

Desenvolvimento de Anel Intravaginal de Quitosana/Gelatina/Promestrieno

L. C. C. Oliveira^{1*}; T. C. Pedrosa¹; D. K. M. Oliveira¹; L. E. Cavalcante¹; A. G. Bezerra Junior¹; W. J. B. Sousa¹; R. C. Barbosa¹; C.A. Pimentel¹; M. V. L. Fook¹

¹ Programa de Pós-Graduação 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 09/05/2018; revisado em 06/06/2018; aceito em 13/06/2018)
(Todas as informações contidas neste artigo são de responsabilidade dos autores)

Resumo:

A terapia de reposição de estrogênio para mulheres menopausadas ocorre por via sistêmica ou vaginal, sendo a última, a via de administração ideal para a atrofia urogenital. Os anéis poliméricos para liberação de hormônios representam uma modalidade de tratamento, no entanto, se faz necessário à retirada dos mesmos após o seu período de funcionalidade que é de 21 dias. Diante disso, o uso de polímeros como a quitosana, que possui características de biodegradabilidade, biocompatibilidade, mucoadesão apresenta-se como uma alternativa para desenvolvimento dos anéis. Desta forma, o presente trabalho objetivou o desenvolvimento de anéis biodegradáveis para liberação intravaginal de promestrieno. Os anéis foram desenvolvidos, através da dissolução da quitosana em ácido láctico (1% v/v), para uma concentração final da solução polimérica (5% m/v), seguida da incorporação de gelatina (30% m/m) e 10 mg/g de promestrieno concentração esta utilizada em anéis comerciais em 30 mL da solução de quitosana para produção de um anel. Utilizou-se um molde em formato de anel e foi realizada a coagulação da solução de quitosana/gelatina/promestrieno em hidróxido de sódio 1 M, em seguida ocorreu a lavagem e submersão das amostras em polietilenoglicol (PEG) 400 por 24 h. Em seguida, as amostras foram submetidas à secagem e caracterizadas por meio das técnicas de Microscopia óptica (MO), Espectroscopia na Região do Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), Molhabilidade por medida de ângulo de contato e ensaio mecânico de tração. Na MO as amostras apresentaram-se densas, assemelhando-se a amostra do anel comercial. Nos resultados de FTIR demonstraram que o fármaco interagiu quimicamente com a matriz polimérica, possivelmente por pontes de hidrogênio, ligações dipolo-dipolo e dipolo induzido. Na molhabilidade por medida de ângulo de contato, constatou-se que todas as amostras evidenciaram ângulo de contato igual a 0° caracterizando-as como hidrofílicas. O ensaio mecânico de tração constatou-se que a incorporação do fármaco possibilitou o aumento na resistência. Mediante o exposto conclui-se que as amostras confeccionadas apresentaram semelhanças com o comercial e adequada interação química entre os constituintes, logo foi possível obter um anel intravaginal de quitosana/gelatina e promestrieno.

Palavras-chave: Estrogênio. Biopolímeros. Biomateriais. Fármaco.

Abstract:

Estrogen replacement therapy for menopausal women may be administered systemically or vaginally, the latter being the optimal route of administration for urogenital atrophy. The polymer rings for hormone release becomes a candidate for treatment, however, it becomes necessary to remove them after their period of functionality is and 21 days. Knowing the characteristics of chitosan and gelatine as a biodegradable biomaterial and presenting antimicrobial properties, besides adhesiveness and plasticity, the present work aimed the development of biodegradable rings for intravaginal release of promestriene. The rings were developed by dissolving the chitosan in lactic acid (1% v / v), to a final concentration of the polymer solution (5% m / v), followed by the incorporation of gelatin (30% w / w) and 10% mg / g of promestriene in 30 ml of the solution for the production of a ring. A ring-shaped template was used and the chitosan / gelatin / promestriene solution was coagulated in 1M sodium hydroxide, then washed and submerged in PEG 400 for 24 h, subsequently dried and characterized by techniques of Optical Microscopy (MO), Spectroscopy in the Infrared Region by Fourier transform (FTIR), Wettability by contact angle measurement and mechanical tensile test. In the MO the samples were dense resembling the commercial ring sample. The results of FTIR were observed that the drug interacted chemically with the polymer matrix, possibly by hydrogen bonds, dipole-dipole bonds and induced dipole. In the wettability by measurement of contact angle it was verified that all the samples showed contact angle equal to 0 ° characterizing them as hydrophilic. Already in the traction test it was found that the incorporation of the drug made possible the increase in resistance. It was concluded that the prepared samples presented similarities with the commercial and adequate chemical interaction between the constituents, so it was possible to obtain a chitosan / gelatin and promestriene ring for future intravaginal release.

