

Preparação e caracterização de microesferas de quitosana e quitosana/gelatina carregadas com os minerais cromo e magnésio

Preparation and characterization of chitosan and chitosan/gelatin microspheres loaded with chrome and magnesium minerals

Preparación y caracterización de microesferas de quitosano y quitosano/gelatina cargadas con minerales de cromo y magnesio

Recebido: 25/05/2022 | Revisado: 12/06/2022 | Aceito: 12/06/2022 | Publicado: 22/06/2022

Maria Helena de Sousa Barroso

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9589-8498>

Universidade Federal de Jataí

E-mail: maria_helena_sousa@ufj.edu.br

Camila Castelli Flores

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7367-1206>

Universidade Federal de Jataí

E-mail: camila-castelli@hotmail.com

Michelle Lemes Pereira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8358-9639>

Universidade Federal de Jataí

E-mail: michellelemespereira@hotmail.com

Resumo

Este trabalho consistiu na preparação e caracterização de microesferas de quitosana (MQUI), quitosana/gelatina (MQUI/GEL), quitosana e quitosana/gelatina carregadas com cromo (MQUI-Cr e MQUI/GEL-Cr) e com magnésio (MQUI-Mg e MQUI-GEL-Mg). As microesferas foram preparadas pelo método de emulsão reticulada utilizando o glutaraldeído como agente de reticulação. O grau de desacetilação (GD) da quitosana determinado por titulação potenciométrica foi 78,7%. O espectro da quitosana na região do infravermelho mostrou bandas características para este tipo de material. As imagens obtidas por uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico mostraram que as microesferas de MQUI e MQUI-Mg apresentaram formas esféricas de tamanhos regulares e provavelmente com diâmetros em escala micrométrica. A adição de 20% de gelatina à quitosana, promove à formação de algumas microesferas para MQUI/GEL e MQUI/GEL-Mg, mas o material passa a apresentar características esponjosa e com aspecto de fibras que parecem insolúveis. Já o material de MQUI-Cr e MQUI/GEL-Cr não foi possível identificar a presença de microesferas, se mostrando com aspectos de materiais amorfos, pressupondo que além da gelatina, o cromo adicionado na forma de sulfato pode ter influenciado nas características deste material. As imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura confirmaram os resultados obtidos por Microscopia Óptica, ou seja, a presença da gelatina fez com que aparecesse um material fibroso e algumas microesferas incrustadas no meio deste ou apresentaram materiais com características amorfas.

Palavras-chave: Quitosana; Gelatina; Microesferas; Emulsão reticulada.

Abstract

This work consisted in the preparation and characterization of chitosan (MQUI), chitosan/gelatin (MQUI/GEL), chitosan and chitosan/gelatin microspheres loaded with chromium (MQUI-Cr and MQUI/GEL-Cr) and with magnesium (MQUI-Mg and MQUI-GEL-Mg). The microspheres were prepared by the cross-linked emulsion method using glutaraldehyde as a cross-linking agent. The degree of deacetylation (GD) of chitosan determined by potentiometric titration was 78.7%. The chitosan spectrum in the infrared region showed characteristic bands for this type of material. The images obtained by a digital camera coupled to an optical microscope showed that the MQUI and MQUI-Mg microspheres presented spherical shapes of regular sizes and probably with diameters on a micrometer scale. The addition of 20% of gelatin to chitosan promotes the formation of some microspheres for MQUI/GEL and MQUI/GEL-Mg, but the material starts to present spongy characteristics with the appearance of fibers that seem insoluble. On the other hand, the MQUI-Cr and MQUI/GEL-Cr material could not identify the presence of microspheres, showing aspects of amorphous materials, if in addition to gelatin, the chromium added in the form of sulfate may have influenced the characteristics of this material. The images obtained by Scanning Electron Microscopy confirmed the results obtained by Optical Microscopy, that is, the presence of gelatin caused a fibrous material to appear, and some microspheres embedded in the middle of it or presented materials with amorphous characteristics.

Keywords: Chitosan; Gelatin; Microspheres; Cross-linked emulsion.

Resumen

Este trabajo consistió en la preparación y caracterización de microesferas de quitosano (MQUI), quitosano/gelatina (MQUI/GEL), quitosano y quitosano/gelatina cargadas con cromo (MQUI-Cr y MQUI/GEL-Cr) y con magnesio (MQUI-Mg y MQUI-GEL-Mg). Las microesferas se prepararon por el método de emulsión reticulada utilizando glutaraldehído como agente de reticulación. El grado de desacetilación (GD) del quitosano determinado por titulación potenciométrica fue del 78,7%. El espectro del quitosano en la región infrarroja mostró bandas características para este tipo de material. Las imágenes obtenidas por una cámara digital acoplada a un microscopio óptico mostraron que las microesferas MQUI y MQUI-Mg presentaban formas esféricas de tamaños regulares y probablemente con diámetros en escala micrométrica. La adición de un 20% de gelatina al quitosano favorece la formación de unas microesferas para MQUI/GEL y MQUI/GEL-Mg, pero el material pasa a presentar características esponjosas con apariencia de fibras que parecen insolubles. Por otro lado, el material MQUI-Cr y MQUI/GEL-Cr no pudo identificar la presencia de microesferas, mostrando aspectos de materiales amorfos, asumiendo que además de la gelatina, el cromo agregado en forma de sulfato pudo haber influido en las características de este material. Las imágenes obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido confirmaron los resultados obtenidos por Microscopía Óptica, es decir, la presencia de gelatina hizo que apareciera un material fibroso y unas microesferas incrustadas en medio del mismo o presentaran materiales con características amorfas.

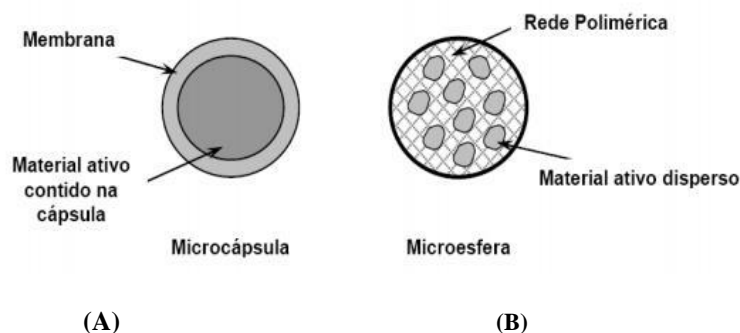
Palabras clave: Quitosano; Gelatina; Microesferas; Emulsión reticulada.

1. Introdução

A microencapsulação é uma técnica muito utilizada no âmbito das indústrias farmacêuticas, alimentícias, cosméticas e entre outras. É um processo no qual ocorre formação de micropartículas onde um componente bioativo é envolto por um agente encapsulante, constituído de outro material, isto possibilita o isolamento e a manutenção das características fundamentais do componente bioativo encapsulado, bem como a possibilidade de controlar a sua liberação (Bansode, et al., 2010; Burhan, et al., 2019; Matté & Da Rosa, 2013; Viera, et al., 2022). Outras justificativas para o emprego dessa técnica nas diversas áreas da indústria, são: capacidade de melhorar a aparência de uma substância, reduzir a inteição do agente bioativo encapsulado com o meio onde será aplicado, reduzir a velocidade de disseminação do agente ativo do interior da célula para o meio, promover a liberação controlada, mascarar odores e sabores desagradáveis, entre outras (Melo & Constant, 2021; Rodrigues, et al., 2012; Pereira, et al., 2018).

As micropartículas poliméricas podem ser denominadas de microesferas ou microcápsulas, diferindo com relação à estrutura final da partícula, conforme representado na Figura 1. As microcápsulas apresentam uma parede polimérica de espessura variável, contendo um núcleo totalmente isento de material polimérico, sendo que o fármaco pode estar presente na parte interna ou no revestimento. As microesferas, por outro lado, são constituídas por uma matriz polimérica com características morfológicas semelhantes em toda a extensão, na qual o fármaco encontra-se distribuído (Matté & Da Rosa, 2013; Moura, 2012). As micropartículas podem apresentar tamanhos variáveis entre 1 a 1000µm e ser ou não de origem biodegradável (Singh, et al., 2010).

Figura 1 - Representação esquemática de uma microcápsula (A) e de uma microesfera (B).



Fonte: Tewes, et al. (2006).

