

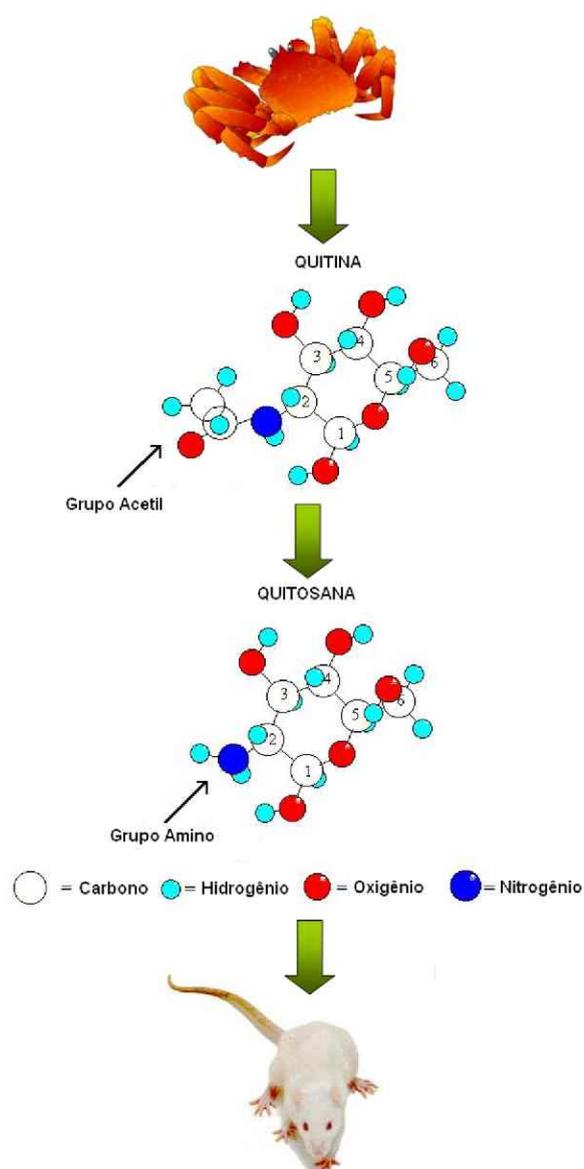
Documentos

ISSN 1518-7179

Novembro, 2007

29

Avaliação do Efeito Cicatrizante da Quitosana por Aplicação Tópica em Ratos



ISSN 1518-7179

Novembro, 2007

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Instrumentação Agropecuária
Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

Documentos 29

Avaliação do Efeito Cicatrizante da Quitosana por Aplicação Tópica em Ratos

Odilio B.G. Assis
Ariane M. Leoni
Antonio Pereira de Novaes

Embrapa Instrumentação Agropecuária
São Carlos, SP
2007

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação Agropecuária

Rua XV de Novembro, 1452
Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: (16) 3374 2477
Fax: (16) 3372 5958
www.cnpdia.embrapa.br
E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Dr. Carlos Manoel Pedro Vaz
Membros: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori,
Dr. João de Mendonça Naime,
Dr. Washington Luiz de Barros Melo
Valéria de Fátima Cardoso
Membro Suplente: Dr. Paulo Sérgio de Paula Herrmann Junior

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Tratamento de ilustrações: Valentim Monzane
Imagem da capa: Moacyr José Vaz de Souza
Editoração eletrônica: Valentim Monzane

1ª edição

1ª impressão (2007): tiragem 300

Todos os direitos reservados.

**A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).**

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Instrumentação Agropecuária**

A848a Assis, Odílio Benedito Garrido de
Avaliação do efeito cicatrizante da quitosana por aplicação tópica em
ratos. / Odílio Benedito Garrido de Assis, Ariane M. Leoni, Antonio Pereira
de Novaes. - São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2007.
16 p. - (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Documentos, ISSN
1518-7179; 29)

1. Bioengenharia. 2. Engenharia Biomédica. 3. Materiais
biocompatíveis. 4. Reparação cutânea. 5. Revestimento biopolimérico. 6.
Quitosana. I. Leoni, Ariane M. II. Novaes, Antonio Pereira de. III. Título. IV.
Série.

