



Universidade
Estadual de Goiás

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE**

JAMES TEIXEIRA RODRIGUES

**EFEITO DA ESTERILIZAÇÃO POR RADIAÇÃO IONIZANTE EM CÁPSULAS
GELATINOSAS DURAS VAZIAS**

**Anápolis
2018**

JAMES TEIXEIRA RODRIGUES

**EFEITO DA ESTERILIZAÇÃO POR RADIAÇÃO IONIZANTE EM CÁPSULAS
GELATINOSAS DURAS VAZIAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Rebelo Guilherme
Co-orientador: Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves

**Anápolis
2018**

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UEG com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

RJ31e Rodrigues, James Teixeira
Efeito da esterilização por radiação ionizante em cápsulas gelatinosas duras vazias / James Teixeira Rodrigues; orientador Luciana Rebelo Guilherme; co-orientador Plínio Lázaro Faleiro Naves. - Anápolis, 2018.
64 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação Mestrado Acadêmico em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) -Campus- Anápolis CET, Universidade Estadual de Goiás, 2018.

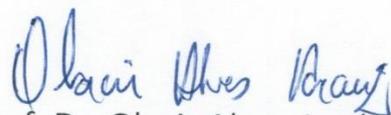
1. Reticulação. 2. Gelatina. 3. Cápsulas duras. 4. Radiação gama. I. Guilherme, Luciana Rebelo, orient. II. Naves, Plínio Lázaro Faleiro, coorient. III. Título.

James Rodrigues Teixeira

**“Efeito da esterilização por radiação ionizante em cápsulas gelatinosas
duras vazias”**

Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás, para a obtenção do título de Mestre, aprovada em 29 de junho de 2018, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores


Profa. Dra. Luciana Rebelo Guilherme
Presidente da Banca
UEG


Prof. Dr. Olacir Alves Araújo
Membro Interno
UEG


Profa. Dra. Thaís Leite Nascimento
Membro Externo
UFG

DEDICATÓRIA

*A Deus,
a minha esposa Joice Cintra Ribeiro Rodrigues,
ao meu filho, João Antônio Ribeiro Rodrigues,
aos meus pais e meus irmãos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que com o cuidado de Pai providenciou todos os recursos necessários para que este projeto fosse realizado. A cada passo que eu der em minha vida tenho a certeza de sua presença e seu amor.

A minha família, especialmente a minha esposa Joice Cintra Ribeiro Rodrigues que me apoiou no início da execução deste projeto e me incentivou a cada dia para que desse continuidade mesmo diante de dificuldades. Minha determinação foi inspirada por você.

A estimada orientadora, Prof. Dra. Luciana Rebelo Guilherme por sua brilhante orientação e dedicação muito além de minhas expectativas. Seu comprometimento e motivação jamais serão esquecidos.

Ao co-orientador deste trabalho Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves por sua inestimável contribuição com este trabalho, pela paciência e apoio nos experimentos e na edição desta dissertação.

Ao Dr. Leonardo Gondin de Andrade e Silva, Dr. Pablo Vasques e Msc. Paulo Santos do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), por sua disponibilidade para realizar a irradiação das amostras que foram avaliadas durante esta pesquisa.

Ao prezado Dr. Francisco Nunes de Souza Neto da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) por sua contribuição na realização de medições de DRX e DSC.

Aos Prof. Dr. Olacir Alves Araújo e Prof. Dra Thais Leite Nascimento por sua contribuição durante o exame de qualificação deste projeto. Suas sugestões auxiliaram a conclusão deste trabalho.

A Patrícia José Marques Tannús e a Genix (recentemente Qualicaps®) pela disponibilização de amostras de cápsulas e por permitir o uso do laboratório para realização de alguns experimentos sem os quais, este trabalho não seria realizado.

*“Pois a Sabedoria é mais ágil que qualquer movimento,
Atravessa e penetra tudo por causa da sua pureza.
Ela é o sopro do poder de Deus,
uma emanção pura da glória do Todo Poderoso.
Por isso, nada de impuro pode introduzir-se nela: ela é reflexo da luz eterna,
espelho sem mancha do poder de Deus e imagem da sua bondade.
Embora sendo uma só, tudo pode, permanecendo imutável renova tudo;
E comunicando-se às almas santas através das gerações,
forma os amigos de Deus e os profetas
Pois Deus ama tão somente aquele que convive com a Sabedoria.
De fato, ela é mais bela que o sol e supera todas as constelações.
Comparada à luz ela é mais brilhante: pois a luz sucede a noite, ao passo que,
contra a Sabedoria o mal não prevalece.”
Sabedoria 7, 22-30*

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA.....	18
2.1	Cápsula dura de gelatina.....	18
2.1.1	Técnica de fabricação.....	19
2.1.2	Principais características de cápsulas duras.....	21
2.2	Gelatina.....	21
2.3	Crescimento bacteriano.....	25
2.4	Irradiação como técnica de esterilização.....	27
2.4.1	Radiação ionizante.....	27
2.4.2	Interação da radiação gama com a matéria.....	28
2.4.3	Efeito da radiação em micro-organismos.....	31
2.4.4	Reticulação de gelatina x irradiação.....	31
2.4.5	Degradação polimérica em consequência da radiação.....	33
3	OBJETIVOS.....	34
3.1	Objetivo geral.....	34
3.2	Objetivos específicos.....	34
4	METODOLOGIA.....	35
4.1	Seleção de cápsulas para irradiação.....	35
4.1.1	Cápsulas gelatinosas duras vazias.....	35
4.1.2	Preparo dos inóculos bacterianos.....	36
4.2	Irradiação gama por cobalto-60.....	36
4.3	Ensaio após irradiação.....	37
4.3.1	Teor de umidade.....	37
4.3.2	Massa.....	38
4.3.3	Comprimento do corpo e da tampa das cápsulas.....	38
4.3.4	Desintegração.....	38
4.3.5	Microscopia eletrônica de varredura.....	39
4.3.6	Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho.....	39
4.3.7	Difratometria de raios X.....	39

4.3.8	Análise Térmica.....	39
4.3.9	Análise microbiológica.....	40
4.4	Tratamento estatístico.....	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1	Ensaio físicos.....	41
5.2	Ensaio químicos.....	43
5.2.1	Microscopia eletrônica de varredura.....	43
5.2.2	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho.....	44
5.2.3	Difratometria de Raios X (DRX).....	46
5.2.4	Análise térmica.....	48
5.3	Resultados microbiológicos.....	51
6	CONCLUSÃO.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotografia apresentando os diferentes tamanhos de cápsulas duras.	19
Figura 2 – Esquema da sequência de fabricação de cápsulas duras de gelatina.	20
Figura 3 – Representação das estruturas moleculares dos aminoácidos	22
Figura 4 – Representação das interações químicas em moléculas de colágeno	23
Figura 5 – Esquema da hidrólise do colágeno para formação da gelatina.....	24
Figura 6 – Proporção de aminoácidos em gelatina bovina.....	25
Figura 7 – Representação da estrutura dos esporos de <i>B. subtilis</i>	26
Figura 8 – Representação do espectro eletromagnético	28
Figura 9 – Representação da absorção fotoelétrica	29
Figura 10 – Representação do efeito compton.....	30
Figura 11 – Representação da formação de pares	31
Figura 12 – Representação da ligação cruzada em cadeias polipeptídicas de gelatina.....	32
Figura 13 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura.....	43
Figura 14 – Resultados de espectroscopia vibracional na região do infravermelho	44
Figura 15 – Difratoogramas de raios X das amostras do grupo controle e amostras irradiadas em doses equivalentes a 05 kGy, 15 kGy e 25 kGy	46
Figura 16 – DSC das amostras de cápsulas	48
Figura 17 – Curva termogravimétrica das amostras.....	50
Figura 18 – Efeito da radiação gama na viabilidade de células do <i>B. subtilis</i> ..	51
Figura 19 – Fotografia de placas de petri evidenciando o crescimento bacteriano	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados de testes físico-químicos	41
Tabela 2 – Intensidade relativa dos halos dos difratogramas de raios X	47

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

^{60}Co	–	cobalto 60
Ala	–	alanina
Arg	–	arginina
Asp	–	ácido aspártico
ATCC	–	<i>American Type Culture Collection</i>
CTR/IPEN	–	Centro de Tecnologia das Radiações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
DP	–	desvio padrão
DRX	–	difratometria de raios X
DSC	–	<i>differential scanning calorimeter</i> (calorimetria exploratória diferencial)
EDS	–	<i>energy dispersive X-ray detector</i> (espectroscopia por dispersão de energia de raios X)
eV	–	elétron-volt (unidade de medida para energia)
FTIR	–	<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i> (espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier)
GeIE	–	gelatinase
Glu	–	ácido glutâmico
Gly	–	glicina
His	–	histidina
Hyp	–	hidroxiprolina
IFA	–	Insumo farmacêutico ativo
Ile	–	isoleucina
IPEN	–	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
KBr	–	Brometo de Potássio
Leu	–	leucina
Lys	–	lisina
MEV	–	microscopia eletrônica de varredura
Phe	–	fenilalanina
Pro	–	prolina

qsp	–	quantidade suficiente para
Raios γ	–	raios gama
Ser	–	serina
Tg	–	temperatura de transição vítrea
TGA	–	termogravimetria
Thr	–	treonina
Tm	–	Temperatura de fusão
Tyr	–	tirosina
UEG	–	Universidade Estadual de Goiás
UNESP	–	Universidade Estadual Paulista
UFC	–	unidades formadoras de colônia
Val	–	valina

Cápsulas duras são fabricadas a partir da gelatina, um polímero de origem orgânica obtido por meio da hidrólise de colágeno, substância presente em tecidos animais. A gelatina pode ser degradada por micro-organismos. A irradiação gama é considerada um processo eficaz de esterilização, porém, sua aplicação pode alterar a estrutura química do produto. O presente trabalho objetivou avaliar o efeito da radiação ionizante por raios gama em cápsulas duras de gelatina em doses equivalentes a 5 kGy, 15 kGy e 25 kGy. O efeito foi avaliado a partir de parâmetros físico-químicos das cápsulas como teor de umidade, massa, comprimento do corpo, comprimento da tampa e tempo de desintegração. A caracterização dos efeitos químicos foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia vibracional na região do infravermelho, difratometria de raios X e análise térmica, por meio das técnicas de calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria. Foram preparados inóculos com população padronizada de *Bacillus subtilis*, micro-organismo gram positivo formador de esporos de resistência, em substrato obtido por meio da diluição de cápsulas para avaliação do efeito esterilizante da radiação por raios gama. Os resultados evidenciam que a radiação gama não interfere em parâmetros físicos da cápsula e na morfologia da superfície. Alterações químicas foram identificadas, indicando que pode ocorrer a reticulação em consequência da interação entre radiação gama e moléculas de gelatina. Os resultados obtidos permitem concluir que a radiação é eficaz na redução de população microbiana e pode ser utilizada como técnica de esterilização de cápsulas duras porém deve ser avaliada a estabilidade de preparações farmacêuticas que empregaram cápsulas irradiadas em sua formulação.

Palavras chave: reticulação, gelatina, cápsulas duras, radiação gama.

Hard capsules are made from gelatine, a polymer of organic origin obtained through the hydrolysis of collagen present in animal tissues. Gelatin can be degraded by microorganisms. Gamma irradiation is considered an effective sterilization process, however its application can alter the chemical structure of the product. The present work aimed to evaluate the effect of ionizing radiation by gamma rays in hard gelatin capsules in doses equivalent to 05 kGy, 15 kGy and 25 kGy. The effect was evaluated using physicochemical parameters of the capsules as moisture content, mass, body length, cap length and disintegration time. The characterization of the chemical effects was done by scanning electron microscopy, infrared spectroscopy in the infrared region, X-ray diffractometry and thermal analysis using differential scanning calorimetry techniques and thermogravimetry. Inoculations were carried out with a population of *Bacillus subtilis*, a gram-positive spore-forming gram-positive microorganism, in a substrate obtained by diluting the capsules to evaluate the sterilizing effect of gamma-ray radiation. The results show that gamma radiation does not interfere with physical parameters of the capsules and surface morphology. Chemical changes were detected, indicating the formation of crosslinking as a consequence of the interaction between gamma radiation and gelatin molecules. The results obtained allow us to conclude that the radiation is effective in the reduction of the microbial population and can be used as a sterilization technique of hard gelatin capsules but, the stability of pharmaceutical preparations with irradiated capsules in their formulation should be evaluated.

Keywords: crosslinking; gelatine; hard capsules; gama radiation.

Cápsula dura de gelatina é uma forma de dosagem farmacêutica tradicional na qual as cápsulas vazias são utilizadas como insumo excipiente para desenvolvimento farmacotécnico ou manufatura de medicamentos (STEGEMANN et al., 2014). São fabricadas em duas partes separadas, corpo e tampa, em diferentes tamanhos e cores que, quando unidas, poderão confinar substâncias em forma sólida, como pós ou *pellets*, ou líquidas, como soluções.

A estrutura proteica da gelatina, principal componente das cápsulas, favorece o desenvolvimento de colônias de bactérias, inclusive espécies que possuem potencial patogênico. Isto ocorre porque algumas espécies produzem Gelatinases (GelE), enzimas que quebram as moléculas de gelatina, e utilizam este substrato para a formação de biofilmes.

Na manufatura farmacêutica, é possível o uso de produtos que porventura apresentem crescimento microbiano, desde que uma etapa de esterilização seja implementada no processo de fabricação. A irradiação ionizante é uma alternativa para esterilização de insumos que pode ser utilizada na indústria farmacêutica. Porém, os impactos da radiação sobre os insumos devem ser pesquisados e identificados.

Cápsulas gelatinosas duras vazias devem ser mantidas a temperatura e umidade controladas para evitar absorção ou perda de umidade. Além disto, a gelatina pode formar reticulação, alterando sua estrutura química quando submetida à radiação ionizante. Por este motivo, ao propor a radiação ionizante como técnica para esterilização de cápsulas duras vazias, deve-se investigar também os efeitos sobre a estrutura química do material.

O efeito da radiação ionizante sobre cápsulas foi avaliado por meio de um procedimento desenvolvido para este estudo, no qual foram preparados inóculos bacterianos com uso do micro-organismo *Bacillus subtilis*. Esta espécie foi selecionada para o estudo por ser um formador de esporos de resistência e produtor de GelE. Em seguida, as cápsulas foram expostas à irradiação ionizante por Cobalto 60 (^{60}Co) nas instalações do Centro de Tecnologia de Radiações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CTR/IPEN).

Após irradiadas, as amostras foram submetidas a estudos de caracterização física, química e microbiológica. Os ensaios foram conduzidos conforme técnicas descritas em

compêndios oficiais, como Farmacopeias ou em literatura científica pertinente. Os resultados obtidos para amostras irradiadas foram avaliados estatisticamente e comparadas a um grupo controle com o objetivo de identificar possíveis alterações relevantes nas cápsulas, caracterizando o efeito esterilizante da radiação neste insumo farmacêutico.

2.1 Cápsula dura de gelatina

Cápsulas duras de gelatina são formadas por duas partes, corpo e tampa, em formato cilíndrico (DARJI et al., 2018). As cápsulas são utilizadas para confinar o fármaco e as substâncias adjuvantes da formulação em um envoltório que seja elegante em seu *design*, facilmente administrado pelo paciente e facilmente preparado. Existem dois tipos de cápsulas diferenciados pela rigidez do envoltório: cápsulas duras e moles (HOAG, 2017).

Tradicionalmente, preparações farmacêuticas na forma sólida, como *pellets*, pós ou grânulos, são confinados em cápsulas gelatinosas duras para administração por via oral. Em geral, fármacos de natureza amorfa, baixa densidade, floculentos ou com baixo ponto de fusão devem ser encapsulados. Preparações sólidas com baixo ponto de fusão também devem ser encapsuladas uma vez que, alternativamente, o processo de compressão eleva a temperatura entre 3 °C e 30 °C durante a etapa de fabricação (FUNG; NG, 2003; ANDERSON, 2012).

Insumos farmacêuticos ativos (IFA) de baixa solubilidade em água, inclusive substâncias caracterizadas por alta potência, podem ser encapsulados em preparações líquidas para uso oral (COLE; CADÉ; BENAMEUR, 2008). O encapsulamento de preparações líquidas em cápsulas duras de gelatina pode ser realizado nas instalações do fabricante do medicamento o que é vantagem em relação ao encapsulamento em cápsulas moles que, geralmente requer terceirização da etapa de fabricação (KUENTZ, 2012). Nestas formulações, o veículo é composto por lipídios como óleo de milho, óleo de amêndoas, óleo vegetal hidrogenado, óleo de soja hidrogenado e Vitamina E. O Colpermin[®] é um exemplo de medicamento constituídos por preparações líquidas em cápsulas duras (CHIANG, 2018).

Nos últimos 30 anos, cápsulas duras de gelatina têm sido utilizadas como dose unitária em inaladores de pó seco, permitindo algumas vantagens em comparação a outros medicamentos de uso inalatório, como a possibilidade do usuário enxergar se toda a dose do medicamento foi completamente administrada (EDWARDS, 2010). Nesta aplicação, a preparação farmacêutica encapsulada é disponibilizada juntamente com um dispositivo para inalação que, ao ser acionado, remove a preparação da cápsula e a direciona para as vias aéreas do paciente (RICHARDSON, 2011). Esta tecnologia está aplicada em medicamentos

como o Spinaler[®], fabricado pela Aventis para administração de cromoglicato de sódio, e Rotahaler[®], fabricado pela GlaxoSmithKline e utilizado para administração de salbutamol e beclometasona dipropionato em tratamento de asma (NEWMAN; BUSSE, 2002).

2.1.1 Técnica de fabricação

A primeira patente relacionada à cápsula foi registrada na França em 1834, por Mothes e Dublanc. O envoltório desenvolvido era produzido manualmente, imergindo peças de couro em uma solução gelatinosa. Após secagem, as peças eram retiradas, o material preenchido com uso de pipeta, e em seguida, selada com solução de gelatina. Este invento, conhecido como cápsulas de Mothes, foi fabricado para inibir o gosto desagradável do bálsamo de copaíba que era empregado no tratamento de doenças venéreas (AUGSBURGER, 2009).

As cápsulas são produzidas com técnicas atuais de manufatura em diversos tamanhos enumerados de #000 (lê-se número triplo zero) a #5 (lê-se número cinco), conforme Figura 1. A seleção do tamanho da cápsula a ser utilizada na formulação de medicamentos é realizada a partir da densidade do produto que será envasado e do volume da cápsula (MURACHANIAN, 2010; ALLEN; ANSEL, 2014).

