

Obtenção e Avaliação de Filmes de Gelatina/Quitosana para Liberação Sublingual de Midazolam

F. P. Brita¹; T. G. C. Garcia¹; A. G. Bezerra Junior¹; W. J. B. Sousa^{1*}; R. C. Barbosa¹; A. F. Tomaz²; 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

² Universidade Estadual da Paraíba, Av. Baraúnas, 351, Bairro Universitário, Bodocongó, Campina Grande – PB, CEP 58429-500

(Recebido em 09/04/2018; revisado em 19/04/2018; aceito em 23/04/2018)
(Todas as informações contidas neste artigo são de responsabilidade dos autores)

Resumo:

O desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos torna-se cada vez mais importante na promoção das ações terapêuticas a fim de reduzir as limitações nas terapias existentes. Diante disso, o uso de polímeros como a quitosana, que apresentam características de biodegradabilidade, biocompatibilidade, mucoadesão, associada com outros polímeros como a gelatina, apresenta-se como uma alternativa para um sistema de liberação controlada de fármaco de vários medicamentos, incluindo os benzodiazepínicos. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo obter membranas de Quitosana/Gelatina para liberação sublingual do Midazolam. As membranas foram preparadas pelo método de evaporação de solvente, através da dissolução da quitosana em ácido acético (1% v/v), para uma concentração final da solução polimérica (1% m/v), seguida da incorporação de gelatina (20% m/m) e Midazolam (0,03mg/mL). Após a obtenção as membranas foram caracterizadas por meio de análises de DRX, MO, FTIR e Molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato. No ensaio de DRX observou-se que a incorporação do fármaco e da gelatina na solução de quitosana possibilitou a redução da cristalinidade da membrana. Na MO observou-se membranas com superfícies uniformes e densas. No ensaio de FTIR evidenciou-se a interação do fármaco e da gelatina com os grupamentos hidroxila e amina da quitosana. Os resultados Molhabilidade demonstraram que o material tem caráter hidrofílico e que a incorporação do fármaco possibilitou a redução da hidrofobicidade do mesmo. Mediante o exposto conclui-se, que o sistema apresentou homogeneidade e adequada interação química entre os constituintes e foi possível obter membranas de Quitosana/Gelatina incorporadas com Midazolam.

Palavras-chave: Sedativo. Liberação controlada. Polímeros. Midazolam.

Abstract:

The development of new drug delivery systems becomes increasingly important in promoting therapeutic actions in order to reduce the limitations of current therapies. Therefore, the use of polymers such as chitosan, which exhibit characteristics of biodegradability, biocompatibility, mucoadhesion, associated with other polymers such as gelatin, is an alternative to a controlled drug release system of several drugs, including benzodiazepines. Thus, the present work aimed to obtain Chitosan/Gelatin membranes for sublingual Midazolam's release. The membranes were prepared by the solvent evaporation method, by dissolving the chitosan in acetic acid (1% v/v), to a final concentration of the polymer solution (1% m/v), followed by the incorporation of gelatin (20% m/m) and Midazolam (0.03mg/mL). After production, the membranes were characterized by means of XRD, OM, FTIR and Wettability by Contact Angle Measurement. From XRD data, the reduction of the membrane crystallinity was evidenced along with the incorporation of the drug and gelatin in the chitosan solution. In the OM images, membranes with uniform and dense surfaces were observed. In the FTIR spectra the interaction of the drug and gelatin with the hydroxyl and amine groups of the chitosan was evidenced. Wettability results demonstrated the material has a hydrophilic character and the incorporation of the drug enabled the reduction of its hydrophilicity. It can be concluded the system produced has homogeneity and adequate chemical interaction as well as it was possible to obtain Chitosan/Gelatin membranes incorporated with Midazolam.

Key-words: Sedative. Controlled release. Polymers. Midazolam.

*E-mail: wladymyrjb@yahoo.com.br (W. J. B. Sousa)

1. Introdução

Nos últimos anos, tem aumentado consideravelmente o interesse pelos polímeros de origem natural como a gelatina, quitosana, caseína, soja, glúten, alginato entre outros para o desenvolvimento de materiais com diferentes aplicações [1].

