácidos, bases, aldeídos, açúcares, íons metálicos, plastificantes, polímeros aniônicos e catiônicos e surfactantes, e devido a estas características ela é amplamente utilizada em sistemas carreadores de fármacos [8,9].

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de membranas biodegradáveis de quitosana e gelatina para liberação do etonogestrel

2. Materiais e Métodos

A pesquisa foi realizada na Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO.

2.1 Materiais

- Quitosana – 75-85 % desacetilada

- Gelatina tipo A
- Ácido Acético Glacial, PA. Vetec
- Hidróxido de amônio, PA. Vetec
- Água destilada.
- Etonogestrel - Sigma Aldrich® ;

2.2 Métodos

2.2.1 Obtenção das membranas de quitosana

As membranas foram preparadas pelo método de evaporação de solvente, através da dissolução do polímero em ácido acético (1% v/v), para uma concentração final da solução polimérica (1% m/v), sob agitação magnética por um período de 2 horas a aproximadamente 40 °C.

Após obtenção da solução de quitosana, a mesma foi distribuída em placa de petri de acrílico de 5,5 cm, com volume final em cada placa de 30 ml de solução e submetidas à secagem na estufa a 37 °C por 7 dias para completa evaporação do solvente. Posteriormente as amostras foram neutralizadas, submetidas a uma atmosfera de hidróxido de amônio a 2 % (v/v) por 48hs .

2.2.2 Obtenção das membranas de quitosana com gelatina

As membranas de quitosana com gelatina foram preparadas seguindo a metodologia anteriormente citada, sendo acrescida na solução de quitosana, a gelatina nas concentrações de 5 e 10 % (m/m), em relação a concentração mássica da quitosana adicionada na solução.

2.2.3 Obtenção das membranas de quitosana com gelatina e Etonogestrel

Inicialmente, o etonogestrel na proporção de 5 mg foi colocada dentro das soluções de quitosana com e sem gelatina, obtidas nas etapas anteriores, após a adição as soluções foram mantidas sob agitação magnética até a total homogeneização das soluções.

Nesta etapa as membranas também foram obtidas utilizando a mesma metodologia das membranas descritas no item anterior. Todas as amostras foram caracterizadas por Difração de raios-X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Citotoxicidade e Tensão Superficial por Ângulo de Contato. Foram preparadas 5 amostras de cada tipo de material, para cada ensaio.

2.3 Caracterização

2.3.1 Difração de raios-X (DRX)

As análises de difração de raios X foram conduzidas a temperatura ambiente em aparelho XRD-6000 Shimadzu, utilizando radiação K α do cobre (1,5418 Å), tensão de 40 kV e corrente 30 mA. As amostras foram examinadas em um intervalo de 2 θ entre 5 e 30,0 graus a uma velocidade de

2°/min. O objetivo deste ensaio foi estudar o comportamento cristalográfico do material.

2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)/ Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS)

Para realização das análises foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura de bancada, modelo TM-1000, marca Hitachi, com aumento de até 10000x, profundidade de foco de 1mm, resolução de 30nm, 15KV, baixo vácuo e pressão variada (1 a 270Pa), sem recobrimento metálico. O MEV foi utilizado para identificar a morfologia da superfície e da estrutura formada, o tamanho, a forma e a distribuição dos poros das membranas. As imagens foram obtidas na magnificação de 500x.

A caracterização por EDS foi realizada na mesma magnitude e imagem do MEV, com finalidade de determinar a composição pontual do biomaterial, isto pelo sistema para micro análise químico por Espectroscopia de Energia Dispersiva – EDS acoplado no MEV.

2.3.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras foram submetidas a técnica de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), em temperatura ambiente, o equipamento utilizado foi o Spectrum 400 da Perkin Elmer. A técnica FTIR foi realizada para identificar as bandas características dos grupos funcionais presentes nas amostras, utilizando a faixa de varredura de 4000 a 650 cm^{-1} .