CDD 21 ED 610.28

© Embrapa 2007

Autores

Odilio Benedito Garrido de Assis

Físico, Dr.,
Embrapa Instrumentação Agropecuária,
Rua XV de Novembro, 1452
C. P. 741 - CEP 13560-970
São Carlos, SP
odilio@cnpdia.embrapa.br

Ariane Maria Leoni

Bióloga, Pedagoga,
PESC - Parque Ecológico de São Carlos
Rua São Joaquim, 979
13560-300 - São Carlos, SP
maria@itelefonica.com.br

Antonio Pereira de Novaes

Veterinário, MSc.,
Embrapa Instrumentação Agropecuária,
Rua XV de Novembro, 1452
C. P. 741 - CEP 13560-970
São Carlos, SP
novaes-consultor@cnpdia.embrapa.br

Apresentação

O presente estudo avaliou a cicatrização cutânea em ratos como resposta à aplicação tópica do polissacarídeo quitosana. Incisões foram criadas na pele e revestidas com gel de quitosana em alta concentração, i.e., 10 g/L. Procedimento similar foi realizado com aplicação de colódio elástico comercial adicionado ao antibiótico cloxacilina, objetivando uma comparação clínica direta. A cobertura por quitosana resultou em filme flexível, transparente e de alta aderência, permitindo um acompanhamento qualitativo da recuperação. Após o sexto dia de tratamento os animais apresentaram graus similares de cicatrização, com ligeira vantagem visual para o uso da quitosana. Aspectos microscópicos do filme e detalhes da preparação e aplicação do gel são descritos. Os resultados confirmam a ação ativa do polissacarídeo como agente hemostático, não diferindo qualitativamente dos resultados obtidos pela aplicação de antibiótico comercial. A avaliação confirmou o potencial uso da quitosana, nas áreas médica e veterinária, como material de uso tópico para reparação de tecido cutâneo. Apresenta como vantagem o fato de ser um material abundante, natural e atóxico.

Álvaro Macedo da Silva
Chefe Geral

Sumário

Introdução	9
A quitosana	9
Material e Métodos	10
Preparação da Quitosana	10
Animais	11
Resultados e discussão	12
Filmes de quitosana	12
Avaliação clínica	13
Conclusões	14
Agradecimentos	14
Referências	14

Avaliação do Efeito Cicatrizante da Quitosana por Aplicação Tópica em Ratos

Odilio B.G. Assis
Ariane M. Leoni
Antonio Pereira de Novaes

Introdução

A reparação de feridas ou danos não profundos na camada dérmica é um processo complexo que depende de fatores internos e externos e envolve essencialmente uma resposta conjunta de diferentes células que compõem o tecido local. As células fibroblastos desempenham papel fundamental no processo de restauração dérmica por sua capacidade de migração e fixação, iniciando a substituição e recombinação celular na área injuriada (MORGAN e PLEDGER, 1992).

O desenvolvimento de materiais poliméricos biocompatíveis e sua aplicação tópica tem sido objeto de diversos estudos, principalmente para o emprego como suporte estruturado auxiliador para a cultura de células *in vivo*, em especial de células fibroblastos (LOMBELLO et al., 2002; RICH, 2002). Os polímeros chamados bioabsorvíveis degradam-se espontaneamente em condições fisiológicas naturais ou são absorvidos completamente pelo organismo, em intervalos de tempo que permitem, em condições adequadas, a plena substituição dos elementos teciduais. Os materiais bioabsorvíveis são particularmente promissores para a chamada *engenharia de tecidos*, com uma ampla gama de aplicações, que vai desde a restauração propriamente dita, ao uso como órgãos artificiais, como revestimentos em pinos, coberturas de suturas ou incisões pós-operatórias, reposições ósseas, peles provisórias e para os chamados curativos inteligentes, com a liberação controlada de drogas e agentes ativos (BONASSAR e VACANTI, 1998; RAMAKRISHNA et al., 2001).

Além de sua completa absorção, um biomaterial adequado deve apresentar boa adesão sem provocar reação adversa de nenhum tipo. Nesse sentido, a quitosana tem sido citada como um material de considerável potencial para uso biomédico (MATTIOLI-BELMONTE et al., 1997). A quitosana é um polissacarídeo atóxico translúcido, permitindo ampla aplicação e a inspeção visual. Pode ser processado na forma de gel, gerando, após a secagem, uma película semipermeável que possibilita a passagem de luz e medicamentos sem que seja necessário sua remoção. Filmes de quitosana para uso tópico merecem ser mais bem avaliados como matriz de suporte na restauração e incorporação de células vivas e por seu caráter antimicrobico.