Entre os polímeros supracitados, a gelatina apresenta-se como uma mistura de proteínas solúveis em água obtida de matérias-primas de origem animal contendo colágeno, e as frações de proteína consistem basicamente dos aminoácidos como glicina, prolina, hidroxiprolina, ácido glutâmico, alanina, arginina, ácido aspártico, lisina, leucina, valina, fenilalanina, treonina, isoleucina, metionina, histidina, tirosina, serina, cistina e cisteína [2].

Outro polímero amplamente estudado é a quitosana, sendo este um polímero biodegradável, biocompatível e atóxico, produzidos por fontes naturais renováveis, cujas propriedades vêm sendo exploradas em aplicações industriais e tecnológicas há vários anos. Após o seu descobrimento houve conflitos na definição entre quitina, quitosana e celulose devido às estruturas semelhantes, deste modo, observou-se que a celulose tem um grupo hidroxila no carbono 2 do anel glicopiranosídeo enquanto a quitosana tem um grupo amino, além disso, a diferença entre quitina e quitosana está na presença de grupos desacetilados na sua estrutura, sendo assim denominada de quitosana quando apresentar valores de desacetilação acima de 50% [3].

O uso de polímeros, principalmente os naturais, tem sido de vital importância para o avanço das ciências, tendo muitas vantagens como a sua fácil obtenção, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Esses materiais poliméricos vêm sendo empregados em diversos campos como na engenharia de tecidos, implante de dispositivos médicos e órgãos artificiais, próteses, oftalmologia, farmacêutica, odontologia e em sistema de liberação controlada de fármacos [4].

O desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos é fundamental na promoção das ações terapêuticas, entretanto para isso ser possível, novas tecnologias devem ser desenvolvidas, reduzindo as limitações nas terapias existentes [5].

A liberação controlada de fármaco e a engenharia de tecido parecem ser os principais interesses para uma melhor compreensão dos princípios da química de polímeros como a quitina e a quitosana, notadamente os de modificações químicas, de biodegradação, de efeitos em vários tecidos, de distribuição em vários órgãos do corpo, de mucoadesão, de associação de quitosana com outros polímeros como a gelatina e também com compostos inorgânicos e de transformações tecnológicas avançadas [6, 7, 8, 9].

Devido as suas propriedades favoráveis de biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioatividade, a quitosana tem sido usada como biomaterial na área biomédica e farmacêutica, associada a vários medicamentos, incluindo os benzodiazepínicos [10].

Biomateriais de gelatina e quitosana são biodegradáveis e suas estruturas poliméricas permitem a incorporação de agentes bioativos, como os diversos fármacos, o que vai depender da finalidade de uso. Essa associação tem tido

grande aplicação nos sistemas de liberação de fármaco devido à capacidade destas se ligarem aos diferentes materiais e poder influenciar no tempo de degradação do sistema e conseqüentemente no tempo de liberação da droga.

Ao comparar os Sistemas de Liberação Controlada (SLC) de fármacos com os sistemas convencionais, observa-se que os métodos convencionais estão longe do ideal, proporcionando variações consideráveis na concentração do fármaco no plasma sanguíneo, influenciando no efeito farmacológico o que pode ocasionar intoxicação, pois há uma faixa de concentração efetiva para a ação no organismo. Já o método de liberação controlada proporciona uma pequena variação na concentração do fármaco com o tempo, impossibilitando inefetividade ou toxicidade [11].

Tendo em vista a relevante importância dos biomateriais e sua aplicabilidade em sistemas de liberação controlada de fármacos, revelando-se promissoras nas pesquisas biomédicas, esse trabalho objetivou obter membranas de Quitosana/Gelatina para liberação sublingual do Midazolam.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

- Quitosana 90% desacetilada, CERTIBIO.
- Gelatina tipo A - Sigma Aldrich®.
- Ácido Acético Glacial - Vetec®.
- Hidróxido de Sódio - Vetec®.
- Água destilada.
- Midazolam - Cristália.

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 h, à uma temperatura de 40° .