2.3.4 Citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* das membranas foi realizada pelo teste de avaliação da viabilidade celular dos macrófagos por MTT [brometo de 3-(4,5dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] de acordo com a ISO 10993-5:2009. Os parâmetros de avaliação observados são a porcentagem de morte celular e a IC50 (concentração do produto que inibe 50% do crescimento celular). O MTT é um ensaio colorimétrico quantitativo, sensível e de confiança que mensura a viabilidade, proliferação e atividade das células, baseando-se na capacidade da enzima desidrogenase encontrada nas mitocôndrias de células vivas converter o substrato amarelo, solúvel em água (MTT) em produto de cor púrpura, decorrente da formação de cristais de formazana, que são insolúveis em água, que poderão ser então detectados através da leitura da absorbância em um espectrofotômetro. A quantidade do formazana produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

2.3.5 Molhabilidade por Medidas do Ângulo de Contato

A técnica consiste no cálculo da Molhabilidade da membrana baseada na análise do formato da gota. O ângulo de molhabilidade entre a água com tensão superficial conhecida e a superfície sólida, depende da relação entre as

forças adesivas, que fazem com que a gota se espalhe sobre a superfície.

Sendo assim, o ângulo formado representa o perfil da amostra, deste modo, aquelas que apresentem ângulo de contato acima de 90° são denominadas hidrofóbicas e abaixo de 90° são denominadas hidrofílicas.

Na realização desta análise foi utilizado um goniômetro.

3. Resultados e Discussões

3.1 Difração de raios-X (DRX)

Na Figura 1 observa-se os difratogramas das amostras analisadas, onde nota-se um perfil semicristalino em 2θ em torno de uma banda de 5° a 40°. Foi possível identificar também que após a adição de gelatina tem-se um aumento da intensidade do pico nos perfis observados, isso justifica pelo fato de que a gelatina apresenta maior cristalinidade do que a quitosana, sendo assim o aumento da gelatina nas amostras fez com que aumentasse a cristalinidade dos filmes obtidos.

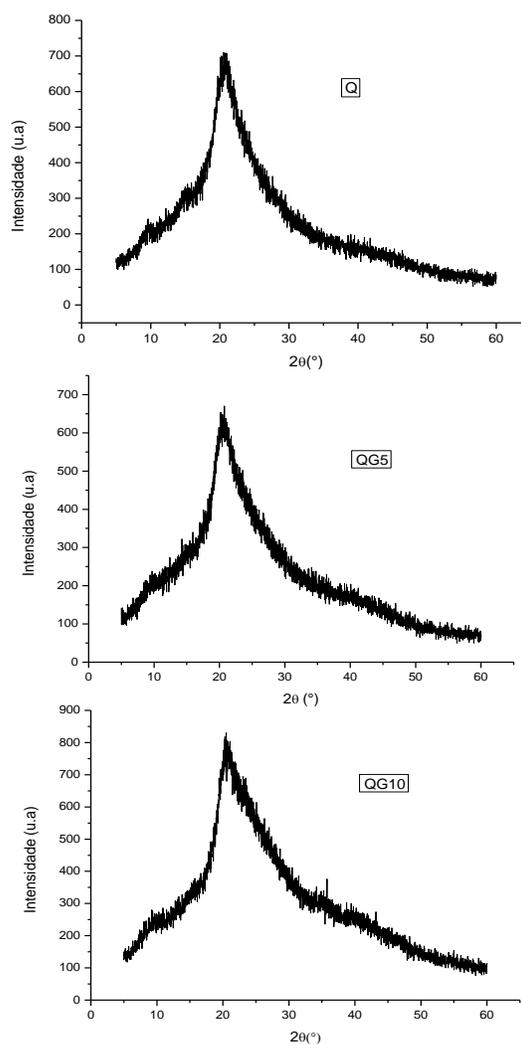


Figura 1 – Difratograma de Raios X das amostras de quitosana e quitosana com gelatina.

Fidèles [10] e Holanda [11] quando trabalharam com filmes de quitosana, observaram uma única banda larga encontrada em torno de 15-30°, com pico máximo 2 θ em torno de 20°, sendo este comportamento típico de polímeros semicristalinos. Segundo Araújo *et al.* [12] essa característica de banda larga indica que a base polimérica da quitosana seguida pelas ligações N-glicosídicas entre os monômeros da estrutura, ocasiona em desordenamento cristalino devido as longas distâncias interatômicas, gerando uma estrutura aleatória. A Figura 2 ilustra os difratogramas dos perfis das amostras com Etonogestrel.

