

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MACROMOLÉCULAS PROFESSORA ELOISA MANO – IMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
POLÍMEROS

RENATA CERRUTI DA COSTA

**ESTUDO DA IRRADIAÇÃO GAMA SOBRE MICROESFERAS DE
POLI(SUCCINATO DE BUTILENO) - PBS**

Rio de Janeiro

2017

RENATA CERRUTI DA COSTA

**ESTUDO DA IRRADIAÇÃO GAMA SOBRE MICROESFERAS DE
POLI(SUCCINATO DE BUTILENO) - PBS**

Dissertação em Ciência e Tecnologia de Polímeros, submetida ao Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências, em Ciência e Tecnologia de Polímeros.

Orientadores: Prof. Fernando Gomes de Souza Jr.

Coorientadora: Dsc. Emiliane Daher Pereira

Rio de Janeiro

2017

CIP - Catalogação na Publicação

C837e Costa, Renata Cerruti da
ESTUDO DA IRRADIAÇÃO GAMA SOBRE MICROESFERAS DE
POLI(SUCCINATO DE BUTILENO) - PBS / Renata Cerruti
da Costa. -- Rio de Janeiro, 2017.
121 f.

Orientador: Fernando Gomes de Souza Junior.

Coorientadora: Emiliane Daher Pereira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Instituto de Macromoléculas
Professora Eloisa Mano, Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Polímeros, 2017.

1. Poli(succinato de butileno) - PBS. 2. liberação
controlada de fármacos. 3. micropartículas . 4.
esterilização. 5. irradiação gama. I. Junior,
Fernando Gomes de Souza, orient. II. Pereira,
Emiliane Daher, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

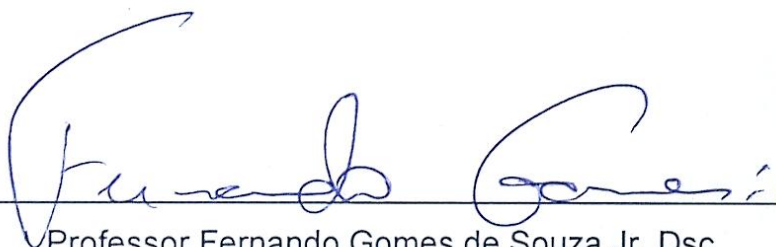
RENATA CERRUTI DA COSTA

**ESTUDO DA IRRADIAÇÃO GAMA SOBRE MICROESFERAS DE
POLI(SUCCINATO DE BUTILENO) - PBS**

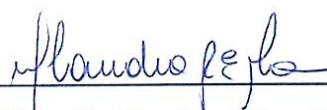
Dissertação em Ciência e Tecnologia de Polímeros, submetida ao Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências, em Ciência e Tecnologia de Polímeros.

Aprovada em: 10 de julho de 2017

BANCA EXAMINADORA



Professor Fernando Gomes de Souza Jr, Dsc
Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano – IMA/UFRJ
Orientador/Presidente da Banca Examinadora



Professora Claudia Regina Elias Mansur, Dsc
Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano – IMA/UFRJ



Professora Vivian María Saez Martínez, Dsc
Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano – IMA/UFRJ



Professor Edgar Francisco Oliveira de Jesus, Dsc
Programa de Engenharia Nuclear - COPPE/UFRJ

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq, CAPES e FAPERJ pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

Agradeço aos meus pais por sempre confiarem nas minhas decisões, por mais que possam parecer loucas e sonhadoras. Agradeço à minha mãe por me ouvir em todos os momentos difíceis durante essa grande etapa.

Ao corpo docente do Instituto de Macromoléculas (IMA) que participaram da minha aprendizagem e do meu desenvolvimento profissional. Agradeço também aos funcionários, sr. André e sr. Geraldo que sempre me ajudaram diante de muitas dificuldades técnicas. Além disso, ao sr. Wilson por ser um divertido observador e amigo.

Agradeço especialmente ao meu orientador Fernando Gomes por toda a paciência e otimismo nos momentos mais difíceis. Agradeço por todo o ensinamento e confiança ao longo de tantos anos de orientação. Agradeço também à minha orientadora Emiliane Daher pela grande amizade, pelo apoio e por embarcar comigo nessa longa dissertação.

Aos meus companheiros do IMA, aos meus amigos de turma, e especialmente aos amigos do LaBioS pela descontraída convivência no laboratório. Agradeço ao Bruno, Letícia, Emiliane, Lucas, Raphael, Edson, Nathali, Macarena, Aline, Fernanda Marques e Willian por tantos anos de amizade. Em especial ao Luis Peña pela fundamental ajuda com as análises na Farmácia.

A todos os meus grandes amigos de vida, por sempre estarem presentes na minha rotina e pelo apoio emocional. E por fim, mas principalmente, às duas grandes parceiras de pesquisa Priscilla Bedor e Luiza Sancier. A amizade de vocês foi de grande importância para o desenvolvimento deste trabalho. Tive diversos conflitos pessoais e vocês, prontamente, se colocaram ao meu lado. Agradeço por toda a ajuda com análises, os conselhos e também pelas boas risadas.

RESUMO

A esterilização de materiais injetáveis através da técnica de irradiação- γ é frequentemente usada para fins biomédicos. Entretanto, a irradiação em matrizes poliméricas usadas como sistemas carreadores de fármacos pode afetar diretamente as propriedades dos materiais. Neste estudo, foi avaliada a influência da radiação gama nas propriedades físico-químicas de duas formulações de microesferas de Poli(succinato de butileno) - PBS. Além disso, de modo a estudar o efeito da irradiação na cinética de liberação, foram usados dois ativos modelos, um com características lipofílicas (Meloxicam) e outro solúvel em água (Fosfoetanolamina). Os ativos foram encapsulados em microesferas de PBS pela técnica de emulsão simples/evaporação de solvente. As microesferas foram irradiadas a uma dose de 25 kGy e extrapoladas a doses de 50kGy e 100kGy, avaliando por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e cromatografia de permeação em gel (GPC) as características desses materiais. Nenhuma diferença foi notada no tamanho e morfologia das microesferas antes e depois da irradiação. Entretanto, a massa molar numérica média (M_n) dos materiais aumentou com o aumento da dose de radiação. Quanto ao estudo de liberação, o encapsulamento de fármacos lipofílicos por emulsão simples foi maior. No entanto, ambos os sistemas foram capazes de sustentar a liberação dos fármacos. A irradiação das micropartículas afetou a liberação dos fármacos no ensaio de dissolução *in vitro*. Com o aumento da irradiação e conseqüente aumento da fração gel dos materiais, menor foi a taxa de liberação de fármaco. A partir desses resultados, pode-se concluir que o processo de esterilização- γ causou mudanças nas propriedades das microesferas vazias e carregadas com Fosfoetanolamina e Meloxicam.

Palavras-chave: Poli(succinato de butileno) – PBS, liberação controlada de fármacos, micropartículas, esterilização, irradiação gama.

ABSTRACT

Sterilization of injectable materials by the γ -irradiation technique is often used for biomedical purposes. However, irradiation in polymer matrices used the drug carrier systems can directly affect the properties of the materials. In this study, the influence of gamma radiation on the physical-chemical properties of two formulations of Poly (Butylene Succinate) - PBS microspheres was evaluated. In addition, in order to study the effect of irradiation on release kinetics, two active models were used, one with lipophilic characteristics and the other water soluble. The actives were encapsulated in PBS microspheres by the simple emulsion/solvent evaporation technique. The microspheres were irradiated at a dose of 25 kGy and extrapolated at 50 kGy and 100 kGy doses, evaluating the characteristics of these materials by scanning electron microscopy (SEM) and gel permeation chromatography (GPC). No difference was noted in the size and morphology of the microspheres before and after irradiation. However, the number average molecular mass (M_n) of the materials increased with increasing irradiation dose. As for the release study, the encapsulation of lipophilic drugs by simple emulsion was greater. However, both systems were able to sustain drug release. Irradiation of the microparticles affected drug release in vitro. With the increase of irradiation and consequent increase of the gel fraction of the materials, the lower rate of drug release. From these results, it can be concluded that the γ sterilization process causes changes in the properties of the empty microspheres and loaded with Phosphoethanolamine and Meloxicam.

Keywords: Poly (butylene succinate) - PBS, controlled release of drugs, microparticles, sterilization, gamma irradiation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Comparação entre o sistema convencional multidose e sistema de liberação controlada (A) e esquema ilustrativo do modo de liberação em sistemas de cinética sustentada (B).....	22
Figura 2: Esquema da síntese de PBS	24
Figura 3: Estrutura genérica de uma micropartícula contendo diferentes componentes para melhorar a eficácia de entrega do fármaco.....	26
Figura 4: Preparação de microesferas a partir de emulsões simples e dupla emulsão.....	29
Figura 5: Micrografia SEM de microcapsulas de PBS/PCL preparadas com diferentes proporções de PCL (a) 5%, (b) 10%, (c) 15% e (d) 20%.	30
Figura 6: Esquema de alterações na cadeia de polímero após irradiação.....	35
Figura 7: Estrutura química dos ativos modelos usados neste trabalho:	38
Figura 8: Esquematização do sistema proposto para a síntese do PBS.....	42
Figura 9: Esquema ilustrativo para a preparação de microesferas de PBS contendo fosfoetanolamina/meloxicam por emulsão simples.	44
Figura 10: Esquema ilustrativo das amostras preparadas	45
Figura 11: Reação de obtenção do derivado fluorescente da Fosfoetanolamina.	51
Figura 12: Espectro FTIR do PBS sintetizado	52
Figura 13: Difratoograma do PBS	53
Figura 14: Termograma do PBS contendo as informações de perda de massa (linha contínua), derivada da perda de massa (linha pontilhada) e fluxo de calor (linha tracejada).....	54
Figura 15: Verificação da Tg no termograma obtido para o PBS	55
Figura 16: Espectro FTIR das microesferas preparadas a partir do PBS, variando o solvente orgânico. Em (a) clorofórmio e em (b) diclorometano.	58
Figura 17: Análise comparativa das transmitâncias das microesferas usando clorofórmio (a) não irradiadas e não irradiada, (b) não irradiada e 25kGy, (c) não irradiada e 50kGy e (d) não irradiadas e 100kGy.....	59
Figura 18: Análise comparativa dos espectros de FTIR das microesferas usando diclorometano. (a) não irradiadas e não irradiada, (b) não irradiada e 25kGy, (c) não irradiada e 50kGy e (d) não irradiadas e 100kGy	60

Figura 19: Padrões de difração de raios-x para as microesferas após irradiação preparadas com clorofórmio (a) e diclorometano (b).....	61
Figura 20: Termograma das microesferas de clorofórmio não irradiadas e irradiadas à 25kGy, 50kGy e 100kGy.....	62
Figura 21: Curva DSC das microesferas de clorofórmio não irradiadas e irradiadas à 25kGy, 50kGy e 100kGy.....	62
Figura 22: Termograma das microesferas de diclorometano não irradiadas e irradiadas à 25kGy, 50kGy e 100kGy.....	63
Figura 23: Curva DSC das microesferas de diclorometano não irradiadas e irradiadas à 25kGy, 50kGy e 100kGy.....	63
Figura 24: Influência do solvente e liofilização sobre o tamanho das partículas	66
Figura 25: Efeito da dose de radiação- γ na fração de gel de PBS puro e microesferas de PBS irradiadas a 25kGy, 50kGy e 100kGy	67
Figura 26: Alterações na fração gel do polímero (linha contínua) e na massa molar numérica média (Mn - linha tracejada) em função da dose de radiação.69	
Figura 27: Microscopia das microesferas de PBS preparadas com diclorometano sem irradiação.	70
Figura 28: Microscopia das esferas de PBS preparadas com diclorometano (A) irradiada à 25kGy, (B) irradiada à 50kGy e (C) irradiada à 100kGy	71
Figura 29: Microscopia das microesferas de PBS preparadas com clorofórmio, antes da irradiação.....	72
Figura 30: Microscopia de microesferas de PBSC nas condições: (A) irradiada à 25kGy, (B) irradiada à 50kGy e (C) irradiada à 100kGy	73
Figura 31: Projeção das variáveis no plano do fator (1 x 2)	78
Figura 32: Espectro FTIR-ATR da Fosfoetanolamina	81
Figura 33: Espectro FTIR-ATR para as microesferas contendo fosfoetanolamina, preparadas com clorofórmio e irradiadas a diferentes doses.	81
Figura 34: Espectro FTIR-ATR para as microesferas contendo fosfoetanolamina, preparadas com diclorometano e irradiadas a diferentes doses.....	82
Figura 35: FTIR-ATR do Meloxicam.....	83