Key-words: Estrogen. Biopolymers. Biomaterials. Drug.

*E-mail: lccanuto@hotmail.com (L. C. C. Oliveira)

1. Introdução

Envelhecer é um processo comum a todos os indivíduos, mas vivenciado de maneiras heterogêneas de acordo com a cultura e a sociedade na qual se vive. No que diz respeito ao envelhecimento das mulheres isso traz alterações anatômicas, fisiológicas e psicológicas importantes [1]. Suas queixas comuns durante a menopausa estão intimamente relacionadas ao declínio acentuado na produção de estrógeno, que exerce um impacto significativo na qualidade de vida [2].

A menopausa é um período na vida da mulher que é caracterizada não somente por uma diminuição na produção do hormônio estrogênio, mas também um gradual declínio dos níveis de androgênios os quais se iniciam antes da falência ovariana [3]. A deficiência androgênica pode ser sintomática na grande maioria das mulheres, desta forma afetando sua qualidade de vida neste período [4,5].

Diante disso, o tratamento menopausal é pautado em aliviar os sintomas relacionados ao período com a finalidade de melhorar a qualidade de vida das mulheres [6]. Esse tratamento está inerentemente ligado ao efeito do estrogênio sobre as funções fisiológicas, sendo este destacado e comprovado para os sistemas musculoesquelético, cardiovascular e genital. O estrogênio desempenha um papel importante na fisiologia da vagina, na qual os receptores de estrogênio são abundantes [7,8].

Não surpreendentemente, algumas das queixas mais comuns entre as mulheres na menopausa consistem em sintomas urogenitais, que incluem secura vaginal, dispareunia, disúria e infecções vaginais e urinárias recorrentes. Estes sintomas podem afetar gravemente a qualidade de vida e a atividade sexual feminina [6,7]. A terapia de reposição de estrogênio; administrado por via sistêmica (oral, transdérmica, implantes) ou vaginal (comprimidos, anéis, cremes, supositórios) é o tratamento padrão para a atrofia urogenital [9]. O tratamento local através do princípio ativo chamado de promestrieno é bem mais tolerado do que a administração por via sistêmica e, portanto, preferido pelas mulheres, principalmente hoje pelo temor do câncer de mama.

Porém é importante destacar que, devido à distribuição generalizada de receptores de androgênios em tecidos femininos, os androgênios podem afetar o desejo sexual, densidade mineral óssea, massa e força muscular, distribuição de tecido adiposo, humor, energia e bem-estar psicológico. Por esta razão, a Terapia de Reposição Hormonal (TRH) por meio do princípio ativo promestrieno em mulheres tem implicações importantes para a saúde geral e bem-estar que se estendem muito além do âmbito da sexualidade, além de ser uma fonte de produção de estrogênio nos tecidos, particularmente durante a menopausa [10].

De modo a atenuar esses problemas, o desenvolvimento de novos sistemas de liberação ou adequação dos já existentes vem sendo pesquisados, como é o caso de anéis poliméricos de liberação de hormônios. Esses tipos de anéis já são comercializados, no entanto, em sua grande maioria são compostos de polímeros não biodegradáveis e, se faz necessário a retirada dos mesmos após o seu período de funcionalidade que é de 21 dias [11]. Diante deste contexto,

observa-se a necessidade da obtenção de um material que exerça sua função e, em seguida, seja solubilizado ou biodegradado sem que haja a necessidade da sua retirada. Polímeros naturais e biodegradáveis como a quitosana e gelatina atendem esse critério devido as suas características. Ambos são estudados em aplicações diversas na área de saúde [12].