Nota-se nos difratogramas com o fármaco um perfil semicristalino, entretanto com a incorporação do mesmo observou-se um aumento significativo na cristalinidade das amostras, esse aumento ocorre em função do perfil cristalino do fármaco (Etonogestrel) e do aumento na adição de gelatina nos filmes obtidos.

Esses resultados estão de acordo com os encontrados nos estudos de Klauss [13] no desenvolvimento de dispositivos poliméricos implantáveis para a liberação de fármaco, onde observou-se um perfil cristalino na amostra de etonogestrel analisada, com picos intensos em 2 θ em torno de 10,5° a 17°.

3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) / e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

A Figura 3 ilustra as imagens obtidas de MEV das amostras de quitosana e quitosana com gelatina. Na análise da morfologia das membranas, observa-se uma superfície densa e lisa, com a presença de algumas partículas dispersas, provavelmente ocasionadas no processo de solubilização da solução.

Ao analisar os dados da Tabela 1, constatou-se a presença dos elementos oxigênio, nitrogênio e carbono presentes nos filmes, característicos da quitosana e da gelatina, nota-se também a presença do elemento silício, que possivelmente é proveniente de uma contaminação que ocorreu durante o processamento das amostras.

Comparando com os resultados encontrados no ensaio, os estudos apresentados por Nascimento [14] nas análises das micrografias de membranas de quitosana, constatou que as mesmas se apresentaram densas, lisas e planas e sem a presenças de poros.

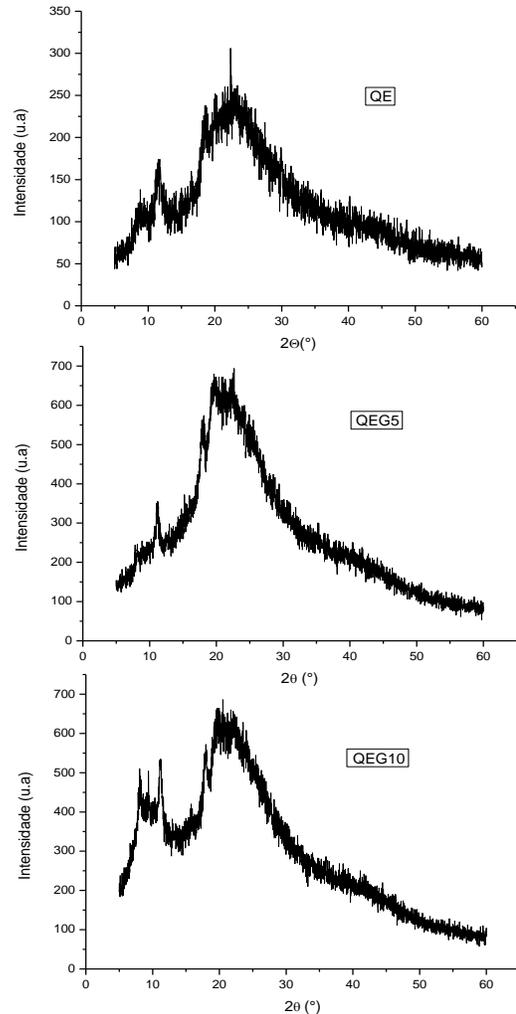


Figura 2 – Difratograma de Raios X das amostras de quitosana com etonogestrel, quitosana com etonogestrel e gelatina.



Figura 3 – Imagens de MEV das membranas de quitosana e quitosana com gelatina.

Tabela 1 - Identificação da composição química das amostras de quitosana e quitosana com gelatina, realizada por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).

AMOSTRAS	Oxigênio (%)	Nitrogênio (%)	Carbono (%)	Silício (%)
Q	75,9 %	12,5 %	11,6 %	-
QEG5	70,3%	13,8%	13,2%	2,7%
QEG10	72,8%	13,8%	13,4%	-

Nas imagens de MEV (Figura 4), as membranas de quitosana com fármaco e quitosana com fármaco e gelatina, apresenta uma morfologia lisa, densa com a presença de algumas rugosidades na amostra QEG5, provenientes do processamento na placa de petri.