Figura 36: Espectro FTIR-ATR para as microesferas em clorofórmio contendo meloxicam e irradiadas a diferentes doses.	84
Figura 37: Espectro FTIR-ATR para as microesferas em diclorometano contendo meloxicam e irradiadas a diferentes doses.....	84
Figura 38: Comparação entre as transmitâncias das microesferas puras.....	85
Figura 39: Comparação entre as transmitâncias das microesferas puras (PBSD - eixo das abscissas) e as microesferas contendo Meloxicam (eixo das ordenadas): (A) PBSD M, (B) PBSD M25, (C) PBSD M50 e (D) PBSD 100	85
Figura 40: Termograma (linha contínua) e curva calorimétrica (linha pontilhada) para a Fosfoetanolamina.....	86
Figura 41: Termograma (linha contínua) e curva calorimétrica (linha pontilhada) para o Meloxicam	87
Figura 42: Placas testadas para crescimento microbiano nas microesferas de PBSC contendo Fosfoetanolamina, no início do teste (A) e após 48h de incubação (B).	89
Figura 43: Placas testadas para crescimento microbiano nas microesferas de PBSD contendo Fosfoetanolamina, no início do teste (A) e após 48h de incubação (B).	90
Figura 44: Crescimento microbiano nas microesferas de PBSC contendo Meloxicam, no início do teste (A) e após 48h de incubação (B).....	90
Figura 45: Crescimento microbiano nas microesferas de PBSD contendo Meloxicam, no início do teste (A) e após 48h de incubação (B).....	91
Figura 46: Curva analítica para a Fosfoetanolamina.....	91
Figura 47: Espectro de UV do Meloxicam	92
Figura 48: Curva analítica para o Meloxicam	92
Figura 49: Teste de liberação para as esferas em clorofórmio (A) e em diclorometano (B).....	93
Figura 50: Teste de dissolução para as microesferas preparadas com clorofórmio (A) e diclorometano (B).....	94
Figura 51: Projeção das variáveis nos fatores 1x2 (Método biplot)	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados térmicos obtidos da curva de DSC	54
Tabela 2: Resultados obtidos na análise de SEC	56
Tabela 3: Percentual de rendimento para as microesferas vazias	56
Tabela 4: Relação entre os espectros de FTIR do polímero à 0kGy e irradiados a diferentes doses	60
Tabela 5: Efeito da irradiação sobre o comportamento térmico das microesferas	64
Tabela 6: Efeito da etapa de secagem e do tipo de solvente no tamanho médio das microesferas preparadas	65
Tabela 7: Efeito da irradiação- γ sobre o tamanho médio das microesferas	66
Tabela 8: Resultados de massa molar e polidispersão das amostras de PBS	68
Tabela 9: Tabela de correlações gerada no Statística. As correlações que apresentam significância estatística apresentam $p < 0.05$	76
Tabela 10: Tabela de autovalores	77
Tabela 11: Tabela de autovetores	78
Tabela 12: Percentual em massa das microesferas carregadas com ativos modelos	80
Tabela 13: Eficiência de encapsulamento para as microesferas de PBS	80
Tabela 14: Erro quadrático médio (RMSE) dos sistemas contendo Fosfoetanolamina	82
Tabela 15: Erro médio quadrático para as microesferas contendo Meloxicam	86
Tabela 16: Resultados térmicos para as microesferas contendo Fosfoetanolamina	87
Tabela 17: Dados térmicos para as microesferas contendo Meloxicam	88
Tabela 18: Teor de gel para as microesferas contendo Fosfoetanolamina	88
Tabela 19: Medição do teor de gel para as microesferas contendo Meloxicam	88
Tabela 20: Tabela de correlação para o estudo de liberação	95
Tabela 21: Tabela de autovalores	96
Tabela 22: Tabela de autovetores	96

LISTA DE ABREVIATURAS

ATR – Reflectância total atenuada

FDA – Food and Drug Administration

FTIR – Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier

PBS – Poli(succinato de butileno)

TG/DSC - Termogravimetria/Calorimetria diferencial de varredura

PBSC - Esferas de PBS preparadas com clorofórmio

PBSC 25 - Esferas de PBS irradiadas a dose de 25 kGy

PBSC 50 - Esferas de PBS irradiadas a dose de 50 kGy

PBSC 100 - Esferas de PBS irradiadas a dose de 100 kGy

PBSD - Esferas de PBS preparadas com diclorometano

PBSD 25 - Esferas de PBS irradiadas a dose de 25 kGy

PBSD 50 - Esferas de PBS irradiadas a dose de 50 kGy

PBSD 100 - Esferas de PBS irradiadas a dose de 100 kGy

PBSC F - Esferas contendo Fosfoetanolamina preparadas com clorofórmio

PBSD F - Esferas contendo Fosfoetanolamina preparadas com diclorometano

PBSC M - Esferas contendo Meloxicam preparadas com clorofórmio

PBSD M - Esferas contendo Meloxicam preparadas com diclorometano

SEC – Cromatografia de exclusão por tamanho

SEM – Microscopia eletrônica de varredura

TGA – Análise termogravimétrica

USP – Farmacopéia Americana

UV- Vis – Ultravioleta visível

XRD – Difração de raios x

LISTA DE SIMBOLOS

M – Molar

h – Hora

rpm – Rotações por minuto

°C – Temperatura (Celsius)

Å – Angstrom

λ – Comprimento de onda

m/m – Massa a massa

v/v – Volume a volume

θ – Ângulo

D – Dalton

kGy - Kilogray

T_m - Temperatura de fusão cristalina

ΔH_f - Entalpia de fusão

ΔH_d - Entalpia de degradação

T_d - Temperatura de degradação

X_c - Grau de cristalinidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
2.3	ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1	LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS	21
3.1.1	Poliésteres aplicáveis à liberação controlada	23
3.1.2	Poli(succinato de butileno) (PBS)	23
3.2	MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	25
3.2.1	Parâmetros para o preparo de microesferas poliméricas	26
3.2.2	Emulsificação	27
3.2.3	Otimização dos parâmetros de emulsificação	29
3.3	ESTERILIZAÇÃO EM SISTEMAS BIOMÉDICOS	31
3.3.1	Técnicas de esterilização	32
3.3.2	Efeitos da irradiação-γ em sistemas poliméricos	33
3.3.3	Efeitos da irradiação-γ em sistemas microparticulados	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	MATERIAIS	40
4.1.1	Síntese dos polímeros	40
4.1.2	Síntese das microesferas	40
4.2	LISTA DOS EQUIPAMENTOS	40
4.3	METODOLOGIA	41
4.3.1	Síntese do Poli(succinato de butileno) - PBS	42
4.3.2	Síntese das micropartículas poliméricas de PBS	43
4.3.3	Preparo das microesferas de PBS carregadas com dois ativos modelos	43
4.3.4	Irradiação gama das microesferas sintetizadas	45
4.3.5	Caracterização dos materiais	45
4.3.5.1	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier - com refletância total atenuada (FTIR-ATR)	46
4.3.5.2	Difração de raios X	46
4.3.5.3	Análise Termogravimétrica e Calorimetria diferencial de varredura	46

4.3.5.4	Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	47
4.3.5.5	Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC)	47
4.3.5.6	Medição de fração gel	47
4.3.5.7	Espalhamento de luz (Mastersizer)	48
4.3.5.8	Microscopia eletrônica de varredura (SEM)	48
4.3.5.9	Análise estatística	48
4.3.5.10	Percentual de rendimento	49
4.3.5.11	Determinação do teor de ativo nas microesferas	49
4.3.5.12	Teste de crescimento microbiano	50
4.3.5.13	Espectrometria para quantificação da Fosfoetanolamina e Meloxicam	50
4.3.6	Estudo <i>in vitro</i> da liberação controlada dos ativos	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO POLI(SUCCINATO DE BUTILENO) - PBS52	
5.1.1	Espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR)	52
5.1.2	Difração de raios X (XRD)	53
5.1.3	Análise termogravimétrica e fluxo de calor simultâneo	53
5.1.4	Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	55
5.1.5	Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC)	56
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS DE PBS PREPARADAS	56
5.2.1	Percentual de rendimento	56
5.2.2	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com reflectancia total atenuada	57
5.2.3	Difração de raios X (XRD)	60
5.2.4	Análise Termogravimétrica e Fluxo de Calor simultâneo	61
5.2.5	Espalhamento de luz (Mastersizer)	65
5.2.6	Medição de fração gel	67
5.2.7	Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC)	68
5.2.8	Microscopia eletrônica de varredura (SEM)	69
5.2.9	Análise estatística e correlação dos resultados anteriores	74
5.3	CARACTERIZAÇÕES DAS MICROESFERAS CARREGADAS COM FOSFOETANOLAMINA E MELOXICAN	79
5.3.1	Percentual de rendimento	79

5.3.2	Eficiência de encapsulamento (EE)	80
5.3.3	Espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR)	80
5.3.4	Análise Termogravimétrica e Fluxo de Calor simultâneo	86
5.3.5	Medição de fração gel	88
5.3.6	Teste de crescimento microbiano	89
5.3.7	Espectrometria	91
5.4	ESTUDO DE DISSOLUÇÃO	93
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
7	SUGESTÕES	98
	REFERÊNCIAS	99
	ANEXO A: TABELA DE ENTRADA PARA AS CORRELAÇÕES DAS MICROESFERAS VAZIAS	121
	ANEXO B: TABELA DE ENTRADA PARA AS CORRELAÇÕES DO ESTUDO DE LIBERAÇÃO	122

1 INTRODUÇÃO

Os poliésteres alifáticos baseados em ácidos lácticos e glicólicos são frequentemente utilizados em estudos de liberação controlada de fármacos, entretanto, o uso do poli(succinato de butileno) – PBS em aplicações biomédicas tem emergido em diversos trabalhos de aplicações biomédicas, por ser biodegradável, biocompatível e apresentar características de boa processabilidade (BRUNNER *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2015; NUGROHO *et al.*, 2001).

Em especial, esses sistemas podem ser amplamente usados para o preparo de microesferas biodegradáveis destinadas à utilização parentérica. Microesferas destinadas à administração parenteral, que tem contato direto com fluidos corporais, tem de satisfazer os requisitos da farmacopeia quanto à esterilidade (DAI *et al.*, 2016). Entretanto, alguns métodos de esterilização propostos para materiais não são adequados para poliésteres alifáticos biodegradáveis, como a esterilização química com óxido de etileno, que provoca graves problemas toxicológicos, devido a resíduos do agente de esterilização.

Por sua vez, a esterilização por irradiação é uma das técnicas mais frequentemente usadas em dispositivos médicos termolábeis, podendo ser aplicada com sucesso em polímeros biodegradáveis e substâncias farmacologicamente ativas (IGARTUA *et al.*, 2008; MONTANARI *et al.*, 2001). Nesse método, uma dose mínima de 25 kGy é considerada como adequada para esterilização de produtos farmacêuticos. No entanto, durante o processo de irradiação- γ , a oxidação do polímero pode induzir, concomitantemente, à ligação cruzada e/ou à cisão da cadeia destes polímeros.

Os efeitos da irradiação- γ em sistemas microparticulados podem influenciar em diversas características importantes para a confecção desses sistemas, podendo alterar a morfologia das esferas, a homogeneidade do tamanho das partículas, a massa molar dos carreadores poliméricos e, conseqüentemente, afetar a cinética de liberação do fármaco.

Além disso, os perfis de liberação também são influenciados pela carga do fármaco e não são facilmente previsíveis devido às diferentes

características físico-químicas do ingrediente ativo e às suas interações com a matriz polimérica (VOLLAND; WOLFF; KISSEL, 1994; YOSHIOKA *et al.*, 1995).

Neste trabalho, foram avaliados os efeitos da radiação gama, em diferentes dosagens, sobre a estabilidade das microesferas de PBS, visando a compreensão dessa técnica na morfologia, massa molar do polímero e cinética de liberação. Tendo em vista que além da radiação ionizante, a influência da carga do fármaco sobre a degradação do polímero também pode ser discutida, foi proposta a utilização de dois ativos modelos com características distintas, a fim de verificar a cinética de liberação de microesferas de PBS.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a influência da irradiação gama nas características dimensionais e morfológicas das micropartículas de PBS. Além disso, também foi proposta a análise da irradiação sobre a cinética de liberação de dois ativos modelos em estudos “in vitro”.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese do polímero PBS, visando a aplicação na liberação controlada de ativos;
- Síntese de microesferas de PBS, avaliando o efeito de algumas variáveis de processamento nas características morfológicas das micropartículas;
- Irradiar as microesferas preparadas e avaliar os efeitos da radiação ionizante sobre a estrutura macromolecular do PBS e as consequentes influências na massa molar e tamanho das partículas;
- Carregar as microesferas com ativos de características diferentes (hidrofílico e lipofílico) visando estudar a alteração na cinética de liberação após a irradiação destes sistemas.

2.3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Esta Dissertação encontra-se distribuída em sete capítulos descritos abaixo:

O Capítulo 1 apresenta, resumidamente, uma introdução ao tema proposto ao longo da Dissertação. No Capítulo 2 encontram-se os objetivos que levaram ao desenvolvimento desta pesquisa, assim como um detalhamento para a construção do mesmo.

O Capítulo 3 apresenta uma revisão bibliográfica sobre os principais pontos do estudo de síntese de micropartículas poliméricas, bem como as técnicas de esterilização destes materiais para aplicações biomédicas e consequentes alterações estruturais das micropartículas.

O Capítulo 4 descreve os materiais utilizados no trabalho, a metodologia de preparo do polímero e microesferas e suas caracterizações. Posteriormente, no Capítulo 5, são apresentados e discutidos os resultados obtidos da síntese e irradiação dos materiais.