Figura 1 – Fotografia apresentando os diferentes tamanhos de cápsulas duras.



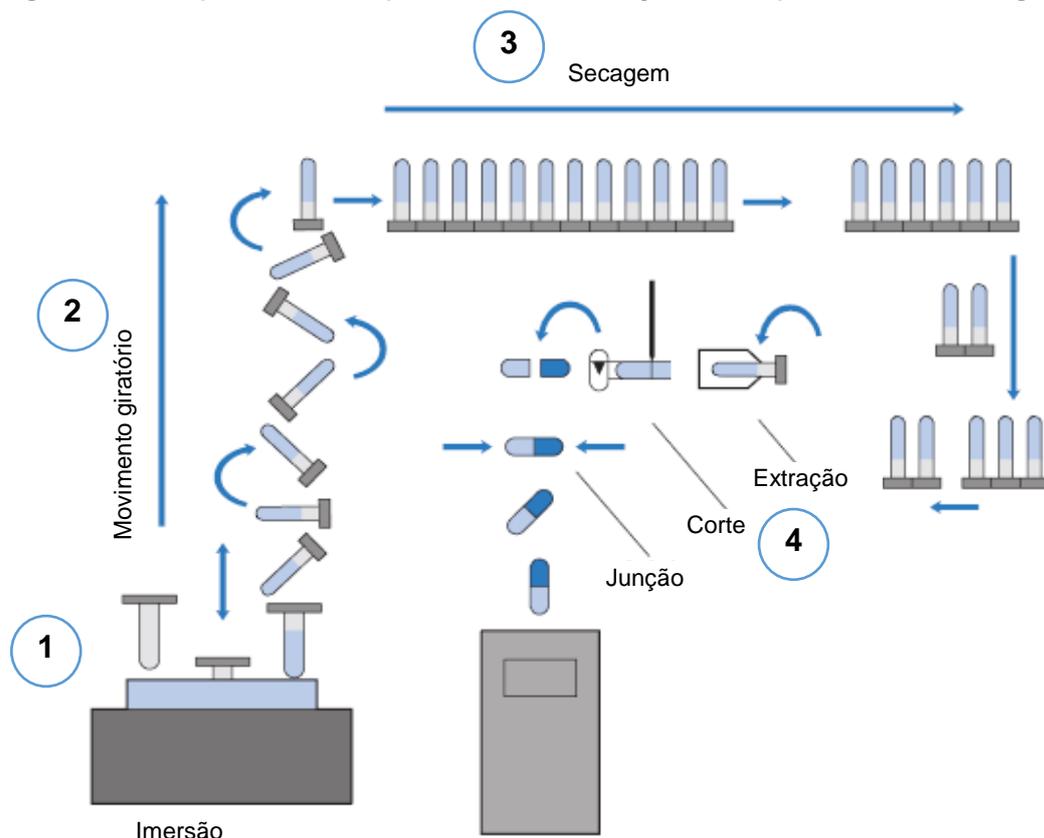
Legenda: cápsulas duras de gelatina podem ser fabricadas em diferentes tamanhos. Da maior cápsula para a menor, são denominadas #000 (lê-se número triplo zero); #00 (lê-se número duplo zero); #0 (lê-se número zero); #1 (lê-se número um); #2 (lê-se número dois); #3 (lê-se número três); #4 (lê-se número quatro); #5 (lê-se número cinco).

Fonte: ALLEN; ANSEL, 2014.

Corpo e tampa das cápsulas são produzidos simultaneamente em um processo automatizado que inicia com a imersão de pinos de aço com o diâmetro e o formato desejado

em um reservatório contendo uma mistura de gelatina líquida em temperatura controlada. Após a imersão a gelatina é secada por fluxo de ar com temperatura e umidade controlada. Por fim, corpo e tampa são extraídos dos pinos e unidos formando o envoltório rígido vazio (ALLEN; ANSEL, 2014). A Figura 2 apresenta um esquema de fabricação de cápsulas de gelatina.

Figura 2 – Esquema da sequência de fabricação de cápsulas duras de gelatina.



Legenda: A fabricação de corpo e tampa das cápsulas ocorre simultaneamente **1** - Cápsulas são formadas a partir da imersão de pinos que estão em temperatura ambiente de 22 °C, em solução de gelatina aquecida à temperatura entre 45 °C e 55 °C. Um filme é formado pela gelatina na superfície do pino. **2** – Os pinos são retirados lentamente da solução de gelatina e ascendem à parte superior da máquina em um movimento giratório para conferir uniformidade à espessura do filme. **3** – Inicia-se o processo de resfriamento no qual os filmes são expostos ao fluxo de ar com umidade controlada. **4** – Assim que o resfriamento é concluído, os filmes são extraídos dos pinos, cortados em comprimento adequado e, as duas partes da cápsula são unidas. Os pinos passam por um processo de limpeza e lubrificação para iniciar novamente o ciclo de fabricação.

Fonte: adaptado de JONES, 2013.

Cápsulas podem ser fabricadas somente com o uso de gelatina, sendo obtidas dessa forma cápsulas incolores. Podem, ainda, ser adicionados à gelatina corantes artificiais orgânicos ou inorgânicos, e agentes opacificantes como o dióxido de titânio com o objetivo de personalizar as cápsulas, conferindo-lhes diferentes colorações (ALLAM; KUMAR, 2011).

2.1.2 Principais características de cápsulas duras

O teor de umidade em cápsulas duras de gelatina varia de 13% a 16%, e pode ser influenciado por condições de armazenamento deste material (RUDNIC; SCHWARTZ, 2006; WEIGERT; INEU; GOMES, 2012). Geralmente, quando o ambiente apresenta aumento da umidade relativa do ar à temperatura constante ou, diminuição da temperatura em umidade relativa do ar constante ocorre a absorção de umidade pela cápsula. Por outro lado, quando ocorre a diminuição da umidade relativa do ar em temperatura constante ou aumento de temperatura em umidade relativa do ar constante, ocorrerá diminuição no teor de umidade da cápsula (KONTNY; MULSKI, 1989). Em consequência de variações nas condições ambientais, poderiam ser observados diferentes problemas nas cápsulas, tornando-a amassada ou quebradiça, por exemplo (BUICE et al., 1995).

2.2 Gelatina

A gelatina é uma proteína obtida a partir do colágeno presente em ossos e couro bovinos, pele suína, peixe e, recentemente descrito, por meio de insetos (MARIOD et al., 2011). São conhecidas mais de 20 estruturas de colágeno geneticamente distintas em tecidos animais que podem ser subdivididos a partir da estrutura e da organização supramolecular, em: formadores de fibrila; associados a fibrila; colágenos em rede; fibrilas ancoradas; colágenos transmembrânicos; colágenos de base de membrana e outros tipos com funções específicas (GELSE, 2003).

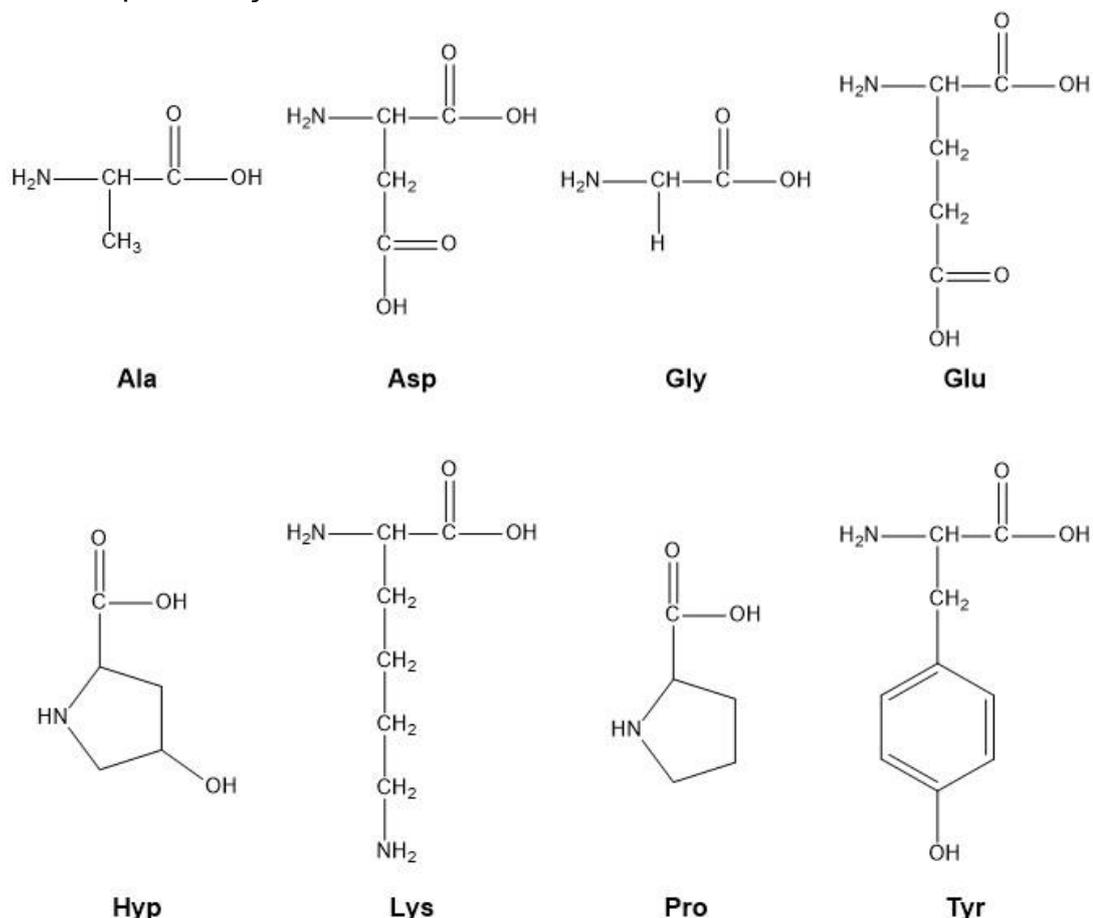
Colágenos são moléculas compostas por três cadeias polipeptídicas, denominadas cadeias α , caracterizadas pela repetição do trímero $[\text{Gly-X-Y}]_n$, sendo X frequentemente prolina e Y, a Hidroxiprolina. Em alguns colágenos todas as três cadeias são idênticas, ao passo que em outras as moléculas contém dois ou três diferentes cadeias identificadas como α_1 , α_2 e α_3 , com diferentes aminoácidos presentes na posição X e Y do trímero (BHATTACHARJEE; BANSAL, 2005; RICARD-BLUM; RUGGIERO; VAN DER REST, 2005).

A constituição química do colágeno varia entre espécies. Em geral, sua estrutura proteica possui todos os aminoácidos exceto o triptofano. A proporção de aminoácidos na estrutura do colágeno determina as propriedades da gelatina (MARIOD; ADAM, 2013).

A glicina (Gly), prolina (Pro) e hidroxiprolina (Hyp) são encontradas em alta proporção nas moléculas de colágeno, sendo estas fundamentais para a biossíntese, estrutura e rigidez

da molécula de colágeno. Grupos amina da glicina interagem com grupos carbonila de outros aminoácidos por meio de pontes de hidrogênio dentro da estrutura da tripla-hélice. A prolina e Hidroxiprolina possibilitam uma organização inicial das cadeias que compõem a molécula de colágeno, diminuindo uma perda entrópica para o dobramento da molécula (SHOULDERS; RAINES, 2009). As estruturas químicas dos aminoácidos que constituem as moléculas de colágeno estão apresentadas na Figura 3.

Figura 3 – Representação das estruturas moleculares dos aminoácidos



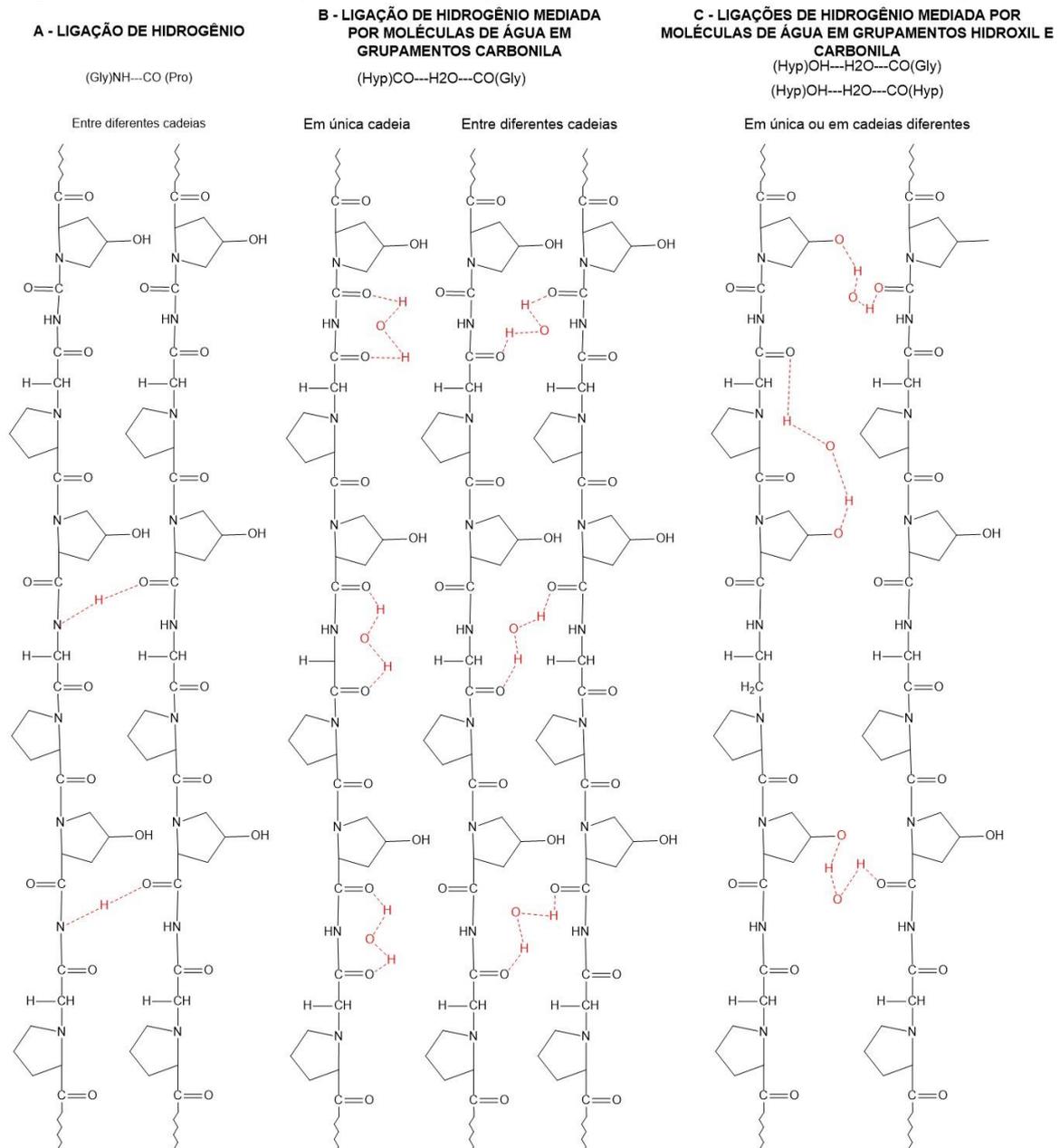
Legenda: Representação molecular da estrutura de aminoácidos que compõem a gelatina: Alanina (Ala), Aspartato (Asp), Glicina (Gly), Ácido Glutâmico (Glu), Hidroxiprolina (Hyp), Lisina (Lis), Prolina (Pro) e Tirosina (Tyr).

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

A interação entre as três cadeias polipeptídicas do colágeno é possibilitada por ligações químicas, principalmente por hidrogênio em ligações diretas ou mediadas por moléculas de água. Interações tipo *Van der Waals* ocorrem, porém em menor proporção. Estas ligações determinam a conformação da molécula de colágeno em tripla-hélice (BRODSKY; RAMSHAW, 1997).

As ligações cruzadas entre moléculas de colágeno são mediadas por grupamentos aldeído que são características específicas do colágeno e da elastina entre todas as proteínas (EYRE, 1987). A Figura 4 apresenta alguns exemplos de interações químicas entre moléculas de colágeno.

Figura 4 – Representação das interações químicas em moléculas de colágeno



Legenda: Representação das ligações moleculares em moléculas de colágeno. A – Ligação peptídica formada por hidrogênio; B – Ligações entre grupamentos carbonil mediadas por moléculas de água, sendo observadas ligações entre diferentes regiões da mesma molécula (em única cadeia) e ligações entre duas moléculas (diferentes cadeias); C – Ligações de hidrogênio entre grupamentos hidroxil e grupamentos carbonila intramolecular ou em diferentes moléculas.

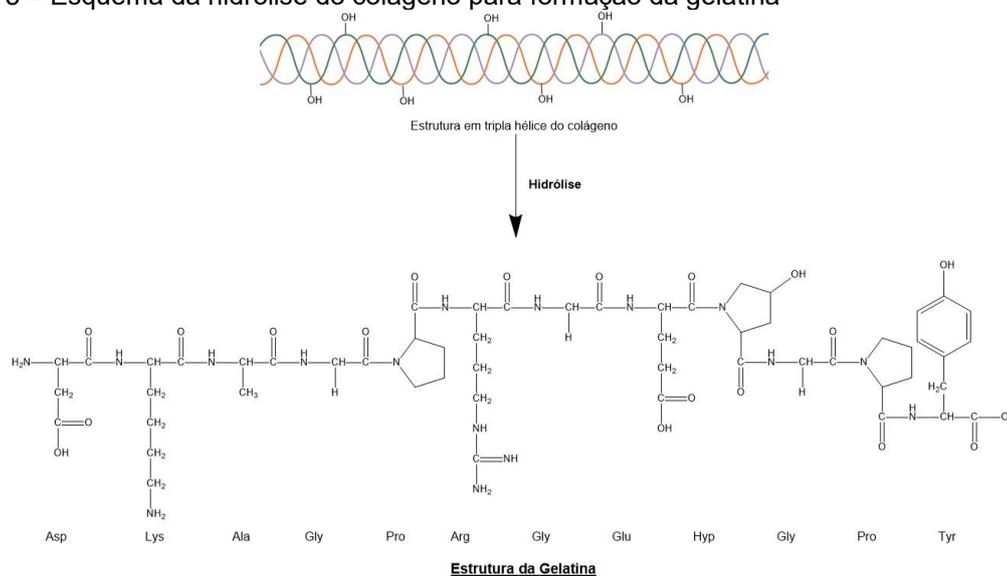
Fonte: adaptado de BRODSKY; RAMSHAW, 1997

A prolina e a hidroxiprolina formam conformação em estrutura secundária do colágeno. Estes aminoácidos limitam a rotação da estrutura do polipeptídeo e contribuem para a estabilidade na tripla hélice. Os grupos hidroxil da hidroxiprolina contribuem ainda para a estabilização da tripla hélice do colágeno. Os polipeptídeos de colágeno que não possuem hidroxiprolina encontrados em formação de tripla hélice em baixas temperaturas não são estáveis à temperatura corporal (SCHRIEBER; GAREIS, 2007). A presença de moléculas de água é essencial para manter a estrutura nativa do colágeno. A retirada destas moléculas induz a rigidez da matriz proteica (MOGILNER; RUDERMAN; GRIGERA, 2002).