Após obtenção da solução de quitosana, a mesma foi distribuída em placas de Petri de acrílico de 5,5 cm, tendo cada placa o volume final de 30 mL de solução, logo após foram submetidas à secagem na estufa a 37 °C por 5 dias para a completa evaporação do solvente. Em seguida, conduziu-se a neutralização imergindo as membranas em solução de hidróxido de sódio (1 M) por 30 min e posteriormente levadas para retirada do excesso da solução básica, levadas para estufa a 40° C e após a secagem foram caracterizadas.

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 no percentual de 20% (m/m) em relação a massa de quitosana.

2.2.3 Obtenção das membranas de quitosana com gelatina e Midazolam

A dosagem de Midazolam utilizada foi de 0,03 mg/mL. O fármaco foi adicionado nas soluções de quitosana com e sem gelatina obtidas através das etapas anteriores, sob agitação magnética até a total homogeneização das soluções, logo após os mesmos passaram pelo mesmo processo de obtenção das membranas. Na Tabela 1 encontra-se a codificação das amostras obtidas e a Figura 1 ilustra o fluxograma simplificado da elaboração das membranas.

Tabela 1 – Codificação das amostras.

Codificação	Amostras
Q	Membranas de Quitosana
QG	Membranas de Quitosana e Gelatina
QF	Membranas de Quitosana e Fármaco
QGF	Membranas de Quitosana, Gelatina e fármaco

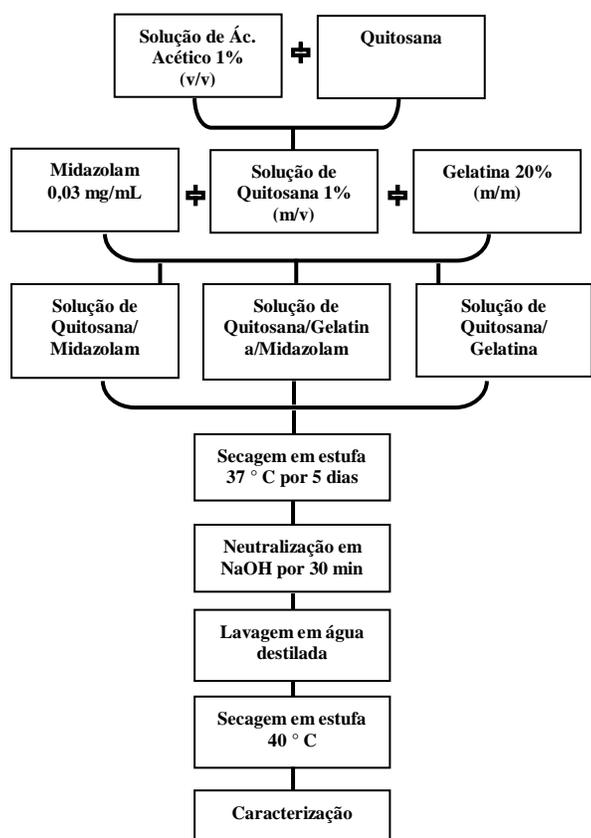


Figura 1 - Fluxograma simplificado da metodologia de obtenção das amostras.

2.3 Caracterização

As membranas foram caracterizadas por Difração de raios-X (DRX), Microscopia Óptica (MO), Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato. Para realização dos ensaios foram preparadas 5 amostras de cada tipo do material obtido.

2.3.1 Difração de raios-X (DRX)

As análises por meio do DRX foram conduzidas a temperatura ambiente em modelo XRD-6000, marca Shimadzu, onde se utilizou a radiação $K\alpha$ do cobre (1,5418 Å), a tensão de 40 kV e a corrente de 30 mA. As amostras foram examinadas em um intervalo de 2θ entre 5 e 70,0 graus, com uma velocidade de $2^\circ/\text{min}$. O objetivo deste ensaio foi estudar o comportamento cristalográfico do material.

2.3.2 Microscopia Óptica

A caracterização através do ensaio de MO foi utilizada para avaliar a morfologia das membranas. A análise foi realizada em um Microscópio Óptico Hirox de reflexão e transmissão com acessórios 2D, além de promover uma variação de 50X-400X. As imagens foram obtidas com magnificação de 160x.