O Capítulo 6 e Capítulo 7 fecham esse trabalho com a apresentação das principais conclusões obtidas no trabalho e as sugestões pertinentes à melhoria do trabalho proposto, respectivamente.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

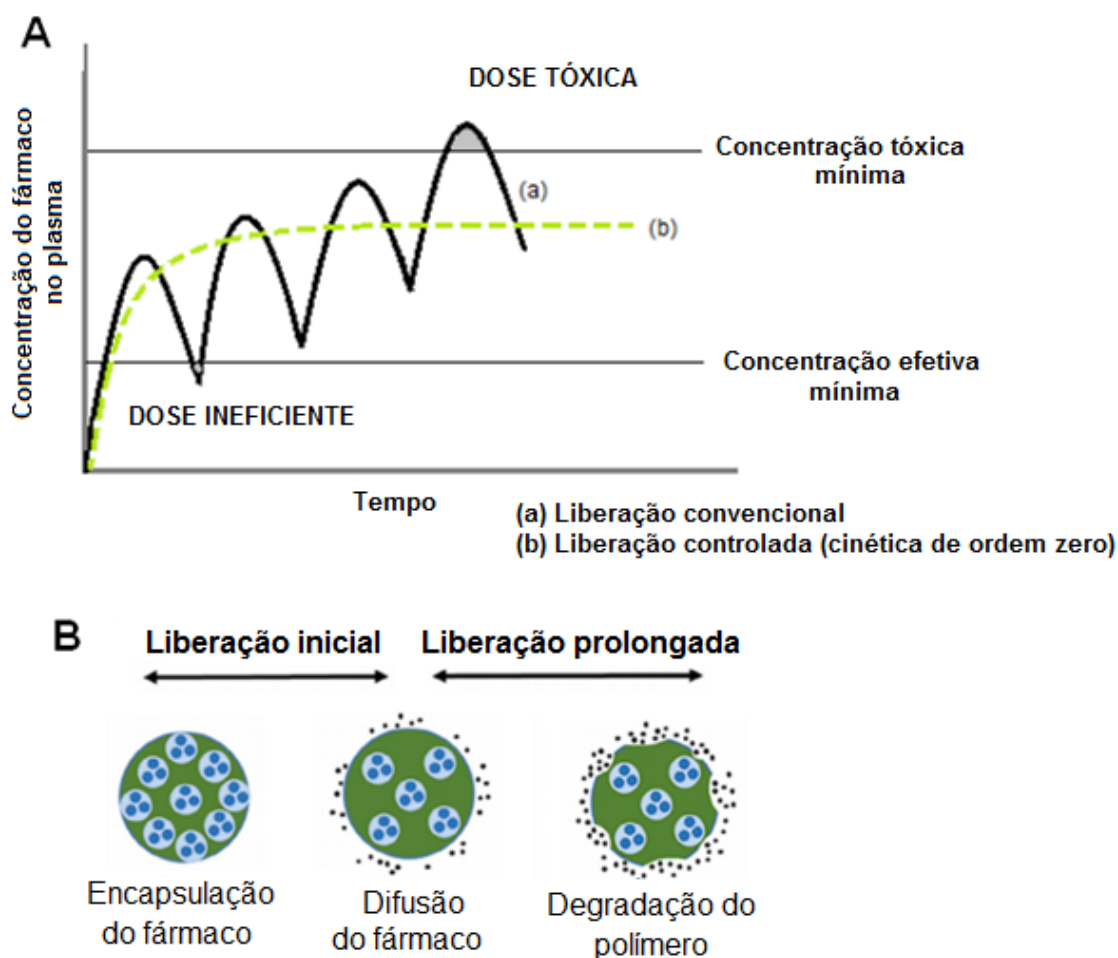
O desenvolvimento de medicamentos que garantam melhor eficácia na entrega do fármaco e redução dos efeitos adversos resulta em grande número de estudos em sistemas de liberação controlada de fármacos, onde um fármaco é ancorado dentro de um transportador polimérico adequado. A seleção adequada de transportadores biocompatíveis e biodegradáveis permite que estes ativos sejam entregues através de novas vias ou de forma sustentada, garantindo controle espacial e/ou cinético desses sistemas (LYONS; BLACKIE; HIGGINBOTHAM, 2008).

O objetivo dos sistemas de liberação controlada é manter a cinética de liberação do fármaco constante, com as seguintes vantagens em relação à via de administração tradicional:

- (i) maior concentração do fármaco no alvo (KANJICKAL; LOPINA, 2004);
- (ii) a proteção de fármacos até o destino de interesse, aumentando assim a possibilidade de uso de medicamentos que possuem uma meia-vida curta no organismo (ELSABAHY; WOOLEY, 2012; ROGOBETE *et al.*, 2016);
- (iii) farmacocinética melhorada na liberação do fármaco, mantendo a concentração do ativo dentro da janela terapêutica (WANG *et al.*, 2016);
- (iv) subsequente redução dos efeitos adversos indesejáveis (MIYATA; CHRISTIE; KATAOKA, 2011);
- (v) diminuição da administração do medicamento no tratamento do paciente (HERRERO-VANRELL *et al.*, 2014).

A Figura 1 compara o que ocorre na corrente sanguínea quando um medicamento é administrado em um sistema de liberação convencional (multi-dose) e em um sistema de liberação controlada através do uso de sistemas matriciais poliméricos.

Figura 1: Comparação entre o sistema convencional multidose e sistema de liberação controlada (A) e esquema ilustrativo do modo de liberação em sistemas de cinética sustentada (B).



Fonte: Adaptado LOPES, 2005

A liberação do fármaco utilizando carreadores poliméricos pode ocorrer concomitantemente com a erosão da superfície e degradação em massa. O estágio inicial da liberação é conduzido por difusão do meio externo entre os poros e conseqüente carreamento do fármaco para o ambiente externo. De acordo com a porosidade do polímero, essa liberação é facilitada. Posteriormente, um segundo estágio de liberação é comandado pela degradação/erosão da matriz polimérica (KANJICKAL; LOPINA, 2004).

3.1.1 Poliésteres aplicáveis à liberação controlada

O uso de sistemas matriciais constituídos por polímeros alifáticos é uma das estratégias disponíveis para alcançar a liberação controlada de fármacos. Esses sistemas poliméricos apresentam diversidade quanto ao caráter anfifílico, velocidade de degradação, características físicas e facilidade de síntese, atendendo as necessidades desejadas para um efeito terapêutico prolongado do fármaco, aumentando a eficácia do medicamento (SEYEDNEJAD *et al.*, 2011; SHEN *et al.*, 2015).

Dentre os polímeros utilizados para esses sistemas de entrega, encontram-se os poliésteres alifáticos biodegradáveis, tais como: poli(ϵ -caprolactona) – PCL, poli(ácido lático) – PLA e o poli(ácido glicólico) – PGA e seus copolímeros (PLAPIED *et al.*, 2011). O uso de PGA e PLA em estudos acadêmicos é extensamente abordado e os seus usos para fins médicos foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) desde 1969 e 1971, respectivamente. Poliésteres contendo caprolactona também foram aprovados pelo FDA para usos clínicos em 1997 (GIGLI *et al.*, 2016).

Poli(hidro)alcanoatos (PHA) pertencem à classe de poliésteres produzidos por bactérias. Estas bactérias geram uma variedade de PHAs, sendo, entre eles, o poli(3-hidroxi-butirato) – PHB um dos mais conhecidos. Esses polímeros funcionam como reserva de carbono e energia para as bactérias e são depositados como inclusões semiesféricas insolúveis no citoplasma das células (GRAGE *et al.*, 2009).

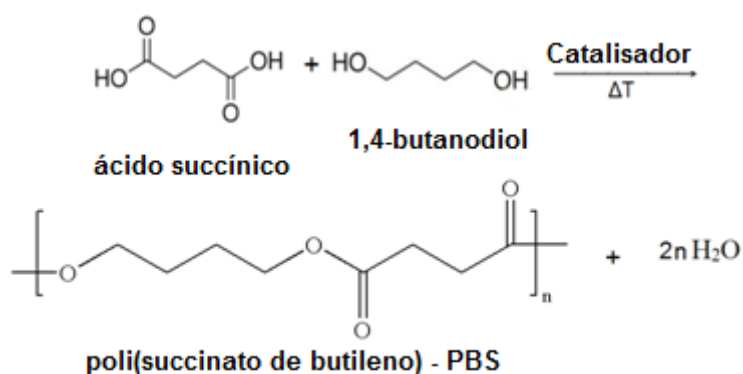
3.1.2 Poli(succinato de butileno) (PBS)

Entre os poliésteres alifáticos, o Poli(succinato de butileno) (PBS) ganha destaque em diversos estudos recentes, devido as suas aplicações biomédicas como polímero plataforma, apresentando características de biodegradabilidade, biocompatibilidade e excelente processabilidade. Além disso, seus produtos de degradação também são atóxicos, sendo descrito que o PBS degrada a ácido succínico, um intermediário no ciclo do ácido tricarbóxico e, posteriormente, em dióxido de carbono e água (ZHAO *et al.*, 2005).

O PBS encontra-se disponível comercialmente desde 1993 pela Showa-Den sob nome de Bionolle[™] e pela Mitsubishi Chemical Corporation,

comercialmente conhecido como GS PLATM. A síntese do PBS consiste em duas etapas principais: na primeira etapa ocorre a esterificação de ácido succínico e 1,4-butanodiol visando à eliminação de água do sistema; na segunda etapa, ocorre a policondensação dos oligômeros, a altas temperaturas. O uso de elevadas temperaturas facilita a remoção do butanodiol colocado em excesso, levando à formação do polímero de alta massa molar média (XU; GUO, 2010). O catalisador frequentemente usado na síntese de PBS é o tetrabutóxido de titânio (FERREIRA *et al.*, 2015). O esquema da polimerização é mostrado na Figura 2.

Figura 2: Esquema da síntese de PBS



Fonte: Adaptado GIGLI *et al.*, 2016

Quanto às propriedades, o PBS possui capacidade de cristalização entre 35-45%, temperatura de fusão cristalina (T_m) na faixa de 111-115°C, e temperatura de transição vítrea (T_g) abaixo da temperatura ambiente, entre 37°C a -18°C, permitindo facilidade de processamento. Quando não há modificadores químicos na síntese do PBS que permitam a extensão de cadeia do polímero, as propriedades mecânicas do material são reduzidas (GIGLI *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2015).

A velocidade de biodegradação deste polímero é dependente da hidrofiliabilidade da cadeia, da cristalinidade do polímero e da massa molar dos componentes da matriz. Cho e seus colaboradores em 1999 investigaram o efeito da microestrutura cristalina sob a degradação hidrolítica de PBS submetidos a diferentes tratamentos térmicos: amostras fundidas e posteriormente submetidas ao *quenching* (resfriamento rápido) e amostras

cristalizadas isotermicamente a 60°C. Conforme proposto pelos autores, a amostra tratada termicamente apresentou maior cristalinidade e taxa de degradação mais lenta, indicando que a degradação hidrolítica ocorre preferencialmente na região amorfa de PBS enquanto a amostra cristalizada isotermicamente apresentou estrutura esferulítica com fibrilas menos empacotadas, facilitando a penetração de água e aumentando a taxa de degradação (CHO; LEE; KWON, 2001).

Gualandi e colaboradores (2012) relataram os efeitos da hidrofobicidade do PBS na degradação hidrolítica do material, observando taxa de degradação muito lenta em condições fisiológicas simuladas *in vitro* (pH7,4 e 37°C) com massa molar mantida relativamente constante durante semanas (GUALANDI *et al.*, 2012). Como a degradação pode ser controlada pelo balanço hidrofílico/hidrofóbico do material, a adição de polímeros hidrofílicos na cadeia do PBS pode alterar a taxa de degradação do polímero. É o que propôs Deng e colaboradores (2004) quando adicionaram poli(etileno glicol) – PEG na cadeia de PBS, aumentando a taxa de degradação do copolímero devido a uma maior capacidade de absorção de água pelo segmento hidrofílico de PEG (DENG *et al.*, 2004).

Diversos estudos têm sido abordados na avaliação da citotoxicidade do PBS em células e animais, importante para a aplicação em substitutos de tecido ou como carreadores de fármacos. Alguns autores estudaram a citotoxicidade de *scaffolds* de PBS em osteoblastos (WANG *et al.*, 2010), fibroblastos (SUTTHIPHONG; PAVASANT; SUPAPHOL, 2009) e no osso femoral de coelhos brancos (NIU *et al.*, 2014) demonstrando a potencialidade do PBS na aplicação de engenharia de tecidos.

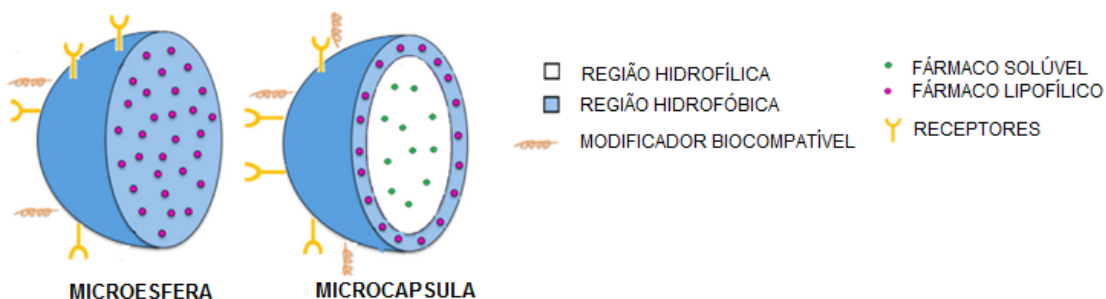
3.2 MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

As micropartículas são comumente usadas para a entrega em longo prazo de proteínas, peptídeos e pequenas moléculas, que geralmente são administradas por via intramuscular ou subcutânea (DEYOUNG *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2010; SHISHATSKAYA *et al.*, 2011). O sistema adequado de liberação controlada depende do tipo de carreador empregado, das características do agente terapêutico usado e da forma de administração do

medicamento. A busca pela melhoria desses sistemas de entrega é frequente, onde a matriz carreadora deve ser escolhida de forma adequada. Além disso, modificações na superfície do material são úteis para torná-lo mais invisível ao sistema imunológico, como no caso da “PEGlação” (SAKATA *et al.*, 2014; TIAN *et al.*, 2012). Outra estratégia é a ligação de receptores adequados que atuem como chave-fechadura. Esses sistemas fazem a marcação dessa partícula, como é o exemplo da albumina e folatos (WEBSTER; SUNDARAM; BYRNE, 2013).

Dependendo da hidrofobicidade do polímero e das características do ativo de interesse, diferentes estruturas podem ser formadas. Componentes hidrofílicos são encapsulados dentro do núcleo aquoso e fármacos hidrofóbicos são aprisionados dentro de uma “casca”, formando estruturas da forma de capsulas. O esquema genérico da estrutura de um carreador com diferentes componentes pode ser observado na Figura 3.

Figura 3: Estrutura genérica de uma micropartícula contendo diferentes componentes para melhorar a eficácia de entrega do fármaco



Fonte: Elaborado pelo autor

3.2.1 Parâmetros para o preparo de microesferas poliméricas

As propriedades químicas e estruturais das microesferas são intimamente relacionadas ao modo de liberação do fármaco, da biocompatibilidade e do encapsulamento.