A quitosana é um biopolímero, pertencente à família dos polissacarídeos e é comumente encontrada no exoesqueleto de crustáceos. Esta se apresenta como um copolímero com unidades aleatórias ou blocos distribuídos ao longo da cadeia de biopolímero de N-acetilglucosamina e N-glucosamina. A porcentagem das unidades N – glucosamina é definida como grau de desacetilação (GD) da quitosana [13]. A Gelatina é uma proteína solúvel derivada da desnaturação parcial do colágeno. O colágeno é a proteína mais difundida no corpo ocorrendo na pele, cartilagem, osso e tecido conectivo e constitui a maior parte das matrizes extracelulares nos animais. No entanto, o colágeno apresenta antigenicidade devido a sua origem animal [14].

Sendo assim, bem como o colágeno a gelatina apresenta biocompatibilidade e possui vários atrativos, entre eles, a não-antigenicidade em condições fisiológicas e, além disso, é completamente reabsorvida *in vivo*. Suas propriedades de adesividade e plasticidade tornam a gelatina uma matriz adequada para compósitos [15]. Desta forma, o presente trabalho objetivou o desenvolvimento de anéis de quitosana/gelatina e promestrieno para liberação intravaginal.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

- Quitosana 90% desacetilada, CERTBIO.
- Gelatina tipo A - Sigma Aldrich®.
- Ácido Lático (CH₃COOH) - Vetec®
- Hidróxido de sódio (NaOH) - Vetec®
- Polietilenoglicol 400 (PEG 400) - Sigma Aldrich®
- Promestrieno (C₂₂H₃₂O₂) - Eurofarma

2.2 Métodos

2.2.1 Obtenção dos anéis de quitosana

A solução de quitosana foi preparada através da dissolução de 5 g de quitosana em 100 mL de ácido láctico a 1% (v/v) sob agitação mecânica (100rpm) a temperatura ambiente por 3 horas.

Posteriormente, a solução foi colocada em moldes com formato de anel, onde em seguida, foram imersos por 24 horas em uma solução de hidróxido de sódio 1 M, para coagulação da solução de quitosana no formato de anel. Após essa etapa, os anéis foram retirados do molde e lavados em água destilada por 2 horas para que houvesse a retirada do excesso da solução coagulante. Em seguida, os mesmos foram submergidos em PEG 400 por 24 horas, e finalmente foram lavados em água destilada, secos em temperatura ambiente e caracterizados.

2.2.2 Obtenção dos anéis de quitosana com gelatina

Os anéis de quitosana com gelatina foram preparados através da metodologia anteriormente citada, sendo acrescida na solução de quitosana 30 % (m/m) de gelatina.

2.2.3 Obtenção dos anéis de quitosana com gelatina e promestrieno

Inicialmente, utilizou-se o fármaco promestrieno na proporção de 10 mg/g do fármaco para 30 mL de solução de quitosana com e sem gelatina obtida através das etapas anteriores, por meio da agitação magnética até a total homogeneização das substâncias, conforme fluxograma (Figura 1).

Após o desenvolvimento dos anéis, os mesmos foram codificados de acordo com a Tabela 1.