Na análise de espectroscopia por energia dispersiva de raios x (Tabela 2), após a adição do fármaco observa-se um aumento no percentual do elemento oxigênio característico da molécula de Etonogestrel.

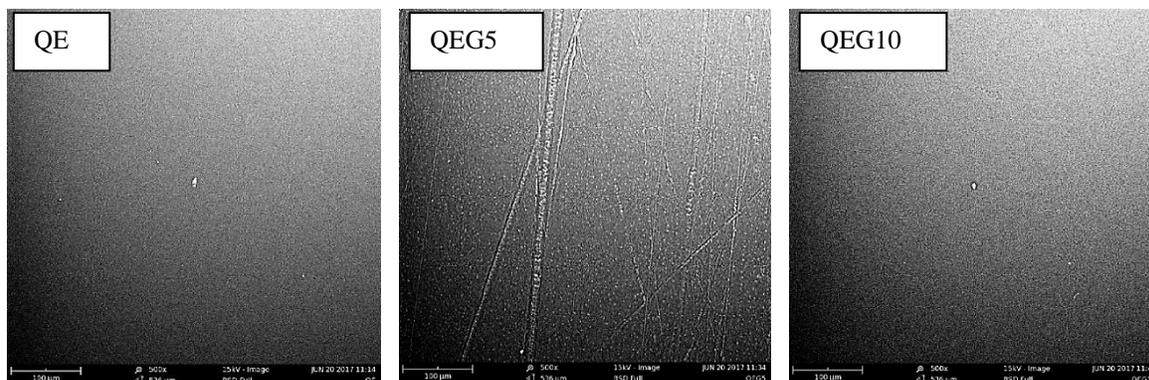


Figura 4 - Micrografia eletrônica de varredura da membrana de quitosana com etonogestrel, quitosana com etonogestrel e gelatina.

Tabela 2 - Identificação da composição química das amostras de quitosana com fármaco e quitosana com fármaco e gelatina, realizada por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).

AMOSTRA	Oxigênio (%)	Nitrogênio (%)	Carbono (%)
QE	81%	11%	8%
QEG5	73,5%	14,5%	12%
QEG10	78,9%	12%	9,2%

Não se observa diferenças morfológicas entre as membranas com e sem fármaco, como evidenciado nos estudos Furtado [15], onde identificou-se a separação da interface entre a matriz polimérica e o fármaco, o que indica que a incorporação do fármaco foi adequada, já que os filmes se apresentaram de forma homogênea.

3.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR foi realizada para avaliar se ocorreu a interação entre os grupos funcionais característicos dos materiais utilizados para obtenção do biocompósito nesta pesquisa. A Figura 5 ilustra o espectro obtido da Quitosana.

Analisando o espectro de infravermelho da quitosana constata-se que o mesmo apresentou bandas de absorções na região entre 3670 a 3000 cm^{-1} referente as vibrações de

estiramento dos grupos OH e NH. Na região em torno de 2970 a 2850 cm^{-1} observa-se vibrações de deformação axial referente a carbonos alifáticos C-N.

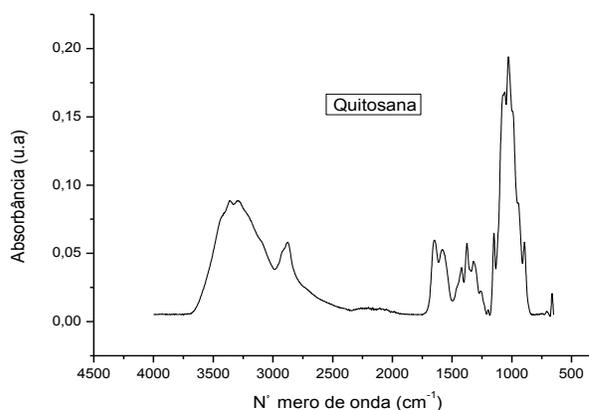


Figura 5 – Espectro de FTIR do pó da Quitosana.