A fabricação da gelatina é composta por cinco etapas, iniciando-se com a limpeza da matéria-prima, extração na qual ocorre a hidrólise do colágeno por meio ácido ou básico, a purificação que ocorre por meio de filtração na qual são removidas partículas insolúveis e sais inorgânicos e, por fim, ocorre a desidratação e secagem da gelatina (BAZIWANE; HE, 2003).

Durante as sucessivas etapas de fabricação da gelatina as ligações entre as cadeias polipeptídicas do colágeno são quebradas, e as próprias cadeias polipeptídicas são divididas em fragmentos (DJABOUROV; LEBLOND; PAPON, 1988). Após o processo de desnaturação do colágeno para formação da gelatina, as cadeias polipeptídicas adotam uma configuração aleatória conforme representado na Figura 5 (BIGI, 2004; WANG et al., 2017).

Figura 5 – Esquema da hidrólise do colágeno para formação da gelatina

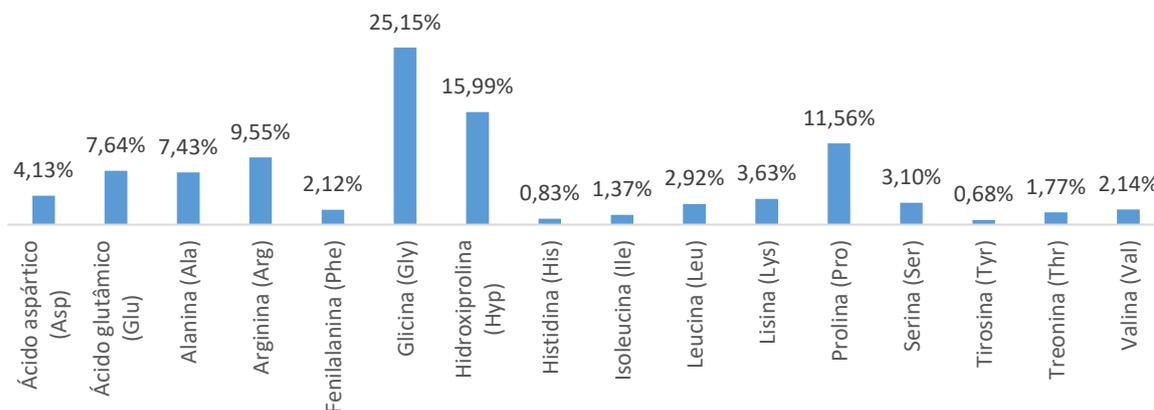


Legenda: A produção da gelatina é realizada por meio de técnica industrial no qual a matéria-prima, o colágeno, é hidrolisado. Neste processo de tratamento químico, a estrutura em tripla hélice é quebrada assim como as cadeias polipeptídicas. Ao término do processo, os aminoácidos adotam uma configuração aleatória, formando a gelatina.

Fonte: Adaptado de WANG et al., 2017 e VIJAYAKUMAR; SUBRAMANIAN, 2014

A Figura 6 apresenta a proporção de aminoácidos encontrados em moléculas de gelatina bovina a partir de um estudo utilizando técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (AHMAD et al., 2018).

Figura 6 – Proporção de aminoácidos em gelatina bovina



Legenda: A proporção dos aminoácidos pode variar de acordo com o processo de fabricação da gelatina. De maneira geral, os três aminoácidos mais abundantes na gelatina são a Glicina (Gly), Hidroxiprolina (Hyp) e Prolina (Pro).

Fonte: Adaptado de AHMAD et al., 2018.

A interação química na molécula de gelatina ocorre por diferentes mecanismos, principalmente por ligações de hidrogênio que ocorrem diretamente entre átomos que compõem os resíduos da Glicina (Gly), ou mediadas por moléculas de água, que são observadas ao longo de toda a estrutura e indicam a manutenção da estrutura em tripla hélice. Considerando a constituição proteica da molécula de gelatina, são encontrados ainda grupamentos catiônicos e aniônicos, o que a caracteriza como altamente influenciável ao pH do meio e a diferentes concentrações de sais (DUCONSEILLE et al., 2015).

2.3 Crescimento bacteriano

Produtos farmacêuticos fabricados a partir de proteínas ou outros biopolímeros são susceptíveis à contaminação microbiana, sendo este um fator de risco que deve ser considerado em todo processo de fabricação. Soluções aquosas de gelatina são consideradas altamente susceptíveis ao crescimento microbiano (KEENAN, 2003).

A degradação enzimática da gelatina pode afetar a viscosidade e a qualidade do produto e de seus derivados. Além disso, sua degradação pode liberar nutrientes essenciais que favorecem o desenvolvimento de micro-organismos que não produzem as enzimas

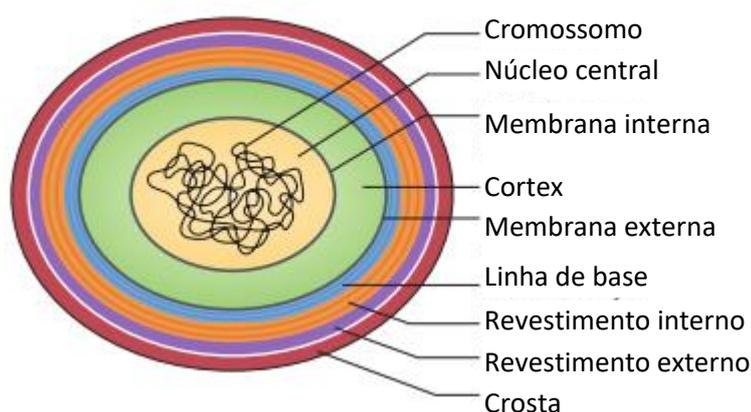
gelatinases (GelE). Estes contaminantes microbianos podem ser patogênicos (DE CLERCK; DE VOS, 2002).

Em estudos anteriores, enterobactérias como a *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi* e *Shigella sonnei*; bactérias anaeróbias como *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum* já foram identificadas durante as etapas de fabricação da gelatina porém não foram identificadas no produto final, o que pode ser justificado pelas etapas finais do processo que envolvem a secagem e não favorecem o crescimento microbiano (SHARMA et al., 2003).

Outra bactéria de interesse nesta área é o *Bacillus subtilis* que possui morfologia cilíndrica e é gram positivo. Em condições adversas, como baixa umidade, agentes tóxicos, radiação, altas temperaturas ou, principalmente, ausência de nutrientes, esta bactéria pode sair do estado vegetativo, sofrer profundas mudanças bioquímicas e se transformar em uma estrutura especializada, altamente resistente, denominada endósporo ou, somente, esporo. A esporulação não faz parte do ciclo reprodutivo da célula, sendo considerado um mecanismo de resistência (VEENING; MURRAY; ERRINGTON, 2009).

O *B. subtilis* apresenta esporo com múltiplas camadas de proteínas que possuem a função de proteger o material genético (MCKENNEY; DRIKS; EICHENBERGER, 2012). A estrutura de um esporo do *B. subtilis* está representada na Figura 7.

Figura 7 – Representação da estrutura dos esporos de *B. subtilis*



Legenda: A figura apresenta as diferentes camadas do esporo que protegem o genoma do *B. subtilis*. O cromossomo está disperso em um meio parcialmente desidratado denominado núcleo central. O núcleo é revestido pelo Cortex que é formado por peptídeoglicano. O córtex, por sua vez, possui duas membranas proteicas a interna e a externa. A linha de base, o revestimento interno, o revestimento externo e a crosta são camadas constituídas por diferentes proteínas.

Fonte: Adaptado de MCKENNEY; DRIKS; EICHENBERGER, 2012

O *B. subtilis* é capaz de decompor moléculas de gelatina através de enzimas proteolíticas extracelulares, que podem ser medidas através da titulação com formol uma vez que, durante o processo de clivagem, são gerados grupamentos NH₂ (CONSOLE; RAHN, 1938).

2.4 Irradiação como técnica de esterilização

A contaminação microbiana em produtos farmacêuticos, seja por células em estado vegetativo ou por esporos, pode gerar sérias consequências. O produto contaminado pode ser degradado, resultando em alterações físicas e químicas como, por exemplo, mudanças em sua coloração, produção de gás e alteração de pH (SMART; SPOONER, 1972). Além disto, produtos contaminados apresentam diversos riscos à saúde dos pacientes que fizerem uso destes materiais (PARKER, 1972).

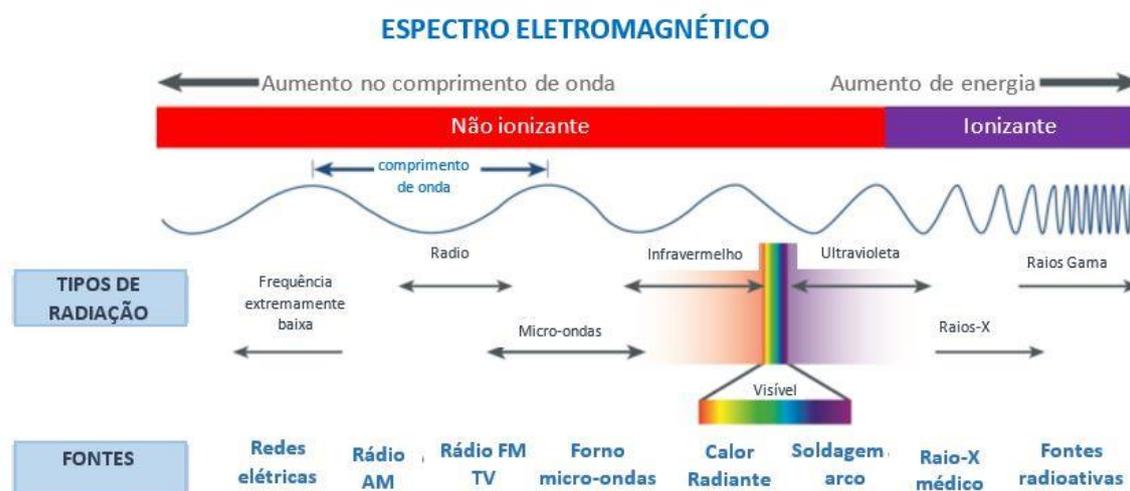
A esterilização através de irradiação por ⁶⁰Co é considerada alternativa viável como técnica de esterilização em comparação a processos de descontaminação por não deixar resíduos no material submetido a este processo, diferentemente de esterilização química com óxido de acetileno, por exemplo, em que os resíduos podem constituir riscos para o meio ambiente e para a saúde humana (JACOBS; WILLS, 1988; LUCAS et al., 2003).

2.4.1 Radiação ionizante

Radiação é um tipo de energia que pode ser gerada por átomos instáveis ou por máquinas. Existem dois tipos de radiação: a não ionizante, que está presente na luz visível, ondas de rádio e micro-ondas e a radiação ionizante, que pode modificar propriedades físicas, químicas ou biológicas dos materiais (MEHTA, 2005).

A radiação eletromagnética é caracterizada a partir de seu comprimento de onda, frequência ou energia, existindo correlação entre estes parâmetros: longos comprimentos de onda apresentam baixa frequência; curtos comprimentos de onda apresentam alta frequência. Desta forma, o comprimento de onda e a frequência indicam a energia da onda no espectro eletromagnético. Radiação eletromagnética com alta frequência ou menor comprimento de onda é mais energética (MALAINEY, 2011). A Figura 8 apresenta um esquema espectro eletromagnético relacionado à radiação.

Figura 8 – Representação do espectro eletromagnético



Legenda: As bandas do espectro eletromagnético são categorizadas de acordo com a frequência ou comprimento de onda. A radiação não ionizante compõe a maior parte do espectro eletromagnético e consiste em ondas com frequência muito baixa emitida por redes elétricas, ondas de rádio, micro-ondas e a radiação óptica que é composta pelo infravermelho, espectro visível e luz ultra violeta). O espectro eletromagnético continua com ondas ionizantes de maior frequência e menor comprimento de onda, como os raios X e a radiação gama.
 Fonte: Adaptado de RUSCHENA; RALPH, 2012.

A radiação não ionizante possui frequência muito baixa, sendo considerada no passado uma radiação segura. Porém, segundo Havas (2017), estudos recentes indicam que a exposição prolongada a este tipo de radiação aumenta a produção de radicais livres em células e induz a reações de oxidação que podem resultar em doenças como câncer.

Radiação ionizante, por sua vez, é qualquer radiação com ou sem massa de repouso que pode remover elétrons de átomos e moléculas (YOSHIMURA, 2009). As partículas gama possuem menor comprimento de onda e maior energia entre todas as ondas do espectro eletromagnético (DONYA et al., 2014). Segundo Hasanain et al. (2014), a radiação ionizante possui algumas vantagens como alto poder de penetração no material, caráter isotérmico e não deixa nenhum resíduo quando utilizado como técnica de esterilização.

Em um processo de irradiação o material é exposto à radioatividade intencionalmente de maneira controlada com a finalidade de esterilizar (REID, 1995) ou de modificar o material (SINTZEL et al., 1997) em processo ágil, que ocorre em, temperatura menor que 5° C e não deixa resíduos no produto irradiado (SANDLE, 2013).

2.4.2 Interação da radiação gama com a matéria

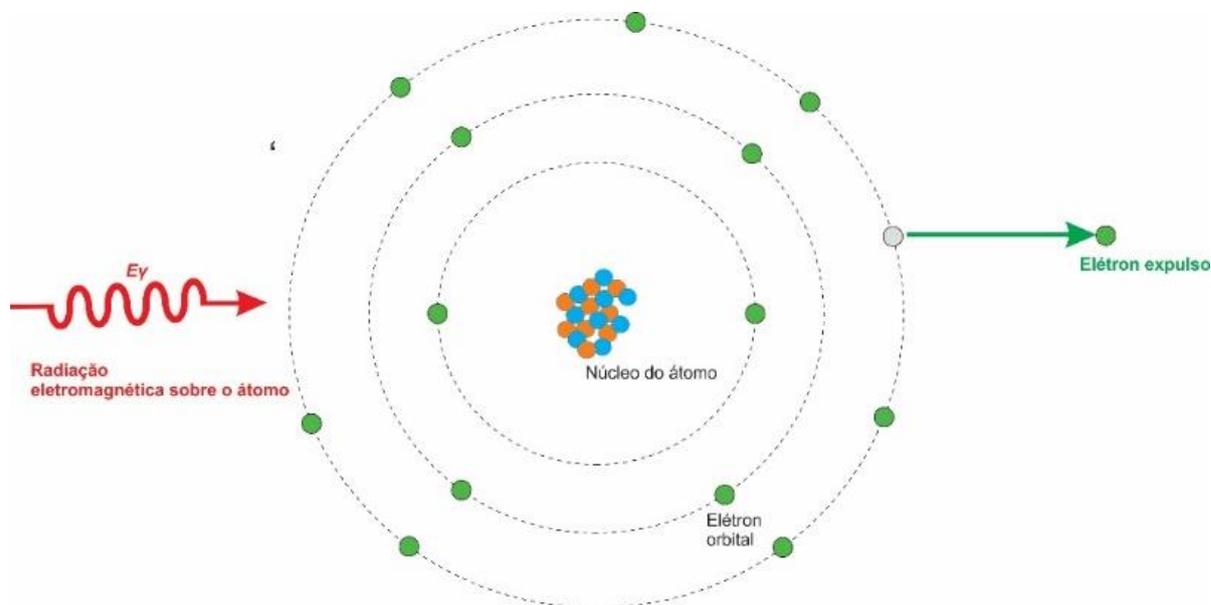
O cobalto é um metal encontrado na natureza como um minério. Em seu estado

natural, o cobalto contém 27 prótons e 32 nêutrons, tem número atômico 59. O ^{60}Co é formado por exposição do isótopo estável Cobalto 59 a nêutrons em um reator nuclear. Um nêutron é absorvido pelo núcleo do cobalto para formar o ^{60}Co . O radioisótopo resultante que tem meia-vida de 5,26 anos, decai para formar o isótopo estável Níquel 60. Dois raios gama, com energia de 1,17 MeV e 1,33 MeV são emitidos cada vez que um núcleo de ^{60}Co decai. Estes fótons são suficientes para penetrar a maioria dos materiais no entanto, as energias dos fótons estão abaixo da energia limite necessária para criar outros radioisótopos (REID; FAIRAND, 1998).

Os fótons emitidos por ^{60}Co podem ser totalmente absorvidos pela matéria durante a irradiação ou por interações subsequentes. Os três principais efeitos da interação da radiação gama com a matéria, provenientes de radioisótopos, são: o efeito fotoelétrico; o efeito compton e, a produção de pares de elétrons e positrons (LEROY; RANCOITA, 2009).

Durante o processo de absorção fotoelétrica (Figura 9), um fóton sofre interação com um átomo que o absorve. Neste processo o fóton desaparece completamente. Em seu lugar, um fotoelétron energético é ejetado do átomo de alguma de suas camadas. Esta interação ocorre com o átomo como um todo, e não pode ocorrer com elétrons livres (KNOLL, 2010).