A quitosana

Quitosana é um polímero natural derivado do processo de desacetilação da quitina, que é

assumido como o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza, atrás apenas da celulose. Comercialmente é extraído a partir das carcaças de alguns crustáceos, como o camarão e o caranguejo. Sua estrutura é formada pela repetição de unidades beta (1-4) 2-amino-2-deoxi-D-glucose (ou D-glucosamina) apresentando uma cadeia polimérica similar à da celulose, conforme expressa na Fig. 1.

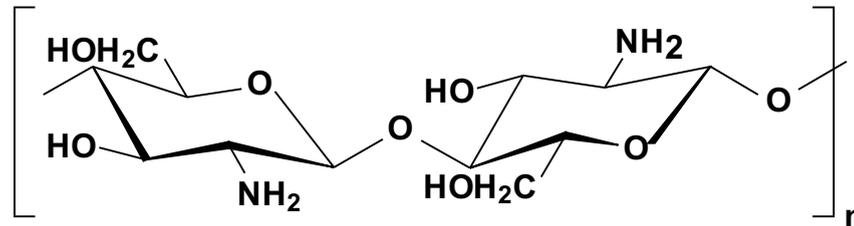


Fig. 1 - Representação esquemática da estrutura primária da quitosana, sendo n o grau de polimerização

Devido a suas características atóxicas, além de ser biocompatível, biodegradável e pela facilidade de formação de géis, a quitosana tem sido considerada como um composto de interesse industrial, em especial no setor alimentício e para uso farmacêutico em geral. Atualmente, suas principais indicações são como aglutinante e floculante, apropriado à confecção de membranas para interação de íons metálicos e compostos orgânicos em meio aquoso (BRUM et al., 1995; CAMPANA-FILHO e DESBRIÈRES, 2000; GOY et al., 2000), como elemento básico para a confecção de matrizes de liberação controlada de drogas (JOSUÉ et al., 2000), como revestimentos protetores de frutas e hortaliças (ASSIS et al., 2002a) e fartamente divulgado, embora ainda que controverso, como um agente ativo no emagrecimento humano por sua interação com gorduras e estruturas afins (*fatter trapper*) (DEUCHI et al., 1994; PITTLER, et al., 1999), entre outras possíveis aplicações sugeridas à quitosana.

Recentemente uma série de estudos foi publicada avaliando potenciais aplicações da quitosana como revestimento curativo ou como suporte para crescimento de células e recuperação de tecido animal (KHAN et al., 2000; NETTLES e ELDER, 2001; HOWLING et al., 2002; KHAN e PEH, 2003). Esses trabalhos além de enfocarem as conhecidas propriedades bioadesivas (HENRIKSEN et al., 1996) e atividades antifúngicas da quitosana (JUNG et al., 1999), avaliam o caráter hemostático como agente de estancamento sanguíneo.

No presente trabalho apresentamos os resultados clínicos comparativos da aplicação de antibiótico em mistura com colódio elástico e de quitosana sobre feridas em ratos. Descrevem-se as etapas de processamento do gel de quitosana e caracterização da película formada.

Material e Métodos

Preparação da Quitosana

Comercialmente, quitosana é disponível de um grande número de fornecedores em diferentes graus de pureza, massa molecular e grau de desacetilação. A quitosana empregada neste trabalho foi obtida em farmácia de manipulação, sendo, segundo informação inscrita, procedente da purificação de quitinas extraídas de cascas de camarão. Esse material apresenta aspecto granular, ligeiramente amarelado e pode ser classificado como de média massa molar (SIGNINI e CAMPANA-FILHO, 1998). O gel foi preparado por procedimento padrão que consiste na dissolução do polímero sob agitação moderada em

meio aquoso, para equilíbrio do pH próximo a 4, fazendo uso de ácido acético 0,5 M. A concentração de quitosana dissolvida foi de 10 g/L. Período de 12 horas de agitação foi mantido para assegurar uma total homogeneização da solução. Para simplificar o processo todo o procedimento foi realizado sob temperatura ambiente.