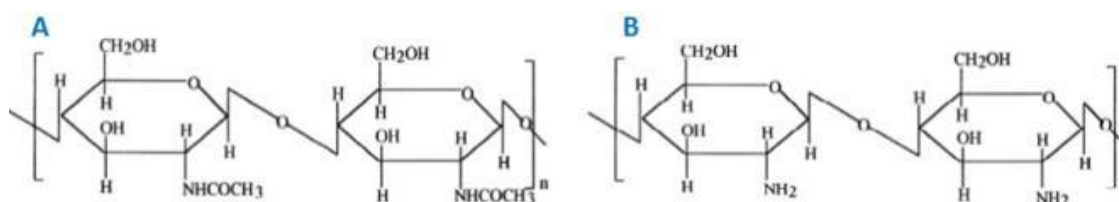
Apesar de existirem diversos métodos de obtenção de micropartículas, e cada um deles apresentarem maneiras e técnicas específicas a fundamentação do processo de formação pode ser considerado comum a todos os métodos existentes (Brasileiro, 2011; Venkatesan, et al., 2009; Ozkan, 2019). Diversos métodos têm sido utilizados na preparação de micropartículas, tais como o método de coacervação ou precipitação, gelificação ionotrópica, spray drying, emulsão simples e emulsão reticulada; (Brasileiro, 2011; Ozkan, 2019; Nunes, et al., 2015; Melo & Constant, 2021).

Dentre os vários materiais utilizados na função de formar micropartículas atualmente, destaca-se a quitosana (Azevedo, et al., 2007; Laranjeira & Fávere, 2009; Ali, et al., 2022; Liu, et al., 2022), diversos estudos têm sido realizados, destacando-se a liberação controlada de diclofenaco de sódio em microesferas de quitosana com diferentes agentes reticulantes (Gonçalves, et al., 2011); sistemas microparticulados e de filmes a base de quitosana e corante natural cúrcuma (Parize, 2009). Desenvolvimento de micropartículas de quitosana reticulada com glutaraldeído para liberação de ibuprofeno (Ofokansi, et al., 2013), entre outros sistemas que vem sendo descritos amplamente na literatura (Barroso, et al., 2020; Nascimento & Lombello, 2016; Silva, et al., 2022), a versatilidade da quitosana se apresenta em diversas áreas completamente distintas como na agricultura, cosmética, farmacêutica, engenharia de tecidos, entre outras (Felipe, et al., 2017; Shariatinia, 2018; Ali, et al., 2022; Liu, et al., 2022).

1.1 Quitosana

A quitosana é um biopolímero derivado da quitina (Figura 2) encontrado em invertebrados marinhos, insetos, fungos e leveduras (Battisti & Campana Filho, 2008; Rinaldo, 2006). A estrutura química da quitina consiste em várias unidades monoméricas do tipo 2-acetoamido-2-deoxi-D-glicose combinadas entre si por ligações $\beta - (1 \rightarrow 4)$. A quitosana é obtida pela N-desacetilação da quitina, quer seja por tratamento com bases fortes ou por métodos microbiológicos, resultando na estrutura $\beta - (1 \rightarrow 4) - 2$ -acetoamido-2-desoxi-glicopiranosose (Rinaldo, 2006; Campana Filho & Signini, 2001).

Figura 2 - Estrutura química: (A) quitina e (B) quitosana.



Fonte: El Knidri et al. (2018).

As propriedades da quitosana, como pureza, viscosidade, grau de desacetilação, peso molecular e estrutura do polímero, dependem das fontes de matéria-prima e métodos de fabricação (Campana Filho, et al., 2007; Silva, et al., 2006). Neste âmbito, é válido ressaltar que o polímero obtido deve ser caracterizado adequadamente, pois estas propriedades podem influenciar na biodegradabilidade do mesmo, principalmente na acessibilidade enzimática, influenciando na hidrólise do polissacarídeo (Muxika, et al., 2017). A principal característica que pode afetar a propriedade da quitosana na maioria das aplicações, como por exemplo, em sistemas de liberação de fármaco é o grau de desacetilação (El Knidri, et al., 2018; Silva et al., 2006; Rinaldo, 2006; Muxika, et al., 2017; Moore & Roberts, 1980) uma vez que controla a fração de grupos amino livres que podem estar disponíveis para interagir com os grupos reativos dos fármacos em solução. Outros fatores como cristalinidade, afinidade pela água e massa molar também podem influenciar no processo de liberação do fármaco (Laranjeira & Fávere, 2009). A quitosana possui diferentes grupos funcionais, como hidroxilas e aminas, que podem sofrer reação com outros grupamentos químicos, aumentando sua eficiência e capacidade de adsorção e liberação de fármacos (Azevedo, et al., 2007).

A quitosana é uma fibra natural de origem animal, e como as outras fibras, não possui valor calórico, não é digerível e não fornece energia ao organismo. Assim como, auxilia na redução de toxinas, favorece a redução de consumo de alimentos, pela satisfação parcial que as fibras fornecem a redução dos níveis de colesterol e dos níveis de risco de doenças cardíacas, além de outros benefícios (Kurtz, et al., 2010; Reis, 2005)

O processo de absorção das gorduras pela quitosana se dá quando a fibra é ingerida antes da ingestão dos alimentos. Quando chega ao estômago, a fibra em contato com meio ácido, se solubiliza, transformando-se em gel. Este gel apresenta condições adequadas para atrair e capturar as gorduras presentes nos alimentos ingeridos, levando-as em direção ao intestino, onde a quitosana é solidificada formando um envoltório em torno das gorduras, não permitindo assim sua absorção pelo organismo (Azevedo, et al., 2007; Pereira, 2016).

Em média, a quitosana tem capacidade de ligar-se de 8 a 10 vezes seu peso em gorduras, o que representaria 8 gramas de gordura para cada grama de quitosana. Considerando a ingestão de 3 gramas diariamente de quitosana, é possível eliminar em torno de 24 gramas de gorduras, o que equivale aproximadamente a uma redução de 240 kcal na dieta diária. Isso significa que mantendo a dieta e incluindo a ingestão da quitosana, é possível se obter uma perda gradual de peso. A perda de peso ocorre devido ao processo que o organismo busca de utilização da reserva energética corporal para compensar o déficit causado pela absorção das gorduras pela fibra. Porém, só se observará resultado se não houver compensação calórica através da ingestão de alimentos ricos em açúcar ou massas, sobre o que a fibra não tem qualquer ação (Pereira, 2016)

A microencapsulação de compostos bioativos, como os nutracêuticos, ou os funcionais, é outra área que também chama atenção para a aplicação das microesferas. Estes alimentos podem ser probióticos e prébióticos, alimentos sulfurados, nitrogenados, pigmentos e vitaminas, compostos fenólicos, ácidos graxos poliinsaturados e fibras. (Moraes & Colla, 2006) A preparação de microesferas de quitosana reticuladas é uma estratégia para incrementar a capacidade de adsorção da quitosana, uma vez que as microesferas possuem uma área superficial cerca de 100 vezes maior do que a quitosana em flocos (Penha, et al., 2020; Barros, et al., 2006; Torres, et al., 2005). A reticulação das cadeias de quitosana com o reagente bifuncional glutaraldeído torna o polímero insolúvel em meio ácido e melhora a sua resistência à degradação química e biológica (Gonsalves, et al., 2011).

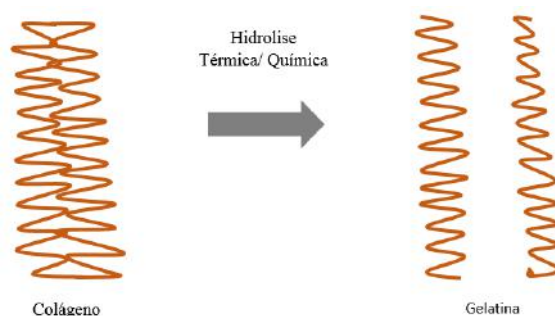
A associação de polissacarídeos com polímeros sintéticos é investigada na busca por materiais que apresentem suas propriedades originais reforçadas ou mesmo fornecer novas funcionalidades, que influenciem suas características físicas, químicas, mecânicas e reológicas. Algumas propriedades de polissacarídeos como abundância, biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade tem favorecido as escolhas desses polímeros na preparação de biomateriais (Berger, et al.,

2004). Neste sentido, espera-se que, a associação da quitosana com gelatina possa ser benéfica e auxiliar na sua capacidade de absorver gorduras e auxílio na redução de peso.