Nas bandas referentes as regiões entorno de 1700 a 1630 cm^{-1} e 1600 a 1530 cm^{-1} , nota-se vibrações de deformação axial de duplas ligações C=O de amidas N-substituídas e à deformação angular simétrica no plano do grupo NH2 respectivamente. Em torno de 1420 cm^{-1} observa-se vibrações do tipo de deformação axial do grupo C-O. A banda em 1068 cm^{-1} é referente a deformações axiais e angulares de ligações C-O de álcoois, e por fim as bandas nas regiões de 1152, 1022 e 901 cm^{-1} são atribuídas ao alongamento -C-O-C-, estes

resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Camacho *et al.* [16] e Rachipudi *et al.* [17].

A Figura 6 ilustra o espectro de FTIR da Gelatina em pó, no qual foi possível identificar os seus grupos característicos.

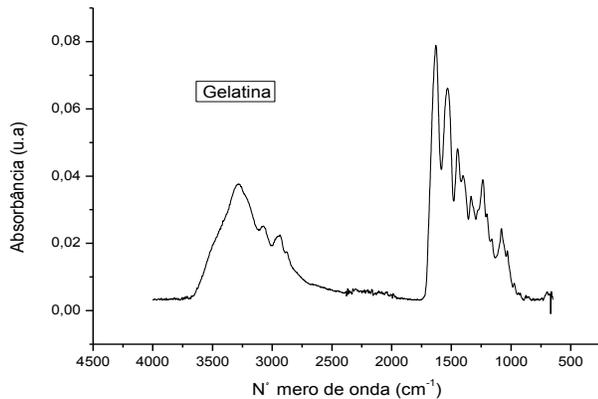


Figura 6 – Espectro de FTIR do Gelatina em pó.

Na região de 3290 cm^{-1} , apresenta-se banda forte, larga, resultante da associação polimérica das vibrações de deformação axial do grupo O-H. Nas bandas 1632 , 1537 e 1450 cm^{-1} , observa-se as vibrações do tipo deformação axial e angular de amina e amidas substituídas do grupo N-H e do grupo CH_2 respectivamente. Nas regiões 1331 , 1241 , 1084 cm^{-1} , é possível identificar as vibrações do tipo deformação axial e angular de carbonos aromáticos e alifáticos do grupo C-N e do grupo C-O de álcoois secundários.

Analisando os espectros de FTIR dos filmes obtidos (Figura 7) de quitosana e quitosana com gelatina, com e sem fármaco, pode-se notar que após a incorporação do fármaco houve um aumento na intensidade de todas as bandas, além disso pode ser observado na região 3290 , 1540 e 1410 cm^{-1} um deslocamento das bandas referente ao estiramento O-H e as bandas amina e amidas respectivamente, o que possivelmente evidencia a interação entre o fármaco e a matriz polimérica.