O material comercial empregado para comparação clínica foi o colódio elástico de origem farmacêutica. O colódio (*Colloidium*) está entre os produtos empregados há várias décadas como emulsão simples para uso em cobertura protetora ou como veículo de liberação de drogas em ferimentos (CLAYMAN, 1989). O colódio consiste em uma base celulósica parcialmente nitretada (piroxilina) dissolvida em solventes voláteis (éter ou etanol) com adição de um composto plastificante (álcool polivinil). Ambos os produtos foram separadamente inseridos em frascos com sistema de nebulização e a aplicação se deu pela formação uma camada espessa de spray (0,5 a 0,7 cm aproximadamente).

Animais

Ratos (*Rattus norvegicus*), machos adultos, com pesos individuais próximos a 160g foram usados como cobaias. Cada animal foi sedado, sendo mantidos neste estado por todo o período operatório com o auxílio de um pequeno recipiente contendo algodão embebido em éter. A tricotomia foi realizada na região dorsal dos animais, na qual foram efetuadas duas incisões retas paralelas, em cada lado do dorso, de 10 a 15 mm, no sentido crânio-caudal, expondo o tecido conjuntivo subcutâneo. Não houve assepsia ou cuidados adicionais em evitar possíveis infecções nos cortes.

Os animais foram separados em dois conjuntos de seis exemplares, nos quais aplicou-se em um grupo o gel de quitosana e no outro o colóide comercial associado a cloxacilina (500 mg, Pfizer) na proporção 1:1 (v/v). A cloxacilina é um antibiótico de uso tópico a base de penicilina benzatina, formulada para a prevenção ou tratamento de rotina infecciosa de amplo uso veterinário (SANTOS et al., 2002). A Fig. 2 apresenta a aparência das incisões provocadas e seu revestimento com o gel de quitosana.



Fig. 2 - Aparência das incisões e posterior cobertura com gel de quitosana. Procedimento idêntico foi realizado com cobertura de colódio elástico associado ao antibiótico cloxacilina.

Por todo o período experimental os animais receberam dieta normal "*ad libitum*" composta de ração e água. O aspecto e a regularidade superficial das feridas, assim como a resposta biológica do tecido foram acompanhados através de registro fotográfico diário até completa

cicatrização. A Fig. 3 sumariza a seqüência de produção do gel de quitosana e sua aplicação tópica nos animais. O aspecto estrutural do filme seco foi observado por microscopia eletrônica de varredura (Philips XL 30), em réplicas externas, ou seja, em depósitos realizados sobre lâminas de vidro.

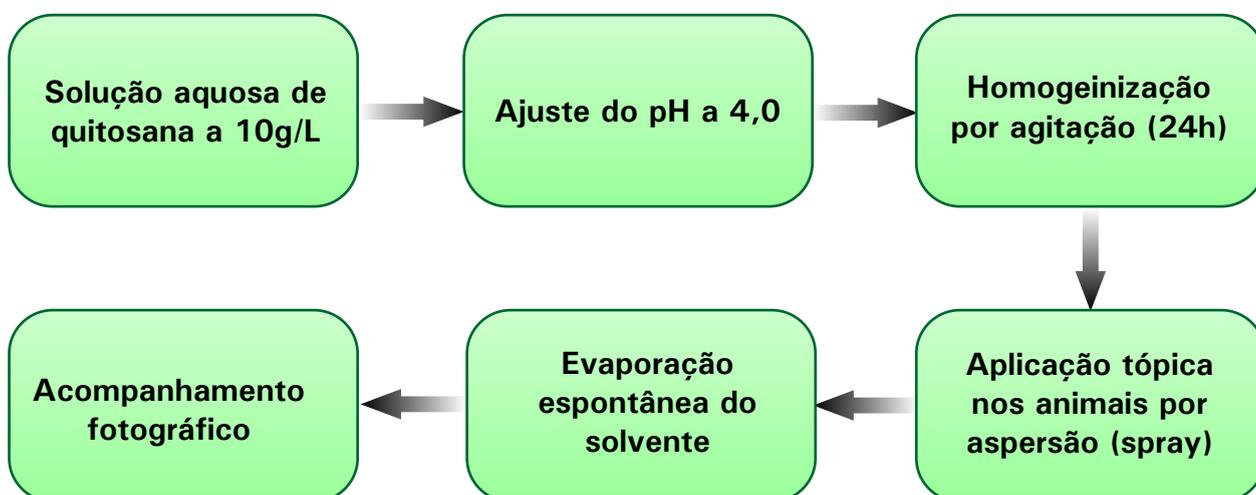


Fig. 3 - Seqüência de produção de gel de quitosana e aplicação tópica no animais.