Figura 9 – Representação da absorção fotoelétrica

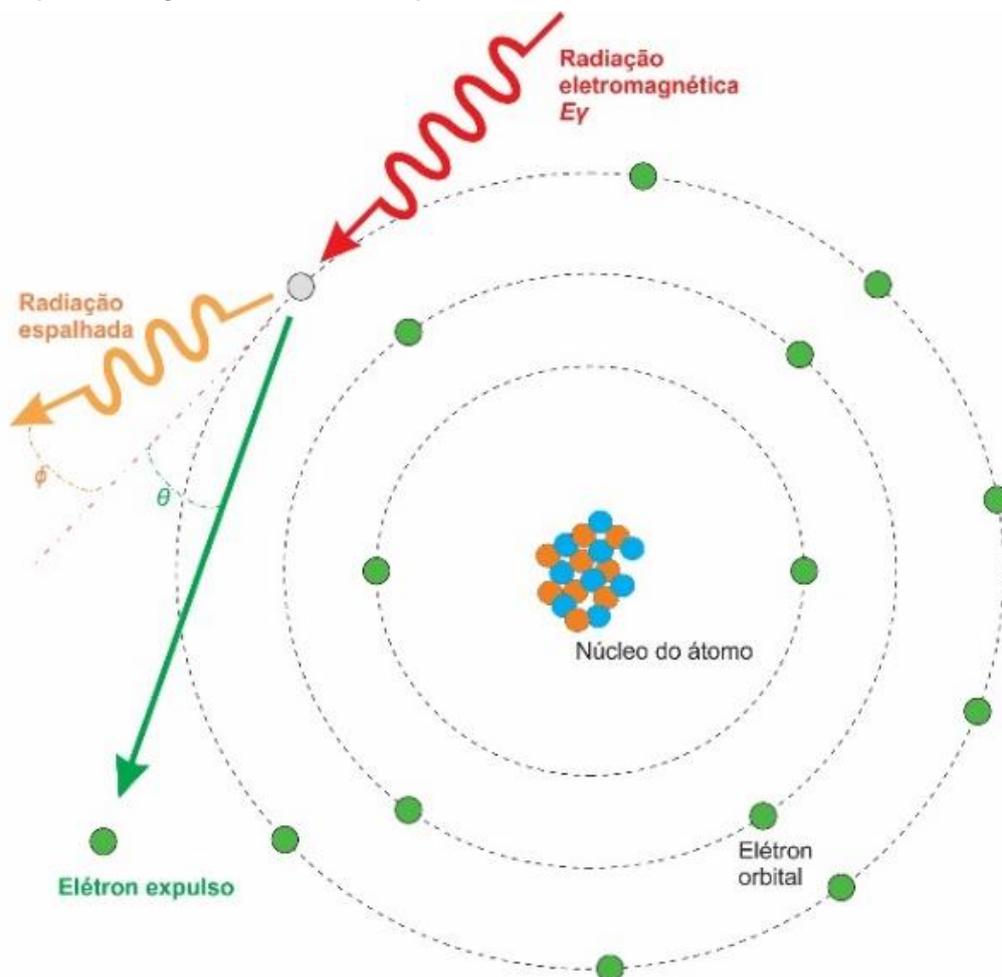


Legenda: Em raios gama, a origem mais provável do fotoelétron é a ligação mais forte ou a camada K do átomo. O fotoelétron carrega a maior parte da energia original do fóton. Em adição ao fotoelétron, a interação também gera um átomo ionizado com uma lacuna em uma de suas camadas de valência que é rapidamente preenchida pela captura de um elétron do meio ou pelo rearranjo dos elétrons de outras camadas do átomo.

Fonte: Adaptado de KNOLL, 2010

O efeito Compton (Figura 10) é caracterizado pela interação da radiação gama com uma ligação fraca de um elétron ou com um elétron livre e transfere parte de sua energia para este elétron. A energia cinética do elétron é equivalente à diferença entre a energia perdida pelo raio gama e a energia de ligação do elétron. A interação depende da densidade eletrônica. (VIDYASAGAR; JAGTAP; YEMUL, 2017).

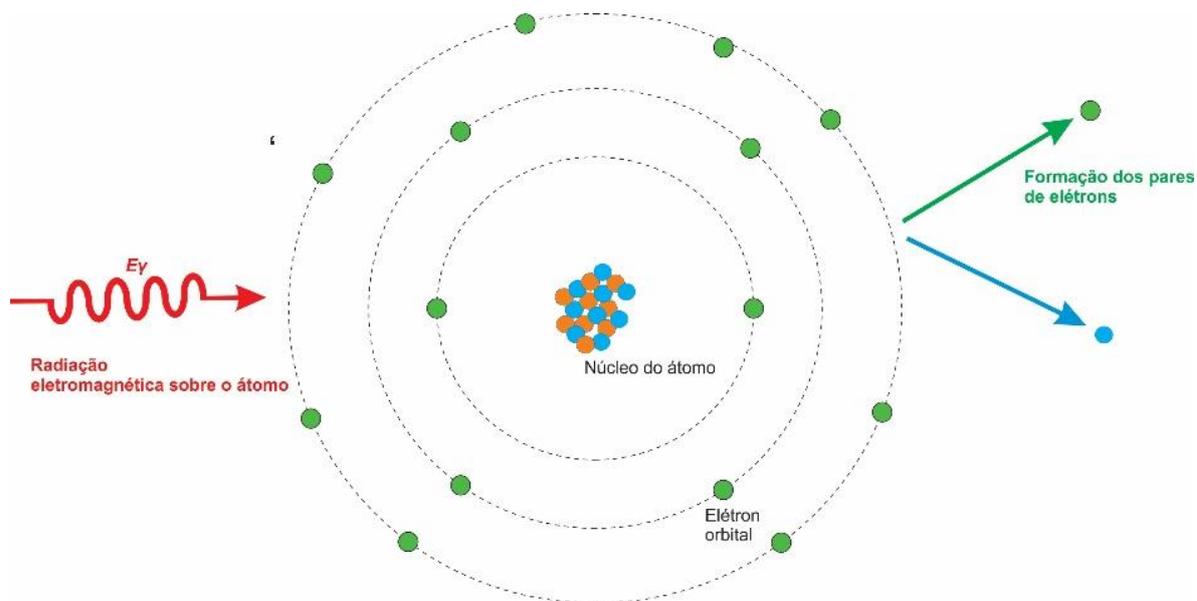
Figura 10 – Representação do efeito compton



Legenda: Em consequência ao efeito Compton, o fóton é ejetado por um ângulo θ com uma energia E_γ enquanto o elétron retrocede com energia cinética em um ângulo ϕ
Fonte: Adaptado de VIDYASAGAR; JAGTAP; YEMUL, 2017.

O efeito de interação da radiação com a matéria, conhecido como produção de pares, (Figura 11) ocorre a partir da interação entre o fóton e o núcleo de um átomo. Como resultado da interação, o fóton desaparece e um par elétron-pósitron aparece. Embora não ocorra mudança no núcleo como resultado desta interação sua presença é necessária para que o par ocorra (TSOULFANIDIS; LANDSBERGER, 2015).

Figura 11 – Representação da formação de pares



Legenda: A radiação gama desaparece e um par elétron-positron é criado, ou seja, a produção de pares elimina o fóton original.

Fonte: adaptado de TSOULFANIDIS; LANDSBERGER, 2015.

2.4.3 Efeito da radiação em micro-organismos

O efeito da radiação em micro-organismos vivos pode ser dividido em fatores diretos e indiretos. Os efeitos diretos se devem à ação da radiação sobre estruturas químicas alvo no micro-organismo, como por exemplo, a ação sobre seu DNA e/ou RNA. Entre os fatores indiretos, encontram-se, por exemplo a ação de radicais hidroxil (OH^\cdot) que são formados como produto da radiação em moléculas de água (BORRELY et al., 1998; HALL; GIACCIA, 2012).

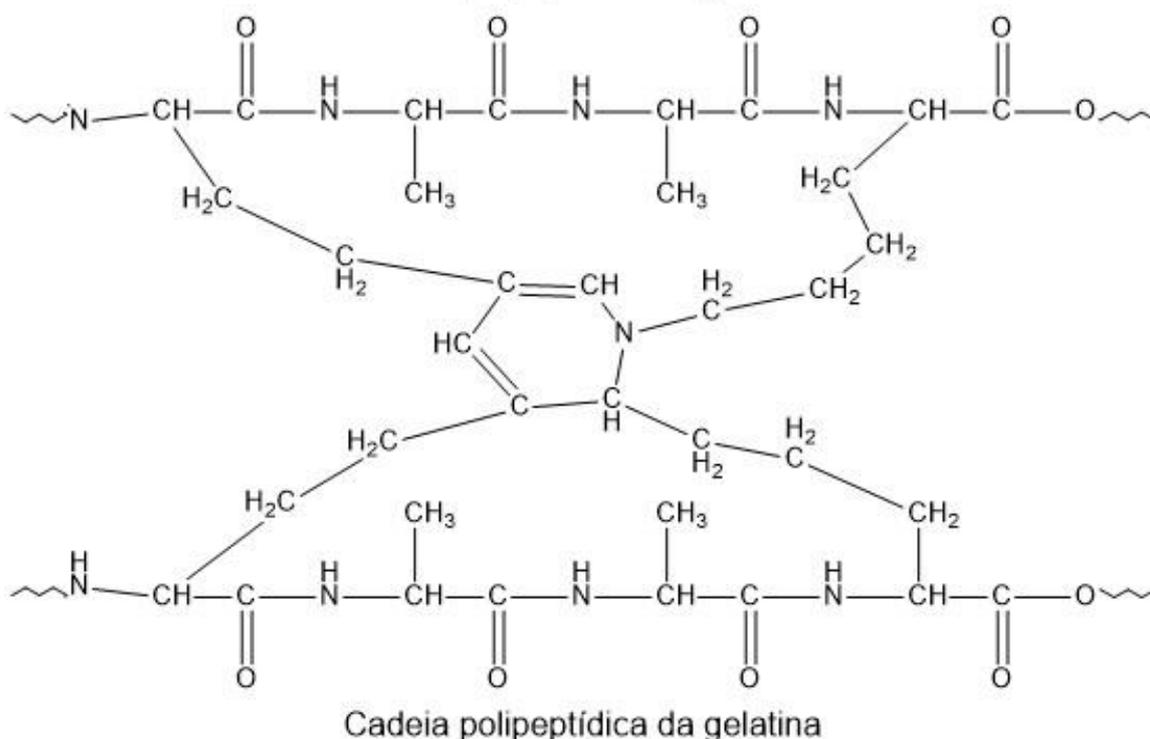
2.4.4 Reticulação de gelatina x irradiação

A radiação como processo capaz de alterar as propriedades químicas de materiais, como polímeros, é bem conhecida. Segundo Lucia, 2011, o efeito da radiação gama em moléculas de gelatina, por exemplo, se deve à alteração na formação de ligações cruzadas das moléculas de gelatina, o *crosslinking*, também denominado reticulação.

Considerando cápsulas vazias, a reticulação ocorre a partir da desaminação oxidativa de quatro resíduos de lisina (Lys). Estas reações resultam na forma de grupamentos aldeídos terminais que poderão ser atacados por um grupamento amino livre de uma lisina, formando um grupamento imina que, após subseqüentes reações de condensação tipo aldol, produz

uma ligação cruzada contendo anel piridínico conforme representado na Figura 12. Esta reação é semelhante à que ocorre na formação do colágeno durante o desenvolvimento de tecidos animais (DIGENIS; GOLD; SHAH, 1994; YAMAUCHI; SHIIBA, 2008).

Figura 12 – Representação da ligação cruzada em cadeias polipeptídicas de gelatina



Legenda: A ligação cruzada entre resíduos de Lys forma um anel piridínico
 Fonte: adaptado de (DIGENIS; GOLD; SHAH, 1994).

A reticulação em gelatina resulta na formação de uma membrana insolúvel em água (MURACHANIAN, 2010). *In vitro*, quando ocorre a reticulação, há diminuição da liberação do medicamento que pode ser observado visualmente em teste de desintegração (MEYER et al., 2000). Além disto, durante a execução de testes de dissolução pode ser observada a formação das películas que confinam os fármacos (GRAY et al., 2014).

A biodisponibilidade de medicamentos também pode ser influenciada pela formação de reticulação em cápsulas (FAN; DASH, 2001). Embora a reticulação possa ser formada de maneira intencional para se desenvolver um sistema controlado de liberação de fármacos, deve-se investigar se tratamentos industriais podem resultar neste fenômeno.

A cápsula apresenta tempo de desintegração rápido uma vez que é permeável à água, absorvendo-a e ocorrendo a separação de corpo e tampa durante a execução do teste (MISSAGHI; FASSIHI, 2006). Porém, caso ocorra o efeito de reticulação em consequência da

irradiação, ocorrerá a formação de uma película insolúvel que poderá influenciar resultados de desintegração (BROWN et al., 1998).

2.4.5 Degradação polimérica em consequência da radiação

Polímeros orgânicos degradam quando expostos a radiação ionizante em dose elevada (WILSKI, 1987). A degradação de proteínas resultam na perda de material que compõe a estrutura e perda de função (RABOTYAGOVA; CEBE; KAPLAN, 2008). Em consequência da radiação, as cadeias carbônicas da molécula de gelatina são quebradas e são geradas espécies reativas oriundos da ruptura entre ligações entre átomos de carbono. Espécies reativas como peróxidos são gerados por que a radiação é realizada na presença de oxigênio. Outras espécies reativas incluem íons e radicais livres (NASREEN; KHAN; MUSTAFA, 2016).

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos físico-químicos e microbiológicos da radiação ionizante com raios γ em cápsulas gelatinosas duras vazias.

3.2 Objetivos específicos

- Irradiar cápsulas gelatinosas duras vazias com raios γ com dose equivalente à 05 kGy, 15 kGy e 25 kGy;
- Avaliar o perfil físico-químico, com a determinação do teor de umidade, massa, tempo de desintegração e os comprimentos do corpo e da tampa da cápsula;
- Avaliar as características estruturais das cápsulas irradiadas usando microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar as características químicas por meio de análise por espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho e difratometria de raios X;
- Avaliar o perfil térmico por meio de calorimetria exploratória diferencial e Termogravimetria;
- Inocular amostras de cápsulas gelatinosas duras vazias com suspensões de *Bacillus subtilis* ATCC 6633;
- Verificar o impacto da radiação na contagem dos micro-organismos inoculados.

4.1 Seleção de cápsulas para irradiação

Para realização da pesquisa, foram selecionadas amostras de cápsula tamanho 2. Uma vez que as cápsulas não apresentavam crescimento bacteriano, foram preparados inóculos em cápsulas utilizando o micro-organismo *Bacillus subtilis*.

4.1.1 Cápsulas gelatinosas duras vazias

Para realização dos experimentos físicos e químicos, foram utilizadas 1.600 cápsulas incolores em tamanho 2 compostas por gelatina somente. As cápsulas foram subdivididas em pacotes com 100 unidades, formando 16 pacotes possibilitando que o manuseio de alíquotas para que os testes e ensaios fossem realizadas de maneira asséptica.

Foram preparados filmes poliméricos com gelatina que possuíam a mesma composição das cápsulas gelatinosas duras vazias submetidas ao ensaio. Os filmes foram divididos em dimensões aproximadas de 5 cm por 4 cm e inseridos em embalagem plástica vedada para que sua integridade fosse mantida.

Tanto as cápsulas quanto os filmes poliméricos foram subdivididos em dois grupos: o grupo controle (que não foi submetido à nenhuma dose de irradiação) e o grupo teste, que foi submetido à irradiação em dose nominal equivalente à 25 kGy. As amostras dos dois grupos foram colocadas em caixas diferentes.

As caixas foram submetidas às mesmas condições durante o acondicionamento antes do envio para irradiação, durante o transporte de ida e retorno do local da irradiação e até a conclusão dos testes. As duas caixas permaneceram separadas somente durante o período em que a amostra teste estava sendo submetida à irradiação.

Para a realização dos experimentos microbiológicos foram utilizados 33 g de cápsulas (aproximadamente 924 cápsulas) sendo divididas em 3 lotes de 11 g, sendo cada lote submetido separadamente aos ensaios microbiológicos desenvolvidos para a avaliação do efeito da radiação ionizante.

4.1.2 Preparo dos inóculos bacterianos

Alíquotas congeladas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 da coleção do Laboratório de Microbiologia do CCET/UEG foram inoculadas em ágar Müeller Hinton, e após 24 h de incubação, foram preparadas suspensões de colônias típicas isoladas em tubos de ensaio com 3 mL de solução tampão fosfato pH 7,2 e homogeneizadas em agitador de tubos. Os inóculos iniciais foram ajustados para $1,5 \cdot 10^8$ UFC.mL⁻¹ com 0,5 da escala de MacFarland (VARETTAS, 2017). Posteriormente, as suspensões bacterianas foram diluídas até atingirem a densidade populacional equivalente a $1,5 \cdot 10^7$ UFC.mL⁻¹.

Em seguida, 11 g de cápsulas foram dissolvidas em 80 mL de solução tampão fosfato pH 7,4 previamente esterilizado e o volume da solução foi completado para 100 mL, obtendo concentração de aproximadamente 0,11%.

Alíquotas de 1 mL da solução 0,11% foram transferidas para microtubos Eppendorf e posteriormente serão acrescentados 100 µL das suspensões bacterianas permitindo a obtenção de inóculo bacteriano de $1,36 \cdot 10^5$ UFC.mL⁻¹ em 1.100 µL da suspensão.

Alíquotas de 100 µL foram distribuídas em 10 microtubos Eppendorf. Cada inóculo foi constituído por densidade populacional equivalente a $1,36 \cdot 10^4$ UFC.mL⁻¹. Os microtubos foram incubados a 35 °C durante 7 dias para dessecar as amostras e, conseqüentemente, induzir a esporulação do *B. subtilis* (RASO et al., 1998). Ao término da incubação, os microtubos foram recolhidos e acondicionados em temperatura ambiente para envio à irradiação.

4.2 Irradiação gama por cobalto-60

A irradiação foi realizada no Irradiador Multipropósito de Cobalto 60 (⁶⁰Co) localizado nas instalações do Centro de Tecnologia das Radiações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CTR/IPEN), Universidade de São Paulo (SP).

O Irradiador foi projetado para proporcionar uniformidade e eficiência de dose. A sala de irradiação é composta por uma área com acesso por uma porta de concreto giratória para entrada e saída de produtos. Os produtos são inseridos na câmara de radiação sendo posicionados ao redor de dois racks de fonte de ⁶⁰Co. As fontes de ⁶⁰Co permaneceram submersas em uma piscina e foram elevados ao nível dos produtos que estavam expostos aos raios gama no momento da irradiação (RELA et al., 2002).