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

As amostras foram submetidas a técnica de FTIR, em temperatura ambiente, o equipamento utilizado foi o modelo Spectrum 400, da marca Perkin Elmer. A técnica FTIR concerniu 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 Molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato

A técnica consiste no cálculo da tensão superficial da membrana baseada através da 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 fariam a gota se espalhar sobre a superfície.

Na realização desta análise foi utilizado um goniômetro desenvolvido por técnicos da Unidade Acadêmica de Engenharia Mecânica da UFCG, no qual encontra-se instalado no CERTBIO.

3. Resultados e Discussões

3.1 Difração de raios-X (DRX)

Os resultados da análise de DRX estão ilustrados na Figura 2, onde observam-se os perfis cristalográficos das amostras de quitosana e quitosana/ gelatina. Foi possível evidenciar que após a incorporação de gelatina nas membranas houve uma redução na cristalinidade, confirmada pela diminuição da intensidade e alargamento dos picos. Na difratometria de raios X da quitosana evidencia-se a presença de 2 picos, sendo o primeiro em torno de 10° e o segundo em 21° . Segundo Lavorgna e colaboradores [12] e Chagas [13], o pico em $2\theta = 10^\circ$ é referente ao cristal hidratado, formado devido às pontes de hidrogênios entre os grupos acetamido da quitosana e as moléculas de água, enquanto que o pico em $2\theta = 21^\circ$ é atribuído à estrutura cristalina regular da quitosana.

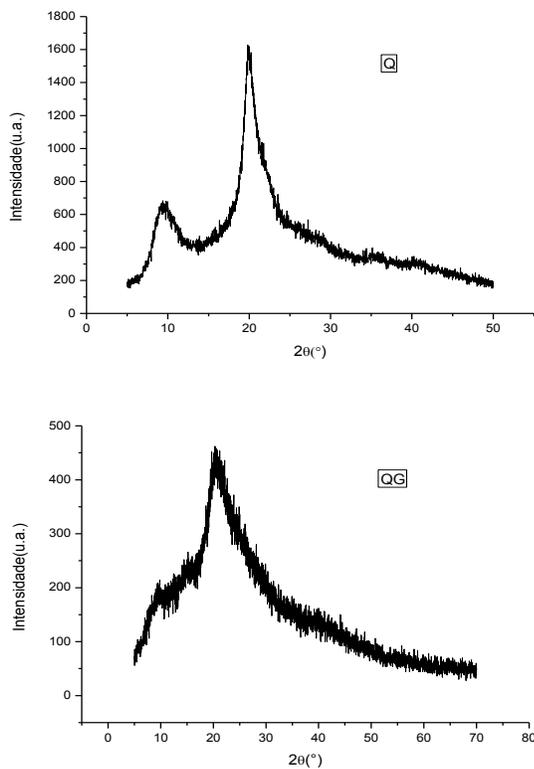


Figura 2 – Difratoformas das amostras de quitosana (Q) e quitosana/gelatina (QG).

Quanto a amostra de quitosana/gelatina observou-se apenas um pico em $2\theta = 23^\circ$. De acordo com Araújo e colaboradores [14] a incorporação de gelatina nos filmes de quitosana possibilita um alargamento das bandas nos difratogramas, indicando a ocorrência de um possível desordenamento cristalino na base polimérica da quitosana

seguida pelas ligações N-glicosídicas entre os monômeros da estrutura, gerando assim uma estrutura aleatória.

Na Figura 3 observa-se os resultados referentes a amostras de quitosana/fármaco e quitosana gelatina/fármaco e seus respectivos perfis.