1.2 Gelatina

Gelatina é uma proteína obtida a partir da desnaturação do colágeno (Figura 3) que tem gerado grande interesse na preparação de materiais para uso biomédico devido às propriedades como, biocompatibilidade e bioadesividade. No entanto, devido à solubilidade de matrizes de gelatina em meio aquoso, a interação com outros polímeros e reticulação tem sido proposta para melhorar suas propriedades físico-químicas (Berger, et al., 2004)

Figura 3 - Representação processo de hidrólise do colágeno em gelatina.



Fonte: Flores (2018).

A desnaturação (perda total da estrutura tridimensional) do colágeno (Figura 4) para obtenção de gelatina normalmente é feita a partir do colágeno de pele ou osso de boi e porco. As proporções de peptídeos e a massa molar da gelatina dependem da natureza do processo químico de desnaturação (Rao & Thomas, 1988; Almeida & Santana, 2010). Por ser um polímero versátil tanto física como quimicamente, e apresentar propriedade significantes como solubilidade, poder gelificante, capacidade de aeração e de interação com outras substâncias como a quitosana, a utilização da gelatina aparenta ser tentador (Gómez-Guillén, et al., 2011; Rocasalbasa, et al., 2013).

Em virtude de todas as características. Pois assim como muitos outros polímeros, a quitosana apresenta desvantagens como baixa resistência mecânica e flexibilidade. Sendo assim, uma interação entre os polímeros quitosana e gelatina visa a melhoria das propriedades físico – químicas do produto. Diversos estudos mostram a versatilidade dos compostos de quitosana e gelatina utilizados como biomateriais (Yang, et al., 2010; Rocasalbasa, et al., 2013). Hidrogéis de quitosana e gelatina apresentaram maior flexibilidade, maior capacidade de absorção de água e melhor atividade antimicrobiana do que os hidrogéis de gelatina, mostrando maior potencial na aplicação de materiais para cicatrização de feridas (Yang, et al., 2010).

Os minerais escolhidos para este estudo foram o cromo e magnésio, a ideia é desenvolver um material que associe a capacidade da quitosana na forma de microesferas em auxiliar na redução de peso corporal potencializada com a adição dos minerais. Pois o cromo está relacionado com o metabolismo de carboidratos e gorduras, e esse seria o mecanismo de ação no (Volpe, 2013; Naithani, et al., 2014).

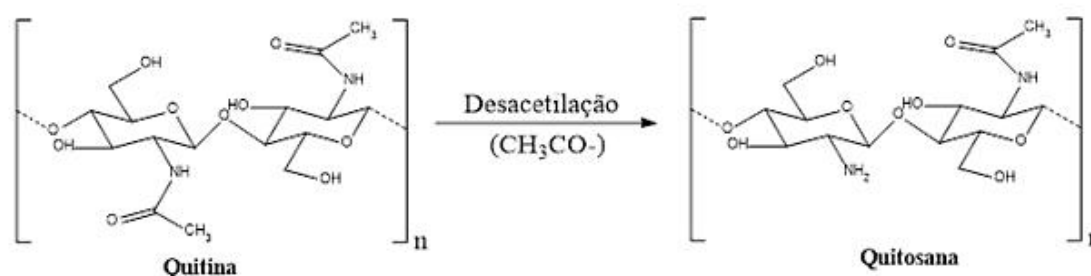
O objetivo deste trabalho consistiu na preparação e caracterização de microesferas de quitosana e quitosana/gelatina carregadas com os minerais cromo e magnésio utilizando o método de emulsão reticulada.

2. Metodologia

2.1 Desacetilação da quitosana comercial

Este procedimento foi realizado a fim de obter uma quitosana com maior grau de desacetilação. A reação de desacetilação foi realizada em meio alcalino com solução de hidróxido de sódio 50% (Campana Filho, et al., 2007; Damian, et al., 2005). A quitosana comercial foi previamente dissolvida em ácido acético e adicionada vagarosamente em solução de hidróxido de sódio, para obtenção de uma suspensão finamente dividida, segundo a reação mostrada na Figura 4.

Figura 4 – Reação de desacetilação da quitina



Fonte: Muxika et al. (2017).

2.2 Grau de desacetilação da quitosana

O grau de desacetilação da quitosana foi estimado a partir de titulação potenciométrica, foi realizado para analisar a eficiência da desacetilação da quitosana (Biskup, et al., 2012.; Garcia, et al., 2020). O método potenciométrico foi publicado por Broussignac (1972) e Muzzarelli (1978). Para o procedimento, aproximadamente 0,5g de quitosana foi dissolvido em 30 ml de HCl 0,1 mol/L à temperatura ambiente, sob agitação magnética até a completa homogeneização, posteriormente acrescentou 150 ml de água destilada para otimizar o procedimento da titulação. A partir da titulação dessa solução com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L previamente padronizada, obteve-se a primeira derivada da primeira curva de pH em função do volume de base que forneceu dois pontos de inflexão estes que permitiram determinar o volume de hidróxido de sódio necessário para a desprotonação dos grupos aminos da quitosana.

2.3 Espectroscopia de infravermelho

Para a obtenção do espectro de infravermelho da quitosana, foi preparada uma pastilha com 120mg de KBr e 40mg de quitosana previamente seca em estufa a 80°C por 12 horas. A amostra foi analisada na região entre 400-4000 cm^{-1} . (Espectrofotômetro FTIR, Série 4000-JASCO). O espectro de infravermelho foi comparado com o espectro de uma amostra padrão de quitosana.

2.4 Preparação das microesferas de quitosana

2.4.1 Preparação da solução de tolueno saturado com glutaraldeído (GA) - (GST)

A solução de GST foi preparada de acordo com o método de Longo, et al., 1982. Colocou-se 30 ml de solução de GA 25% em 30 ml de tolueno. A mistura foi então agitada por 1 hora usando um agitador magnético e mantida em repouso por um período de 24 horas para estabilização. A camada superior de tolueno saturado com GA foi então separada usando funil de decantação.

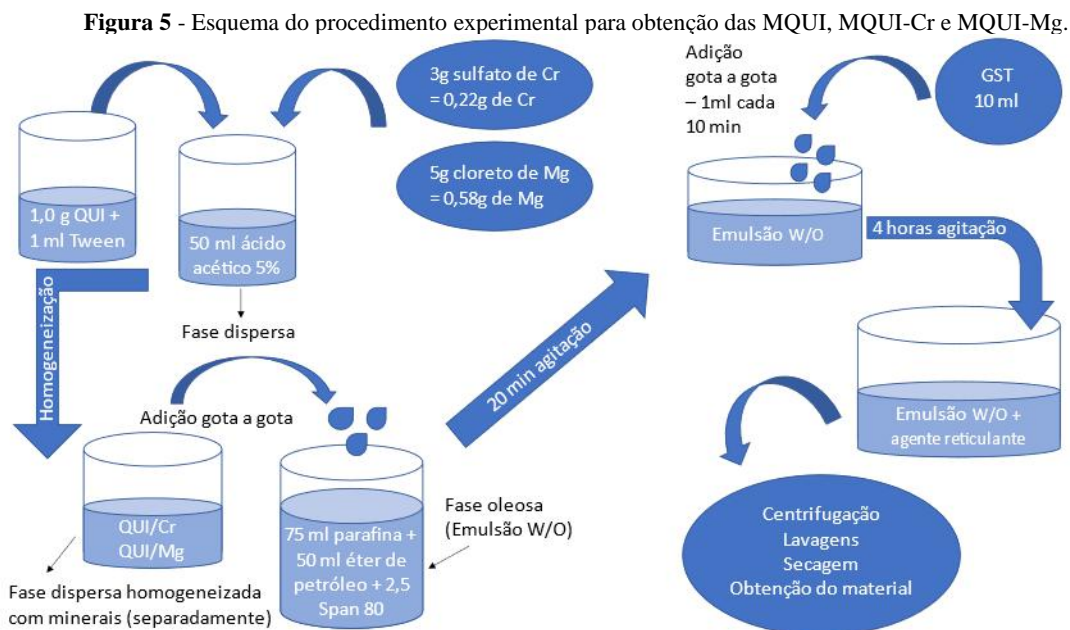
2.4.2 Preparação de microesferas de quitosana e quitosana/gelatina carregadas com os minerais cromo e magnésio

As microesferas de quitosana (MQUI), microesferas de quitosana carregadas com cromo (MQUI-Cr) e microesferas de quitosana carregadas com magnésio (MQUI-Mg) foram obtidas a partir da adaptação do método descrito por Thanoo, et al., 1992. As microesferas foram preparadas pelo método de emulsão reticulada utilizando o glutaraldeído como agente de reticulação (Jameela & Jaykrishnan, 1995; Ofokansi, et al., 2013).