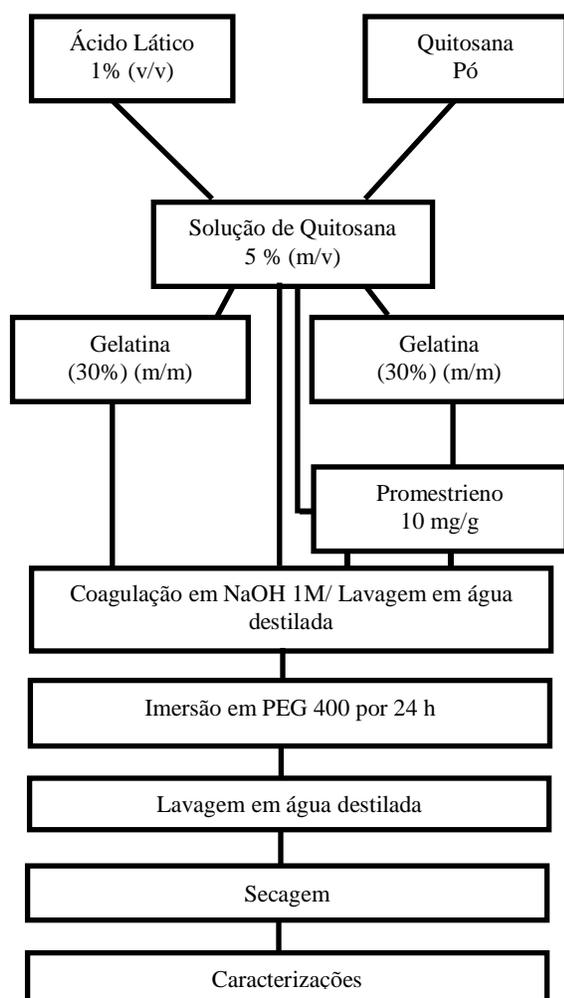


Figura 1 - Fluxograma simplificado da metodologia de obtenção das amostras.

Tabela 1 – Codificação das amostras.

Codificação	Amostras
AQ	Anel de Quitosana
AQG	Anel de Quitosana e Gelatina
F	Promestrieno
AQF	Anel de Quitosana e Fármaco
AQGF	Anel de Quitosana, Gelatina e Fármaco
AC	Anel comercial

2.3 Caracterização

Todas as amostras foram submetidas aos ensaios de Microscopia Ótica, Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato e Tração.

3. Resultados e discussão

3.1 Microscopia Ótica

Na Figura 2 estão ilustradas as imagens da MO das amostras AQGF e AC.

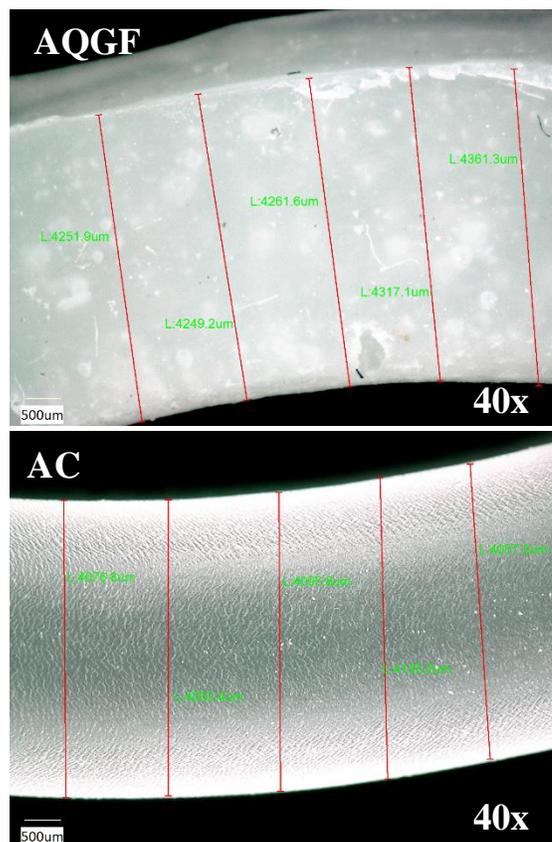


Figura 2 – Microscopia ótica das amostras AQGF e AC.

Todas as amostras apresentaram-se lisas e sem poros, caracterizadas como densas.

A partir das imagens obtidas, pode-se observar as medidas da espessura dos anéis analisados, onde foi possível constatar que comparativamente as amostras não apresentaram diferenças relevantes quanto a homogeneidade da espessura do anel. Entretanto, a amostra AQGF quando comparada com a amostra AC em relação a sua superfície, aparenta ser mais irregular.

Lucena [16] na produção de tubos de quitosana, utilizou técnicas de processamentos semelhantes as desse trabalho e conseguiu resultados semelhantes na microscopia ótica das amostras, caracterizando suas amostras como densas. Além disso, o mesmo conseguiu obter tubos com espessura homogênea pela técnica de dip-coating adaptada.