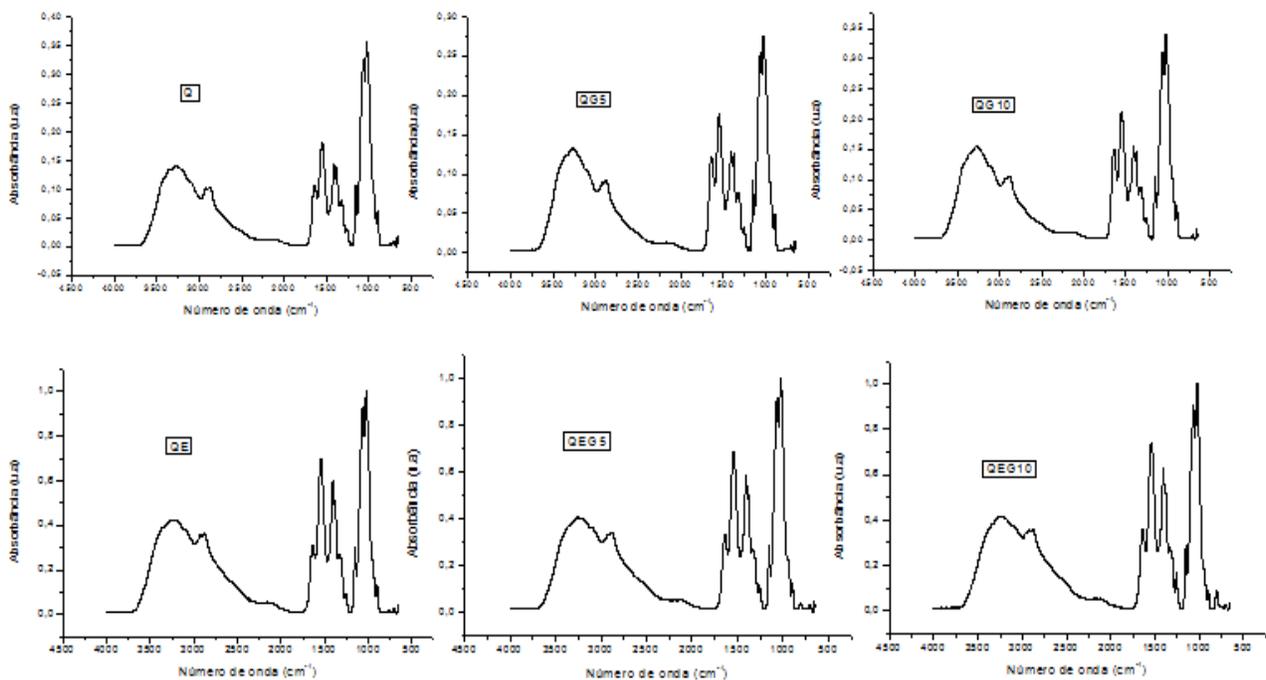


Figura 7 – Espectros de FTIR das membranas de quitosana e quitosana com gelatina, com e sem fármaco.

Comparando com os resultados encontrados por Liu [18], observou-se as seguintes bandas referentes ao espectro de gelatina, em 3290 cm^{-1} referente ao estiramento O-H, na região 1656 cm^{-1} referente ao estiramento da carbonila (amida I), em 1556 cm^{-1} vibrações no plano da ligação N-H e ao estiramento C-H (amida II), esses resultados corroboram com os encontrados neste trabalho, confirmando assim os grupos característicos da molécula de gelatina.

Vulcani e Plepis [19] quando avaliaram o espectro da matriz polimérica de colágeno para liberação de progesterona, observaram no espectro do colágeno as bandas 1450 e 1235 cm^{-1} , no espectro da progesterona as bandas características da molécula estão em torno da região entre 1700 e 1200 cm^{-1} , para tanto, notaram que com a incorporação da progesterona na matriz polimérica as bandas características do colágeno em 1450 e 1235 cm^{-1} sofreram sobreposição em torno de 1650 e 1400 cm^{-1} , deste modo, esses resultados podem sugerir e

reafirmar a hipótese de uma possível interação química entre o Etonogestrel e a matriz polimérica, como anteriormente evidenciado.

3.4 Citotoxicidade

A avaliação da atividade citotóxica das membranas foi realizada pelo método do MTT e teve por objetivo avaliar a viabilidade das células em face do material produzido para uso em organismos vivos, pois todo material que tem por finalidade ser utilizado em ser vivo deve, como regra de segurança, não ser tóxico e ser biocompatível. Os resultados de citotoxicidade das membranas estão ilustrados na Figura 8.

Quando comparado o percentual de citotoxicidade das membranas com o valor mínimo determinado por Bispo [20], que é de 50%, e pela norma ISO 10993-5:2009 que é de 70%, pode-se afirmar que todas as membranas se apresentam viáveis, uma vez que encontram-se com percentual de viabilidade acima de 80%.

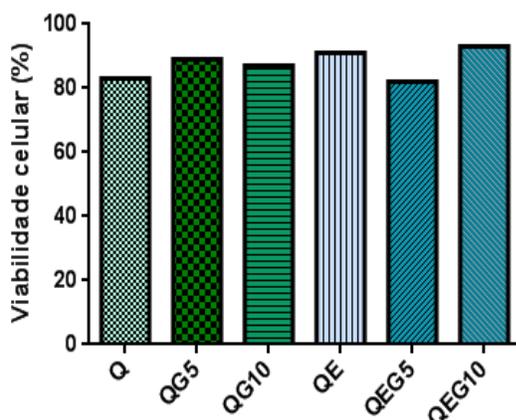


Figura 8 - Viabilidade celular das membranas de quitosana e quitosana com gelatina, com e sem fármaco.