Recentemente, Mitragotri e colaboradores (2014) estudaram os principais parâmetros das micropartículas que afetam a liberação do fármaco. Os parâmetros avaliados são referentes à porosidade das microesferas, tamanho das partículas e polidispersão, modificações superficiais e forma dos materiais. A porosidade da matriz polimérica afeta a difusão do fármaco,

facilitada quando há um maior número de poros presente na estrutura da matriz (MITRAGOTRI; BURKE; LANGER, 2014). Além disso, o aumento da porosidade permite a penetração de água, facilitando a sua degradação e subsequente liberação do fármaco (NGUYEN *et al.*, 2012; PATEL; GUPTA; AHSAN, 2012).

O tamanho das esferas e a polidispersão também contribuem significativamente na entrega do fármaco, pois, quanto maior é o tamanho da partícula, menor é a relação superfície/volume, o que prolonga a liberação do fármaco. Além disso, a polidispersão pode ocasionar variabilidade nas taxas de liberação, devido à distribuição de tamanhos das microesferas produzidas (KOBIASI *et al.*, 2012).

Quanto às características superficiais das microesferas, estas afetam a interação com o ambiente no local do tumor, especialmente células imunes. A modificação da superfície com polímeros, tais como o PEG, é usada para reduzir as interações da microesfera com células do sistema imunológico (TABATABAEI REZAEI *et al.*, 2012). Outro parâmetro importante no projeto das microesferas é a forma das partículas, que afeta as interações com macrófagos; partículas alongadas apresentam internalização dependente da orientação por macrófagos (SHARMA *et al.*, 2010).

Mohanraj e colaboradores (2013) desenvolveram microcápsulas de PBS carregadas com Levodopa, fármaco para tratamento de Parkinson. Os autores observaram que as microesferas que exibiram superfície mais lisa exibiram maior eficiência de encapsulação em comparação as mais porosas. Além disso, a liberação do fármaco foi mais elevada no líquido cefalorraquidiano simulado do que em tampão fosfato, mostrando que a composição do meio de liberação é um fator importante que afeta a liberação do fármaco (MOHANRAJ; SETHURAMAN; KRISHNAN, 2013).

3.2.2 Emulsificação

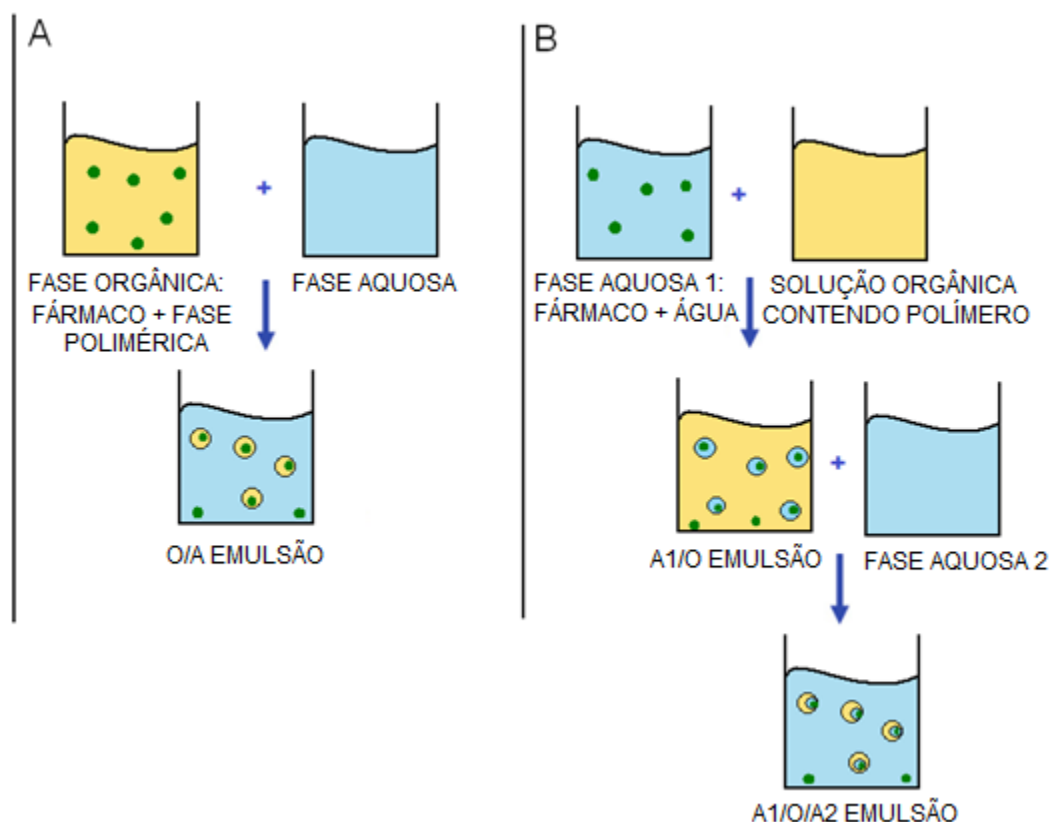
Dentre as possibilidades de métodos disponíveis para o preparo de micropartículas, a emulsificação seguida por evaporação do solvente é extensamente usada devido sua facilidade de processamento (DELGADO *et al.*, 2012; STAFF *et al.*, 2013).

A técnica de emulsificação e evaporação do solvente consiste em quatro etapas principais. Inicialmente acontece a dissolução ou dispersão do fármaco hidrofóbico em um solvente orgânico adequado que contém o polímero previamente dissolvido. Esta fase orgânica, chamada de fase dispersa, é vertida lentamente sob uma fase aquosa (fase contínua) que contém o tensoativo, formando micro gotículas a partir da difusão da fase orgânica sob a fase contínua. Mantendo as condições de agitação, o solvente é evaporado e as partículas sólidas formadas são recuperadas e secas para eliminação do solvente residual e conformação sólida das microesferas. Este método de emulsificação é frequentemente usado para fármacos hidrofóbicos, não sendo adequado para fármacos hidrofílicos, pois apresentam tendência de migração para o solvente polar, diminuindo a eficiência de encapsulamento do fármaco (GERT *et al.*, 2016; LI; ROUAUD; PONCELET, 2008).

Para fármacos hidrofílicos é necessária dupla emulsão, método similar à técnica de emulsão simples com o acréscimo de uma segunda etapa de emulsificação contendo fase aquosa e tensoativo (AYOUB *et al.*, 2011). Para diminuir o tamanho das gotículas, é necessária alta energia de agitação através do uso de homogeneizadores de alta pressão ou de um sonicador (LUCIANI *et al.*, 2008).

Determinadas condições de emulsificação também influenciam no tamanho e morfologia das microesferas obtidas. A escolha adequada dos parâmetros resultará no aumento da encapsulação de fármaco de interesse (FREITAS; MERKLE; GANDER, 2005)(freitas; merkle; gander, 2005). A Figura 4 mostra a diferença entre os dois métodos de emulsão.

Figura 4: Preparação de microesferas a partir de emulsões simples e dupla emulsão.



Fonte: Elaborado pelo autor

3.2.3 Otimização dos parâmetros de emulsificação

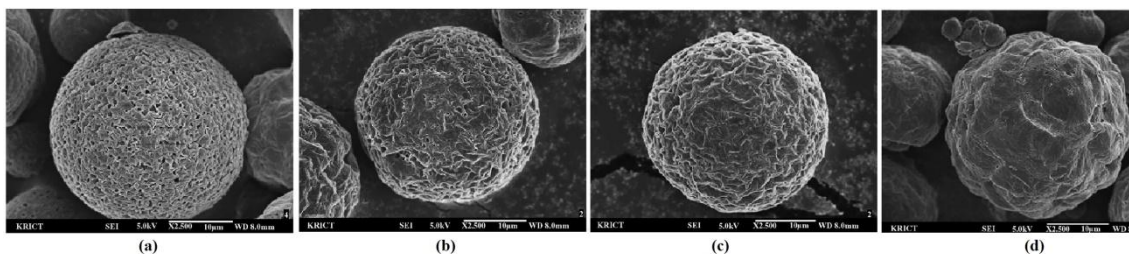
Embora o processo de emulsificação e evaporação de solvente seja extensamente abordado devido à sua facilidade, alguns fatores são importantes na morfologia das microesferas e, conseqüentemente, na eficácia de encapsulação de fármacos.

A concentração e a massa molar do polímero influenciam na viscosidade da fase orgânica, o que modifica a constante de difusão do fármaco (KATOU; WANDREY; GANDER, 2008). Uma elevada viscosidade da fase orgânica, quer através do uso de polímeros de alta massa molar ou com maiores concentrações do polímero, resultará em alta eficiência de encapsulação. Conforme reportado por Brunner e colaboradores (2011) a concentração da fase orgânica altera a morfologia de microesferas de PBS preparadas por dupla emulsão, A concentração de polímero em diclorometano foi ajustada para 1%, 3% e 5% e verificou-se que conforme o aumento da concentração de PBS, menor era a esfericidade dos materiais preparados (BRUNNER *et al.*, 2011).

Entretanto, no estudo feito por Chaisri e colaboradores (2011), microesferas de PLGA tiveram uma redução na porosidade com o aumento da concentração de polímero. Além disso, os autores estudaram o efeito da concentração do PLGA na eficiência de encapsulação da gentamicina, um antibiótico aminoglicósido. Os autores mostraram que aumentando a concentração de PLGA, em dicloro metano, de 10% para 20% resultou num aumento da eficiência de encapsulamento de 17% para 68%, devido ao aumento da viscosidade do meio (CHAI SRI *et al.*, 2011).

A porosidade também pode ser dependente da composição das microesferas. Park; Lee e Hong (2006) sintetizaram microcapsulas de PBS/PCL contendo indometacina avaliando o efeito do PCL sobre o perfil de liberação do fármaco e a morfologia dos materiais preparados. Os autores concluíram que a taxa de liberação de indometacina foi menor com a diminuição do tamanho dos poros das microcápsulas resultante do aumento da incorporação de PCL, conforme ilustrado na Figura 5 (PARK; LEE; HONG, 2006).

Figura 5: Micrografia SEM de microcapsulas de PBS/PCL preparadas com diferentes proporções de PCL, em peso: (a) 5%, (b) 10%, (c) 15% e (d) 20%



Fonte: Adaptado PARK; LEE; HONG, 2006

No estudo de Crucho e Barros (2015), nanopartículas poliméricas foram sintetizadas por nanoprecipitação e diferentes parâmetros experimentais (escolha do solvente orgânico e taxa de evaporação) foram investigados de modo a verificar a influência no tamanho médio das partículas obtidas. Quanto ao solvente, a miscibilidade entre solvente orgânico e água pode influenciar no tamanho das partículas, uma vez que a diferença entre os parâmetros de solubilidade dos solventes é minimizada com o aumento da miscibilidade (CRUCHO; BARROS, 2015). O segundo fator experimental avaliado pelos

autores foi a taxa de evaporação do solvente, sob pressão atmosférica por 16h ou pressão reduzida de 300mbar. Os resultados obtidos por dispersão de luz dinâmica indicam que o tamanho médio para as nanopartículas que sofreram evaporação a vácuo foi de 96 nm enquanto um aumento de tamanho para 132 nm foi observado quando as mesmas partículas foram evaporadas a pressão atmosférica. A análise sugere que o aumento da taxa de evaporação reduz a probabilidade de coalescência das partículas preparadas (CRUCHO; BARROS, 2015).

Diversos estudos também têm sido avaliados a fim de investigar o efluxo de fármacos anfifílicos para a fase aquosa da emulsificação, reduzindo a eficiência de encapsulação. A adição de diferentes sais (NaCl, NaBr, NaClO₄ e Na₂SO₄) na fase externa tem sido uma das soluções utilizadas por alguns autores para minimizar os efeitos de transporte do fármaco (GERT *et al.*, 2016).

Brunner e colaboradores (2011) estudaram o efeito de PVA sobre a morfologia das microesferas de PBS. A síntese de PBS foi feita por dupla emulsão e a variação de PVA na segunda fase aquosa foi de 0,5%, 1%, 2%, 4% e 6% (BRUNNER *et al.*, 2011). O grupo de Mohanraj (2013) também desenvolveram microesferas de PBS por dupla emulsão utilizando clorofórmio e diclorometano como solventes orgânicos e diferentes tensoativos: dodecilsulfato de sódio – SDS (surfactante aniônico), brometo de cetiltrimetilamônio – CTAB (surfactante catiônico) e poli(álcool vinílico) – PVA (surfactante não iônico). Eles observaram que usando diclorometano como solvente as microesferas exibiram superfície externa áspera com alta porosidade enquanto com clorofórmio, as microesferas eram mais rugosas. Além disso, o PVA como surfactante aumentou a irregularidade na superfície das partículas. Os autores sugerem que esse fenômeno é relacionado ao mecanismo de “respiração”, que envolve a disposição das gotículas de água formada pela condensação de vapor de água na superfície do material preparado (MOHANRAJ; SETHURAMAN; KRISHNAN, 2013).

3.3 ESTERILIZAÇÃO EM SISTEMAS BIOMÉDICOS

O método de esterilização de materiais destina-se a remover ou destruir todas as formas de vida, macroscópica ou microscópica, do produto de

interesse, garantindo que não ocorra inativação de toxinas e enzimas celulares. O método de esterilização deve ser cuidadosamente selecionado, pois implica em alterações nas propriedades físicas e mecânicas dos materiais durante o processo.

De acordo com os requisitos de garantia de esterilidade descritos nas farmacopeias, um nível de garantia de esterilidade (SAL) de 10^{-6} (probabilidade estatística de encontrar uma unidade contaminada é igual a 1:1000000) é geralmente aceito para procedimentos de esterilização de materiais e produtos farmacêuticos (MONACO *et al.*, [s.d.]; SAKAR *et al.*, 2016). Entretanto, o método de esterilização deve ser cuidadosamente selecionado, uma vez que pode resultar em alterações nas propriedades físicas e mecânicas dos materiais durante o processo (YAMAN, 2001).

3.3.1 Técnicas de esterilização

Neste subcapítulo serão apresentadas as formas de esterilização (métodos químicos e físicos) de sistemas poliméricos carreadores de fármacos que são atualmente utilizadas para as aplicações farmacêuticas.