Para produzir as MQUI, dissolveu-se 1g de quitosana em 50 mL de solução aquosa de ácido acético 5% (v/v) contendo 1mL de tween (fase dispersa). Para obtenção de MQUI-Cr e MQUI-Mg, adicionou-se na fase dispersa aquosa 3g sulfato de cromo e 5g cloreto de magnésio, correspondendo a 0,22g de cromo e 0,58g de magnésio respectivamente. Após a completa homogeneização, esta solução de quitosana contendo os minerais foi adicionada na fase oleosa constituída por 40mL de parafina, 25mL de éter de petróleo e 1,5g de surfactante (Span 80) para formar uma emulsão de água em óleo (w/o). Após 20 minutos de agitação em agitador magnético, iniciou a adição do agente de reticulação (GST). O procedimento consistiu na adição de 1mL (gota a gota) de GST, após 10 min mais 1mL até completar 10mL no total. Quando finalizou a adição o sistema permaneceu em agitação por mais 4h. Foram obtidos três lotes de microesferas, MQUI, MQUI-Cr e MQUI-Mg. As microesferas MQUI, foram preparadas para servir de comparação em relação às microesferas carregadas com minerais. O esquema sintetizando todas as etapas do procedimento experimental pode ser visualizado na Figura 5.

As microesferas de quitosana/gelatina MQUI/GEL foram obtidas a partir do mesmo procedimento descrito acima, utilizando uma proporção de gelatina em relação a quitosana de 20%. Foram obtidos três lotes de microesferas, MQUI/GEL (Branco), MQUI/GEL-Cr, MQUI/GEL-Mg. Foi feito também um lote de microesferas na proporção de 10% de gelatina (0,1g) e 90% de quitosana (0,9g).

Assim, as microesferas endurecidas foram separadas por centrifugação e lavadas diversas vezes com éter de petróleo, uma vez com acetona e uma vez com solução aquosa de bissulfito de sódio 5% para remoção do GA residual, e em seguida foram lavadas inúmeras vezes com quantidades grandes de água gelada e finalmente lavadas com acetona (Jameela & Jaykrishnan, 1995). As microesferas assim obtidas foram colocadas para secar em um dessecador em temperatura ambiente.



Fonte: Autores.

2.5 Caracterizações das microesferas

2.5.1 Microscopia Óptica

Os diâmetros das microesferas foram medidos utilizando uma câmera digital com micrômetro Olympus SC30 acoplado ao fotomicroscópio Óptico Olympus CX-41.

2.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A observação da superfície das microesferas de QUI/GEL, QUI/GEL-Cr e QUI/GEL-Mg após secagem foi realizada utilizando um microscópio eletrônico de Varredura - JSM-610LV. As amostras recobertas com carbono em um metalizador Bal-Tec SCD-050.

3. Resultados e Discussão

3.1 Caracterização da quitosana

3.1.1 Grau de desacetilação da quitosana

A titulação foi realizada em presença de um excesso de HCl. De acordo com a Figura 6 podem ser identificadas três regiões no gráfico de pH em função do volume de base. A primeira região (1) corresponde ao volume de hidróxido de sódio necessário para a neutralização do ácido em excesso. A segunda região (2) corresponde à neutralização dos prótons dos grupos aminos da quitosana. A terceira região (3) corresponde ao volume de base em excesso. Com esses dados foi possível obter o gráfico da primeira derivada pH/V no qual é possível a identificação de dois picos que correspondem aos dois pontos de inflexão. Pela diferença desses pontos obteve-se o volume de base necessário para neutralizar os grupos amino passíveis de protonação cujo valor foi utilizado para calcular o Grau de Desacetilação (GD). O resultado obtido foi 78,67% de desacetilação da quitosana. Esse GD maior que 50% indicam que a desacetilação da quitosana comercial foi eficiente, ou seja, houve uma substituição relevante dos grupos $-\text{COCH}_3$ pelo $-\text{H}$. O grau de desacetilação foi determinado (Biskup, et al., 2012) a partir da equação 1:

$$GD = \frac{N_{\text{NaOH}} \times (V2 - V1) \times 161}{M} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

N_{NaOH}: Concentração de NaOH (mol/L)

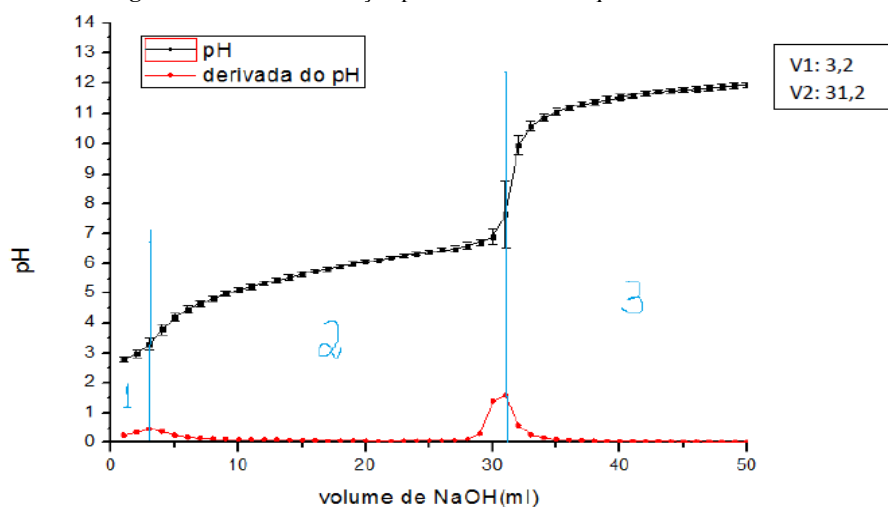
V1: Volume em litros de NaOH para neutralizar o excesso de HCl

V2: Volume em litros de NaOH usados para neutralizar a amostra de quitosana protonada

M: Massa da amostra (g)

161: Massa molar do monômero ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N}$)

Figura 6 – Curva de titulação potenciométrica da quitosana desacetilada.

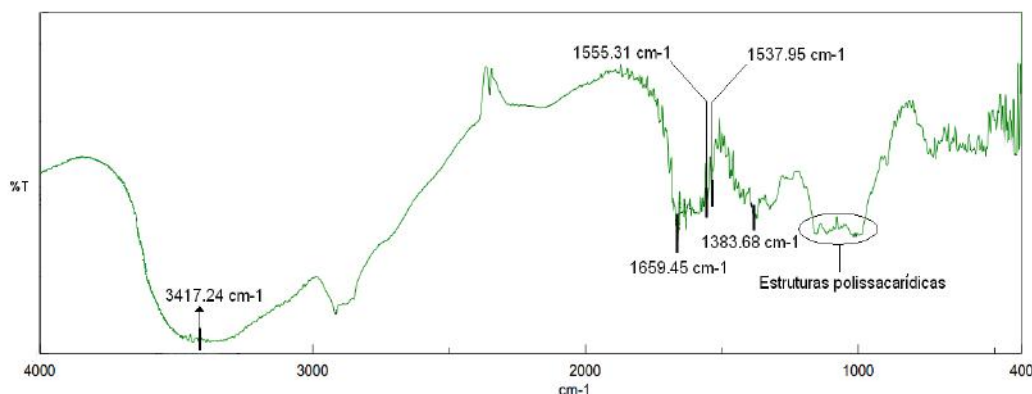


Fonte: Autores.

3.1.2 Espectroscopia de infravermelho

O espectro de infravermelho da quitosana mostrado na Figura 7 apresentou as seguintes bandas características: estiramento axial de -OH entre 3417 cm^{-1} , (esta banda se encontra sobreposta a banda de estiramento N-H), deformação axial do C=O do grupo amida por volta de $1659,45\text{ cm}^{-1}$, deformação angular de N-H por volta de $1555,31\text{ cm}^{-1}$, deformação angular do -CN de amida por volta de $1537,95\text{ cm}^{-1}$, deformações angulares de CH_3 por volta de $1386,68\text{ cm}^{-1}$ e bandas características de polissacarídeos entre $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$. Essas bandas são muito semelhantes às encontradas na literatura (Yang et al., 2010).

Figura 7 - Espectro de Infravermelho da Quitosana.