3.5 Molhabilidade por Medidas do Ângulo de Contato

A técnica é fundamentada na medida do ângulo de contato da gota, o qual avalia as características de hidrofiliabilidade e hidrofobicidade, portanto para materiais que apresentem ângulo de contato maior que 90° considerar-se-á material com perfil hidrofóbico, porém quando o material apresentar ângulo de contato inferior a 90° o mesmo é dito como material de perfil caracteristicamente hidrofílico. A Figura 9 ilustra os valores de Molhabilidade das membranas.

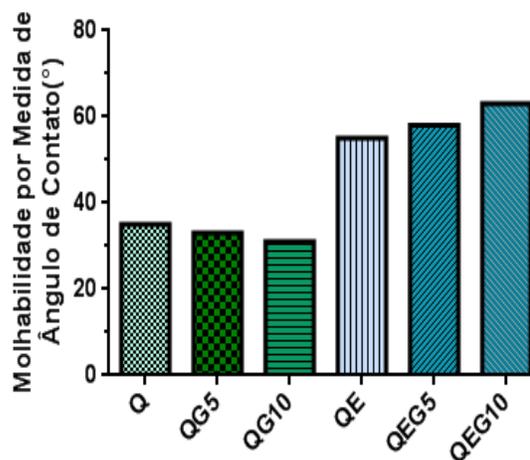


Figura 9 – Gráfico com os valores referente a Molhabilidade por medida de ângulo de contato das amostras analisadas.

A partir dos valores obtidos, nota-se um aumento no ângulo de contato das amostras após a incorporação do fármaco, isso se justifica pelo o aumento da cristalinidade das mesmas em decorrência da adição do Etonogestrel, entretanto os valores evidenciam que as amostras apresentam um caráter hidrofílico, visto que os valores observados estão abaixo do ângulo de contato de 90° .

A molhabilidade é afetada pela presença de grupos polares e não polares na superfície. A incorporação de grupos funcionais tais como: C-OH (álcool), C-O-O-H (hidro peróxido), H-C=O (aldeído), C=O (carbonila), C-O-C=O (Ester), C-O-O (peróxido), H-O-C=O (ácido) e NH₂ (amina), através do ataque a superfície polimérica podem provocar modificação superficial [21]. Esse fato pode então explicar as interações químicas ocorridas entre o fármaco e a matriz polimérica.

A molécula do Etonogestrel apresenta um caráter anfipático, ou seja, a mesma apresenta regiões com grupos polares e apolares. Possivelmente os grupamentos hidroxila e carbonila da molécula do Etonogestrel, interagiram com os grupamentos amins e amidas da matriz polimérica, como anteriormente observado pela Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier, essa ligação expôs o grupamento apolar da molécula do fármaco (C≡C) na superfície, tornando os filmes menos hidrofílicos após a incorporação do Etonogestrel.

Conclusão

As membranas apresentaram-se uniformes e o fármaco interagiu bem com a matriz polimérica, além disso alta viabilidade celular e os resultados de tensão superficial sugerem a possibilidade de utilização dos filmes de quitosana e gelatina para liberação controlada de progesterona em sistemas in vivo, entretanto ainda são necessários estudos pré-clínicos.