Esterilizações através de métodos químicos podem ser utilizadas com gás adequado, frequentemente usando o óxido de etileno. Embora não cause degradação da cadeia polimérica, apresente compatibilidade com um grande número de materiais e possa ser aplicado em materiais que não resistam a altas temperaturas, apresenta como desvantagens natureza altamente inflamável, propriedades mutagênicas e possibilidade de resíduos tóxicos nos materiais tratados, subprodutos em polímeros e apresenta capacidade limitada de penetração no polímero (SAVARIS; SANTOS; BRANDALISE, 2016; SOMMERFELD; SCHROEDER; SABEL, 1998).

O método físico mais simples utilizado apresenta como agente esterilizante o calor, podendo ser por calor úmido e calor seco. Embora barato e seguro, a esterilização por calor apresenta desvantagens referentes à degradação de biomateriais poliméricos já que a técnica frequentemente utiliza temperaturas que excedem as temperaturas de transição vítrea (T_g) e fusão cristalina (T_m) dos materiais (ROGERS, 2012; SANDLE, 2013).

A esterilização por calor úmido ocorre em autoclave, utilizando vapor saturado sob pressão, dependente do tempo de exposição ao calor e

temperatura (MEMISOGLU-BILENSOY; HINCAL, 2006). A esterilização por calor seco é feita em estufa, com circulação forçada de ar para promover a distribuição homogênea do calor (KOTHA *et al.*, [s.d.]).

Outro método físico de esterilização ocorre por exclusão de tamanho, através de filtração em matriz porosa. A eficiência da filtração depende do tamanho dos poros do material e da adsorção de micro-organismos dentro da matriz do filtro (DOBROVOLSKAIA; MCNEIL, 2016; LI *et al.*, 2013). Esse tipo de esterilização não é aplicada a materiais poliméricos, devido a limitação dos poros da membrana.

O uso de radiações ionizantes de várias fontes, tais como α , β , γ e raios x, servem muito bem ao propósito da esterilização. Entre estes, o feixe de elétrons e radiação gama são os mais amplamente utilizados (DEARTH *et al.*, 2016; RAI *et al.*, 2013). A técnica consiste na colisão entre ondas eletromagnéticas ou partículas de alta energia com os átomos do material irradiado, alterando a carga elétrica do material. Os átomos irradiados tornam-se íons positivos ou negativos que ao atravessarem as células, criam hidrogênio livre; radicais hidroxilas e alguns peróxidos capazes de causarem diferentes efeitos nestas células (CUSINATO *et al.*, 2016). A técnica de irradiação é amplamente utilizada para esterilizar produtos médicos, tais como suturas cirúrgicas, implantes e outros materiais metálicos. No caso de materiais poliméricos, a irradiação tem o potencial de penetrar na cadeia polimérica e não deixar resíduos tóxicos (SEFAT *et al.*, 2013; ZEMBOUAI *et al.*, 2016). No entanto, pode causar alterações indesejáveis na estrutura de alguns polímeros, tais como degradação ou reticulação (SUHARTINI *et al.*, 2003). A irradiação é especialmente útil para a esterilização de materiais sensíveis ao calor. Neste caso, o fator de controlo é a dose de radiação absorvida. Normalmente, a dose de referência é de 25 kGy, mas esta pode ser alterada para atingir um certo nível de letalidade e reprodutibilidade (CROONENBORGHES; SMITH; STRAIN, 2007).

3.3.2 Efeitos da irradiação- γ em sistemas poliméricos

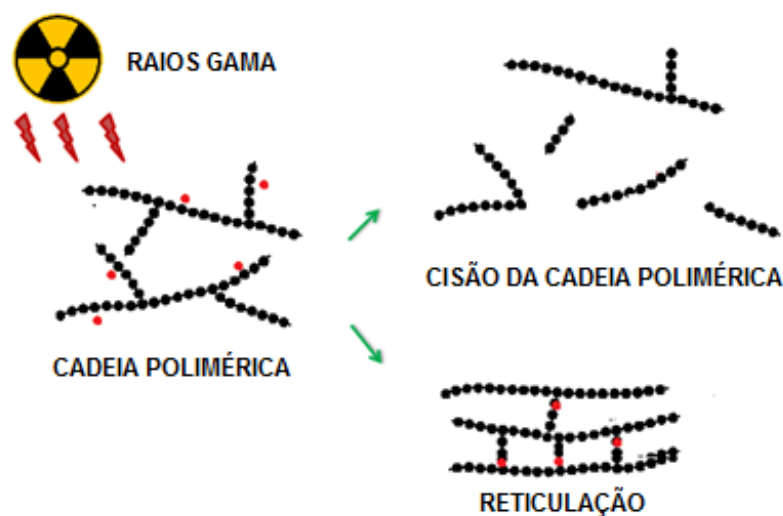
A irradiação- γ é uma das técnicas mais utilizadas na área biomédica, no entanto, induz a fragmentação de ligações covalentes e a produção de radicais livres nos materiais irradiados, que recombinados, podem resultar em

alterações físicas, acarretando em fragilização, enrijecimento, amolecimento, descoloração, geração de odor e diminuição da massa molar média (CROONENBORGHES; SMITH; STRAIN, 2007).

Neste tipo de esterilização, podem ser usados dois tipos de radiações ionizantes: raios gama emitidos pelos isótopos radioativos artificiais ^{60}Co e ^{137}Cs e feixes de elétrons obtidos em aceleradores de elétrons (CHMIELEWSKI; HAJI-SAEID; AHMED, 2005). O mecanismo de interação, para ambas as fontes de radiação, envolve a ionização atômica e posterior ejeção de um elétron de alta energia. Este elétron continua a produzir numerosas excitações eletrônicas e ionizações ao longo do caminho tomado [270]. A diferença entre as fontes é a faixa de energia fornecida e o grau de penetração no material. A taxa de dose para uma fonte de ^{60}Co é kGy/h enquanto a taxa de dose média para o feixe de elétrons é 10.000 vezes maior. A diferença entre as taxas de dose é de 4-5 ordens de grandeza. Além disso, as emissões do feixe de elétrons têm um grau moderado de penetração, porque o número de interações entre os elétrons diminui significativamente com a profundidade do material, enquanto que os raios gama têm alto poder de penetração no material (ITO; ISLAM, 1994; RAŽEM; KATUŠIN-RAŽEM, 2008).

Como já foi citada anteriormente, a aplicação de radiação- γ em polímeros pode gerar cisão da cadeia polimérica ou reticulação (ver Figura 6). Embora ambos os processos ocorram simultaneamente, se a clivagem predominar sobre a reticulação, o massa molar; o processo é chamado de degradação. No entanto, se a irradiação resulta num aumento da massa molar, o processo envolve a reticulação.

Figura 6: Esquema de alterações na cadeia de polímero após irradiação



Fonte: Elaborado pelo autor

No caso de poliésteres alifáticos biodegradáveis, as alterações físicas dependem da presença ou ausência do grupo lateral metila (JO *et al.*, 2012). Em poliésteres tais como PCL e PBS, que não têm grupo metila, os biomateriais são reticuláveis por radiação (JEONG *et al.*, 2015; LUK *et al.*, 2013; SONG; YOSHII; KUME, 2001). Nugroho e colaboradores (2001) propuseram uma mistura de PCL e PBS (30/70) por fusão dos polímeros na extrusora. Os grânulos foram irradiados por raios- γ a partir de uma fonte de ^{60}Co , de modo a melhorar a estabilidade do PCL durante o processamento. Os autores descobriram que um aumento na dose de radiação aumenta a massa molar do material e a polidispersidade (NUGROHO *et al.*, 2001). Quanto aos polímeros com grupos metila, a consequência predominante da irradiação é a cisão da cadeia, como é observado em PHB, PLLA e PLGA (CHAKOLI *et al.*, 2015; KELES *et al.*, 2015; KHALIL; ALBACHIR; ODEH, 2016).

3.3.3 Efeitos da irradiação- γ em sistemas microparticulados

A irradiação de sistema microparticulados para liberação de fármacos produzem diferentes alterações, tanto na morfologia e na distribuição de tamanho das micropartículas, como na taxa de liberação. Além disso, os resultados são dependentes da estrutura química do ativo, apresentando particularidades quanto às alterações esperadas e a eficiência de encapsulamento do fármaco de interesse. A determinação do efeito

predominante depende além das condições de irradiação, da estrutura da macromolécula e da presença de ar e aditivos (NINAYA *et al.*, 2016; THOMARAYIL MATHEW *et al.*, 2013).

O grupo de Lee (2002) estudou os efeitos da irradiação na difusividade do fármaco etanidazol em microesferas de parede dupla formada por PLLA e PLGA. Os autores verificaram uma difusão lenta do fármaco durante cerca de 3 semanas nas microesferas não irradiadas, entretanto, quando as micropartículas foram irradiadas a fase de liberação lenta do fármaco diminuiu para 1 semana (LEE; WANG; WANG, 2002).

Bozdog e su (2001) encapsularam diclofenaco, um fármaco anti-inflamatório, em microesferas de PLGA e submetem esses sistemas à irradiação em dosagens de 5kGy, 15kGy e 20kGy. Os autores perceberam que houve aumento no diâmetro médio das microesferas preparadas, sugerindo que é possível controlar as características de liberação o fármaco com a dosagem adequada (BOZDAG; SU, 2002). Erdemli; Keskin e Tezcaner (2015) sintetizaram microesferas de PCL com diferentes tensoativos, visando aumentar a estabilidade das micropartículas preparadas. As amostras foram submetidas 25kGy de radiação- γ e o tamanho médio foi medido por SEM. A distribuição de tamanho entre as microesferas não irradiadas e irradiadas não foi estatisticamente significativo, indicando estabilidade dos sistemas preparados (ERDEMLI; KESKIN; TEZCANER, 2015).

Quanto às alterações morfológicas nas microesferas após esterilização, Spadaro e colaboradores (1996) observaram por SEM a irregularidade das micropartículas de PHEA, contendo um agente anti-neoplasicopleonásico, após a irradiação (SPADARO *et al.*, 1996). Wang *et al.* (2003) prepararam microesferas de PLGA contendo placitaxel com e sem aditivos, as quais foram irradiadas a 10kGy usando uma fonte de ^{60}Co . Os autores reportam uma redução da massa molar média de 97% e de 88% para o polímero e para o polímero aditivado, respectivamente (WANG *et al.*, 2003). Memisoglu-bilensoy e Hincal (2006) produziram partículas injetáveis de β -cyclodextrina para tratamento de câncer e compararam os efeitos de esterilização por calor e irradiação- γ , a 25kGy, dos materiais. Os autores observaram alterações significativas no potencial zeta dos materiais irradiados sugerindo que, com a

irradiação, ocorreu fragmentação de ligações covalentes e quebra parcial da cadeia. Essa hipótese também foi confirmada pelo estudo *in vitro* dos materiais preparados (MEMISOGLU-BILENSOY; HINCAL, 2006).

3.4 ATIVOS HIDROFÍLICOS E LIPOFÍLICOS EM ESTUDOS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

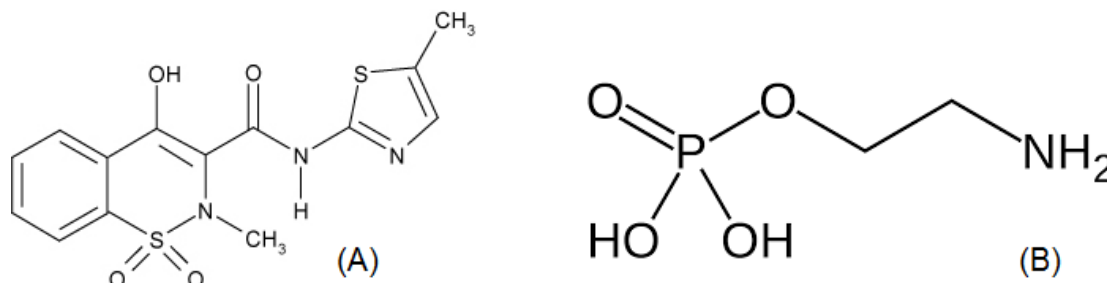
A produção de micropartículas para administração parenteral tem sido uma via eficaz nos sistemas de administração de fármacos devido ao aumento da biodisponibilidade do mesmo, afetando a eficácia terapêutica e a segurança da forma de dosagem (VAN NGO *et al.*, 2016). Na preparação destes sistemas, a solubilidade é um dos principais fatores que influenciam a biodisponibilidade de medicamentos. Atualmente, estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos de novas substâncias químicas mostram solubilidade limitada em água (TRAN; TRAN; LEE, 2009). A técnica de emulsificação e evaporação de solvente é frequentemente utilizada para o desenvolvimento de sistemas visando melhorar a solubilização de fármacos pouco solúveis em água. Dependendo da técnica de emulsificação (simples ou dupla), da característica do ativo e da hidrofobicidade da matriz polimérica, esses sistemas terão maior desempenho quanto à encapsulação do ativo de interesse (EL-SAY; EL-SAWY, 2017).

O Meloxicam, um fármaco anti-inflamatório e analgésico não esteroide de baixa massa molar, é frequentemente usado para tratar artrite reumatoide, osteoartrite e outras doenças articulares (AMBRUS *et al.*, 2009). Aprovado pelo FDA para comercialização desde 2000, este fármaco apresenta baixa solubilidade em água e baixa taxa de dissolução, fatores limitantes para a sua taxa de absorção (biodisponibilidade 89% após a sua dissolução) (TACCA *et al.*, 2002). A sua concentração plasmática máxima é atingida 3-7 h após a administração de uma suspensão oral e após 5-9 h para comprimidos (LIANG; CHESSIC; YAZDANIAN, 2000). Para obter propriedades farmacodinâmicas adequadas, como o início rápido do efeito do medicamento, a dissolução rápida é um fator importante.

Outro ativo proposto para o estudo neste trabalho é a Fosfoetanolamina sintética. A estrutura química dos ativos modelos propostos é apresentada na Figura 7.