Resultados e Discussão

Filmes de quitosana

As características físicas dos filmes de quitosana, em diversas concentrações e condições de processamento, têm sido objeto de estudos já há algum tempo junto à Embrapa Instrumentação Agropecuária. O filme gerado através da evaporação espontânea do solvente, cujo processo completo se dá em torno de 5 a 7 minutos, resulta em uma película delgada, com espessura da ordem de 1 mm, que dependendo das condições da superfície depositada pode resultar em filmes com estruturas densas e com baixa porosidade ou microporosas com topografia irregular (ASSIS e CAMPANA-FILHO, 2002). Estudos anteriores têm constatado, contudo, pouca dependência das características finais, como espessura e rugosidade, quando aplicado sobre uma mesma superfície, com relação à concentração de polissacarídeo em solução (ASSIS et al., 2002b). O filme seco é transparente, brilhante e pode apresentar, quando aplicado sobre a derme, regiões de destacamento em função de diferentes taxas de evaporação, irregularidade da região depositada ou adesão. A título de ilustração, a Fig. 4 apresenta os aspectos possíveis do filme sob visualização por microscopia eletrônica de varredura.

Em condições em que se encontram totalmente secos, os filmes de quitosana apresentam uma permeação ao O₂ muito inferior ao demais filmes naturais como os de glúten ou a base de celulose (KITTUR et al., 1998; OLABARRIETA, 2005). Contudo a quitosana é um material altamente hidrofílico em função do alto número de grupos amino (NH) e hidroxilas (OH) em sua estrutura, que por serem polares favorecem a migração de moléculas de água ao redor desses sítios (ASSIS e SILVA, 2003). Essa absorção de água induz o intumescimento do filme, ou seja, a separação das cadeias permitindo a respiração local (DESPOND et al., 2001; ASSIS e SILVA, 2003)

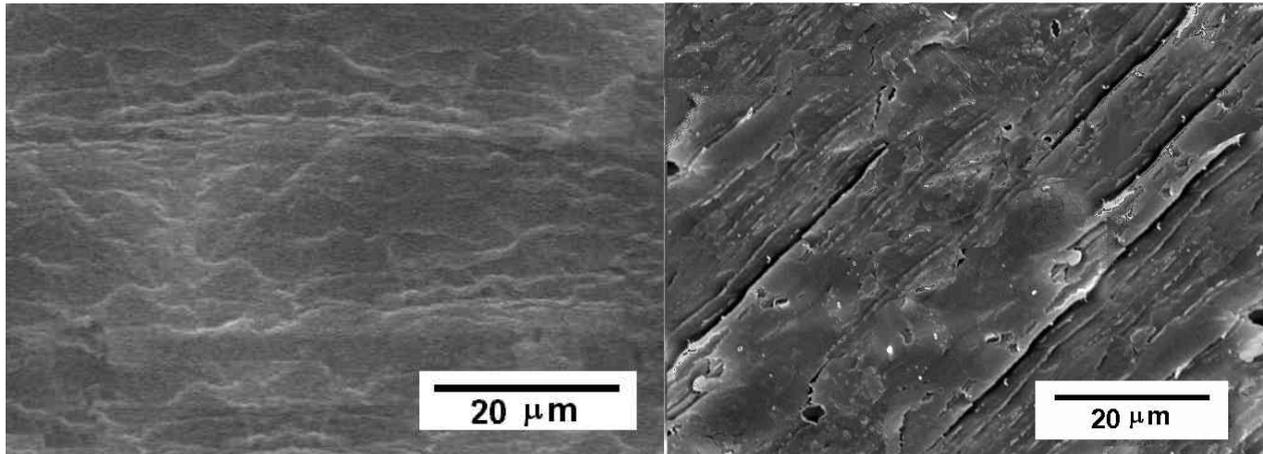


Fig. 4 - Aspecto microscópico de filmes de quitosana depositado sobre superfície plana e sobre superfície irregular. O filme resultante pode ser denso sem poros aparentes, ou irregular, escamado, com regiões de destacamento ou falhas.