Referências

- [1] Lima, L. R. M.; Vaz, S. N. D. A.; Partata, A. K. Contracepção medicamentosa em situações especiais. *Revista Científica do ITPAC*. v. 4, n. 2, abr., 2011.
- [2] Moraes, M. S. T.; Oliveira, R. C.; Santos, J. M.; Lucena Júnior, R. P.; Queiroz, J. R. C.; Cobucci, R. N. O. Efeitos adversos em usuárias de implantes contraceptivos. *FEMINA*. v. 43, n. 1, fev., 2015.
- [3] Carmo, L. S. M. P.; Braga, G. C.; Ferriani, R. A.; Quintana, S. M.; Vieira, C. S. Timing of Etonogestrel-Releasing Implants and Growth of Breastfed Infants. A Randomized Controlled Trial. *Obstetrics & Gynecology*. v. 130, n. 1, jul., 2017.
- [4] Albuquerque, A. P. S.; Pitangui, A. C. R.; Rodrigues, P. M. G.; Araujo, R. C. Prevalence of rapid repeat pregnancy and associated factors in adolescents in Caruaru, Pernambuco. *Rev. Bras. Saude Mater. Infant.*, v. 17, n. 2, pp. 347-354, jun., 2017.
- [5] Casey, P. M.; Long, M. E.; Marnach, M. L.; Fleming-Harvey, J.; Drozdowicz, L. B.; Weaver, A. L. Association of body mass index with removal of etonogestrel subdermal implant. *Contraception*. v. 87, n. 3, pp. 370-374, 2013.
- [6] Moraes, M. S. T.; Oliveira, R. C.; Santos, J. M.; Lucena Júnior, R. P.; Queiroz, J. R. C.; Cobucci, R. N. O. Efeitos adversos em usuárias de implantes contraceptivos. *FEMINA*. v. 43, n. 1, fev., 2015.
- [7] Senel, S., McClure, J. S. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 1467-1480, 2004
- [8] Prestes, R. C. Colágeno e seus derivados: Características e Aplicações em Produtos Cárneos. *UNOPAR CientCiêncBiol Saúde*, v.15, p. 65-74, 2012.
- [9] Bader, R. A., Putnam, D. A. (2014). *Engineering polymer systems for improved drug delivery*. New York: Wiley.
- [10] Fidèles, T. B. Filmes reticulados de quitosana para aplicação como biomaterial. 2010. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciência e Tecnologia. Campina Grande, 2010.
- [11] Holanda, A. L. Membranas de Quitosana para uso em Sistema de Liberação Controlada de Insulina: Síntese e Caracterização. 2011. (Tese Doutorado). Universidade Federal de Campina Grande. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos. Campina Grande.
- [12] Araújo, P. M. A. G., Santos, P. T. A., Santos, P. T. A., Costa, A. C. F. M., Araújo, E. M. Obtenção de filmes de quitosana para aplicação em Engenharia de Tecido. Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais. Natal – RN, 2012.
- [13] Klauss, P. Dispositivos poliméricos implantáveis para a liberação de fármaco. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Santa Catarina. 2010.
- [14] Nascimento, I. V. S. R. Desenvolvimento de Sistemas Quitosana/Piperina para liberação controlada de fármacos. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande. 2014.
- [15] Furtado, G. T. S. Quitosana/Curcumina: Membranas de liberação controlada para tratamento de melanoma. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande. 2014.
- [16] Camacho, A. P. M. Cortez-Rocha, M.O.; Ezquerra-Brauer, J.M.; Graciano-Verdugo, A.Z.; Rodriguez-Félix, F.; Castillo-Ortega, M.M.; Yépiz-Gómez, M.S.; Plascencia-Jatomea, M. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*, v.82, p.305–315, 2010.
- [17] Rachipudi, P. S., Kittur, A. A. A. M, Kariduraganavarm, Y. Synthesis and characterization of hybrid membranes using chitosan and 2-(3,4-epoxycyclohexyl) ethyltrimethoxysilane for pervaporation dehydration of isopropanol. *Journal of Membrane Solenoe on SolenoeDireotv*. 441, n.15, p.83–92, 2013.
- [18] Liu, D., Ewi, Y., Yao, P., Jiang, L. Determination of degree of acetylation of chitosan by UV spectrophotometry using dual standards. *Carbohydrate Research*, v. 341, p. 782-785, 2006.
- [19] Vulcani, V. A. S, Plepis, A. M. G. Ensaios de liberação in vitro de progesterona a partir de matrizes de colágeno aniônico. *Vet. Not., Uberlândia*, v. 12, n. 2, p. 47-54, ago-dez. 2006.
- [20] Bispo, V. M. Estudo do efeito da reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA. 2009. 140p. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas), Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.
- [21] Macêdo, M. O. C., Macêdo, H. R. A., Silva, G. C., Silva, M. A. M., Júnior, C. A. Estudo comparativo da modificação superficial de membranas de quitosana tratadas por plasma de oxigênio, nitrogênio e hidrogênio. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.7.2 (2012) 95 – 103.