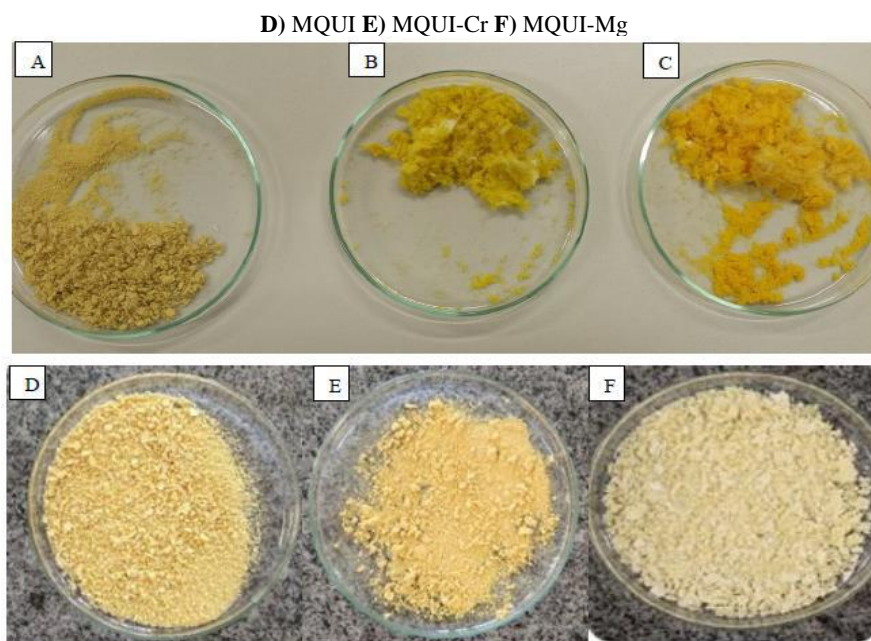


Fonte: Autores.

3.2 Preparação das microesferas de quitosana

A Figura 8 (A, B e C) apresentam as fotografias das microesferas MQUI/GEL, MQUI/GEL-Cr e MQUI/GEL-Mg respectivamente. Observando essas fotografias, pode-se averiguar que os materiais possuem um aspecto esponjoso em uma parte e, a outra parte apresenta um material na forma de grânulos e de pó bastante fino. Este aspecto esponjoso que essas microesferas apresentaram provavelmente é devido à presença da gelatina, pois comparando com as microesferas de quitosana sem a gelatina, MQUI (Figura 8D), de quitosana carregada com cromo, MQUI-Cr (Figura 8E), e com magnésio, MQUI-Mg (Figura 8F), podemos notar que estas microesferas não mostraram este aspecto esponjoso, e sim um aspecto somente de pó e grânulos e, aparentemente apresentam tamanhos menores.

Figura 8 - Fotografias das microesferas secas: A) MQUI/GEL B) MQUI/GEL-Cr C) MQUI/GEL-Mg.



Fonte: Autores.

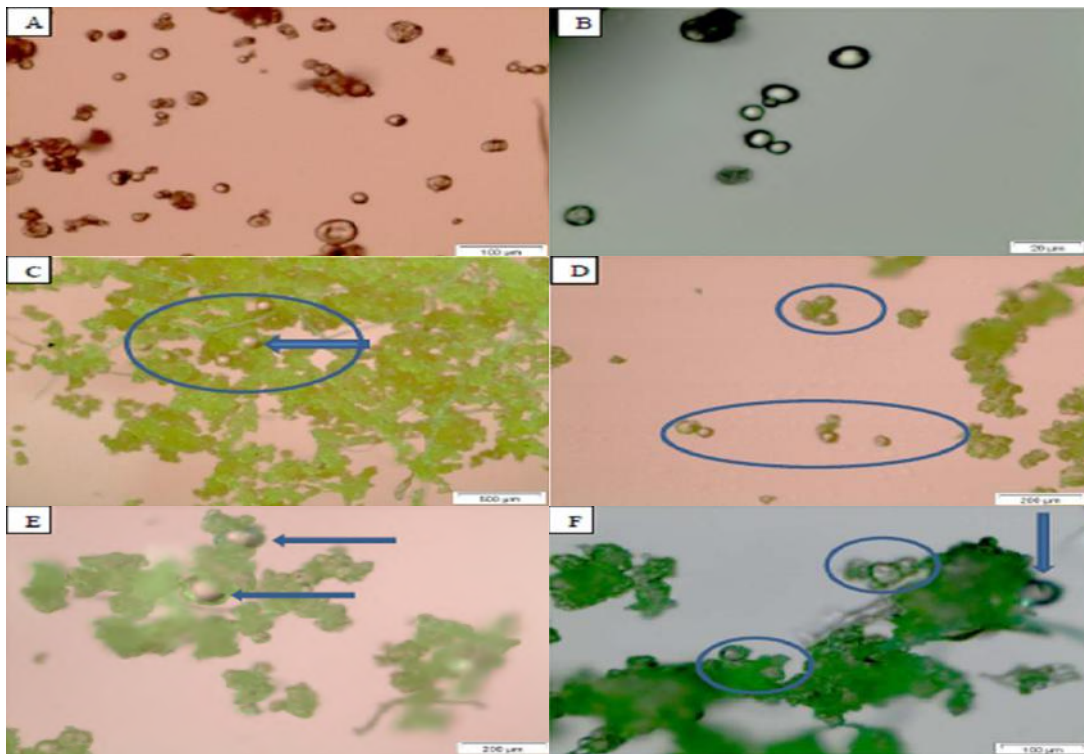
Estas microesferas foram obtidas pelo método da emulsão reticulada (Berger, et al., 2004; Rokhade, et al., 2007). Este método utiliza o grupo amino funcional reativo da quitosana para a ligação cruzada com grupos aldeídos do glutaraldeído (agente de reticulação). Neste método, uma emulsão água-em-óleo (W/O) foi obtida por adição da solução aquosa de quitosana/gelatina em uma fase oleosa contendo parafina e éter de petróleo. A solução de quitosana ou quitosana/gelatina em ácido acético foi estabilizada utilizando o surfactante hidrofílico tween e na fase oleosa adicionou o surfactante span 80, que é um tensoativo lipofílico, sendo desta forma solúvel em óleo, para estabilização da mesma. A emulsão estável, assim formada, foi reticulada por meio da adição de GST para endurecer e precipitar as partículas. A quantidade de GST adicionada foi baseada em um estudo feito por Ofokansi, et al., 2013. Neste estudo os pesquisadores mostram que esta quantidade era suficiente para obtenção de micropartículas com tamanhos e esfericidade mais uniformes (Ofokansi, et al., 2013).

3.3 Caracterização das microesferas

3.3.1 Microscopia Óptica

A Figura 9 apresentam as microfotografias obtidas por microscopia óptica nas quais se observam os tamanhos e as formas de algumas microesferas de quitosana sem gelatina MQUI (A e B). Nota-se, que o material seco é esférico, apresentando alguns formatos ovais, porém mantendo as características de microesferas, mas com tamanhos bastantes irregulares. A Figura 9 (C, D, E e F) apresenta as imagens das microesferas de quitosana com 20% de gelatina. Pode-se observar que o material apresenta algumas microesferas incrustadas em meio do material esponjoso. Este aspecto pode ser atribuído a presença da gelatina visto que as microesferas somente de quitosana não se mostraram com este aspecto de esponja.

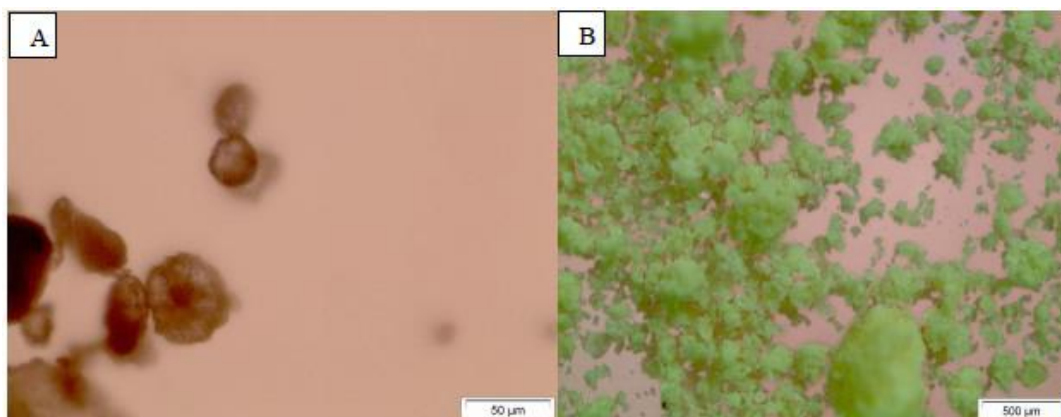
Figura 9 - Imagens obtidas por microscopia óptica: **A)** e **B)** MQUI, **C), D), E)** e **F)** MQUI/GEL



Fonte: Autores.