Figura 7: Estrutura química dos ativos modelos usados neste trabalho:

(A) Meloxicam e (B) Fosfoetanolamina



Fonte: Elaborado pelo autor

Atualmente, novos medicamentos têm sido estudados para a substituição dos agentes quimioterapêuticos no tratamento de câncer. Uma alternativa promissora são os análogos sintéticos de alquil-lisofosfolípidios, conhecidos como fosfolípidios antineoplásicos, que apresentam atividade anticancerígena (GAJATE *et al.*, 2012). O mecanismo de ação desses compostos não visa ataque ao DNA. Esses fosfolípidios se inserem facilmente na bicamada lipídica, o que pode interferir no metabolismo lipídico e na transdução de sinal, induzindo a apoptose (ALDERLIESTEN *et al.*, 2011).

A Fosfoetanolamina pertence a classe desses novos ativos, sendo um composto precursor central na biossíntese de fosfolípidios (FERREIRA *et al.*, 2012). Recentemente, muitas discussões foram abertas quando a possibilidade da Fosfoetanolamina sintética ter efeitos potentes em uma grande variedade de células tumorais (ZHU; BAKOVIC, 2012). Alguns estudos demonstraram que a fosfoetanolamina sintética é altamente citotóxica para uma grande variedade de células tumorais, incluindo os melanomas humanos SK-MEL-28 e MEWO e o melanoma murino B16-F10, induzindo a apoptose (FERREIRA *et al.*, 2011).

A Fosfoetanolamina apresenta alta solubilidade em água, cerca de 25mg/mL, enquanto que o Meloxicam apresenta solubilidade em água de 0,154mg/mL (YU *et al.*, 2006; YUAN *et al.*, 2006). De acordo com a técnica de emulsificação utilizada, as características lipofílicas de cada ativo interferem diretamente na eficiência de encapsulamento.

O objetivo do presente estudo é investigar a cinética de liberação destes dois ativos modelos, que apresentam características diferentes, após a irradiação- γ dos seus respectivos sistemas matriciais e, estudar as interações fármaco-cadeia polimérica na liberação desses ativos em meio adequado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Os materiais estão listados e classificados dentro da etapa em que foram utilizados durante a Dissertação.

4.1.1 Síntese dos polímeros

- Ácido succínico - ISO FAR
- 1,4 butanodiol - VETEC
- Ácido fosfórico - VETEC
- Nitrogênio gás – IMA

4.1.2 Síntese das microesferas

- Diclorometano P.A. - VETEC
- Clorofórmio - ISO FAR
- Poli(álcool vinílico) - VETEC
- Água destilada e deionizada - LaBioS
- Fosfoetanolamina - SIGMA ALDRICH
- Meloxicam - ZHEJIANG EXCEL PHARMACEUTICA

4.1.3 Caracterizações das amostras

- Brometo de potássio - SYNTH
- Fluorescamina - SIGMA ALDRICH

4.2 LISTA DOS EQUIPAMENTOS

Equipamentos localizados no IMA-UFRJ - Rio de Janeiro - RJ:

- Agitador mecânico IKA modelo Eurostar 2600000;
- Análise Termogravimétrica modelo STA 6000, da Perkin – Elmer;
- Balança Analítica Shimadzu AY 220;
- Bomba de vácuo Primatec 131;
- Cromatógrafo de exclusão por tamanho Shimadzu Pump LC20AD detector RID 20A Coluna CTO20A;
- Destilador de água em inox CIENTEC CT-422;
- Deionizador de água JAPI;
- Difratorômetro de raios X, Rigaku Inc., Modelo Miniflex;

- Dissolutor Ethiktechnology modelo 299;
- Espectrômetro de ultravioleta-visível (UV-Vis) Varian modelo Cary 100;
- Espectrômetro de ultravioleta-visível (UV-Vis) Biospectro, modelo SP220;
- Estufa DE LEO EQUIPAMENTOS DE LABORATÓRIO;
- Liofilizador de bancada Liotop, modelo L101;
- Mastersizer MAF5000 Particle Size Analyzer, Malvern Instruments
- Microscópio óptico (MO), Olympus, BX50 acoplado a um analisador de imagens;
- Moinho de bancada, IKA A11
- Turrax T10 IKA modelo S10N com dispersores S10N-10G e S10N-8G;
- Placa de aquecimento com agitador magnético FISATOM modelo 753A;
- Placa de aquecimento com agitador magnético IKAMAG;
- pHgâmetro MS Tecnopon equipamentos especiais LTDA modelo NT PHM.

Equipamentos localizados em outros Institutos:

- Irradiador Gama, fonte de ^{60}Co , MDS Nordion, Gammacell 220 Excel - COPPE-UFRJ, Rio de Janeiro - RJ
- Microscópio eletrônico de varredura tabletop marca Hitachi modelo TM3000 - NUMATS-UFRJ, Rio de Janeiro, RJ
- Espectrofluorímetro Spectramax M3, Molecular Devices, USA - CCS - UFRJ, Rio de Janeiro, RJ
- FT-IR Sprettrum 100 - Perkin Elmer - COPPE-UFRJ, Rio de Janeiro - RJ

4.3 METODOLOGIA

O trabalho experimental desta pesquisa foi dividido em cinco etapas:

1. Síntese do Poli(succinato de butileno) - PBS: Esterificação e transesterificação;
2. Preparo de microesferas de PBS usando diferentes solventes e modificação dos materiais por irradiação gama;
3. Preparo de microesferas de PBS contendo Fosfoetanolamina e irradiação dos materiais;

4. Preparo das microesferas de PBS contendo Meloxicam e irradiação- γ dos materiais;

5. Caracterização dos materiais obtidos.

Os produtos obtidos em cada etapa foram caracterizados por diferentes técnicas, que serão detalhadas adiante.

4.3.1 Síntese do Poli(succinato de butileno) - PBS

O poli(succinato de butileno), PBS, foi preparado através de reação de transesterificação em duas etapas (FERREIRA *et al.*, 2015). Para isso, o 1,4 butanodiol e o ácido succínico foram adicionados em quantidades equimolares (0,3mol), juntamente com 0,1mL de ácido fosfórico, em um sistema constituído por um balão de 3 bocas com agitação magnética, mantido em banho de silicone. As entradas foram acopladas com um condensador (água circulante à 10°C), fluxo constante de nitrogênio e termopar para controle da temperatura. O sistema é mostrado na Figura 8. Nesta primeira etapa de esterificação, o sistema foi mantido aberto para retirada de água e a temperatura mantida em 160°C por 2 horas. Na segunda etapa, de policondensação, o sistema foi fechado com a aplicação de vácuo e a temperatura da reação ajustada para 230°C por mais 4 horas.

Terminada a reação, o polímero foi rapidamente vertido para um gral, macerado com o auxílio de nitrogênio líquido e moído com moinho de bancada, para redução do tamanho do material.

Figura 8: Esquematização do sistema proposto para a síntese do PBS.



Fonte: Elaborado pelo autor

4.3.2 Síntese das micropartículas poliméricas de PBS

Todas as microesferas foram preparadas usando o método de evaporação de solvente por emulsão simples.

Micropartículas de PBS foram preparadas usando o método de evaporação de solvente. Dissolveu-se 1,25mg de PBS em 25mL de solvente orgânico e 6mL desta fase orgânica foi então adicionada lentamente à 50mL de fase aquosa contendo solução de PVA 1%*m/v*. A emulsificação deste sistema foi conduzida a 30000rpm/min, durante 5 minutos, com um homogeneizador (Ultraturrax modelo IKA S10N-10G e 8G) sob banho de gelo durante todo o processo (DORATI *et al.*, 2005). Posteriormente para evaporação do solvente, foram acrescentados mais 100mL de PVA 1%*m/v*, mantendo o sistema em agitação mecânica por 2 horas a 200rpm. As microesferas sólidas foram recuperadas por decantação, lavadas com água destilada e secas sob liofilização.

Para preparo das microesferas, parâmetros de composição e variáveis técnicas podem influenciar na morfologia e distribuição de tamanho das partículas. Neste estudo, foram avaliados os efeitos do método de secagem no tamanho das micropartículas preparadas (BERKLAND; KIM; PACK, 2001; MA *et al.*, 1994), como variável técnica e, nas variáveis de composição, a escolha do solvente da fase orgânica (FREITAS; MERKLE; GANDER, 2005; SANSDRAP; MOËS, 1993; TAGHIPOUR *et al.*, 2014). Foram utilizados diclorometano (PBSD) e clorofórmio (PBSC) como solventes na fase orgânica.

4.3.3 Preparo das microesferas de PBS carregadas com dois ativos modelos

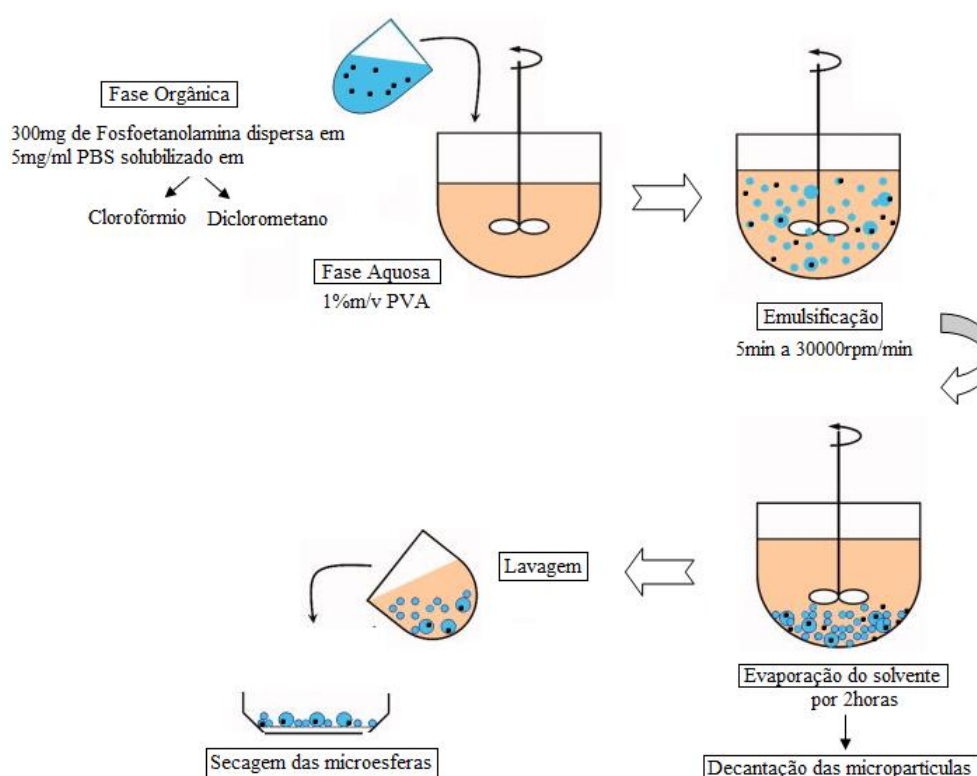
O trabalho propôs o estudo da cinética de liberação de dois ativos modelos diferentes, um com características hidrofílicas (fosfoetanolamina) e outro com características lipofílicas (meloxicam), de modo a avaliar o efeito do ativo ancorado na matriz polimérica e seus resultados na liberação controlada em meio adequado.

A técnica de emulsão/evaporação de solvente foi utilizada para preparar as microesferas de ambos os casos. Além disso, a baixa solubilidade do Meloxicam em soluções aquosas é uma barreira importante à sua aplicação e,

portanto, o encapsulamento deste fármaco constitui uma solução adequada para esta limitação.

Para a inserção da fosfoetanolamina (F), 300mg da proteína foram dispersas em 6mL da solução orgânica contendo PBS (50mg/ml) em solvente adequado. Os solventes utilizados foram clorofórmio e diclorometano. A fase orgânica foi então adicionada à fase aquosa e o procedimento apresentado no subcapítulo anterior seguiu conforme descrito. O esquema ilustrativo do preparo das microesferas encontra-se na Figura 9.

Figura 9: Esquema ilustrativo para a preparação de microesferas de PBS contendo fosfoetanolamina/meloxicam por emulsão simples.



Fonte: Elaborado pelo autor

Para o preparo das microesferas contendo meloxicam (M), o procedimento segue da mesma forma como o proposto para as microesferas contendo fosfoetanolamina. Entretanto, a carga de ativo adicionada foi de 3mg de meloxicam na fase orgânica de PBS, em diferentes solventes (clorofórmio e diclorometano). A quantidade de ativo sugerido é para que as microesferas

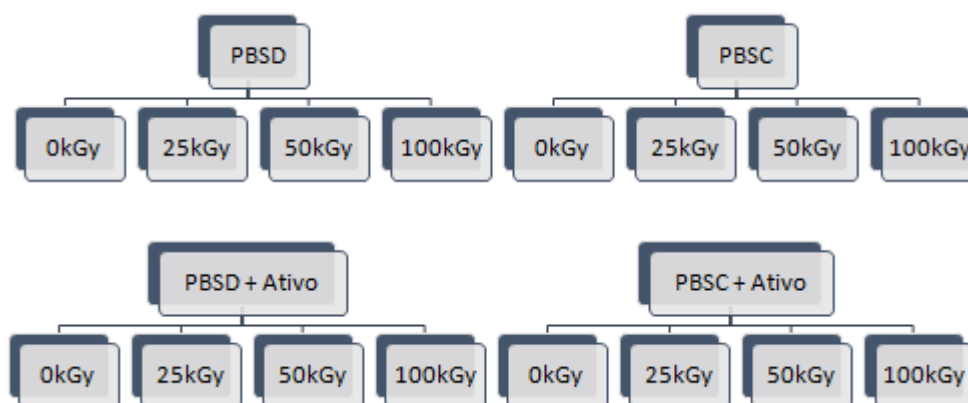
possam ter a mesma quantidade de ativo encapsulado, visto que a fosfoetanolamina é mais solúvel em água, sendo perdida durante o processo de emulsificação. Assim, garante-se o mesmo teor dos fármacos hidrofílico e hidrofóbico, sem alterar a rota de preparo e as condições emulsificantes envolvidas.