Avaliação clínica

Nos primeiros dias de acompanhamento, para os dois grupos de curativos, não foi observado inflamação, infecção ou sinais de necrose no tecido conjuntivo subcutâneo. Após o terceiro dia observou-se suave regressão do quadro reacional quando comparado com o período anterior. Tendência à cicatrização fica comprovada para ambos os materiais em teste. Com o decorrer dos períodos o quadro histológico tendeu a uma regressão em condições aparentemente ausentes de contaminações microbianas. Após o quarto dia não é possível visualizar as aplicações de quitosana, sendo completamente absorvido pela pele dos animais, embora o filme de colódio fosse ainda visível. Observou-se, contudo, que a taxa de cura foi bastante similar para ambos materiais, constatando-se em alguns animais, uma total cicatrização com o uso da quitosana, embora não significativo do ponto de vista estatístico. A Fig. 5 apresenta o aspecto após 6 dias da aplicação dos compostos onde o quadro clínico é satisfatório para as duas aplicações em teste.

De uma forma geral os materiais apresentaram rápida secagem e boa aderência. Embora transparente, é possível observar uma gradual absorção pelo organismo até completo desaparecimento da cobertura.



Fig. 5 - Aspecto clínico após o sexto dia. A recuperação é similar para os materiais aplicados. (A) Quitosana e (b) Colódio elástico

A quitosana, em sua formulação básica, apresenta grupos aminos que são estruturalmente semelhantes aos aminoácidos que constituem a pele. Esta característica é um aspecto favorável na redução de irritações ou rejeições localizadas além de atuar na redução do sangramento. Somada a capacidade de estimular a regeneração da derme, outra característica que reforça o potencial médico da quitosana é sua natureza hidrofílica. Segundo Sebastianov (2002), materiais hidrofílicos têm a capacidade de minimizar a absorção de proteínas durante a interação entre sangue e o biomaterial. Ou seja, as melhores respostas como suportes de crescimento celular ocorrem nos materiais polares, como a quitosana, onde a compatibilidade é essencialmente com o sangue, com baixa taxa de interação com proteínas. Este aspecto é particularmente interessante no caso de tratamento de queimaduras ou lesões profundas. Para elevar o tempo de interação, existe a possibilidade de reduzir a taxa de absorção do filme pela elevação da massa molar da quitosana empregada. Nos testes deste trabalho avaliamos uma quitosana de média massa molar, mas o emprego de polissacarídeo de alta massa molar reduz a penetração sobre a pele (PITTERMANN et al., 1997), permanecendo desta forma por um maior período sobre o ferimento, o que pode ser desejado para tratamentos de longa duração.

Conclusões

A quitosana processada segundo as condições apresentadas neste trabalho, resultou em um material transparente, flexível e com considerável resposta de biocompatibilidade. O acompanhamento realizado sobre a aplicação em ratos, sugere e, de certa forma confirma, que a quitosana pode exercer uma influência benéfica nas diversas etapas da recuperação de injúrias cutânea. Na comparação com produto farmacêutico convencional (colódio associado a antibiótico), a quitosana apresentou resultados similares, o que reforça seu potencial de aplicação médica, além de ser consideravelmente mais barato que o similar comercial.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Embrapa Instrumentação Agropecuária e ao CNPq por auxílio financeiro recebido. Agradecem também o técnico Moacyr J. Vaz de Souza pelo auxílio no registro fotográfico.