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

A Figura 3 ilustra os espectros obtidos para as amostras AQ e AQG. Observa-se nos espectros as vibrações características da quitosana, onde na região 3400 cm^{-1} e 2874 cm^{-1} evidencia-se vibrações do tipo deformação axial referentes aos grupos O-H resultante da associação polimérica da quitosana e C-H de carbonos alifáticos. Em 1648 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} nota-se vibrações do tipo deformação axial de C=O de amidas associadas e deformação angular de CH_2 . Na região de 1370 cm^{-1} deformação angular de CH_3 e em 1240 cm^{-1} deformação angular de C-N de alifáticos. Na banda 1090 cm^{-1} deformação axial do grupo C-O, em 940 cm^{-1} deformação angular fora do plano da C=O de ácidos carboxílicos. Um dado a ser observado é a alta intensidade da banda referente à ligação C-H de carbonos alifáticos, a qual pode estar associada à imersão da amostra em PEG 400 nas etapas finais de processamento.

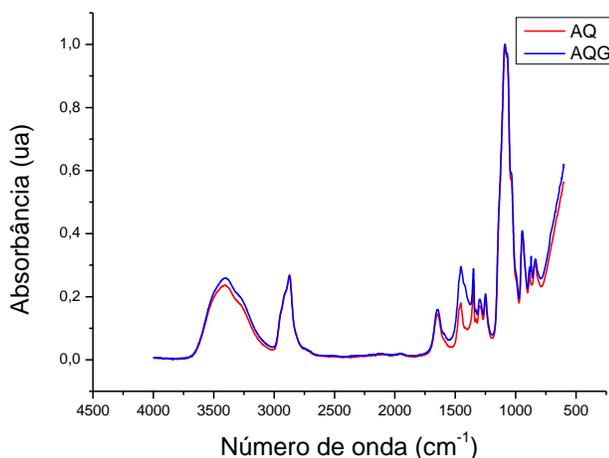


Figura 3 – FTIR das amostras AQ e AQG.

Oliveira [17] encontrou resultados semelhantes para o espectro de membranas de quitosana com bandas de absorção em 1080 cm^{-1} referente ao estiramento C-O, característica dos anéis piranosídicos de quitosana; 1380 cm^{-1} deformações

angulares de C-H; 1556 cm^{-1} relacionada a deformação angular N-H (amida II); 1652 cm^{-1} correspondente ao grupo C=O da amida I; 3370 cm^{-1} região associada ao N-H, a ligação hidrogênio e ao estiramento O-H.

Diante dos espectros sobrepostos da amostra AQ e AQG (Figura 3), é possível identificar a intensificação das bandas 3400 cm^{-1} referente à deformação axial do grupo O-H associado, 1450 cm^{-1} da deformação axial de C=O de amidas associadas e 1370 cm^{-1} referente à deformação angular de CH_3 . Essa intensificação ocorre devido à incorporação de gelatina nas amostras.

Denari [18] observou a ocorrência de deslocamento da banda 3396 cm^{-1} para 3437 cm^{-1} após a incorporação de gelatina em membranas de quitosana, esse deslocamento segundo o mesmo, ocorre devido as interações hidrogênio no grupo N-H nessa vibração.

Segundo Braga [19], o aumento na intensidade da banda 1450 cm^{-1} pode indicar as ligações do tipo interações eletrostática entre gelatina e quitosana.

O espectro da Figura 4 é referente às vibrações características do fármaco (Promestrieno). Na banda de $2914 - 2850\text{ cm}^{-1}$ evidencia-se vibrações do tipo deformação axial de C-H de alifáticos. Em 1740 cm^{-1} verifica-se vibrações do tipo deformação axial do grupo C=O de aldeídos e na região 1470 cm^{-1} e 1370 cm^{-1} deformação angular dos grupos CH_2 e CH_3 . Na banda 1240 cm^{-1} observa-se vibrações de deformação angular de C-N de compostos aromáticos. Em 1020 cm^{-1} verifica-se vibrações do tipo deformação angular do grupo éteres aromáticos e, na banda 720 cm^{-1} nota-se vibrações do tipo deformação angular de cadeia $-(\text{CH}_2)_n-$.