Na imagem dos materiais de quitosana com gelatina e cromo (MQUI/GEL-Cr), mostrado na Figura 10B, observa-se um material com características amorfas e não sendo possível observar a presença de microesferas. Este comportamento talvez possa ser atribuído à presença da gelatina somado com o efeito do sal proveniente da adição do cromo na forma de sulfato, material este que provavelmente não saiu totalmente no processo de lavagem. Estas características estão de acordo com as apresentadas pelo material de quitosana e cromo (MQUI-Cr) mostrado na Figura 10A, embora este apresenta aspecto de microesferas, estas possuem tamanhos muito irregulares, aparentando que estão envoltas por material amorfo.

Figura 10 - Imagens obtidas por microscopia óptica: **A)** MQUI-Cr, **B)** MQUI/GEL-Cr.

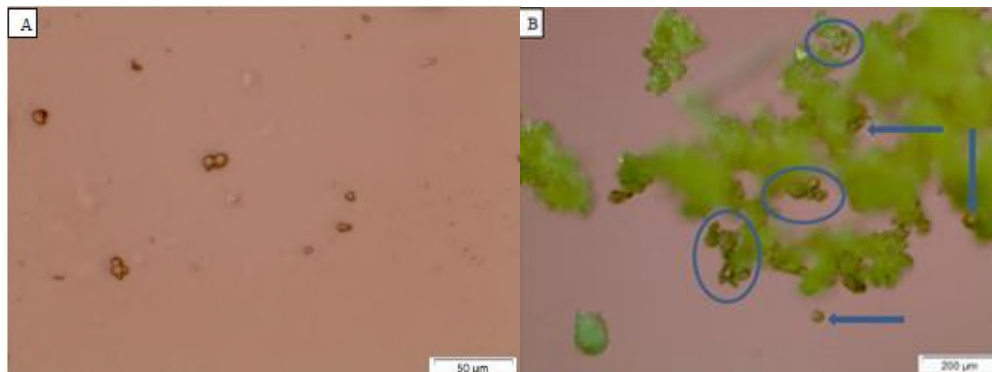


Fonte: Autores.

A Figura 11B apresenta as microesferas de quitosana/gelatina com magnésio (MQUI/GEL-Mg). Este material mostrou um comportamento similar ao apresentado pelas microesferas de quitosana e gelatina sem o mineral (MQUI/GEL) mostrado na Figura 9 C, D, E e F, ou seja, o material apresenta algumas microesferas incrustadas no meio do material esponjoso. Este

aspecto pode ser atribuído a presença da gelatina visto que as microesferas somente de quitosana e magnésio (MQUI-Mg) não se mostraram com este aspecto de esponja (Figura 11A).

Figura 11 - Imagens obtidas por microscopia óptica: **A)** MQUI-Mg, **B)** MQUI/GEL-Mg.

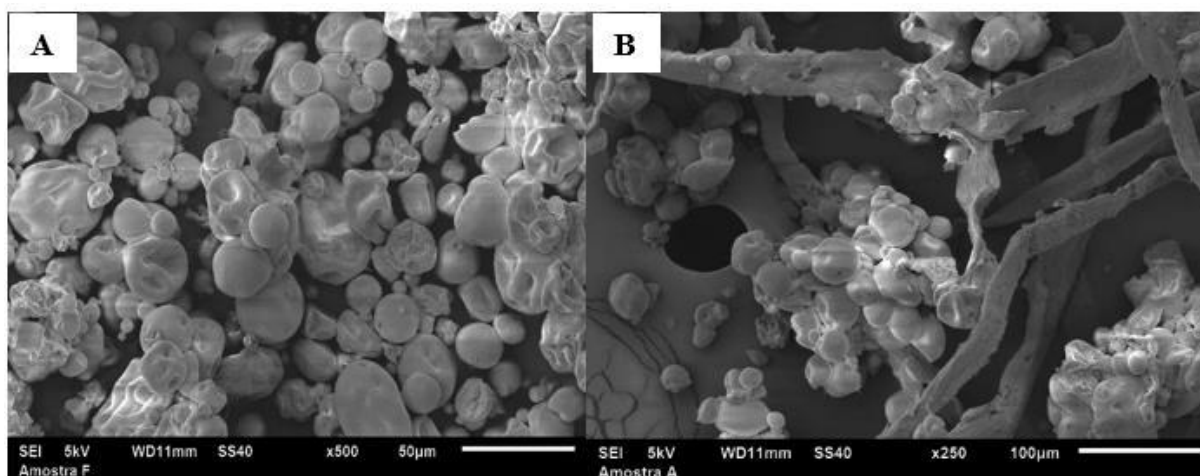


Fonte: Autores.

3.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

As micrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das microesferas de quitosana (MQUI) estão mostradas na Figura 12 A. A imagem mostra que a quitosana apresentou morfologia de microesferas, porém não estavam homogêneas e nem uniformes. Por comparação com imagens de microesferas de quitosana encontradas na literatura (Barroso et al., 2020) nota-se que as imagens obtidas neste trabalho são semelhantes para este tipo de material, portanto, mesmo com essas variações no tamanho e na morfologia, pode se comprovar o sucesso desse sistema para a obtenção de microesferas de quitosana. A Figura 12 B mostra a imagem de MEV para as microesferas de quitosana/gelatina (MQUI/GEL). Pode-se observar que o material apresenta microesferas dispersas ou incrustadas no meio do material com a presença de fibras. Este material fibroso provavelmente é devido a presença da gelatina visto que as microesferas somente de quitosana (MQUI) não se mostraram com este aspecto de fibras. Estes resultados estão de acordo com os obtidos previamente a partir da microscopia óptica.

Figura 12 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura: **A)** MQUI, **B)** MQUI/GEL.

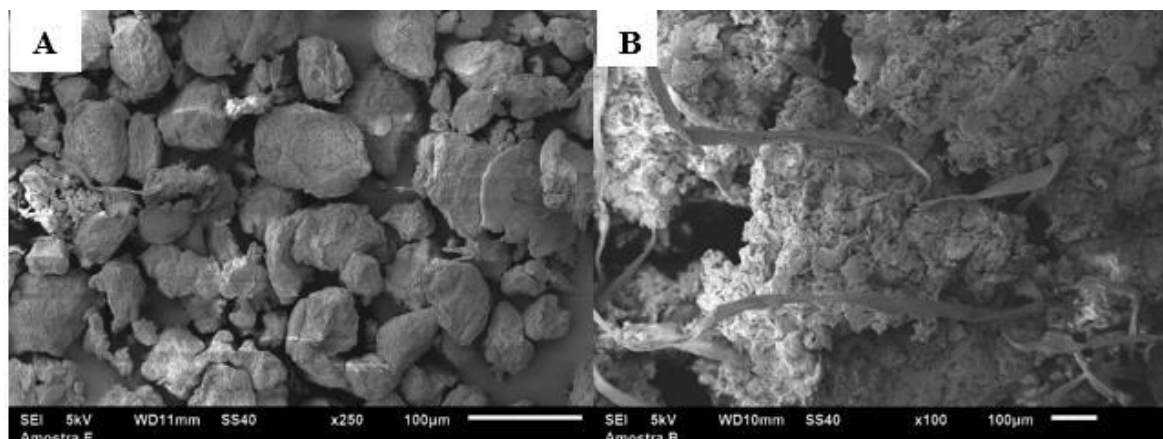


Fonte: Autores.

As imagens mostradas na Figura 13A e 13B deveriam mostrar um material na forma de microesferas constituído de quitosana (MQUI-Cr) e quitosana/gelatina carregadas com cromo (QUI/GEL-Cr). Porém as imagens de MEV mostraram um

material com características amorfas e não sendo possível observar a presença de microesferas. Este comportamento já demonstrado a partir da microscopia óptica pela Figura 10 talvez possa ser atribuído à presença da gelatina somado com o efeito do sal proveniente da adição do cromo na forma de sulfato, material este que provavelmente não saiu totalmente no processo de lavagem.