Referências

- ASSIS, O. B. G.; ALVES, H. C.; PESSOA, J. D. C. Avaliação preliminar do uso de quitosana como revestimento protetor em maçãs cortadas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2002, Belém. **Anais....** [S. l.: s. n.], 2002a. 1 CD-ROM.5 f.
- ASSIS, O. B. G.; BERNARDES FILHO, R.; VIEIRA, D. C.; CAMPANA FILHO, S. P. AFM Characterization of Chitosan Self-Assembled Films. **Int. J. of Polym. Mater.**, New York, v. 51, n. 7, p. 633-638, 2002b.
- ASSIS, O. B. G.; CAMPANA FILHO, S. P. Chitosan self-assembled Thin-film: Influence of Solution concentration on the film roughness and thickness. In: *LATINAMERICAN SYMPOSIUM ON POLYMERS SLAP*, 8., 2002, Acapulco. **Proceedings...** Acapulco: Sociedad Polimérica de México A.C. 2002. p. 599-600.

ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. Caracterização Estrutural e da Capacidade de Absorção de Água em Filmes Finos de Quitosana Processados em Diversas Concentrações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 13, n. 4, p. 223-228, 2003.

BONASSAR, L. J.; VACANTI, C. A. Tissue Engineering: The First Decade and Beyond. **J. of Cellular Bioch. Suppl.**, [S. I.], v. 30/31, p. 297303, 1998.

BRUM, O. G.; SOLDI, V.; MAGGIONI, J. F.; PIRES, A. T. N. Chitosan membranes for pressure filtration. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 6 n. 4, p. 353-356, 1995.

CAMPANA-FILHO, S. P.; DESBRIÈRES, J. Chitin, chitosan and derivatives. In: FROLLINI, E.; LEÃO, A. L.; MATTOSO, L. H. C. (Ed.). **Natural polymers and agrofibers composites**. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2000. p. 41-71.

CLAYMAN, C. B. **The American Medical Association Encyclopedia of Medicine**. Random House, USA: AMA, 1989. 1136 p.

DESPOND, S.; ESPUCHE, E.; DOMARD, A. Water Sorption and Permeation in Chitosan Films: Relation between Gas Permeability and Relative Humidity. **J. Polymer Sci.: Part B: Polymer Physics**. 2001; 39:31143127.

DEUCHI, K.; KANAUCHI, O.; IMASATO, Y.; KOBAYAH, E. Decreasing effect of chitosan on the apparent fat digestibility by rats fed on a high-fat diet. **Biosci Biotechnol. Biochem.**, Tokyo, v. 58, n. 9, p.1613-1616, 1994.

GOY, R. C.; VIEIRA, D. C.; CAMPANA FILHO, S. P.; ASSIS, O. B.G. FTIR spectroscopy evaluation of chitosan-pesticide interaction in aqueous medium In: MATTOSO, L. H. C.; LEÃO, A.; FROLLINI, E. (Ed.). Proceedings from the Third International Symposium on Natural Polymers and Composites and the São Carlos. Workshop on Progress in Production and Processing of Cellulosic Fibers and Natural Polymers: **Proceedings...** Embrapa: USP-IQSC, UNESP, 2000. p. 127-130.

HENRIKSEN, I.; GREEN, K. L.; SMART, J. F.; SMISTAD, G.; KARLSEN, J. Bioadhesion of hydrated chitosan: an in vitro and in vivo study. **Intern. J. of Pharm.**, [S. I.], v. 145, p. 231-240, 1996.

HOWLING, G. I.; DETTMAR, P. W.; GODDARD, P. A.; HAMPSON, F. C.; DORNISH, M.; WOOD, E. J. The effect of chitin and chitosan on fibroblast-populated collagen lattice contraction. **Biotech. and Appl. Biochem.**, Copenhagen, v. 36, p. 246-253, 2002.

JOSUÉ, A.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T.; KIMURA, I. Y.; PEDROSA, R. C. Liberação controlada da eosina impregnada em microesferas de copolímero de quitosana e poli(ácido acrílico). **Polímeros: Cienc. e Tec.**, São Carlos, v. 10, n. 3, p. 116-121, 2000.

JUNG, B-O.; KIM, C-H.; LEE, Y. M.; KIM, J-J. Preparation of amphiphilic chitosan and their antimicrobial activities. **J. of Appl. Polymer Sci.**, New York, v. 72, p. 1713-1719, 1999.

KHAN, T. A.; PEH, K. K. A preliminary investigation of chitosan film as dressing for punch biopsy wounds in rats. **J. of Pharm. and Pharmaceutical Sci.**, [S. I.], v. 6 n.1, p.20-26, 2003. www.ualbeta.ca/~csps.