As doses de irradiação foram controladas a partir de reação colorimétrica obtida por meio de placas de polimetilmetacrilato (PMMA). O indicador de dose utilizado foi o de marca Harwell Dosimeters, Amber Perspex, Batch W, tipo 3042, aplicável a doses entre 1 e 30 kGy. O dosímetro possui aproximadamente 3 mm de espessura. Sua resposta ocorre através da mudança da densidade óptica (absorbância) em relação à espessura do dosímetro em consequência da dose absorvida (SWALLOW, 1984).

O dosímetro foi fixado na superfície externa da caixa que acondicionava as amostras, sendo realizado procedimento de irradiação estacionária em duas faces, ou seja, o material permanece estático próximo à fonte de radiação até que se complete a metade do tempo planejado para exposição. Em seguida o material é girado em ângulo de 180° para que se complete o tempo de exposição (SANTOS; VASQUEZ, 2015).

Foi empregada irradiação em doses equivalentes a 05 kGy, 15 kGy e 25 kGy. O controle de doses foi realizado através de avaliação da placa de PMMA. A avaliação das doses foi realizada durante o processo de irradiação e ao seu término. Para a determinação da dose de irradiação, inicialmente é realizada a medição da espessura da placa em milímetros (mm). Em seguida, para verificar a mudança na coloração da placa em consequência da irradiação, é realizada a avaliação da absorbância da placa em comprimento de onda equivalente à 650 nm, utilizando um espectrofotômetro marca Thermo Fisher, Modelo Genesys 20. Tanto o micrômetro quanto o espectrofotômetro empregado na avaliação das doses estavam localizados em laboratório próximo ao Irradiador Multipropósito de ^{60}Co , nas instalações do CTR/IPEN.

4.3 Ensaios após irradiação

4.3.1 Teor de umidade

As amostras foram submetidas ao teste de teor de umidade em balança com lâmpada de halogênio marca Ohaus, modelo MB-35 localizado nas instalações da Genix – Indústria Farmacêutica, conforme técnica prevista na Farmacopeia Brasileira 5ª Edição. Para realização do teste foram selecionadas 18 cápsulas incolores, massa aproximado de 2 g, sendo realizada a separação de corpo e tampa das cápsulas na balança para teste à temperatura de 125 °C por 15 min.

Foram realizadas três análises da amostra do grupo controle e três análises de

cápsulas submetidas à 25 kGy. Para avaliação dos resultados foi calculada a média aritmética e desvio padrão das amostras. Os resultados foram comparados através de avaliação estatística.

4.3.2 Massa

As análises de massa foram obtidas em balança analítica, com precisão 0,1 mg, marca Ohaus, localizado nas instalações da Genix – Indústria Farmacêutica. Foi realizada a pesagem unitária de 20 cápsulas, sendo realizado o cálculo de média dos resultados, conforme metodologia adaptada a partir da Farmacopeia Brasileira 5ª Edição. Ao término da pesagem, foi calculada a média aritmética das medições unitárias para determinação do massa médio.

Foram realizadas três análises da amostra do grupo controle e três análises de cápsulas submetidas à 25 kGy. Os resultados obtidos foram avaliados através de cálculos estatísticos.

4.3.3 Comprimento do corpo e da tampa das cápsulas

As medições de comprimento do corpo e da tampa das cápsulas foram realizadas em relógio comparador marca Mitutoyo com precisão 0,01 mm, localizado nas instalações da Genix – Indústria Farmacêutica. Para realização do teste, corpo e tampa de 20 cápsulas foram separadas e, em seguida foram realizadas medições unitárias. Ao término foi realizado o cálculo para determinação de média do comprimento.

Foram realizadas três análises de amostras do grupo controle e três análises de cápsulas submetidas à irradiação em dose de 25 kGy.

4.3.4 Desintegração

As cápsulas foram submetidas ao teste de desintegração em Desintegrador marca Nova Ética, localizado nas instalações da Genix – Indústria Farmacêutica. Para realização do teste foi observado o tempo de desintegração decorrido em 6 cápsulas. Foi utilizada água purificada em temperatura de 37 °C para realização do teste.

Foram realizadas três análises de amostras do grupo controle e três análises de

cápsulas submetidas à irradiação em dose de 25 kGy.

4.3.5 Microscopia eletrônica de varredura

Com o objetivo de avaliar a estrutura microscópica do filme polimérico foram obtidas imagens com a utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura marca Hitachi, modelo TM 3030Plus do laboratório de análises instrumentais da Universidade Estadual de Goiás (UEG). As imagens foram analisadas quanto à estrutura do filme polimérico.

4.3.6 Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho

Amostras foram submetidas à espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho para a caracterização de ligações químicas dos constituintes da cápsula antes da irradiação e após a irradiação. Os testes foram realizados em equipamento marca Perkin Elmer, modelo Frontier FT IR número de série 93.788, localizado no laboratório de análises instrumentais da Universidade Estadual de Goiás (UEG). As amostras foram analisadas por meio de ATR, em número de ondas de 4000 cm^{-1} a 700 cm^{-1} .

4.3.7 Difratometria de raios X

A difratometria de raios X (DRX) foi utilizada para a caracterização da estrutura cristalina em filmes poliméricos de gelatina, sendo utilizado equipamento marca Shimadzu, modelo XRD 6000, com fonte de radiação $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1,54056\text{ \AA}$), voltagem de 30 kV e corrente de 30 mA localizado nas instalações da Universidade Estadual Paulista (UNESP) Júlio de Mesquita Filho. As medidas foram feitas em varredura contínua no intervalo de $5^\circ \leq 2\theta \leq 80^\circ$, a uma velocidade de varredura equivalente a $2^\circ.\text{min}^{-1}$.

4.3.8 Análise Térmica

As medidas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) das cápsulas foram realizadas nas instalações da Universidade Estadual Paulista (UNESP) Júlio de Mesquita Filho. Para realização dos experimentos, 11 g de amostra foram submetidas ao ensaio em um calorímetro exploratório diferencial com varredura térmica diferencial NETZSCH modelo DSC

204 Phoenix, com taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ na faixa de temperatura de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ em atmosfera de N_2 em fluxo de gás de 20 mL/min .

Amostras foram submetidos à análise por termogravimetria (TGA), sendo utilizado equipamento marca Perkin Elmer localizado nas instalações da UEG. As amostras foram submetidas aquecimento de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ até $900\text{ }^{\circ}\text{C}$, em velocidade de aquecimento equivalente à $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$.

4.3.9 Análise microbiológica

Após a irradiação, os inóculos previamente preparados conforme item 4.1.2, página 36, foram dissolvidas em $900\text{ }\mu\text{L}$ de solução tampão pH 7,0, foi realizada a homogeneização em vórtex por 10 segundos e $100\text{ }\mu\text{L}$ da solução foram inoculados em ágar Müller Hinton para recuperação dos micro-organismos inoculados. Após 24 horas de incubação, foi realizada a contagem de colônias. A comparação entre os resultados das contagens microbianas do grupo irradiado e o grupo controle não irradiado foi feita por meio de análise estatística.

4.4 Tratamento estatístico

Os dados foram representados através de medidas de tendência central e medidas de dispersão, que correspondem ao valor do ponto em torno do qual os dados se distribuem e medidas no qual os dados estão distribuídos, respectivamente (VIEIRA, 1999). As diferenças observadas entre os grupos irradiado e não irradiado foram avaliadas através do teste *T* de Student com nível de significância de 5%.

5.1 Ensaios físicos

Com o objetivo de avaliar as cápsulas duras de gelatina submetidas ao processo de irradiação, foram executados ensaios de perda por dessecação (teor de umidade), comprimento do corpo, comprimento da tampa e tempo de desintegração em amostras do grupo controle (não irradiado) e cápsulas submetidas à radiação em dose equivalente a 25 kGy. Os resultados obtidos estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados de testes físico-químicos

PARÂMETRO FÍSICO- QUÍMICO	GRUPO CONTROLE		IRRADIADO (25 kGy)	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
Teor de umidade (%)	14,53	0,33	14,88%	0,08
Massa (mg)	59,59	0,30	60,85	0,31
Comprimento da tampa (mm)	8,96	0,02	8,95	0,02
Comprimento de corpo (mm)	15,38	0,01	15,35	0,01
Tempo de desintegração (s)	100,00	1,73	94,00	10,53

Legenda: Os resultados representam a média e o desvio padrão de três medições que foram aplicadas em amostras do grupo controle e amostras irradiadas em dose equivalente a 25 kGy.

Fonte: desenvolvido pelo autor.

A comparação estatística para resultados de teor de umidade, massa, comprimento do corpo e comprimento da tampa e tempo de desintegração foi realizada utilizando o teste *T* de *Student* com nível de significância de 5%. Essa comparação indicou que os resultados obtidos para amostras do grupo controle e amostras submetidas à irradiação em dose equivalente a 25 kGy não possuem diferença significativa. Logo, os resultados mostram que o processo de irradiação não influenciou características físicas das cápsulas.

As propriedades físicas de cápsulas de gelatina são influenciadas pela umidade. Quando o teor de umidade da cápsula é inferior a 10%, o envoltório da gelatina pode tornar-se quebradiço. Por outro lado, quando o teor de umidade é superior a 18% as cápsulas podem amolecer e tornar-se pegajosas (BERNTSSON; ZACKRISSON; ÖSTLING, 1997). Por este motivo, a umidade é um parâmetro importante para a estabilidade cápsulas duras de gelatina.

Diferentes etapas do processo de irradiação poderiam ter alterado significativamente

o teor de umidade das cápsulas, como o transporte e acondicionamento das amostras. O processo de irradiação pode ser considerado fator de risco para umidade das cápsulas uma vez que a irradiação se dá em um ambiente acima de um reservatório de água purificada onde as fontes de ^{60}Co estão submersas.

As amostras do grupo controle e amostras irradiadas apresentaram umidade dentro dos limites especificados para o produto, entre 13% e 16%. A diferença entre os resultados de umidade das amostras do grupo controle e grupo irradiado resultados é de 0,35%. A dispersão das amostras apresenta desvio padrão relativo equivalente a 1,68%.

A dose aplicada durante a irradiação de cápsulas poderia levar à degradação de seu principal componente, a gelatina. A avaliação de massa foi considerada parâmetro importante para caracterização dos efeitos da irradiação, principalmente se houvesse diminuição significativa de massa observada entre amostras irradiadas em relação à amostra do grupo controle, uma vez que este resultado pode indicar degradação da matriz proteica que compõe a cápsula (GOSWAIM; MAITI, 1998).

Não há correlação entre a biodisponibilidade de fármacos administrados em cápsulas e o tamanho das cápsulas (PARKER; WILSON; HARDY, 1988), o que torna o tamanho da cápsula irrelevante quanto à critérios farmacocinéticos. Porém, variações em tamanho da cápsula podem influenciar na quantidade do pó ou grânulo encapsulado. Esta variação, por sua vez, pode resultar na dificuldade do fechamento das cápsulas com extravasamento do material, levando a perdas durante o processo de encapsulamento e prejuízos para a indústria farmacêutica (DAVIDSON, 2014). Considerando que não houve variação do comprimento do corpo e da tampa em consequência do processo de irradiação, conclui-se que a irradiação não acarretará em variações em seu tamanho.

Uma vez que o processo de irradiação de cápsulas de gelatina pode resultar na formação de reticulação, o teste de desintegração é um parâmetro necessário para caracterizar a cápsula como veículo em preparações farmacêuticas. Considerando que o teste foi realizado com cápsulas vazias, o tempo de desintegração foi considerado como o necessário para romper a integridade das cápsulas submetidas ao teste sendo visualizado como resíduo macio na tela do aparado do desintegrador (CIPER; BODMEIER, 2006; UNITED STATES, 2016). Os resultados indicam tempo de desintegração para cápsulas vazias com diferença de 6 segundos entre amostra irradiada e amostra do grupo controle.

O tempo máximo para desintegração de cápsulas de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª Edição, é de 45 minutos. De acordo com os testes aplicados, o resultado obtido

para cápsulas do grupo controle foi 100 segundos e do grupo irradiado em dose equivalente a 25 kGy foi 94 segundos. Por este motivo, todos os resultados foram considerados satisfatórios em comparação com valores especificados na monografia oficial.

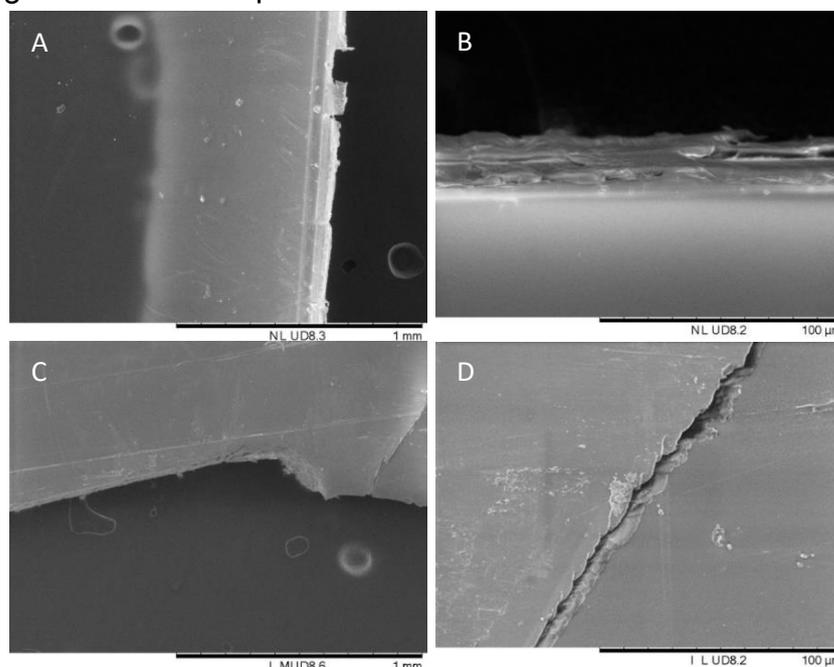
O desvio padrão calculado para amostras do grupo controle é de 1,73 segundos ao passo que em cápsulas irradiadas em dose equivalente a 25 kGy, o resultado foi de 10,53 segundos. A diferença entre os resultados poderia estar relacionada à reticulação do filme de gelatina porém, provavelmente, se dá pelas características do teste uma vez que o tempo de desintegração é determinado através da visualização de cápsulas estando sujeito à percepção do observador.

5.2 Ensaios químicos

5.2.1 Microscopia eletrônica de varredura

A Figura 13 apresenta as imagens obtidas do filme polimérico de amostras não submetidas à irradiação e filmes submetidos à irradiação, respectivamente.

Figura 13 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura



Legenda: Amostra não exposta à irradiação, com ampliação de 100x (imagem A) e ampliação de 1.000x. (imagem B). Amostra exposta à irradiação em dose equivalente a 25 kGy, com ampliação de 100x (imagem C) e, com ampliação de 1000x (imagem D)

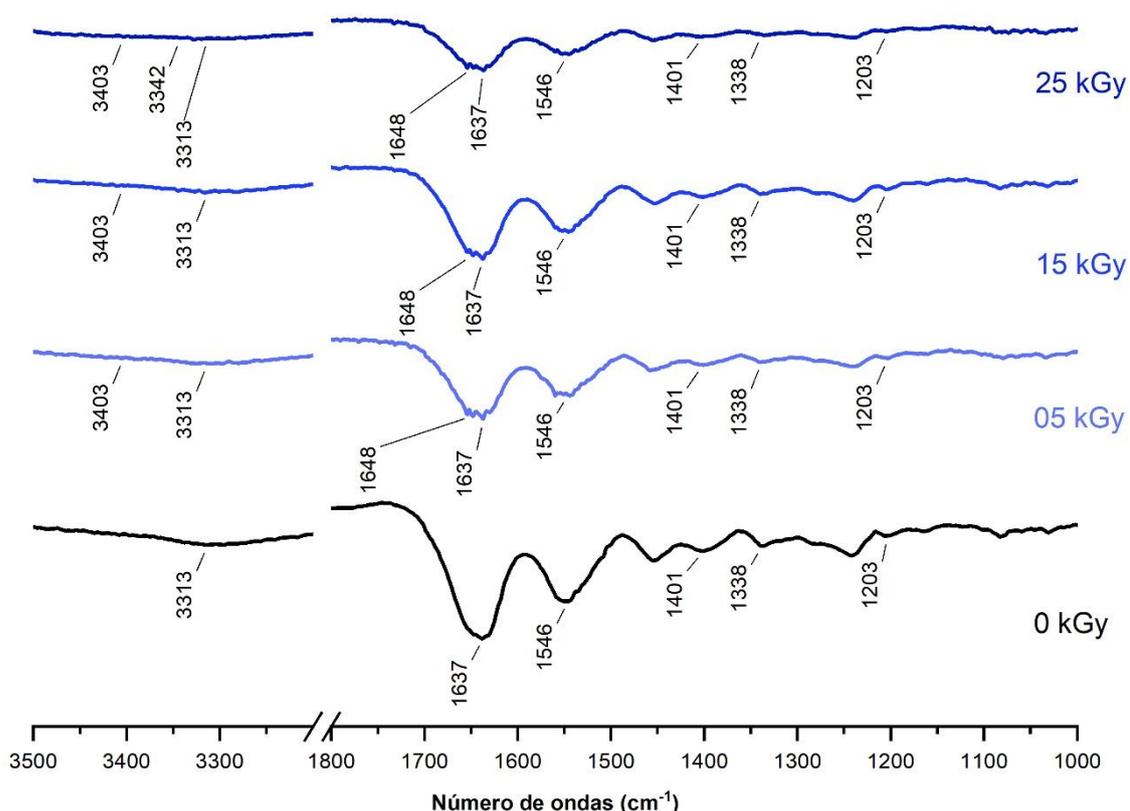
Fonte: desenvolvido pelo autor

Os filmes poliméricos apresentam estrutura plana e lisa, em que se observam nas áreas de corte e ampliadas a formação de camadas características de filmes poliméricos de gelatina (ELDIN et al., 2014). Não foram percebidas variações entre amostras irradiadas de forma a concluir que a irradiação não altera a morfologia de superfície das amostras.

5.2.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

A Figura 14 apresenta o espectro vibracional de absorção na região do infravermelho obtido por ATR em superfícies cápsulas do grupo controle e cápsulas submetidas à irradiação em doses equivalentes à 05 kGy, 15 kGy e 25 kGy.