4.3.4 Irradiação gama das microesferas sintetizadas

Diferentes doses de irradiação gama foram selecionadas para testar tanto a esterilidade dos materiais preparados quanto para verificar as alterações morfológicas e físicas das matrizes poliméricas. A dose mínima de 25 kGy é considerada adequada para fins de esterilização de produtos farmacêuticos (IGARTUA *et al.*, 2008; SHALABY, 1993).

As microesferas vazias e carregadas com Fosfoetanolamina e Meloxicam foram irradiadas à temperatura ambiente. Foi aplicada uma dose de 25kGy, 50kGy e 100kGy a uma taxa de dose de 56Gy/min e ^{60}Co como fonte de irradiação (Laboratório de Engenharia Nuclear - COPPE, UFRJ).

Figura 10: Esquema ilustrativo das amostras preparadas



Fonte: Elaborado pelo autor

4.3.5 Caracterização dos materiais

As técnicas de caracterização empregadas, assim como os equipamentos utilizados, são descritos nesta seção.

4.3.5.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier - com refletância total atenuada (FTIR-ATR)

Para estudo da composição química do polímero sintetizado, foi feita análise de FTIR-ATR. A análise foi feita em equipamento Spectrum 100 - Perkin Elmer, com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras de 4000 a 550cm^{-1} .

As transmitâncias das microesferas após a irradiação e das microesferas carregadas com fosfoetanolamina e meloxicam foram comparadas estatisticamente. Para isso, os resultados da análise foram normalizados em um intervalo de 1 a 100. Os gráficos foram construídos de modo que os valores de transmitância das amostras (eixo das ordenadas) fossem relacionados aos valores de transmitância obtidos para a microesfera pura, sem irradiação (eixo das abcissas) com auxílio de uma regressão linear via mínimos quadrados, a partir da qual foi possível obter os valores de correlação (R_2) e do erro médio quadrático (RMSE).

4.3.5.2 Difração de raios X

Esta análise foi usada para observar a cristalinidade do polímero sintetizado, feitos em difratômetro da marca Rigaku, modelo Miniflex. As condições de análise foram: 2θ variando de 2° a 80° pelo método FT (tempo fixo), sob passo de $0,05^\circ$ e tempo de 1s. A análise foi feita em temperatura ambiente, usando um equipamento ajustado com diferença de potencial de 30kV no tubo e corrente de 15mA. A radiação utilizada foi de $\text{CuK}\alpha = 1,5418\text{Å}$.

4.3.5.3 Análise Termogravimétrica e Calorimetria diferencial de varredura

As análises simultâneas de termogravimetria e calorimetria diferencial de varredura foram conduzidas utilizando um equipamento simultâneo de medição de análises térmicas, modelo STA 6000, da Perkin – Elmer. As amostras foram acondicionadas em panela de platina aberta. Foram aquecidas de $25\text{ }^\circ\text{C}$ a $700\text{ }^\circ\text{C}$ com taxa de aquecimento igual a $20^\circ\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera de nitrogênio, com vazão igual a $20\text{ mL}/\text{min}$. A massa utilizada nas amostras foi ajustada para cerca de 20 mg.

Com as curvas de TG/DSC obtidas é possível determinar o valor da temperatura de fusão cristalina (T_m) do polímero, temperatura de máxima degradação (T_d), entalpia de degradação (ΔH_d) e o valor da entalpia de fusão

do polímero (ΔH_f) e, através dele, calcular a cristalinidade do material por meio da Equação 1 (FERREIRA *et al.*, 2015).

$$X_c = \frac{\Delta H_f \text{ amostra}}{\Delta H_f (100\% \text{ cristalino})} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Na Equação 3, X_c é a cristalinidade do polímero, $\Delta H_f \text{ amostra}$ é a entalpia de fusão do polímero (J/g) e $\Delta H_f (100\% \text{ cristalino})$ é o valor empírico da entalpia de fusão de uma amostra 100% cristalina de PBS, igual a 110,3 J/g (PHUA *et al.*, 2011).

4.3.5.4 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A fim de verificar a temperatura de transição vítrea (T_g) do polímero sintetizado, o PBS foi submetido à análise de DSC em TA Instruments DSC, Q1000 V9.9 Build 303. Cerca de 9mg da amostra foram selados em placas de alumínio e aquecidos em atmosfera inerte (50mL/min de N_2). A referência era um recipiente vazio. O equipamento foi calibrado com uma amostra de índio. O polímero foi tratado termicamente por *quenching*, à 10°C/ min de -80°C a 150°C.

4.3.5.5 Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC)

As massas molares numérica média (M_n), ponderal média (M_w) e a polidispersão (M_w/M_n) do polímero sintetizado e das microesferas puras foram determinados por meio da técnica de cromatografia de exclusão de tamanho (GPC). Foram pesados cerca de 5 mg da amostra e o clorofórmio foi usado como fase móvel. As condições de análise foram: temperatura de 30°C; vazão de 1 mL/min; concentração de 1g/L; volume de injeção: 20 μ L; coluna série 1200 com colunas MIXED-C; calibração com padrões de poliestireno monodispersos com massas molares de $2,5 \times 10^2$ a $1,4 \times 10^6$. A amostra foi filtrada para remoção de aglomerados e de material reticulado.

4.3.5.6 Medição de fração gel

A verificação da fração de gel, ou fração insolúvel, de PBS puro e das microesferas irradiadas foi medida comparando a alteração de massa das

amostras de cada condição, antes e depois de serem imersos em excesso de clorofórmio durante 48h (KIM *et al.*, 2015). Após a imersão, o PBS solúvel, que não estava reticulado, foi removido através de papel de filtro. Após a remoção do clorofórmio da superfície das amostras, calculou-se a fração de gel das amostras não irradiadas e irradiadas utilizando a Eq. 2. O teste foi conduzido em duplicata para todas as amostras.

$$\text{Fração Gel(\%)} = \frac{\text{Massa da amostra após imersão em clorofórmio}}{\text{Massa da amostra antes da imersão}} \times 100 \quad (\text{Eq.2})$$

4.3.5.7 Espalhamento de luz (Mastersizer)

O diâmetro médio volumétrico e a distribuição de tamanho das microesferas de PBS foram caracterizados pelo equipamento de Mastersizer da Malvern Instruments, Modelo MAF5000. As esferas foram dispersas em água e analisadas antes e após a liofilização. Posteriormente, as microesferas foram irradiadas e também foram conduzidas à análise de espalhamento de luz. Esta dispersão foi adicionada no equipamento com excesso de água deionizada e submetidas a ultra-som de 2700rpm, a fim de estimar o tamanho das micropartículas através do coeficiente de difusão destas no meio.

Os resultados foram obtidos através de valores de D10, D50 e D90 correspondentes a 10%, 50% e 90% em volume sobre uma curva de distribuição de tamanho cumulativa, respectivamente.

4.3.5.8 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

A fim de verificar a morfologia dos materiais preparados, as microesferas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM) por elétrons retro-espalhados, em um Microscópio Hitachi TM 3000, operando em 15 kV, com ampliação de 500 a 800. As microesferas foram depositadas sobre fita de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro.

4.3.5.9 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi feita usando o programa Statistica StatSoft, Inc. (2001), versão 6. O nível de significância ($1 - p$) é de 95%. O valor p pode ser entendido como a "insignificância estatística" do resultado, de

modo que os valores p inferiores a 0,05 indicam melhores resultados e, portanto, resultados estatisticamente significativos.

4.3.5.10 Percentual de rendimento

O rendimento percentual foi calculado como a razão entre a massa de micropartículas obtida no final do processo e a massa das substâncias iniciais adicionadas, incluindo o ativo e o polímero. O cálculo do rendimento está indicado na Equação 3.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{massa das microesferas obtidas}}{\text{Massa inicial de polímero + massa do fármaco}} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

4.3.5.11 Determinação do teor de ativo nas microesferas

A quantidade de carga de fosfoetanolaminas nas microesferas PBS foi determinada por método de extração, utilizando um espectrofluorímetro (Spectramax M3, Molecular Devices, EUA). Cerca de 10mg de microesferas de PBS carregadas com fosfoetanolamina (F) foram dissolvidas em 2mL de diclorometano com agitação por 10min. A solução foi vertida em 10mL de água num funil de separação com agitação vigorosa da mistura, de modo a extrair a fosfoetanolamina em PBS a partir da solução orgânica. Posteriormente, a fase aquosa e a fase orgânica foram separadas para se obter a solução aquosa de proteína (CHENG; LIU; HE, 2010). A intensidade de fluorescência do sobrenadante foi medida a 480nm. A estimativa da quantidade encapsulada de F foi calculada comparando a leitura do desconhecido com uma curva padrão. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. A percentagem de eficiência de encapsulação foi determinada a partir da Eq. 4 (DOZIE-NWACHUKWU *et al.*, 2017).

$$\text{Eficiência de encapsulamento (\%)} = \frac{\text{massa de proteína medida}}{\text{Massa teórica de proteína adicionada}} \times 100 \quad (\text{Eq.4})$$

Por outro lado, a quantidade de Meloxicam nas microesferas foi determinado por dissolução de 10 mg de amostra em 100 mL de solução

tampão fosfato (pH 7,4), mantendo a agitação da solução durante 24 h. O sobrenadante foi analisado por espectrometria UV a 362 nm.

4.3.5.12 Teste de crescimento microbiano

A fim de verificar o potencial de esterilidade dos materiais após a irradiação- γ em comparação as amostras não irradiadas, cerca de 5mg de microesferas de cada condição foram pulverizadas sob meio previamente preparado contendo 3g/L de extrato de carne, 10g/L de peptona, 1g/L de fosfato dissódico, 5g/l de cloreto de sódio e 3g de meio sólido Agar (KASANA *et al.*, 2008). O meio de cultura é propício para crescimento de bactérias e foi ajustado para pH 7,0 (RAVINDRA *et al.*, 2011). Posteriormente a adição das microesferas, as placas foram mantidas a 30°C em incubadora humidificada durante 48 horas.

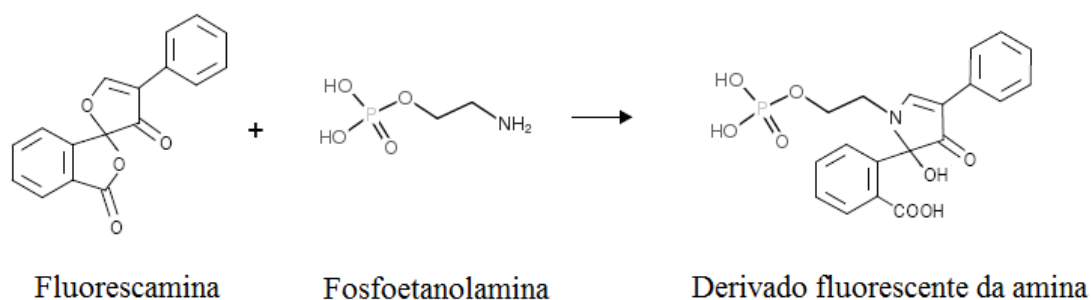
4.3.5.13 Espectrometria para quantificação da Fosfoetanolamina e Meloxicam

Os perfis de liberação de fármacos, frequentemente, utilizam a espectrometria ultravioleta (UV) para quantificação do percentual de ativo liberado (PEREIRA *et al.*, 2016). Neste tópico serão apresentadas as análises espectrométricas apropriadas para cada fármaco, de acordo com suas características físico-químicas.

4.3.5.13.1 Espectrofluorimetria

A Fosfoetanolamina não apresenta bandas de absorção na região do UV, entretanto, quando a proteína é reagida com fluorescamina, produz um fluoróforo que tem um máximo de emissão a 480 nm por excitação a 390 nm (GUERREIRO *et al.*, 2012). A interação entre essas moléculas gera um produto altamente fluorescente enquanto que a fluorescamina e os seus produtos de degradação não são fluorescentes, permitindo que a análise seja livre de perturbação da fluorescência de fundo (DE BERNARDO *et al.*, 1974). O esquema ilustrativo da reação entre a fosfoetanolamina e a fluorescamina é apresentada na Figura 11.

Figura 11: Reação de obtenção do derivado fluorescente da Fosfoetanolamina.



Fonte: Elaborado pelo autor

A curva de calibração da fosfoetanolamina foi medida em Spectramax M3 da Molecular Devices - EUA, através da intensidade de fluorescência resultante a 480 nm. A linearidade foi obtida pela regressão linear das curvas de calibração, feitas em duplicatas.

4.3.5.13.2 Espectrometria no UV-Visível

O fármaco Meloxicam apresenta bandas de absorção na região do Ultravioleta, sendo possível a utilização da técnica de espectrometria no UV-Vis. Foi preparada uma solução conhecida de meloxicam e posteriormente feita sucessivas diluições. Foi feita uma varredura no espectrômetro Cary 100 para determinação do comprimento de onda a ser feita a quantificação. As diluições foram analisadas com o auxílio de um espectrômetro UV-Vis Bioespectro, onde o fármaco foi quantificado na região do comprimento de onda de 362nm.

4.3.6 Estudo *in vitro* da liberação controlada dos ativos

Os estudos de liberação das microesferas contendo os diferentes fármacos foram feitos em dissolutor conforme sugerido pela United States Pharmacopeia – USP. Cerca de 50 mg de microesferas foram mergulhadas em provetas de 230ml contendo solução salina tamponada com fosfato, de modo a simular o ambiente do sangue no corpo humano (pH 7,4 e temperatura de 37°C) sob rotação orbital contínua. As alíquotas de 5 ml foram removidas em intervalos de tempo de 15min, 30min, 1h, 2h, 2,25h, 2,50h, 3h, 4h, 5h e 6h; sendo substituídas com volume igual de tampão. O sobrenadante foi recolhido e quantificado utilizando a técnica de espectrometria apropriada para cada fármaco (Espectrofluorimetria para a Fosfoetanolamina e espectrometria no

UV-Vis para o Meloxicam), de acordo com a curva de calibração previamente construída. Os dados foram expressos como a percentagem de libertação cumulativa.