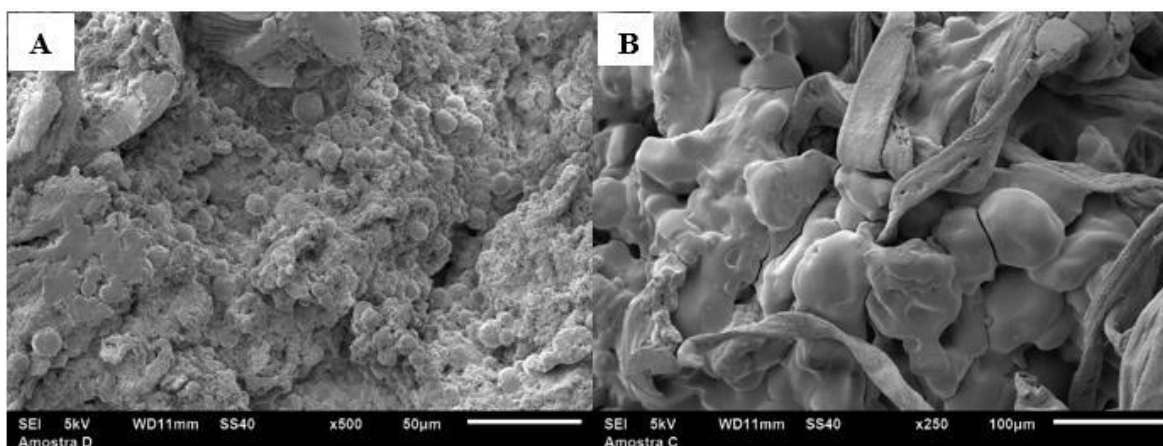
Figura 13 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura: **A)** MQUI-Cr, **B)** MQUI/GEL-Cr.



Fonte: Autores.

A imagem de MEV apresentada na Figura 14A para o material MQUI-Mg mostram algumas microesferas dispersas num material amorfo provavelmente seja o sal ainda presente. A Figura 14B mostra as MQUI/GEL-Mg, o material apresenta algumas microesferas incrustadas no meio do material fibroso, material este que provavelmente pode ser atribuído à presença da gelatina. Este material mostrou um comportamento similar ao apresentado pelas MQUI/GEL. As imagens de MEV para as MQUI/GEL-Mg corroboram com os resultados obtidos por microscopia óptica para esse material (Figura 11).

Figura 14 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura: **A)** MQUI-Mg, **B)** MQUI/GEL-Mg.



Fonte: Autores.

4. Conclusão

Foi possível obter microesferas de quitosana (MQUI) e quitosana/gelatina (MQUI/GEL), quitosana e quitosana/gelatina carregadas com cromo (MQUI-Cr e MQUI/GEL-Cr) e com magnésio (MQUI-Mg e MQUI-GEL-Mg).

As imagens obtidas de microscopia óptica e confirmadas pelas imagens de MEV mostraram microesferas de MQUI e MQUI-Mg apresentaram formas esféricas de tamanhos regulares e provavelmente com diâmetros em escala micrométrica.

As imagens também mostraram que a adição de 20% de gelatina à quitosana, promove à formação de algumas microesferas para MQUI/GEL e MQUI/GEL-Mg, mas o material passa apresentar características esponjosa e com aspecto de fibras que parecem insolúveis. Para o material de MQUI-Cr e MQUI/GEL-Cr não foi possível identificar a presença de microesferas. Estes materiais se mostraram com aspectos de materiais amorfos, pressupondo que além da gelatina, o cromo adicionado na forma de sulfato pode ter influenciado nas características deste material.

Os materiais obtidos com a adição de gelatina à quitosana não se mostraram satisfatórios, ou seja, houve uma obtenção de microesferas, porém incrustadas no material esponjoso, diferentemente do material obtido somente com a quitosana. Pode-se asseverar que o método da emulsão reticulada é funcional, porém a presença da gelatina interferiu negativamente na produção das microesferas.

Para trabalhos futuros, a ideia é otimizar a metodologia de produção de microesferas de quitosana pelo método da emulsão reticulada e posteriormente realizar estudos de toxicidade com elas. Caso essas microesferas não apresentem toxicidade, utilizá-las para estudos de encapsulação de fármacos.

Referências

- Ali, G., Sharma, M., Salama, E. S. Ling, Z., & Li, X. (2022). Applications Of Chitin And Chitosan As Natural Biopolymer: Potential Sources, Pretreatments, And Degradation Pathways. *Biomass Conv. Bioref.* <https://doi.org/10.1007/S13399-022-02684-X>
- Almeida, P. F., & Santana, J. C. C. (2010) Avaliação da qualidade de uma gelatina obtida a partir de tarsos de frango. *XXX Encontro Nacional de Engenharia de Produção*, São Paulo, Brasil,
- Azevedo, V., Chaves, S., Bezerra, D., Lia Fook, M. & Costa, A. (2007). Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista eletrônica de Materiais e processos*. 2 (3), 27-34. www.dema.ufeg.edu.br/revista
- Bansode, S. S., Banbarjee, S. K., Gaikwad, D. D., Jadhav, S. L., & Thorat, R. M. (2010). Microencapsulation: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, p. 38-43.
- Barros, F. C. F., Cavalcante, R.N., Carvalho, T. V., Dias, F. S., Queiroz, D. C., Vasconcellos, L. C. G., & Nascimento, R. F. (2006) Produção e caracterização de esferas de quitosana modificada quimicamente. *Rev. Iberoamericana de Polímeros*, 7, 232 – 246. eviberpol.files.wordpress.com/2019/08/2006-barros.pdf
- Barroso, M. H. S., Pereira, M. L., & Malaquias, K. S. (2020) Obtenção e caracterização de microesferas de quitosana: um estudo para liberação de fármacos anti-inflamatórios. *Em Atividades de Ensino e de Pesquisa em Química 2*. Atena Editora, 2. 123-139. [10.22533/at.ed.29520170112](https://doi.org/10.22533/at.ed.29520170112)
- Battisti, M. V.; & Campana-Filho, S. P. (2008). Obtenção e caracterização de α -quitina e quitosanas de cascas de macrobrachium rosebergi. *Quím. Nova*, 31(8). doi:10.1590/S0100-40422008000800019
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., & Gurny, R. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European journal of pharmaceuticals*, 57(1), 19–34. [https://doi.org/10.1016/s0939-6411\(03\)00161-9](https://doi.org/10.1016/s0939-6411(03)00161-9)
- Brasileiro, J.S.L. (2011) Microencapsulação De Compostos Bioativos: Inovação Em Diferentes Áreas. Tese (Dissertação De Mestrado) – Universidade Fernando Pessoa, Faculdade De Ciências Da Saúde, Porto,
- Broussignac, J. (1972) Un hault polymere naturel per connum dans l'industrie le chitosan, *Chimie et Industrie-Genie Chimique*, 99, 1241-1249
- Burhan A. M., Abdel-Hamid, S. M., Soliman, M. E., & Sammour, O.A. (2019) Optimisation of the microencapsulation of lavender oil by spray drying. *J Microencapsul*, 36(3):250-266. doi: 10.1080/02652048.2019.1620355.
- Biskup, R. C., Jarosińska, D., Rokita, B., Ulański, P., & Rosiak, J. (2012) Determination of degree of deacetylation of chitosan - comparison of methods, *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its ...*, XVII, 5-20.
- Campana Filho, S. P., Britto, D. De., Curti, E., Abreu, F. R., Cardoso, M. B., Battisti, M. V., Sim, P. C., Goy, R. C., Signini, R., & Lavall, R. L. (2007). Extração, estrutura e propriedades de α e β -quitina. *Química Nova*, 3(3): 644-650. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000300026>
- Campana Filho, S. P., & Signini, R. (2001). Efeito de aditivos na desacetilação de quitina. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 11(4), 169-173. doi:10.1590/S0104-14282001000400006
- Damian, C., Beirão, L. H., Francisco, A. De., Espírito Santo, M. L. P., & Teixeira, E. (2005) Quitosana: Um Amino Polissacarídeo com Características Funcionais. *Alim. Nutr.*, 16 (2), 195-205.
- El Knidri, H., Belaabed, R., Addaou, A., Laajeb, A., & Lahsini, A. (2018). Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, Part A, 1181-1189. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.139>.
- Felipe, L. O., Rabello, L. A., Junior, E. N. O., & Santos, I. J. B. (2017) Quitosana: Da Química Básica À Bioengenharia. *Química Nova*, 3 (4), 312-320.