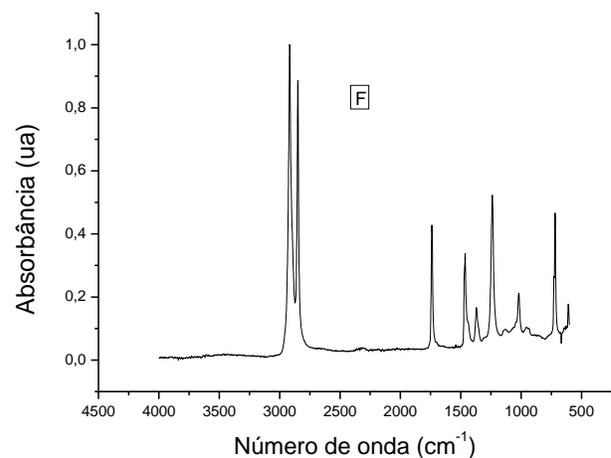


Figura 4 – FTIR da amostra F.

Os resultados comparativos entre as amostras AQ e AQG (Figura 5) revelam que a introdução do fármaco na matriz intensificou as bandas 1450 cm^{-1} e 1370 cm^{-1} referente à deformação angular de CH_2 e da deformação angular de CH_3 . Nota-se também um aparecimento de uma nova banda em 1740 cm^{-1} , referente à deformação axial do grupo C=O de aldeídos presentes no fármaco.

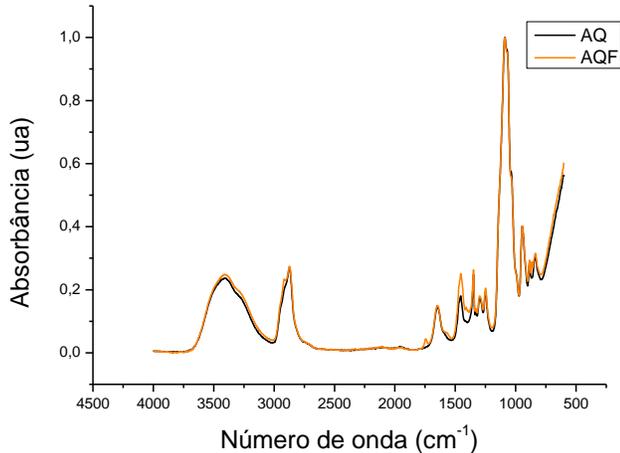


Figura 5 – FTIR da amostra AQ e AQF.

A Figura 6 ilustra os espectros das amostras AQG e AQGF, onde se verifica que após a incorporação do fármaco na blenda houve uma intensificação das bandas em 3400 cm^{-1} referente à deformação axial dos grupos O-H associado, 1648 cm^{-1} referente à deformação axial de C=O de amidas associadas e em 1370 cm^{-1} referente à deformação angular de CH_3 . Observa-se também o aparecimento de uma nova banda de baixa intensidade em 1740 cm^{-1} , referente à deformação axial do grupo C=O de aldeídos. Além disso, evidenciou-se a redução das bandas 1450 cm^{-1} referente à deformação angular de CH_2 e em 1090 cm^{-1} referente à deformação axial do grupo C-O. Também foi possível identificar a bifurcação da banda em 2874 cm^{-1} com o aparecimento de duas bandas, uma em 2914 cm^{-1} e a outra em 2850 cm^{-1} referentes à deformação axial de C-H de alifáticos.

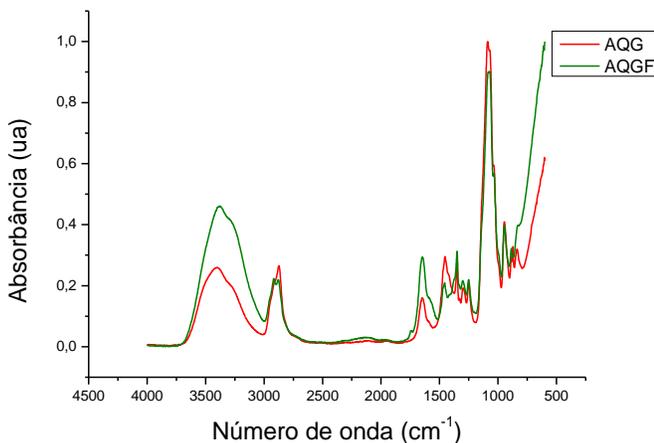


Figura 6 – FTIR da amostra AQG e AQGF.