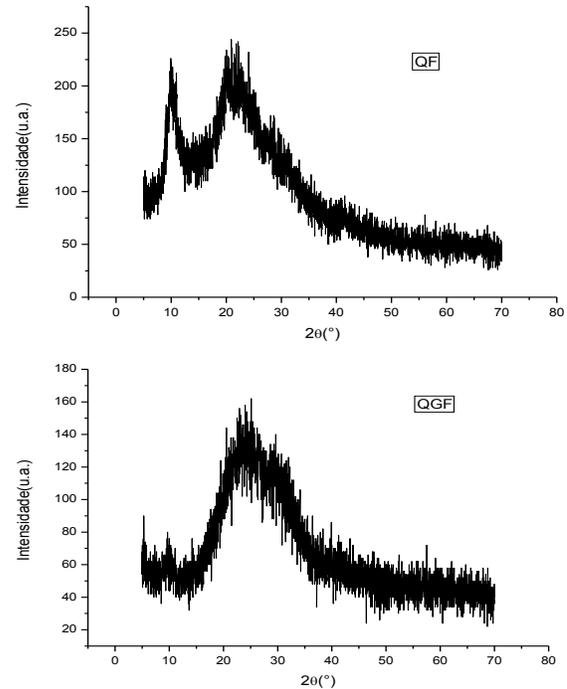


Figura 3 – Difratoformas das amostras de quitosana/fármaco (QF) e quitosana/gelatina/fármaco (QGF).

Diante dos resultados obtidos, é possível notar que tanto as amostras de quitosana/fármaco, quanto as amostras de quitosana/gelatina/fármaco apresentaram um perfil semicristalino e que a redução da cristalinidade para ambas é influenciada pela incorporação do fármaco e da gelatina, além disso, é importante evidenciar que a redução na cristalinidade possibilita uma biodegradação mais rápida.

Corroborando com os resultados encontrados nesse trabalho, Araújo e colaboradores [15] observaram, quando incorporaram o Etonogestrel, redução na cristalinidade das matrizes de quitosana.

3.2 Microscopia Óptica

A Figura 4 ilustra as imagens de Microscopia Óptica das membranas. As membranas apresentaram-se com superfícies lisas, sem poros com algumas ranhuras, sendo assim caracterizadas como densas.

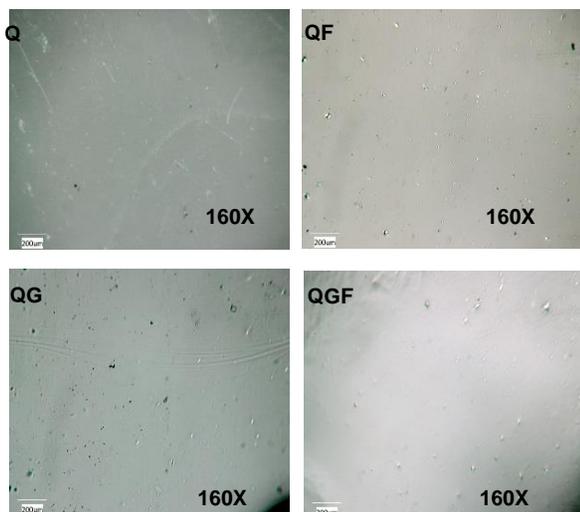


Figura 4 – Imagens de MO das membranas de quitosana, quitosana/gelatina, quitosana/ fármaco e quitosana/gelatina/fármaco.

Batista [16] observou o mesmo aspecto para as membranas de quitosana em seu trabalho, onde o mesmo às caracterizou como sendo densas.

Nascimento e colaboradores [17] evidenciaram as mesmas características em suas membranas, apresentando-as como lisas e sem poros.

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

Os resultados de FTIR das amostras de quitosana e quitosana/gelatina estão ilustrados na Figura 5. A partir dos espectros foi possível identificar os grupos característicos da quitosana. A banda de absorção em 3300 cm^{-1} é referente ao estiramento OH resultante da associação polimérica da quitosana, as bandas 1646 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} e 1400 cm^{-1} são referentes a deformação axial do grupo C=O em amidas, deformação angular em NH_2 e ligações N-H de aminas primárias e secundárias consequentemente.

Após a incorporação da gelatina observa-se um aumento na intensidade da banda 3300 cm^{-1} referente ao estiramento OH que pode ser explicada pelo aumento dos grupos OH na matriz e, redução com deslocamento das bandas 1550 e 1400 cm^{-1} possivelmente evidenciando uma interação de segunda ordem do tipo pontes de hidrogênio e/ou dipolo induzido.