Figura 14 – Resultados de espectroscopia vibracional na região do infravermelho



Legenda: Foi realizada análise de espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho em cápsulas duras antes e após a irradiação. Para composição da figura, foi selecionado um dos resultados obtidos.

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

O primeiro sinal evidenciado no espectro está na região de 3.313 cm⁻¹ em amostras do grupo controle. Este sinal repetiu-se em todas as amostras irradiadas. Conforme descrito

por Tengroth et al., 2005, em geral picos na região entre 3.600 cm^{-1} e 3.000 cm^{-1} estão relacionados ao estiramento de grupamentos OH e NH da molécula de gelatina.

Grupamentos hidroxílicos estão relacionados à estrutura molecular dos aminoácidos que formam a gelatina, que após formação permanecem livres ou participam de ligações entre as cadeias conforme representado na Figura 4, sendo a água importante para manutenção da estrutura proteica da cápsula.

Grupamentos hidroxílicos também estão relacionados a moléculas de água presentes na cápsula. Yakimets et al., 2005 observaram alterações em sinais na região de 3.475 cm^{-1} e 3.240 cm^{-1} em consequência de estiramentos de bandas -OH após absorção de água por moléculas de gelatina. As amostras irradiadas nas três doses do tratamento apresentaram sinal em 3.403 cm^{-1} , que provavelmente se deve a grupamentos -OH e está relacionada à absorção de água pelas estruturas químicas, seja para formação de ligações na mesma molécula ou para ligações entre moléculas diferentes (BASU; TARAFDAR, 2016).

Em região de 1.637 cm^{-1} do espectro de infravermelho foram observados picos que correspondem a grupamentos amida primária relacionadas a estiramentos da ligação C=O (SANTOS et al., 2018). Nestas condições, as referidas bandas estão relacionadas às ligações entre resíduos de praticamente todos os aminoácidos que ocorre em diversas regiões da molécula de gelatina. Amostras irradiadas em doses equivalentes a 05 kGy, 15 kGy e 25 kGy apresentaram sinal em 1.648 cm^{-1} que também estão relacionadas à ligações em amidas primárias.

O pico evidenciado em região de 1.546 cm^{-1} corresponde à banda de amida secundária devido à ligação -NH em vibração relacionada à ligação entre o carbono e o nitrogênio, que é formada em ligações peptídicas nas moléculas de gelatina (HERMANTO; SUMARLIN; FATIMAH, 2013; DEY et al., 2014).

Em geral, picos nas regiões de 1.401 cm^{-1} , 1338 cm^{-1} e 1.203 cm^{-1} estão relacionados a cadeias laterais presentes em todos os aminoácidos (BARTH, 2000). Os espectros apresentaram picos em 1.480 cm^{-1} e 1.300 cm^{-1} , em que são observados deformações regulares em ligações C-H (DERRICK; STULIK; LANDRY, 1999). O sinal observado em região equivalente a 1455 cm^{-1} indica vibração em amida sendo considerado um indicativo de preservação da integridade da tripla hélice do colágeno (HE et al., 2011).

O sinal de amida terciária centralizada na região de 1.240 cm^{-1} está relacionado ao estiramento C-N e N-H de ligações amidas assim como grupamentos CH_2 localizados na estrutura da glicina e cadeia lateral da prolina. No infravermelho equivalente à 1.082 cm^{-1} foi

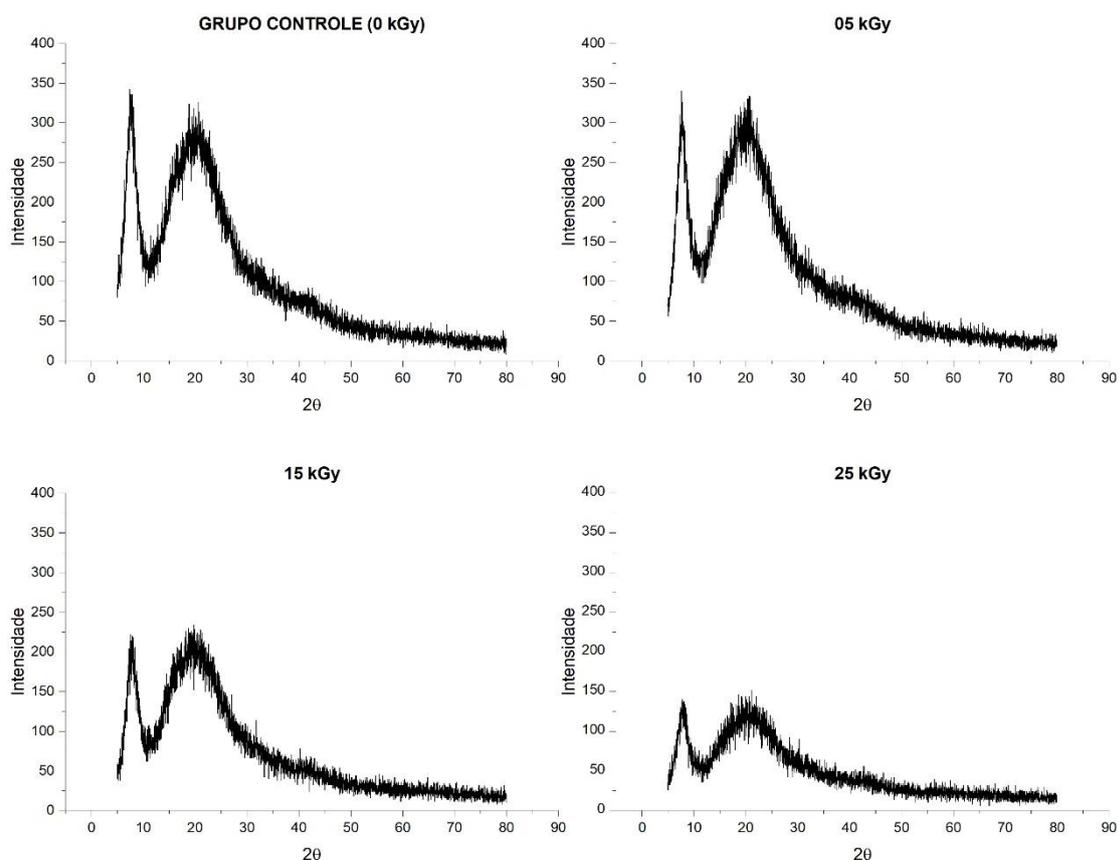
observado pico característico de dobramento em regiões hidroxil (SYAFIQA; KAMARUDIN, 2018).

Os picos observados no espectro de infravermelho de amostras irradiadas e amostras não submetidas à irradiação indicam que não houve alteração na estrutura química da gelatina após o processo de irradiação em dose equivalente à 25 kGy indicando que a esterilização através de raios gama até a referida dose pode ser utilizada em cápsulas vazias sem que ocorra mudança na estrutura química do material.

5.2.3 Difratomia de Raios X (DRX)

A Figura 15 compara os perfis de difratometria de raios X para amostras submetidas à irradiação em dose equivalente à 25 kGy e amostras do grupo controle não irradiadas.

Figura 15 – Difratomogramas de raios X das amostras do grupo controle e amostras irradiadas em doses equivalentes a 05 kGy, 15 kGy e 25 kGy



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Ao avaliar separadamente cada um dos difratogramas de raios X, percebe-se

variação na intensidade relativa do halo em $2\theta=7,59^\circ$ em relação ao halo $2\theta=20,54^\circ$, conforme relacionado na Tabela 2.

Tabela 2 – Intensidade relativa dos halos dos difratogramas de raios X

Tratamento	0 kGy	05 kGy	15 kGy	25 kGy
Intensidade relativa	95,32%	98,23%	105,40%	108,57%

Legenda: Intensidade relativa do halo observado em $2\theta=20,54^\circ$ (região amorfa) em relação a $2\theta=7,59^\circ$ (região de característica cristalina) evidenciando intensificação da região amorfa à medida em que a dose de radiação é aumentada.

Fonte: desenvolvido pelo autor.

Ambos difratogramas apresentaram halos nas mesmas regiões. Em ângulo de difração equivalente $2\theta=7,59^\circ$ foi observado pico correspondente a regiões cristalinas em tripla hélice do colágeno, utilizado como matéria prima para fabricação da gelatina (PEÑA et al., 2010). Em $2\theta=20,54^\circ$ observa-se um halo típico de regiões amorfas de material polimérico (BIGI, 2004).

Os perfis apresentados nos difratogramas indicam a estrutura de material semicristalino. A estrutura da gelatina pode ser representada pelo modelo estrutural da micela franjada, no qual a estrutura tridimensional é composta por microcristalitos interconectados com regiões amorfas. Aplicando este modelo à gelatina, uma macromolécula pode possuir segmentos neutros, não polares (Gly-Pro-Hypro)_n localizados dentro de uma ou mais regiões cristalinas, randomicamente entrelaçados com regiões amorfas constituídas por sequências polares (SLADE; LEVINE, 1987).

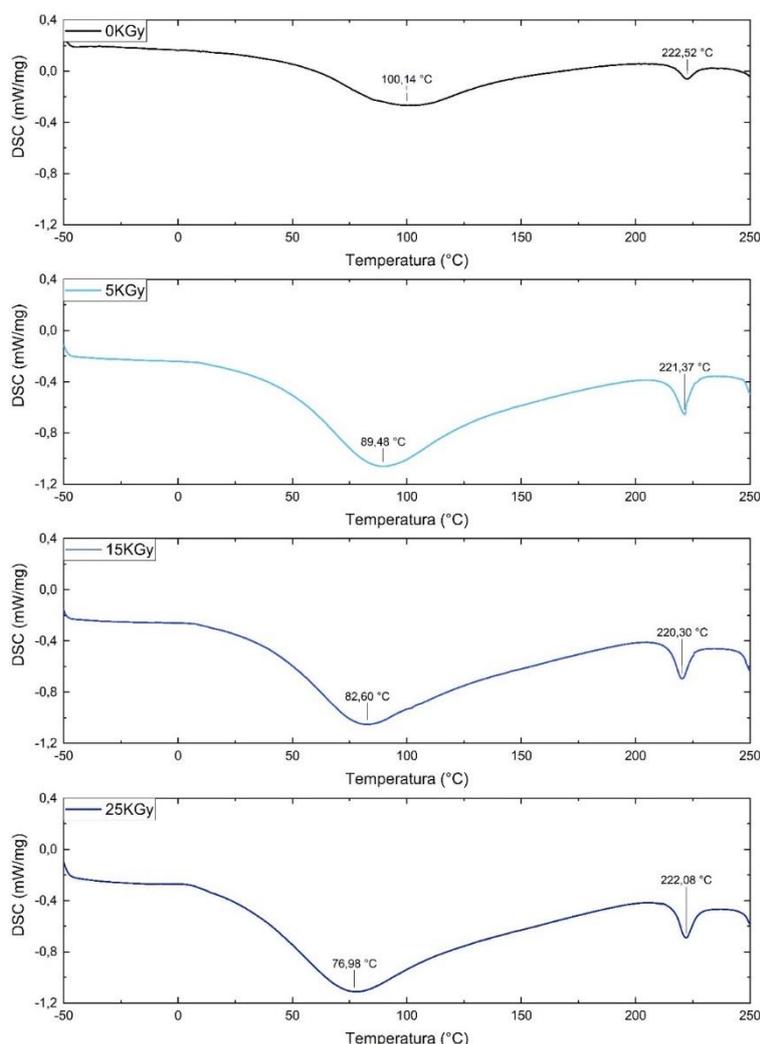
Modificações moleculares induzidas em polímeros por radiação ionizante ocorrem em regiões amorfas. Em baixas doses, a irradiação não modifica a cristalinidade do material. Porém a modificação pode ocorrer em doses altas, com introdução de cristalitos devido à reticulação e degradação que é intensificada por reações de oxidação (SPADARO; ALESSI; DISPENZA, 2017).

Os resultados de intensidade relativa dos halos no difratograma de raios X relacionados na Tabela 2 indicam que a região amorfa da molécula de gelatina intensifica a medida em que a dose é aumentada. Segundo TOMŠOVÁ; ĎUROVIČ; DRÁBKOVÁ, 2016, a irradiação induz mudanças moleculares porém, por possuir uma cadeia longa seus segmentos não se alinham em regiões regulares, diminuindo a cristalinidade e aumentando a intensidade de regiões amorfas.

5.2.4 Análise térmica

A primeira etapa de análise do perfil térmico entre $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi realizada por meio de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) em amostras do grupo controle e amostras submetidas à radiação ionizante em doses equivalente a 5 kGy, 15 kGy e 25 kGy. Os resultados estão representados na Figura 16.

Figura 16 – DSC das amostras de cápsulas



Legenda: Resultados de DSC de amostras do grupo controle não submetido à radiação, identificado como 0 kGy e amostras irradiadas em dose equivalente a 5 kGy, 15 kGy e 25 kGy.

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

A Calorimetria Exploratória Diferencial realizada em amostras do grupo controle não irradiado apresentou evento endotérmico em temperatura equivalente a $100,14\text{ }^{\circ}\text{C}$, conforme

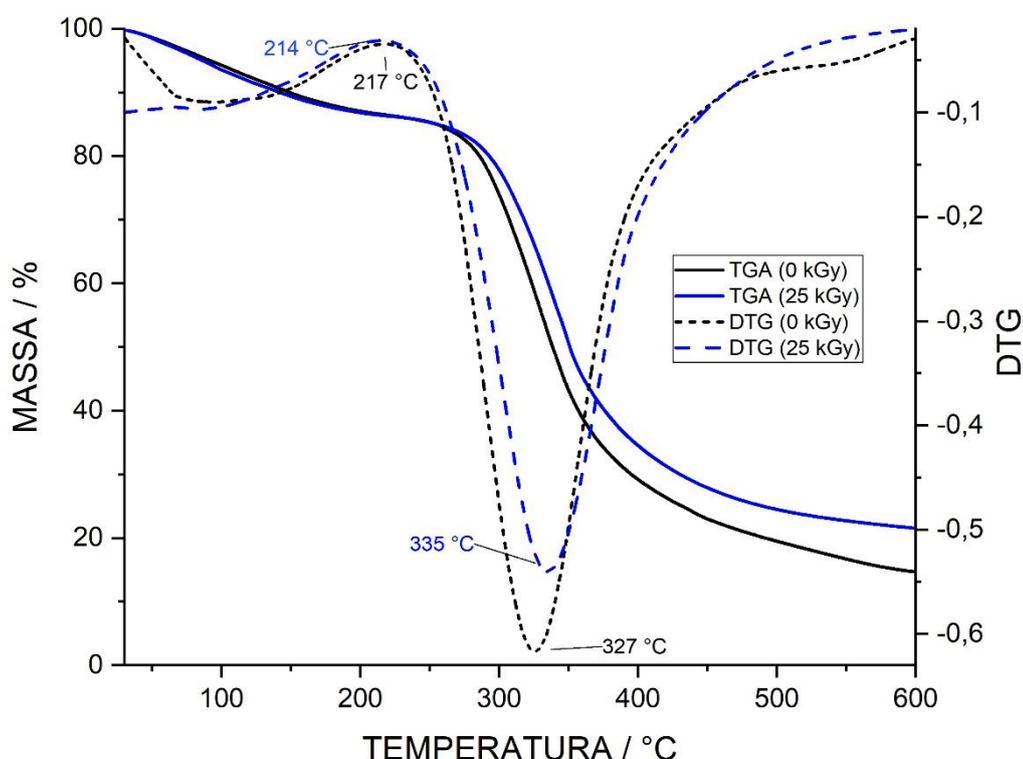
representado. Em amostras irradiadas em doses equivalentes à 05 kGy, 15 kGy e 25 kGy houve deslocamento de intensidade de transições endotérmicas, com maior intensidade em 89,48 °C; 82,60 °C e 76,98 °C respectivamente. Islam et al., 2014, descrevem que a temperatura de desnaturação proteica diminui conforme dose de irradiação aplicada em gelatina uma vez que ocorre a transformação da hélice que compõe sua estrutura molecular. Segundo Cataldo et al., 2008, o deslocamento a temperaturas mais baixas e a redução da intensidade em transições endotérmicas observadas no DSC são fenômenos consistentes como aumento da rigidez da estrutura de gelatina devido à ligações cruzadas entre as cadeias e a menor propensão da gelatina a aprisionar água que é mantida em menor quantidade e liberada mais facilmente em amostras irradiadas.

Em consequência da liberação de material volátil na região de 100 °C, não foi possível identificar a temperatura de transição vítrea (Tg) da gelatina que ocorre nesta região (FLORY; GARRETT, 1958). Os resultados de Tg em gelatina são influenciados pela umidade da amostra porém, de maneira geral, sua temperatura de transição vítrea é menor que 150 °C (YANNAS, 1972). O teor de umidade da gelatina é considerado difícil de ser controlado uma vez que a gelatina é facilmente desidratada pela umidade ambiente. A água funciona como efeito plastificante no filme de gelatina e amplifica picos de Tg (PERKASA et al., 2013). O pico endotérmico que ocorre na região de 100 °C também está relacionada à desnaturação de segmentos de gelatina, temperatura no qual ocorre a transição da tripla hélice que sobrepõe a Tg (RAHMAN et al., 2013).

Em amostras irradiadas e amostras do grupo controle também foi evidenciado segundo evento endotérmico em temperatura média de 221 °C que está relacionada à Temperatura de fusão (Tm) das regiões cristalinas (MUKHERJEE; ROSOLEN, 2013). Em amostras do grupo controle (0 kGy) e amostras submetidas à irradiação os valores de Tm encontrados possuem média 221 °C indicando que a irradiação até dose equivalente a 25 kGy não interfere nesta característica do material.

A Figura 17 apresenta as curvas de análise termogravimétrica das cápsulas irradiadas e cápsulas não irradiadas através de gráfico que correlaciona a temperatura de exposição das amostras, entre 30 °C e 1000 °C.

Figura 17 – Curva termogravimétrica das amostras



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

A degradação térmica da gelatina ocorreu em dois estágios (CORREIA et al., 2013). O primeiro evento térmico, entre 30 °C e 217 °C observado no TGA corresponde à perda de aproximadamente 15% da massa inicial da amostra e está relacionada à perda de material volátil, água. As cápsulas não irradiadas e as irradiadas apresentam teor de umidade equivalente a 14,5% e 14,8% respectivamente, conforme evidenciado em teste de caracterização do perfil físico-químico descrito na Tabela 1.