O aparecimento de algumas bandas encontradas no FTIR do promestrieno sugere que possivelmente ocorreram interações entre o fármaco e matriz, além disso, a intensificação e redução de algumas bandas, pode estar associada a ligações do tipo pontes de hidrogênio, ligações dipolo-dipolo e dipolo induzido.

3.3 Molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato

No ensaio de molhabilidade por medida de ângulo de contato, todas as amostras apresentaram comportamento altamente hidrofílico, com ângulo de contato 0° conforme imagem ilustrativa de uma das amostras (Figura 7).



Figura 7 – Molhabilidade por medida de ângulo do contato das amostras.

Shenvi [20] e Pinto [21] relatam que a quitosana apresenta propriedades hidrofílicas devido à presença de grupos amino e hidroxila na sua estrutura, além disso, os valores de ângulos de contato obtidos são influenciados de acordo com as diferenças no grau de desacetilação da quitosana utilizada.

3.4 Tração

O ensaio mecânico de tração foi realizado com o propósito de avaliar o módulo elástico, deformação e tensão dos anéis. Para tanto, com base na norma ASTM D 3039/D 3039M-08, foram preparados e ensaiados 3 corpos de prova para cada composição.

Analisando-se os valores médios da tensão e deformação dos materiais ensaiados (Tabela 2), pode-se observar que a amostra comercial apresenta maior tensão e deformação quando comparada ao anel de quitosana. Esta diferença está relacionada ao tipo de polímero, o resultado demonstrou que a amostra comercial é mais resistente, entretanto, o material utilizado não é biodegradável e necessita de remoção em 21 dias.

Tabela 2 - Resistência à tração dos anéis de quitosana em relação ao anel comercial.

	Deformação Máxima (%)	Tensão (MPa)
AC	753,04	10,885
AQ	20,87	0,1483
AQG	25,64820	0,64
AQF	21,38867	1,09
AQGF	22,40	0,83

João e colaboradores [22] enfatizam que embora os materiais à base de quitosana apresentem grande número de aplicações industriais em diferentes áreas, frequentemente estes demonstram propriedades mecânicas inferiores quando comparados a materiais poliméricos produzidos a partir de polímeros sintéticos.

Quando Silva [23] analisou em seu estudo a tensão de ruptura dos filmes de quitosana, observou um valor de 2,4 MPa, esse resultado é superior ao encontrado nesse trabalho, entretanto isso pode ser explicado pelo método de processamento, e pela adição do plastificante nos anéis, parâmetros esses que influenciam nas propriedades mecânicas dos mesmos. Segundo Fiori e colaboradores [24], a adição de plastificante em filmes de quitosana influencia na redução da tensão de ruptura dos filmes.

Conclusões

Os anéis apresentaram uma espessura uniforme assemelhando-se aos anéis comerciais. As propriedades físicas do mesmo foram adequadas tendo em vista sua utilização em um meio aquoso. Quimicamente, o fármaco interagiu bem com a matriz polimérica. A incorporação do fármaco possibilitou o aumento na resistência à tração.

Por meio da metodologia e técnicas de processamento utilizadas foi possível desenvolver um anel de quitosana/gelatina e promestrieno para liberação intravaginal.