KHAN, T. A.; PEH, K. K.; CH'NG, H. H. Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. **J. of Pharm. and Pharmaceutical Sci.**, [S. I.], v. 3, n. 3, p. 303-311, 2000. www.ualbeta.ca/~csps.

KITTUR, F. S.; KUMAR, K. R.; THARANATHAN, R. N. Functional packaging properties of chitosan films. **Z. Lebensm Unters Forsch A**, Berlin, v. 206, p. 44-47, 1998.

LOMBELLO, C. B.; SANTOS JR., M. S. M.; BARBANTI, S. H.; WADA, M. L. F.; DUEK, E. A. R. Adhesion and morphology of fibroblast cells cultured on different polymeric biomaterials in vitro. **J. of Mater. Sci. in Med.**, London, v. 13, p. 867-874, 2002.

MATTIOLI-BELMONTE, M.; MUZZARELLI, B.; MUZZARELLI, R. A. A. Chitin and chitosan in wound healing and other biomedical applications. **Carbohydrates Europe**, Den Haag, v.19, p.30-36, 1997.

MORGAN, C. J.; PLEDGER, W. J. Fibroblast proliferation In: COHEN, I. K.; DIEGELMANN, R. F.; LINDBLAD, W. J. (Ed.). **Wound Healing**. Biochemical and Clinical Aspects. Philadelphia: Saunders, 1992. p. 63-76.

NETTLES, D.; ELDER, S. Evaluaton of chitosan as a cell scaffold for cartilage tissue engineering. In: PROCEEDINGS OF THE 47TH ANNUAL MEETING OF ORTHOPEDIC RESEARCH SOCIETY, Feb. 25-28, San Francisco, 2001. [S. l.: s. n., 2001], p. 202.

OLABARRIETA, I. **Strategies to Improve the Aging, Barrier and Mechanical Properties of Chitosan: Whey and Wheat Gluten Protein Films**. 2005. 74 f. Thesis (PhD) - Kungliga Tekniska Högskolan, Stockholm.

PITTERMANN, W.; HÖRNER, V.; WACHTER, R. Efficiency of high molecular weight chitosan in skin care applications. In: MUZZARELLI, R. A. A.; PETER, M. G. (Ed.). **Chitin Handbook**. [S. l.]: European Chitin Society, 1997.

PITTLER, M. H.; ABBOT, N. C.; HARKNESS, E. F.; ERNST, E. Randomized, Double-Blind Trial of Chitosan for Body Weight Reduction. **Eur. J. Clin. Nutr**, London, v. 53, p. 379-381, 1999.

RAMAKRISHNA, S.; MAYER, J.; WINTERMANTEL, E.; LEONG, K. Biomedical applications of polymer-composites materials: a review. **Composites Scie. and Tech.**, Barking, v. 61, p. 118-1224, 2001.

RICH, J. **In vitro characterization of bioresorbable polymers and composites for drug delivery and bone replacement**. 2002. 47 f. Dissertation (Doctor of technology) - Helsinki University of Technology, Espoo, Finland. (Acta Polytech. Scandinavica, Chemical Technology Series, n. 289).

SANTOS, I. C. A.; SOUSA, R. V.; SANTANA, G. C. **Princípio da antibioticoterapia em medicina veterinária**. Lavras: Ed. UFLA, 2002. (Boletim técnico, 38). Disponível em: <http://www.editora.ufla.br/BolTecnico/pdf/bol_38.pdf>. Acesso em: 5 nov. 2007

SEBASTIANOV, V. I. Biocompatible biomaterials: current status and future perspectives. **Trends in Biomater. Artf. Organs**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 20-30, 2002.

SIGNINI, R.; CAMPANA-FILHO, S. P. Purificação e caracterização de quitosana comercial. **Polímeros: Ciên. e Tecn.**, São Carlos, v. 8, n. 4, p. 63-68, 1998.



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Embrapa Instrumentação Agropecuária

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Rua XV de Novembro, 1452 - Caixa Postal 741 - CEP 13560-970 - São Carlos - SP

Telefone: (16) 3374 2477 - Fax: (16) 3372 5958

www.cnpdia.embrapa.br - sac@cnpdia.embrapa.br

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