A segunda etapa de degradação térmica foi observada em faixa de temperatura de 325 °C para material do grupo controle e 335 °C para material submetido a irradiação no qual cerca de 50% da massa da amostra é consumida. Nesta temperatura ocorre a decomposição de material orgânico que ocorre normalmente até aproximadamente 400 °C (BARRETO; PIRES; SOLDI, 2003; VERGNE et al., 2018).

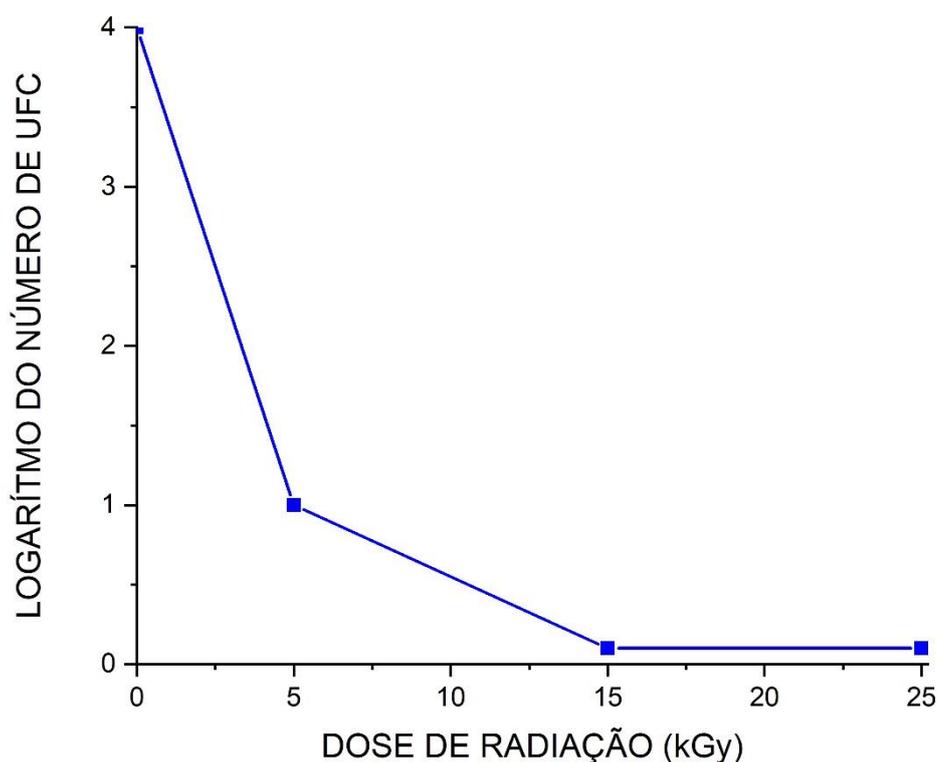
A curva termogravimétrica indicou que amostras do grupo irradiado apresentaram maior temperatura de decomposição térmica (335 °C) e menor perda de massa indicando maior estabilidade térmica em comparação à amostras do grupo controle. Conforme estudos prévios, a estabilidade térmica da gelatina aumenta à medida em que a reticulação se torna

mais intensa (KUIJPERS et al., 2000; HAN; ZHAO, 2016).

5.3 Resultados microbiológicos

Os resultados de crescimento bacteriano foram expressos em logaritmo de população viável. Amostras do grupo controle apresentaram crescimento bacteriano em população equivalente a 10^4 UFC.mL⁻¹ do inóculo preparado. Após irradiação, foi observada redução da população viável do micro-organismo. A Figura 18 relaciona os resultados de logaritmo de crescimento bacteriano em amostras do grupo controle e amostras irradiadas nas doses equivalentes a 05 kGy, 15 kGy e 25 kGy.

Figura 18 – Efeito da radiação gama na viabilidade de células do *B. subtilis*

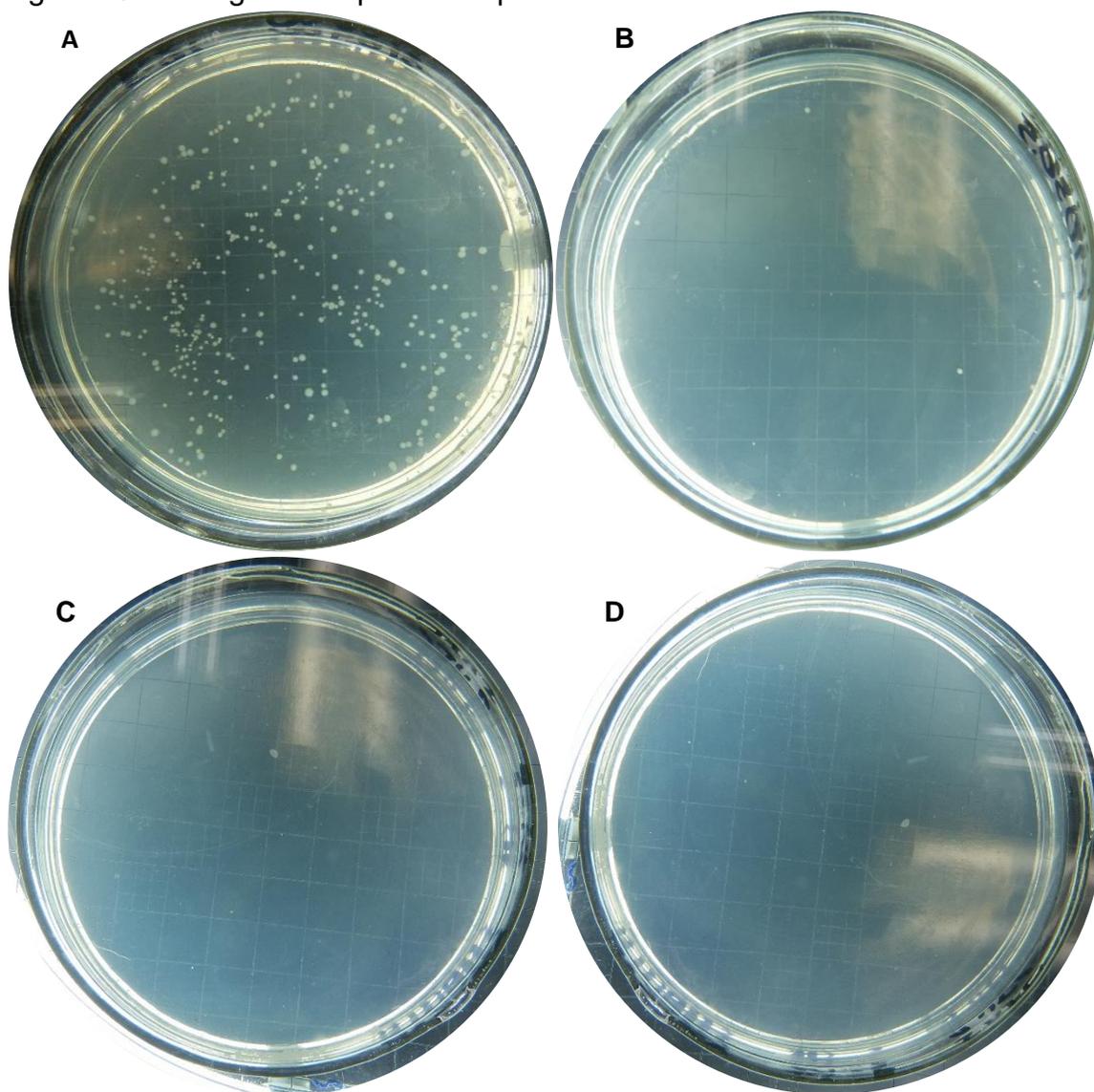


Legenda: A população de *B. subtilis* apresentada em logaritmo (10^y UFC.mL⁻¹) é reduzida à medida em que as doses de radiação são aumentadas.

Fonte: desenvolvido pelo autor

A Figura 19 apresenta as fotografias das placas de petri obtidas após 24h de incubação:

Figura 19 – Fotografia de placas de petri evidenciando o crescimento bacteriano



Legenda: Os ensaios foram realizados em triplicata para cada dose de esterilização. As fotografias evidenciam o crescimento bacteriano de *B. subtilis* em uma das réplicas analisadas. A – Amostra do grupo controle (não irradiado) evidenciado crescimento equivalente a $3,3 \cdot 10^4$ UFC.mL⁻¹; B – Amostra submetida à radiação em dose equivalente a 5 kGy, evidenciando crescimento de 70 UFC.mL⁻¹; C – Amostra submetida a radiação em dose equivalente a 15 kGy, não foi evidenciado crescimento bacteriano; D – Amostra submetida a radiação em dose equivalente a 25 kGy, não foi evidenciado crescimento bacteriano.

Fonte: fotografada pelo autor.

No presente experimento, após irradiação, em amostras do grupo controle foi evidenciado crescimento bacteriano em população equivalente a 10^4 UFC.mL⁻¹. Estes resultados validam a técnica de preparo do inóculo antes da irradiação, em que esperava-se obter população viável na ordem de 10^4 UFC.mL⁻¹. Foi observado ainda a redução significativa da população viável do *B. subtilis* em amostras submetidas a doses equivalentes a 05 kGy para 10^1 UFC.mL⁻¹. Segundo Diep et al., 2017 em dose de radiação superior a 0,5 kGy ocorre

a redução do número de colônias de *B. subtilis* e a redução é intensificada a partir de dose equivalente a 1,2 kGy.

Não foi evidenciado crescimento microbiano em doses equivalentes a 15 kGy e 25 kGy, indicando total esterilização do material. Os resultados indicam que em dose superior a 15 kGy o crescimento de *Bacillus subtilis* é inferior aos limites mínimos de detecção (POSTMES; VAN DEN BOGAARD; HAZEN, 1995).

Bacillus subtilis são bactérias gram positivas, aeróbicas formadoras de endósporos. Estão associados à doenças alimentares, cujos sintomas principais são diarreia e vômito que iniciam entre 10 e 14h após a infecção. Possuem temperatura de crescimento ótima entre 25 °C e 37 °C, formando colônias ásperas com perímetro irregular (BHUNIA, 2018).

A formação de colônias por micro-organismos pode ser afetada pela irradiação. Porém, os componentes que constituem os esporos de *B. subtilis* são importantes na resistência à radiação ionizante e, sabe-se que este micro-organismo pode ainda apresentar sistemas de reparo em seu DNA em resposta a danos causados pela irradiação (MOELLER et al., 2014; POLLARD, 2018)

A redução observada a partir de 15 kGy pode ocorrer em doses menores conforme descrito em estudos anteriores. Segundo estudo conduzido por Briggs, 1966, a redução em população viável ocorre a partir de dose equivalente em 12 kGy, não somente para o *B. subtilis*, mas para outras espécies do mesmo gênero, como o *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*, *B. megaterium* e *B. pantothenicus*.

A dose de 15 kGy é eficaz na eliminação de células viáveis em população na ordem de 10^4 UFC, mesmo para micro-organismos de espécie diferente. Hilsen; Kournikakis; Ford, 2005 conduziram um estudo para a inativação do *Bacillus atrophaeus* em população viável de 10^7 UFC em pó e em suspensão. Em pó seco a população foi inativada após dose equivalente a 25 kGy e tratamento por 75 minutos e em 35 kGy em tratamento de 105 minutos para amostra líquida, em suspensão. Assim, neste experimento foi observada a redução de 10^4 UFC a partir de dose de radiação equivalente a 15 kGy. Isto permite concluir que o tempo de exposição, a atividade de água, e a taxa de irradiação por hora são parâmetros importantes na esterilização por radiação gama.

A avaliação do perfil físico-químico permitiu concluir que a radiação em dose equivalente a 25 kGy não alterou os comprimentos do corpo e da tampa. Isto indica que as cápsulas irradiadas não apresentaram deformações, evidenciando que seguramente poderão ser utilizadas em preparações farmacêuticas sem maiores dificuldades no momento do envase quando comparadas à cápsulas que não foram submetidas à radiação.

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, concluiu-se que o teor de umidade nas cápsulas permaneceu estável após o processo de irradiação, conforme observado no ensaio de umidade e em conclusões preliminares de TGA. A massa das cápsulas irradiadas manteve-se equivalente ao material do grupo controle.

A desintegração de cápsulas vazias indica se o material poderia retardar a liberação de fármacos em testes *in vitro* como em testes de dissolução ou, alterar a biodisponibilidade do medicamento *in vivo*. Conforme resultados obtidos, sabe-se que a irradiação em dose equivalente a 25 kGy não alterou o tempo de desintegração das cápsulas. Ao analisar cápsulas do grupo controle e irradiadas através de microscopia eletrônica de varredura concluiu-se que a estrutura física da cápsula não foi alterada, confirmando resultados do perfil físico-químico do material.

Embora não tenham sido evidenciadas alterações no perfil físico-químico das cápsulas, sabe-se que a gelatina ao ser submetida a irradiação sofre alterações moleculares. Estas alterações foram evidenciadas em análises de espectroscopia vibracional na região do infravermelho, calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria apresentando a formação de reticulação do material.

Por fim, os resultados obtidos até o presente momento indicam a irradiação por raios γ pode ser empregada como etapa final do processo de fabricação de cápsulas gelatinosas duras vazias até 25 kGy, sendo o processo eficiente na eliminação de população microbiana em doses de 15 kGy e 25 kGy. Porém, trata-se de procedimento que influencia a estrutura molecular do material, com indução de ligações cruzadas (reticulação) e por este motivo, pode gerar consequências em formulações de medicamentos. Neste sentido a estabilidade de preparações farmacêuticas durante o desenvolvimento de medicamentos deve considerar se as cápsulas presentes na formulação deverão ser submetidas ao processo de irradiação.

-
- AHMAD, T. et. al. Characterization of gelatin from bovine skin extracted using ultrasound subsequent to bromelain pretreatment. **Food Hydrocolloids**, v. 80, n. 9–10, p. 264–273, jul. 2018.
- ALLAM, K. V.; KUMAR, G. P. Colorants - the cosmetics for the pharmaceutical dosage forms. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. SUPPL. 3, p. 13–21, 2011.
- ALLEN, L. V.; ANSEL, H. C. **Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems**. 10. ed. Baltimore: Wolters Kluwer Health, 2014.
- ANDERSON, N. G. Final Product Form and Impurities. In: **Practical Process Research and Development: A guide for organic chemists**. 2. ed. Jacksonville, Oregon: Elsevier, 2012. p. 365–395.
- AUGSBURGER, L. L. Hard- and Soft-Shell Capsules. In: FLORENCE, A. T.; SIEPMANN, J. (Ed.). **Modern Pharmaceutics**. 5. ed. New York, NY: Informa Healthcare USA, Inc., 2009. p. 499–565.
- BARRETO, P. L. M.; PIRES, A. T. N.; SOLDI, V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. **Polymer Degradation and Stability**, v. 79, n. 1, p. 147–152, jan. 2003.
- BARTH, A. The infrared absorption of amino acid side chains. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 74, n. 3–5, p. 141–173, jan. 2000.
- BASU, T.; TARAFDAR, S. Influence of gamma irradiation on the electrical properties of LiClO₄-gelatin solid polymer electrolytes: Modelling anomalous diffusion through generalized calculus. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 125, p. 180–198, 2016.
- BAZIWANE, D.; HE, Q. Gelatin: The Paramount Food Additive. **Food Reviews International**, v. 19, n. 4, p. 423–435, 11 jan. 2003.
- BERNTSSON, O.; ZACKRISSON, G.; ÖSTLING, G. Determination of moisture in hard gelatin capsules using near-infrared spectroscopy: applications to at-line process control of pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, n. 7, p. 895–900, abr. 1997.
- BHATTACHARJEE, A.; BANSAL, M. Collagen structure: The Madras triple helix and the current scenario. **IUBMB Life**, v. 57, n. 3, p. 161–172, 2005.
- BHUNIA, A. K. **Foodborne microbial pathogens**. New York, NY: Springer New York, 2018.
- BIGI, A. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. **Biomaterials**, v. 25, n. 25, p. 5675–5680, nov. 2004.
- BORRELY, S. I. et al. Radiation processing of sewage and sudge. A review. **Progress in Nuclear Energy**, v. 33, n. 1/2, p. 3–21, 1998.
- BRIGGS, A. The Resistances of Spores of the Genus Bacillus to Phenol, Heat and

- Radiation. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 29, n. 3, p. 490–504, 1966.
- BRODSKY, B.; RAMSHAW, J. A. M. The collagen triple-helix structure. **Matrix Biology**, v. 15, n. 8–9, p. 545–554, 1997.
- BROWN, J. et al. The effect of Cross-Linking on the in vivo disintegration of hard gelatin capsules. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 7, p. 1026–1030, 1998.
- BUICE, R. G. et. al. A. Determination of moisture in intact gelatin capsules by Near-infrared Spectrophotometry. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 1, p. 161–163, 1995.
- CATALDO, F. et al. Radiation-induced crosslinking of collagen gelatin into a stable hydrogel. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 275, n. 1, p. 125–131, 5 jan. 2008.
- CHIANG, P. Commentary: Liquid-filled Formulations. **Journal of Drug**, v. 1, n. 3, p. 7–9, 8 jan. 2018.
- CIPER, M.; BODMEIER, R. Modified conventional hard gelatin capsules as fast disintegrating dosage form in the oral cavity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 62, n. 2, p. 178–184, fev. 2006.
- COLE, E. T.; CADÉ, D.; BENAMEUR, H. Challenges and opportunities in the encapsulation of liquid and semi-solid formulations into capsules for oral administration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 6, p. 747–756, mar. 2008.
- CONSOLE, a D.; RAHN, O. A Study of Gelatin Digestion by Bacillus subtilis. **Journal of bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 47–52, 1938.
- CORREIA, D. M.; PADRÃO, J.; RODRIGUES, L. R.; et al. Thermal and hydrolytic degradation of electrospun fish gelatin membranes. **Polymer Testing**, v. 32, n. 5, p. 995–1000, ago. 2013.
- DARJI, M. A. et al. Excipient Stability in Oral Solid Dosage Forms: A Review. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 1, p. 12–26, 2018.
- DAVIDSON, J. Strategies for improving Capsule Filling Efficiency. **CSC Publishing**, n. January, 2014.
- DE CLERCK, E.; DE VOS, P. Study of the Bacterial Load in a Gelatine Production Process Focussed on Bacillus and Related Endosporeforming Genera. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 611–617, jan. 2002.
- DERRICK, M.; STULIK, D.; LANDRY, J. **Infrared spectroscopy in conservation science**. 1. ed. New York, NY: Institute, The Getty Conservation, 1999.
- DEY, K. et al. Study of the Effect of Gamma Irradiation on the Mechanical Properties of Polyvinyl Alcohol Based Gelatin Blend Film. **OALib**, v. 1, n. 5, p. 1–10, 2014.
- DIEP, T. B. et al. Screening Streptomycin Resistant Mutations from Gamma Ray Irradiated Bacillus subtilis B5 for Selection of Potential Mutants with high Production of Protease. **VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology**, v. 32, n. 1S, p. 170–176, 2017.
- DIGENIS, G. A.; GOLD, T. B.; SHAH, V. P. Cross-Linking of Gelatin Capsules and Its

Relevance to Their in Vitro-in Vivo Performance. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, n. 7, p. 915–921, jul. 1994.