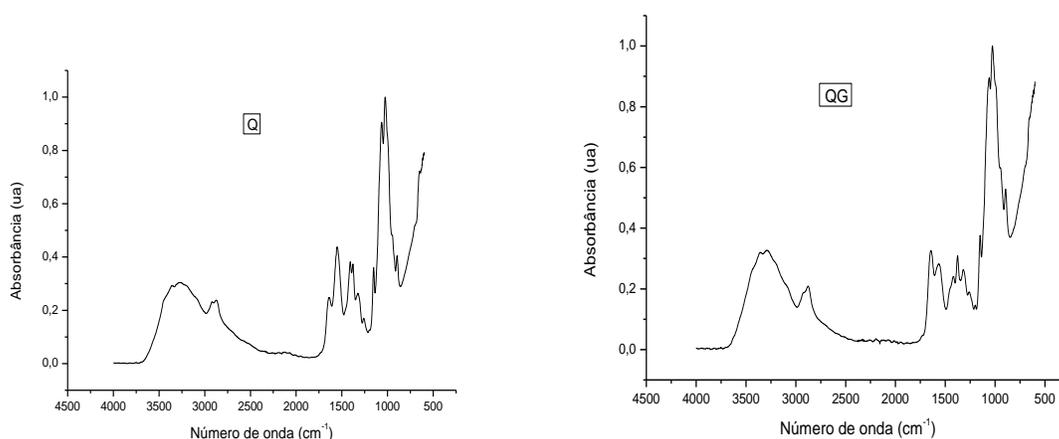


Figura 5 – Espectros de FTIR das amostras de quitosana (Q) e quitosana/gelatina (QG).

Segundo Almeida [18] e Mallman [19] quando há interação do tipo hidrogênio no grupo N-H observa-se descolamento nessa vibração, além disso, deslocamentos referentes a bandas abaixo de 1150 cm^{-1} podem estar associados às interações que ocorrem entre os grupos $-\text{NH}_3^+$ da quitosana com COO^- ou com alguns sítios aniônicos presentes na gelatina.

A Figura 6 ilustra os espectros das membranas de quitosana/fármaco e quitosana/gelatina fármaco.

Observou-se para ambas as amostras a redução e o deslocamento das bandas em 3300 , 1550 e 1400 cm^{-1} ,

referentes ao estiramento OH, a deformação axial do C=O de amidas e deformação angulares dos grupos NH_2 e ligações N-H de aminas primárias e secundárias. Essa redução na intensidade evidencia uma forte interação entre o fármaco e os grupos característicos da quitosana por meio de ligações de segunda ordem.

De acordo com Peres [20] a interação entre o fármaco e a quitosana ocorre entre os grupos reativos (OH e C=O) do fármaco e o grupo amina da quitosana.

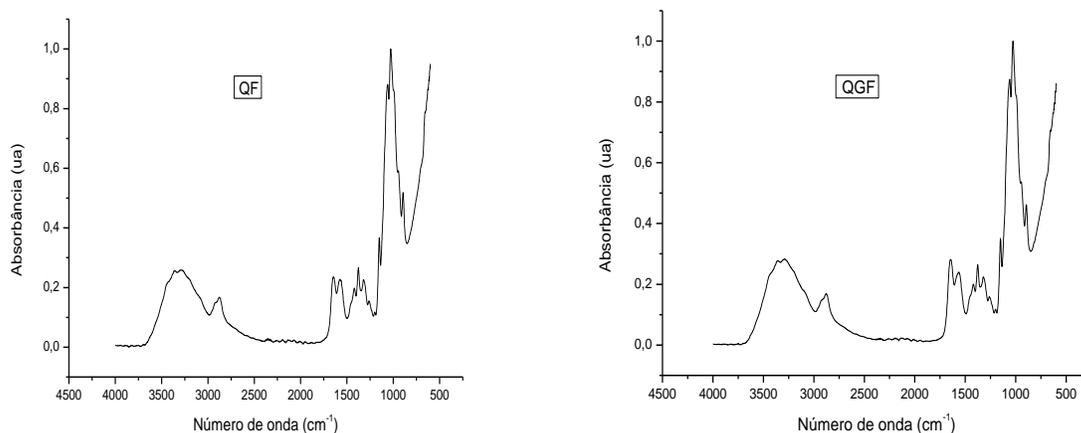


Figura 6 – Espectros de FTIR das amostras de quitosana/fármaco e quitosana/gelatina/fármaco.