- Flores, C.C. (2018). Preparação e caracterização de microesferas de quitosana/gelatina carregadas com os minerais cromo e magnésio. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Biomedicina) – Universidade Federal de Goiás, Jataí.
- Garcia, I. A., Hirdes, A. R., Inoue, M. D., & Santos, A. J. R. W. A. (2020). Evaluation of titrimetric methods for determination of deacetylation's degree in chitosan. *Braz. J. of Develop.* 6 (1), 4066-4084. doi:10.34117/bjdv6n1-289
- Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2011) Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: a review. *Food Hydrocolloids*, 25. 1813-1827. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>
- Gonsalves, A. A., Araújo, C. R. M., Soares, N. A., Goulart, M. O. F., & Abreu, F. C. (2011). Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. *Química Nova*, 34, 1215-1223. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000700021>
- Jameela, S. R., & Jayakrishnan, A. (1995). Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle. *Biomaterials*, 16, 769-775. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)99639-4](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)99639-4)
- Kurtz, M. C., Cruz, A., Retamoso, V., Drehmer, P. B., Silveira, V., & Kirsten, V. R. (2010) Quitosana na redução de colesterol e perda de peso: uma revisão da literatura. IN: *Promovendo Saúde na Contemporaneidade: desafios de pesquisa, ensino e extensão*. <https://xdocs.com.br/doc/artigo-2-semana-2-9877v9kpdq8z>
- Laranjeira, C. M. M., & Fávere, V. T. (2009) Quitosana: Biopolímero Funcional Com Potencial Industrial Biomédico. *Química.Nova*, 32 (3), 672-678.
- Longo, W. E., Iwata, H.; Lindheimer, T. A., & Goldberg, E. P. J. (1982) Preparation of hydrophilic albumin microspheres using polymeric dispersing agents. *Journal Pharmaceutical Science*, 71(12):1323-1328.
- Liu, Z., Wang, K., Pen, X., & Zhang, L. (2022). Chitosan-based drug delivery systems: current strategic design and potential application in human hard tissue repair. *European polymer journal*, 166, (5). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110979>
- Matté, G. M.; & Da Rosa, S. (2013) A tecnologia da microencapsulação através das microesferas de quitosana. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 14 (5)
- Melo, F. O., & Constant, P. B. L. (2021). Microencapsulação por gelificação iônica: Uma prospecção tecnológica com base no INPI. *Cadernos de Prospecção*. 14 (4). <http://dx.doi.org/10.9771/cp.v14i4.37093>
- Moore, G. K.; & Roberts, G. A. F. (1980). Determination of degree of N-acetylation of chitosan. *International Journal Biology Macromolecules*, 2, 115- 116.
- Moraes, F. P., & Colla, L.M. (2006). Alimentos funcionais e nutraceuticos: definições legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 3, 99-112. doi: <https://doi.org/10.5216/ref.v3i2.2082>
- Moura, M. J. (2012). Aplicações do Quitosano em Libertação Controlada de Fármacos: Algumas Considerações. *Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer*, 8 (14). <https://www.conhecer.org.br/enciclop/2012a/saude/aplicacoes.pdf>
- Muxika, A., Etxabide, A., Uranga, J., Guerrero, P., & de la Caba, K. (2017). Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *International journal of biological macromolecules*, 105(2), 1358–1368. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087>
- Muzzarelli, R. A. A. (1978) Chitin. Oxford: Pergamon Press.
- Nascimento, M.H.M., & Lombello, C.B. (2016) Hidrogéis a base de ácido hialurônico e quitosana para engenharia de tecido cartilaginoso. *Revista Polímeros*, 26 (4). <https://doi.org/10.1590/0104-1428.1987>
- Naithani, M., Bharadwaj J., & Darbari, A. (2014) Magnesium: The fifth electrolyte. *J. Med. Nutr Nutraceut*, 3, 66-72. doi:10.4103/2278-019X.131955
- Nunes G., Silva T., Holkem A., Schley V., & Menezes C. (2015) Microencapsulation of Probiotic Cultures: Principles of Spray Drying Method. *Ciência e Natura*, (37) 132– 141. doi:10.5902/2179-460X19742
- Ofokansi, K.C., Kenechukwu, F.C., Isah, A.B., & Okigbo, E.L. (2013) Formulation and Evaluation of Glutaraldehyde-Crosslinked Chitosan Microparticles for the Delivery of Ibuprofen. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12 (1), 19-25. doi:10.4314/tjpr v12i1.4
- Ozkan, G., Franco P., Marco, I., Xiao, J., & Capanoglu, E. (2019). A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications, *Food Chemistry*, 272, 494-506. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.07.205.
- Parize, A.L. (2009). Desenvolvimento de sistemas particulados e de filmes de a basequitosana e corante cúrcuma. Tese de Doutorado. Florianópolis, *Penha, V. C. S., Silva, Y. M. O., Silva, G. C., & Queiroz, M. B. (2020). Produção de microesferas de quitosana para fins farmacêuticos/production of chitosan microspheres for pharmaceutical purposes. Brazilian. Journal. of Development* 6 (8). 55941-55973. doi:10.34117/bjdv6n8-129
- Pereira, K. C., Ferreira, D. C. M., Alvarenga, G. F., Pereira, M. S. S., Barcelos, M.C. S., & Costa, J. M. G. (2018). Microencapsulação e liberação controlada por difusão de ingredientes alimentícios produzidos através da secagem por atomização: revisão. *Braz. J. Food Technol.*, v.21. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.08317>
- Pereira, M. L. (2016). Microesferas de quitosana carregadas com minerais para potencial aplicação no emagrecimento. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Biomedicina) – Universidade Federal de Goiás, Jataí.
- Rao, K.P., & Thomas, J.K. (1988) Collagen graft copolymers and their biomedical application. In: NIMNI.M.E. Collagen. Boca Raton, CRC, v.3, p.63-86
- Reis, A. B. (2005) Caracterização de filmes e coberturas de quitosana aplicados em papelão ondulado. 83 f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.

- Rinaudo, M. (2006) Chitin and Chitosan: Properties and Applications. *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632. <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Rodrigues, S.; Costa, A. M.; & Grenha, A. (2012). Chitosan/Carrageenan nanoparticles: Effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios. *Carbohydrate Polymers*, 89, doi: 10.1016/j.carbpol.2012.03.010
- Rokhade, A.P., Patil, S.A., & Aminabhavi, T.M. (2007). Synthesis and characterization of semi-interpenetrating polymer network microspheres of acrylamide grafted dextran and chitosan for controlled release of acyclovir. *Carbohydrate Polymers*, 67, 605-613.
- Rocasalbasa, G., Franceskoa, A., Tourinoa, X.F.F., Guebitzc, G.M., & Tzanoova, T. (2013). Laccase-assisted formation of bioactive chitosan/gelatin hydrogel stabilized with plant polyphenols. *Carbohydrate Polymers*, 92, 989-996.
- Shariatnia, Z. (2018). Pharmaceutical applications of chitosan. *Advances in colloid and interface science*, 263, 131-194. 10.1016/j.cis.2018.11.008
- Silva, H. S. R. C., Santos, K. S. C. R., & Ferreira, E. I. (2006). Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*, 29 (4), 776-785.
- Silva, I. C. T., Tavares, J. R., & Lyra A. M. (2022). Micropartículas de liberação modificada contendo cetoprofeno. *Visão Acadêmica*, 23 (1) ISSN 1518-8361
- Singh, M. N., Hemant, K. S., Ram, M., & Shivakumar, H. G. (2010). Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Research in pharmaceutical sciences*, 5(2), 65-77.
- Tewes, F., Boury, F., & Benoit, J.P. (2006). Patent: WO2007072106 A1
- Torres, M. A., Vieira, R. S., Beppu, M. M., & Santana, C. C. (2005). Microesferas de quitosana modificadas quimicamente. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 15 (4), 306-312. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282005000400016>
- Venkatesan, P., Manavalan, R., & Valliappan, K. (2009) Microencapsulation: a vital technique in novel drug delivery system. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 1 p. 26-35.
- Volpe S. L. (2013). Magnesium in disease prevention and overall health. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, 4(3), 378S-83S. <https://doi.org/10.3945/an.112.003483>
- Vieira, W. T., Nicollini, M. V. S., da Silva, M. G. C., de Oliveira Nascimento, L., & Vieira, M. G. A. (2022). Natural polysaccharides and proteins applied to the development of gastroresistant multiparticulate systems for anti-inflammatory drug delivery—A systematic review. *European Polymer Journal*, <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111205>
- Yang, C., Xu, L., Zhou, Y., Zhang, X., Huang, X., Wang, M., Han, YZhai, M., Wei, S., & Li, J. (2010). A green fabrication approach of gelatin/CM-chitosan hybrid hydrogel for wound healing. *Carbohydrate Polymers*, 82, 1297-1305. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.07.013>