DJABOUROV, M.; LEBLOND, J.; PAPON, P. Gelation of aqueous gelatin solutions. I. Structural investigation. **Journal de Physique**, v. 49, n. 2, p. 319–332, 1988.

DONYA, M.; RADFORD, M.; ELGUINDY, A.; FIRMIN, D.; YACOUB, M. H. Radiation in medicine: Origins, risks and aspirations. **Global cardiology science & practice**, v. 2014, n. 4, p. 437–48, 2014.

DUCONSEILLE, A. et al. Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 360–376, jan. 2015.

EDWARDS, D. Applications of capsule dosing techniques for use in dry powder inhalers. **Therapeutic Delivery**, v. 1, n. 1, p. 195–201, jul. 2010.

ELDIN, M. S. M. et al. Polyacrylamide-grafted gelatin: swellable hydrogel delivery system for agricultural applications. In: HAGHI, A. K.; CARVAJAL-MILLAN, E. (Ed.). **Food composition and Analysis Methods and Strategies**. 1. ed. Toronto, Canada: Apple Academic Press, Inc, 2014. p. 187–212.

EYRE, D. Collagen cross-linking amino acids. **Methods in Enzimology**, v. 144, n. 1968, p. 115–139, 1987.

FAN, H.; DASH, A. K. Effect of cross-linking on the in vitro release kinetics of doxorubicin from gelatin implants. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 213, n. 1–2, p. 103–116, fev. 2001.

FLORY, P. J.; GARRETT, R. R. Phase Transitions in Collagen and Gelatin Systems 1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 18, p. 4836–4845, set. 1958.

FUNG, K. Y.; NG, K. M. Product-centered processing: Pharmaceutical tablets and capsules. **AIChE Journal**, v. 49, n. 5, p. 1193–1215, maio 2003.

GELSE, K. Collagens—structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 12, p. 1531–1546, nov. 2003.

GOSWAIM, T. H.; MAITI, M. M. Biodegradability of gelatin—PF resin blends by soil burial method. **Polymer Degradation and Stability**, v. 61, n. 2, p. 355–359, jan. 1998.

GRAY, V. A.; C. MARQUES, M. R.; COLE, E.; et al. Use of Enzymes in the Dissolution Testing of Gelatin Capsules and Gelatin-Coated Tablets-Revisions to Dissolution <711> and Disintegration and Dissolution of Dietary Supplements <2040>. **Dissolution Technologies**, v. 21, n. 4, p. 6–18, 2014.

HALL, E. J.; GIACCIA, A. J. **Radiobiology for the radiologist**. 7. ed. Philadelphia, USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2012.

HAN, Y.-P.; ZHAO, X.-H. Properties of bovine gelatin cross-linked by a mixture of two oxidases (horseradish peroxidase and glucose oxidase) and glucose. **CyTA - Journal of Food**, v. 6337, n. March, p. 1–8, 3 mar. 2016.

HASANAIN, F. et al. Gamma sterilization of pharmaceuticals - a review of the irradiation of excipients, active pharmaceutical ingredients, and final drug product formulations. **PDA journal of pharmaceutical science and technology**, v. 68, n. 2,

p. 113–137, 2014.

HAVAS, M. When theory and observation collide: Can non-ionizing radiation cause cancer? **Environmental Pollution**, v. 221, p. 501–505, fev. 2017.

HE, L.; MU, C.; SHI, J.; ZHANG, Q.; SHI, B.; LIN, W. Modification of collagen with a natural cross-linker, procyanidin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 2, p. 354–359, mar. 2011.

HERMANTO, S.; SUMARLIN, L. O.; FATIMAH, W. Differentiation of bovine and porcine gelatin based on spectroscopic and electrophoretic analysis. **Journal of Food and Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 3, p. 68–73, 2013.

HILSEN, R. E.; KOURNIKAKIS, B.; FORD, B. Inactivation of Microorganisms by Gamma Irradiation. **Defence Research and Development Canada**, v. 15, n. December, p. 1031–1037, 2005.

HOAG, S. W. Capsules Dosage Form. In: QIU, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, G. G. Z.; YU, L.; MANTRI, R. V. (Ed.). **Developing Solid Oral Dosage Forms**. 2. ed. Baltimore: Elsevier, 2017. p. 723–747.

ISLAM, M. M. et al. Physico-chemical characteristics of gamma-irradiated gelatin. **Progress in Biomaterials**, v. 3, n. 1, p. 21, 2014.

JACOBS, G. P.; WILLS, P. A. Recent developments in the radiation sterilization of pharmaceuticals. **International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part**, v. 31, n. 4–6, p. 685–691, 1988.

JONES, B. E. Hard Capsules. In: AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. (Ed.). **Aulton's Pharmaceutics - The design and Manufacture of Medicines**. 4. ed. Leicester: Elsevier Ltd, 2013. p. 583–596.

KEENAN, T. R. Gelatin. In: **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2003. 12p. 436–448.

KNOLL, G. F. **Radiation detection and measurement**. 4. ed. Michigan, US: John Wiley & Sons, Inc., 2010.

KONTNY, M. J.; MULSKI, C. A. Gelatin capsule brittleness as a function of relative humidity at room temperature. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 54, n. 1, p. 79–85, 1989.

KUENTZ, M. Lipid-based formulations for oral delivery of lipophilic drugs. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 9, n. 2, p. e97–e104, 2012.

KUIJPERS, A. J. et al. Cross-linking and characterisation of gelatin matrices for biomedical applications. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 11, n. 3, p. 225–243, 2 jan. 2000.

LEROY, C.; RANCOITA, P.-G. Electromagnetic Interaction of Radiation in Matter. In: **Principles of Radiation Interaction in Matter and Detection**. 2. ed. London: World Scientific Publishing Co., 2009. p. 31–216.

LUCAS, A. D. et al. Residual ethylene oxide in medical devices and device material. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 66B, n. 2, p. 548–552, ago. 2003.

LUCIA, N. **Irradiation of Gelatin. Important Applications for the Development of**

New Materials. Disponível em:

<<https://www.ipen.br/biblioteca/2011/eventos/17668.pdf>>. Acesso em: 28 abr. 2018.

MALAINEY, M. E. **A consumer's guide to archaeological science**. 1. ed. New York, NY: Springer New York, 2011.

MARIOD, A. A. et al. Preparation and Characterization of Gelatins from Two Sudanese Edible Insects. **Journal of Food Science and Engineering**, v. 1, n. JANUARY, p. 45–55, 2011.

MARIOD, A. A.; ADAM, H. F. REVIEW: GELATIN, SOURCE, EXTRACTION AND INDUSTRIAL APPLICATIONS. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 12, n. 2, p. 135–147, 2013.

MCKENNEY, P. T.; DRIKS, A.; EICHENBERGER, P. The Bacillus subtilis endospore: assembly and functions of the multilayered coat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 33–44, dez. 2012.

MEHTA, K. Radiation: Basic principles. **Journal of Vascular Surgery**, v. 42, n. 6, p. 1237–1238, 2005.

MEYER, M. C. et al. The effect of gelatin cross-linking on the bioequivalence of hard and soft gelatin acetaminophen capsules. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 8, p. 962–966, 2000.

MISSAGHI, S.; FASSIHI, R. Evaluation and Comparison of Physicomechanical Characteristics of Gelatin and Hypromellose Capsules. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 32, n. 7, p. 829–838, 25 jan. 2006.

MOELLER, R. et al. Resistance of Bacillus subtilis Spore DNA to Lethal Ionizing Radiation Damage Relies Primarily on Spore Core Components and DNA Repair, with Minor Effects of Oxygen Radical Detoxification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 104–109, 1 jan. 2014.

MOGILNER, I. G.; RUDERMAN, G.; GRIGERA, J. R. Collagen stability, hydration and native state. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 21, n. 3, p. 209–213, 2002.

MUKHERJEE, I.; ROSOLEN, M. Thermal transitions of gelatin evaluated using DSC sample pans of various seal integrities. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 114, n. 3, p. 1161–1166, 2013.

MURACHANIAN, D. Two-Piece Hard Capsules for Pharmaceutical Formulations. **Journal of GXP Compliance**, v. 14, n. 3, p. 31–42, 2010.

NASREEN, Z.; KHAN, M. A.; MUSTAFA, A. I. Improved Biodegradable Radiation Cured Polymeric Film Prepared from Chitosan-Gelatin Blend. **Journal of Applied Chemistry**, v. 2016, p. 1–11, 2016.

NEWMAN, S. P.; BUSSE, W. W. Evolution of dry powder inhaler design, formulation, and performance. **Respiratory Medicine**, v. 96, n. 5, p. 293–304, 2002.

PARKER, G.; WILSON, C. G.; HARDY, J. G. The effect of capsule size and density on transit through the proximal colon. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 40, n. 5, p. 376–377, maio 1988.

PARKER, M. T. The clinical significance of the presence of micro-organisms in

pharmaceutical and cosmetic preparations. **J Soc Cosmet Chem**, v. 426, p. 415–426, 1972.

PEÑA, C. et al. Enhancing water repellence and mechanical properties of gelatin films by tannin addition. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 17, p. 6836–6842, set. 2010.

PERKASA, D. P. et al. Effect of gamma irradiation on mechanical and thermal properties of fish gelatin film isolated from *Lates calcarifer* scales. **Indonesian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 28–35, 2013.

POLLARD, E. C. Effect of Radiation at the cellular and tissue level. In: JOSEPHSON, E. S.; PETERSON, M. S. (Ed.). **Preservation of Food by Ionizing Radiation**. 1. ed. Massachusetts: CRC Press, 2018. p. 219–235.

POSTMES, T.; VAN DEN BOGAARD, A. E.; HAZEN, M. The sterilization of honey with cobalt 60 gamma radiation: a study of honey spiked with spores of *Clostridium botulinum* and *Bacillus subtilis*. **Experientia**, v. 51, n. 9–10, p. 986–989, set. 1995.

RABOTYAGOVA, O. S.; CEBE, P.; KAPLAN, D. L. Collagen structural hierarchy and susceptibility to degradation by ultraviolet radiation. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, n. 8, p. 1420–1429, 2008.

RAHMAN, M. M.; PERVEZ, S.; NESA, B.; KHAN, M. A. Preparation and characterization of porous scaffold composite films by blending chitosan and gelatin solutions for skin tissue engineering. **Polymer International**, v. 62, n. 1, p. 79–86, 2013.

RASO, J. et al. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by combining ultrasonic waves under pressure and mild heat treatment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, n. 5, p. 849–854, 1998.

REID, B. D. Gamma processing technology: an alternative technology for terminal sterilization of parenterals. **PDA J Pharm Sci Technol**, v. 49, n. 2, p. 83–89, 1995.

REID, B. D.; FAIRAND, B. P. Gamma Radiation Sterilization of Pharmaceuticals. In: NORDHAUSER, F. M.; OLSON, W. P. (Ed.). **Sterilization of Drugs and Devices: Technologies for the 21st Century**. 1. ed. New York: CRC Press, 1998. p. 311–392.

RELA, P. R. et al. **Desenvolvimento e implantação de um irradiador multipropósito de Cobalto-60 tipo compacto**. Disponível em: <<https://www.ipen.br/biblioteca/2002/inac/08865.PDF>>. Acesso em: 2 jun. 2018.

RICARD-BLUM, S.; RUGGIERO, F.; VAN DER REST, M. The collagen superfamily. **Topics in Current Chemistry**, v. 247, p. 35–84, 2005.

RICHARDSON, M. Impact of capsule selection on formulation stability in dry powder inhalers (DPIs) An examination of differences between gelatin and HPMC capsules and their respective formulations. **Inhalation Magazine**, p. 1–5, 2011.

RUDNIC, E. R.; SCHWARTZ, J. B. Oral Solid Dosage Forms. In: FELTON, L. A. (Ed.). **Remington: The Science And Practice Of Pharmacy**. 22. ed. London: Pharmaceutical Press, 2006. p. 2393.

RUSCHENA, L. J.; RALPH, M. I. **Physical hazards : non-ionising radiation**. 1. ed.

Tullamarine: Safety Institute of Australia Ltd, 2012.

SANDLE, T. Gamma radiation. In: **Sterility, Sterilisation and Sterility Assurance for Pharmaceuticals**. 1. ed. Philadelphia: Elsevier, 2013. p. 55–68.

SANTOS, J. P. et al. Crosslinking agents effect on gelatins from carp and tilapia skins and in their biopolymeric films. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 539, p. 184–191, fev. 2018.

SANTOS, P. S.; VASQUEZ, P. A. S. Two-Faces Stationary Irradiation Method and Dosimetric Considerations for Radiation Processing at the Multipurpose Gamma Irradiation Facility/ IPEN-CNEN. In: International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2015, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Associação Brasileira de Energia Nuclear - ABEN, 2015.

SCHRIEBER, R.; GAREIS, H. **Gelatine handbook**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007.

SHARMA, A.; AGARWAL, S.; RAJPUT, S.; MEHTA, R. S. Occurrence of enterobacteria and Clostridium during gelatin manufacture. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 62, n. 5, p. 468–472, 2003.

SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T. Collagen Structure and Stability. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, n. 1, p. 929–958, jun. 2009.

SINTZEL, M. B. et al. Influence of Irradiation Sterilization on Polymers Used as Drug Carriers—A Review. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 23, n. 9, p. 857–878, 1997.

SLADE, L.; LEVINE, H. Polymer-chemical properties of gelatin in foods. In: PEARSON, A. M.; DUTSON, T. R.; BAILEY, A. J. (Ed.). **Advances in meat research**. 1. ed. New york: An Avi Book, 1987. p. 251–266.

SMART, R.; SPOONER, D. F. Microbiological spoilage in pharmaceuticals and cosmetics. **J. Soc. Cosmet. Chem. Society of Cosmetic Chemists of Great Britain**, v. 23, p. 721–737, 1972.

SPADARO, G.; ALESSI, S.; DISPENZA, C. Ionizing Radiation-Induced Crosslinking and Degradation of Polymers. In: SUN, Y.; CHMIELEWSKI, A. G.; BEREJKA, A.; GODLEWSKA-PARA, E. (Ed.). **Applications of ionizing radiation in materials processing**. 1. ed. Warszawa: Institute of Nuclear Chemistry and Technology, 2017. p. 167–182.

STEGEMANN, S. et al. Application of QbD Principles for the Evaluation of Empty Hard Capsules as an Input Parameter in Formulation Development and Manufacturing. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 3, p. 542–549, 14 jun. 2014.

SWALLOW, A. J. Preservation of Food by Ionizing Radiation. **International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine**, v. 46, n. 1, p. 97–97, 3 jan. 1984.

SYAFIQA, N.; KAMARUDIN, B. Comparative Study of Bio-Cellulose from Acetobacter Xylinum 0416 and Commercial Hard Gelatine Capsule. **International Journal of Applied Engineering Research**, v. 13, n. 1, p. 743–748, 2018.

TENGROTH, C. et al. Cross-Linking of Gelatin Capsules with Formaldehyde and

Other Aldehydes: An FTIR Spectroscopy Study. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 10, n. 3, p. 405–412, 1 ago. 2005.

TOMŠOVÁ, K.; ĎUROVIČ, M.; DRÁBKOVÁ, K. The effect of disinfection methods on the stability of photographic gelatin. **Polymer Degradation and Stability**, v. 129, p. 1–6, 2016.

TSOULFANIDIS, N.; LANDSBERGER, S. **Measurement & detection of radiation**. 4. ed. Boca Raton: CRC Press, 2015.

UNITED STATES, P. C. **Disintegration United States Pharmacopeia**. Baltimore: United Book Press, 2016. .

VARETTAS, K. The visual assessment of broth cultures for tissue bank samples. **Cell and Tissue Banking**, v. 18, n. 3, p. 343–345, 5 set. 2017.

VEENING, J.; MURRAY, H.; ERRINGTON, J. A mechanism for cell cycle regulation of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. **Genes & Development**, v. 23, n. 16, p. 1959–1970, ago. 2009.

VERGNE, D. M. C. et al. Collagen modification by Maillard reaction. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 131, n. 1, p. 671–679, 2018.

VIDYASAGAR, P. B.; JAGTAP, S. S.; YEMUL, O. **Radiation in medicine and biology**. 1. ed. Singapore: Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., 2017.

VIEIRA, S. Estatística para a qualidade - como avaliar a qualidade em produtos e serviços. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1999.

VIJAYAKUMAR, V.; SUBRAMANIAN, K. Diisocyanate mediated polyether modified gelatin drug carrier for controlled release. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 22, n. 1, p. 43–51, jan. 2014.

WANG, X.; AO, Q.; TIAN, X.; FAN, J.; TONG, H.; HOU, W.; BAI, S. Gelatin-Based Hydrogels for Organ 3D Bioprinting. **Polymers**, v. 9, n. 9, p. 401, ago. 2017.

WEIGERT, G. G.; INEU, A. P.; GOMES, P. Evaluation of hard gelatin capsules and hydroxypropyl methylcellulose containing ampicillin. **Química Nova**, v. 35, n. 2, p. 286–290, 2012.

WILSKI, H. The Radiation Induced Degradation of Polymers. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 29, n. 1, p. 1, 1987.

YAKIMETS, I. et al. Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state. **Polymer**, v. 46, n. 26, p. 12577–12585, 2005.

YAMAUCHI, M.; SHIIBA, M. Lysine Hydroxylation and Cross-linking of Collagen. In: **Post-translational Modifications of Proteins**. Totowa, NJ: Humana Press, 2008. 446p. 95–108.

YANNAS, I. V. Collagen and Gelatin in the Solid State. **Journal of Macromolecular Science, Part C**, v. 7, n. 1, p. 49–106, 5 jan. 1972.

YOSHIMURA, E. M. Física das Radiações : interação da radiação com a matéria. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 3, n. 1, p. 57–67, 2009.