3.4 Molhabilidade por Medidas do Ângulo de Contato

Observam-se na Figura 7 os resultados da tensão superficial por medida de ângulo de contato de todas as amostras.

Todas as amostras apresentaram ângulo de contato inferior a 90° o que às caracteriza como sendo de caráter predominantemente hidrofílico. De acordo com Macêdo [21] a hidrofiliabilidade está relacionada com a molhabilidade, que envolve a interação de um líquido com a superfície. A molhabilidade é afetada pela presença de grupos polares na superfície do material. Deste modo, o comportamento da gota sobre a superfície indica diferentes situações de molhabilidade de uma superfície: para ($\theta = 0^\circ$) pode-se dizer que a superfície apresenta alta molhabilidade ou que é uma superfície hidrofílica, para ($0^\circ < \theta < 90^\circ$) diz-se que a superfície é predominantemente hidrofílica, para ($90^\circ < \theta < 180^\circ$) a superfície é predominantemente hidrofóbica e para ($\theta = 180^\circ$) a superfície é totalmente hidrofóbica ou não molhável.

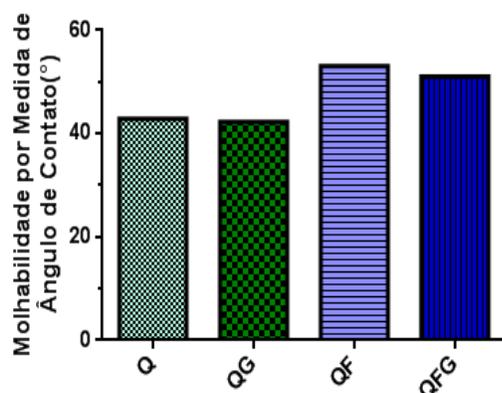


Figura 7 – Tensão superficial das amostras.

Apesar de todas as amostras ressaltarem um caráter predominantemente hidrofílico nota-se que a incorporação de

fármaco nas membranas resultou em decréscimo na sua hidrofiliabilidade, tendo em vista que houve um aumento no ângulo de contato após a incorporação do mesmo nas amostras.

Segundo Tsai e Wang [22] e Zheng e colaboradores [23] a hidrofiliabilidade da quitosana é atribuída aos grupos hidroxila e amino presentes em sua estrutura, portanto a presença de cargas positivas dos grupos amino protonados diminuem a energia livre da superfície, otimizando a molhabilidade do material. Diante disso, é possível inferir que a redução da hidrofiliabilidade após a incorporação do fármaco está ligada a interação do mesmo com os grupos característicos da quitosana, evidenciado pelo aumento do ângulo de contato e confirmado pela análise de FTIR.

Conclusões

O sistema apresentou homogeneidade e boa interação química entre os constituintes, abrindo as possibilidades para sua utilização como sistema de liberação controlada de Midazolam, entretanto, faz-se necessário outros estudos pré-clínicos e clínicos, a fim de entender o perfil de liberação do fármaco e interação do mesmo no organismo.

Mediante aos resultados conclui-se que foi possível obter membranas de Quitosana/Gelatina incorporadas com Midazolam.

Agradecimentos

CERTBIO e UFCG.