Referências

- [1] Tomic, D.; Gallacchio, L.; Whiteman, M. K.; Langenberg, P.; Flaws, J. L. Factors associated with determinants of sexual functioning in mid-life women. *Maturitas*. v. 53, pp. 144-157, 2006.
- [2] Pandit, L.; Ouslander, J.; G. Post-menopausal vaginal and atrophic vaginitis. *Am J Med Sci*. v. 314, pp. 228-231, 1997.
- [3] Mazer, N. A., Testosterone deficiency in women: etiologies, diagnosis and emerging treatments. *Int J Fertil Womens Med*. v. 47, pp. 47-86, 2002.
- [4] Bachmann, G. A. The hypo-androgenic woman: pathophysiologic overview. *Fertil Steril*. v. 77, n. 4, pp. 72-76, 2002.
- [5] Papalia, M. A.; Davis, S. R. What is the rationale for androgen therapy for women? *Treat Endocrine*. v. 2, pp. 77-84, 2003.
- [6] Palacios, S.; Castelo-Branco, C.; Cancelo, M. J.; Vasquez, F. Low-dose, vaginally administered estrogens may enhance local benefits of systemic therapy in the treatment of urogenital atrophy in post menopausal women on hormone therapy. *Maturitas*. v. 50, pp. 98-104, 2005.
- [7] Castelo-Branco, C.; Cancelo, M. J.; Nohales, F.; Juliá, M. D. Management of post menopausal vaginal atrophy and atrophic vaginitis. *Maturitas*. v. 52, pp. 46-52, 2005.
- [8] Pessina, M. A.; Hoy, R. F.; Goldstein, I.; Traish, A. M. Differential regulation of the expression of estrogen, progesterone, and androgen receptors by sex steroid hormones in the vagina: Immunohistochemical studies. *J Sex Med*. pp. 804-814, 2006.
- [9] Pompei, L. M.; Fernandes, C. E.; Melo, N. R. Promestrieno no tratamento de atrofia vulvovaginal: Revisão sistemática. *Femina*. v. 38, 2010.
- [10] Maia Jr, H., Casoy, J., Valente, J. Testosterone replacement therapy in the climacteric: benefits beyond sexuality. *Gynecol Endocrinol*. v. 25, n. 1, pp. 12-20, 2009.
- [11] Nuvaring, 2017. Disponível em: www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao. Acesso em 25 de maio 2017.
- [12] Nwe, N.; Furuike, T.; Tamura, H. The Mechanical and Biological Properties of Chitosan Scaffolds. *Materials*. v. 2, pp. 374-398, 2009.
- [13] Jiang, T.; Targeted oral delivery of BmpB vaccine using porous PLGA microparticles coated with M cell homing peptide-coupled chitosan. *Biomaterials*. v. 35, pp. 2635-2373, 2014.
- [14] Lien, S. M.; Li, W. T.; Huang, T.J. *Materials Science and Engineering*. v. 28, n. 36, 2008.
- [15] Liu, H; Gao, L.; Liu, M; Li, Q; Jiang, Y; Zhang, S. Characterization and determination of genipin – 1 – β gentiobioside in gardênia fruit by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection following electrospray ionization mass spectrometry. *Microchemical Journal*. v. 84, pp. 38–43, 2006.
- [16] Lucena, B. M. Dispositivos tubulares de quitosana obtidos pelo método de dip-coating para utilização como biomateriais. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande, 2017.
- [17] Oliveira, A. P. R. Desenvolvimento de membranas de gelatina/quitosana e o estudo do processo de reticulação. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Universidade de São Paulo, 2013.
- [18] Denari, N. S. M. Biomateriais binários de quitosana/amido e quitosana/gelatina em L-ácido láctico. Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2014.
- [19] Braga, A. H. F. Elaboração e caracterização de filmes coacervados à base de gelatina/quitosana, gelatina/pectina e gelatina/goma arábica. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 2013.
- [20] Pinto, F. R. V. Citocompatibilidade de matrizes de

quitosano/ fosfato de cálcio. Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro, 2013.

- [21] Shenvi, S. S. Preparation and characterization of PPEES/chitosan composite nanofiltration membrane. Desalination, v.315, pp. 135-141. 2013
- [22] João, C. F. C.; Echeverria, C.; Velhinho, A.; Silva, J. C.; Godinho, M. H.; Borges, J. P. Bio-inspired production of chitosan/chitin films from liquid crystalline suspension. Carbohydrate Polymers, v.155, pp. 372-381, 2017.
- [23] Silva, A. P. P. Desenvolvimento e Caracterização de filmes de quitosana reforçados com whiskers de beta-quitina. Monografia apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2017.
- [24] Fiori, A. P. S. M.; Guabiraba, G. P.; Praxedes, A. P. P.; Nunes, M. R. S. Balliano, T. L.; Silva, R. C.; Tonholo, J.; Ribeiro, A. S. Preparação e Caracterização de Nanocompósitos Poliméricos Baseados em Quitosana e Argilo Minerais. Polímeros. v. 24, n. 5, pp. 628-635, 2014.