Referências

- [1] Carretero, A. C.; Costa, S. M.; Sanches, R. A.; Araujo, M. C.; Pessoa Jr, A.; Costa, S. A. Desenvolvimento de fibras têxteis a base de alginato, quitosana e alginato/quitosana para aplicações médicas. In: 10o Congresso Brasileiro de Polímeros, 2009, Foz do

- Iguaçu. Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros., 2009.
- [2] Prestes, R. C.; Carneiro, E. B. B.; Demiate, I. M. Adição de colágeno hidrolisado, amido modificado e goma guar em presunto de peru. *Cienc. Rural* [online]. 2012, vol.42, n.7, pp.1307-1313.
- [3] Dias, K. B. Chitin and chitosan: Characteristics, uses and production current perspectives. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, Gurupi, v.4, n. 3, p. 184-191, 2013.
- [4] Primo, J. O. Estudo visando a obtenção de micropartículas e géis de quitosana para liberação controlada de substâncias bioativas. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2015.
- [5] Gemeinder, J. L. P. Desenvolvimento e avaliação de um sistema de liberação sustentada de gentamicina em biomembranas de látex natural. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Estadual Paulista, 2016.
- [6] Huang, Y.; Onyeri, S.; Siewe, M.; Moshfeghian, A.; Madihally, S. V. In vitro characterization of quitosana-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, v. 26, pp. 7616-7627, 2005.
- [7] Li, Z.; Ramay, H. R.; Hauch, K. D.; Zhang, M. Chitosan-alginate scaffolds for in vitro bone tissue regeneration. *Materials research society*, v. 873, pp.K8.2.1-K8.2.6, 2005.
- [8] Torres, M. A. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.15, n.4, p.306-312, 2005.
- [9] Suzuki, D. Comparison of various mixtures of b-chitin and chitosan as a scaffold for three-dimensional culture of rabbit chondrocytes, *J Mater Sci: Mater Med*, v.19, p.1307-1315, 2008.
- [10] Gonçalves, V. L. Sistemas de liberação controlada do fármaco diclofenaco de sódio a partir de microesferas de quitosana reticuladas. Dissertação. Pós graduação em química. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 1999.
- [11] Holanda, A. L. Membranas de quitosana para uso em sistema de liberação controlada de insulina: síntese e caracterização. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência em Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande, 2011.
- [12] Lavorgna, M. Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. *Carbohydrate Polymers*, v. 82, p. 291-298, 2010.
- [13] Chagas, J. A. O. Membranas de quitosana com glicerol para aplicação em tratamento de águas residuais. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2017.
- [14] 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.
- [15] Araújo, P. B.; Garcia, T. G. C.; Bezerra Junior, A. G.; Colaço, R. M. R.; Sousa, W. J. B.; Barbosa, R. C.; Fook, M. V. L. Matrizes de quitosana/gelatina para liberação de Etonogestrel. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 12, n. 2 (2017) 138-145.
- [16] Batista, J. G. S. Desenvolvimento de matrizes poliméricas biodegradáveis à base de quitosana e possíveis blendas como sistemas de liberação controlada de fármacos. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear pela Universidade de São Paulo, 2015.
- [17] Nascimento, I. V. S. R.; Leal, R. C. A.; Fook, M. V. L.; Meira, R. C. Esterilização de membranas de quitosana para utilização como biomaterial. Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, Natal, 2012.
- [18] Almeida, P. F. Análise qualitativa de gelatina obtida de tarsos de frango e aspectos envolvidos no processo produtivo. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção pela Universidade Nove de Julho, 2012.
- [19] Mallman, E. J. J. Obtenção de um novo compósito biológico com propriedades magnéticas. Dissertação Universidade Federal do Ceará, 2010.
- [20] Peres, F. O. Estudo da dissociação de ibuprofeno utilizando matrizes de quitosana e montmorilonita/quitosana. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química pela Universidade de São Paulo, 2014.
- [21] Macêdo, M. O. C.; Macêdo, H. R. A.; Barbosa, J. C. P.; Gerra Neto, C. L. B.; Pereira, M. R.; Alves Júnior, C. O uso do plasma de nitrogênio para modificação superficial em membranas de quitosana. *Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde*, v. 1, n. 2, 2011.
- [22] Tsai, H. S.; Wang, Y. Z. Properties of hydrophilic chitosan network membranes by introducing binary crosslink agents. *Polymer Bulletin*, v. 60, pp. 103-113, 2008.
- [23] Zheng, Z., Surface properties of chitosan films modified with polycations and their effects on the behavior of PC12 cells. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 24, pp. 63-82, 2009.