Os perfis de libertação *in vitro* buscaram avaliar a influência da irradiação- γ na cinética de libertação. Além disso, também foi estudado o modo de libertação para cada sistema de acordo com a interação fármaco-matriz polimérica, ao encapsular um fármaco solúvel em água e um fármaco lipofílico.

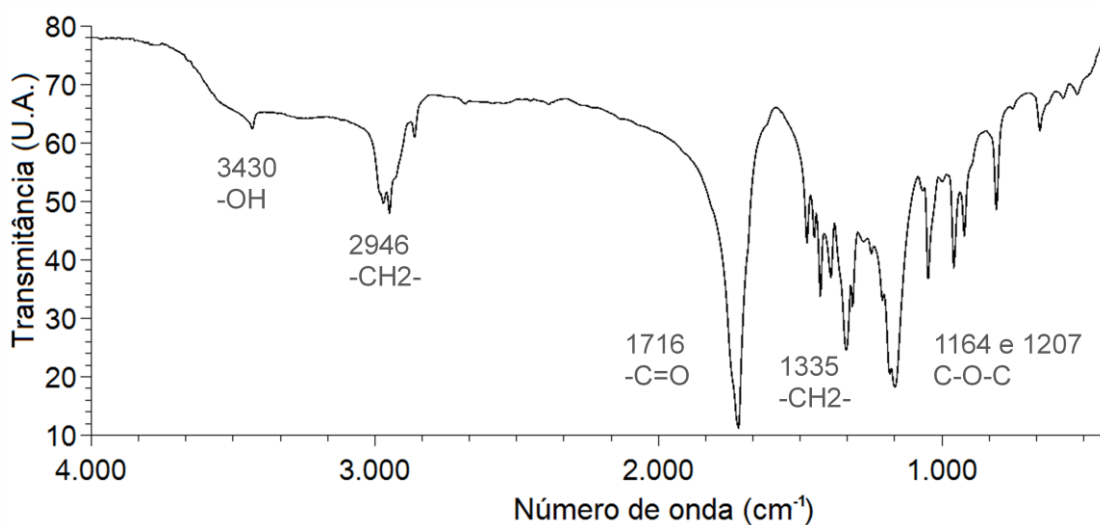
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO POLI(SUCCINATO DE BUTILENO) - PBS

5.1.1 Espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR)

O espectro de FTIR do PBS sintetizado no laboratório é mostrado na Figura 12.

Figura 12: Espectro FTIR do PBS sintetizado



Fonte: Elaborado pelo autor

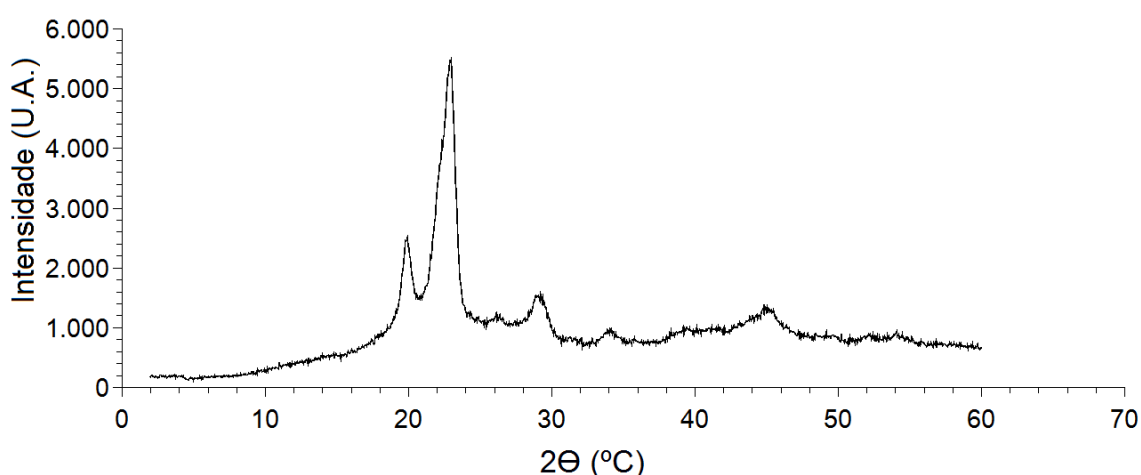
Na região de grupos, a banda em torno de 3430 cm⁻¹ pode ser atribuída ao grupo terminal hidroxila no PBS (FERREIRA *et al.*, 2015). Além disso, bandas em 2946 e 1335 cm⁻¹ são atribuídas às vibrações assimétricas e simétricas de deformação de grupos -CH₂- na cadeia principal do PBS, respectivamente (PHUA; CHOW; MOHD ISHAK, 2011).

As fortes bandas de absorção características do PBS em aproximadamente 1716 cm^{-1} são atribuídas ao alongamento vibracional da ligação C=O, as bandas em 1164 e 1207 cm^{-1} podem ser atribuídas ao grupo éster C-O-C e as bandas em 1046 cm^{-1} ao alongamento vibracional da ligação O-C-C (KIM *et al.*, 2006).

5.1.2 Difração de raios X (XRD)

Informação sobre a estrutura cristalina do PBS foi obtida através de medições de XRD. A Figura 13 mostra os difratogramas do poliéster.

Figura 13: Difratograma do PBS



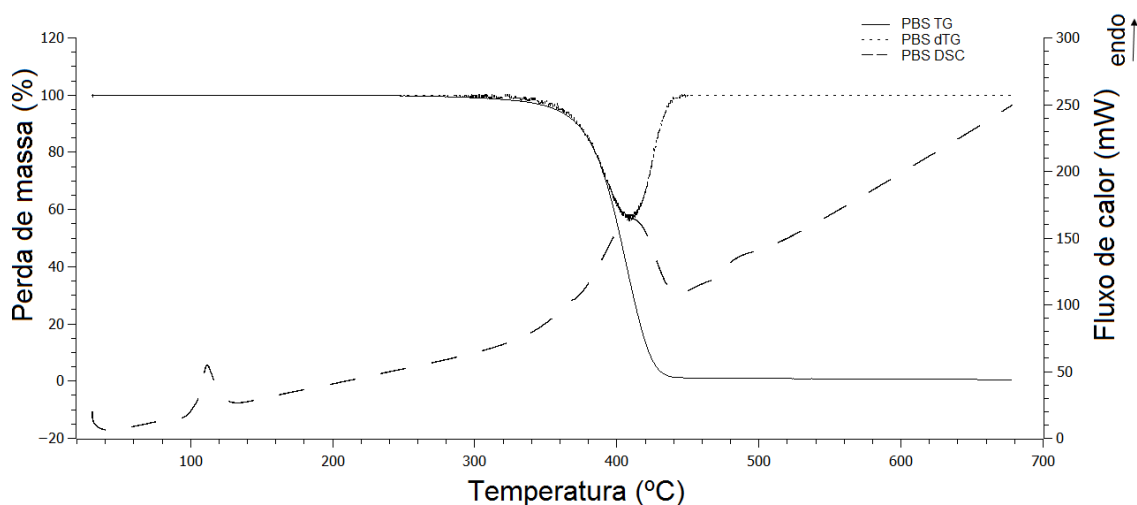
Fonte: Elaborado pelo autor

Como pode ser visto, os índices de Miller correspondentes aos picos do PBS são observados em $2\theta = 19.95$ (002), 22.93 (110) e 29.17 (111), respectivamente (NIKOLIC; DJONLAGIC, 2001). Além disso, é possível observar comportamento semi-cristalino do PBS, devido a presença de halos amorfos e picos cristalinos (NIKOLIC; DJONLAGIC, 2001).

5.1.3 Análise termogravimétrica e fluxo de calor simultâneo

A Figura 14 apresenta o termograma de TG/DSC simultâneo obtido para o PBS.

Figura 14: Termograma do PBS contendo as informações de perda de massa (linha contínua), derivada da perda de massa (linha pontilhada) e fluxo de calor (linha tracejada).



Fonte: Elaborado pelo autor

A curva de TG apresentada na Figura 14 representa a perda de massa (em %) e a curva de DTG, a derivada desta perda em função da temperatura (em °C). Para o polímero PBS observa-se apenas um evento de perda de massa, na faixa de 320-500°C, associado à degradação da matriz polimérica. A amostra de PBS apresenta 0,511% de massa residual.

Na curva de DSC é possível observar um pico endotérmico em 111,7°C, referente à T_m do polímero, calculada pelo máximo do pico endotérmico de fusão (KIM *et al.*, 2001). A temperatura encontrada corresponde com a proposta pela literatura, indicando que a síntese proposta está de acordo para produção do poliéster alifático de interesse. A Tabela 1 indica as principais informações térmicas do polímero sintetizado.

Tabela 1: Resultados térmicos obtidos da curva de DSC

Amostra	T_m (°C)	ΔH_f (J/g)	X_c (%)	T_d (°C)	ΔH_d (J/g)
PBS	111,7	64,75	58,71	409,35	413,44

Fonte: Elaborado pelo autor

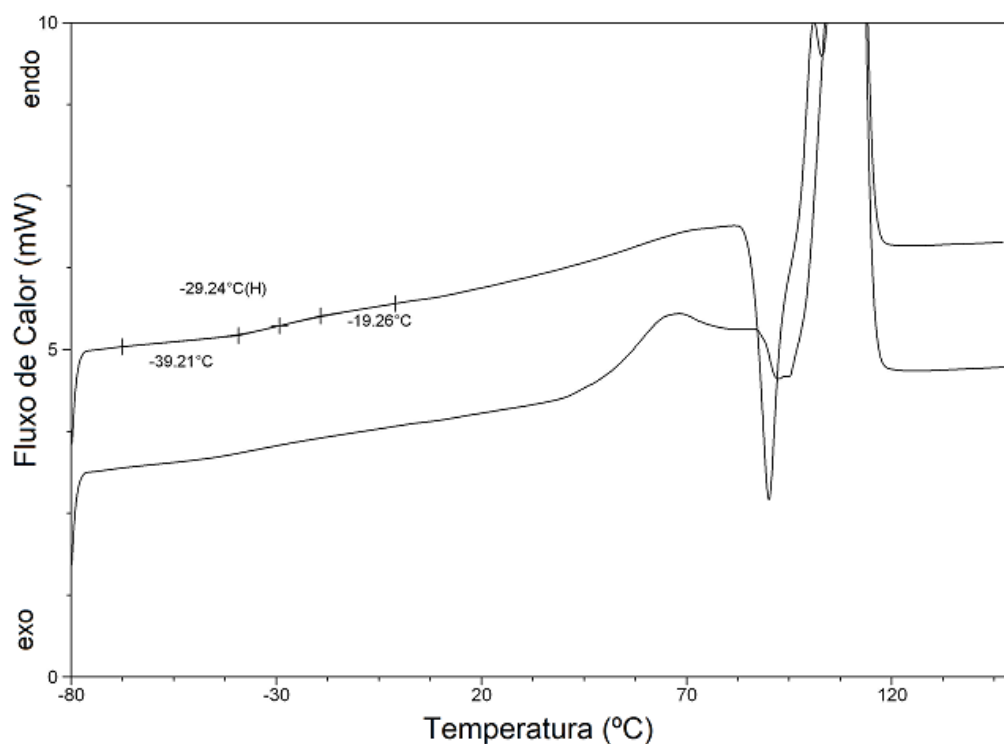
É importante destacar que o valor teórico da entalpia de formação para uma amostra 100% cristalina de PBS é igual a 110,3 J/g. Como o valor de ΔH_f encontrado é de 64,75 J/g, corresponde a um valor de 58,71% de cristalinidade para o polímero, pode-se observar uma característica semi-cristalina do PBS

sintetizado. Além disso, o valor de ΔH_f confirma a identidade semi cristalina do material proposta pelo teste anterior de XRD.

5.1.4 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A análise de DSC foi repetida em outro equipamento adequado de modo a estudar a temperatura de transição vítrea (T_g) do PBS, uma vez que no equipamento de TG/DSC simultâneo utilizado no subtópico anterior não é possível atingir a temperatura teórica proposta para encontrar a T_g do PBS. O resultado da análise de DSC é indicado na Figura 15.

Figura 15: Verificação da T_g no termograma obtido para o PBS



Fonte: Elaborado pelo autor

É possível foi verificar a T_g do poliéster indicada por uma deflexão da linha de base, correspondente ao valor de $-29,24^\circ\text{C}$. Esta temperatura encontrada está de acordo com o previsto para o PBS comercial, na faixa entre 37°C a -18°C (KIM *et al.*, 2006).

5.1.5 Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC)

A avaliação da massa molar média para o polímero foi analisada por SEC. Nesta análise são obtidos os resultados de massa molar numérica média (M_n) e massa molar ponderal média (M_w), além do índice de polidispersão (CANEVAROLO JR., 2003). Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados obtidos na análise de SEC

Amostra	M_n (Da)	M_w (Da)	Polidispersão (M_w/M_n)
PBS	2760	11862	4,298

Fonte: Elaborado pelo autor

Vale destacar que nesse trabalho foi utilizado o ácido fosfórico como catalisador. Com isso, a polimerização do PBS gerou um polímero de massa molar mais baixa do que as sínteses preparadas com outros catalisadores, como o tetrabutóxido de titânio ou com o uso de extensores de cadeia, onde os valores de M_n são maiores a 6000 (CHRISAFIS; PARASKEVOPOULOS; BIKIARIS, 2005; FERREIRA *et al.*, 2015). Esse valor de M_n encontrado é adequado para aplicação em estudos de liberação controlada de fármacos (BODMEIER; OH; CHEN, 1989).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS DE PBS PREPARADAS

5.2.1 Percentual de rendimento

O rendimento percentual foi calculado através da razão entre as massas de micropartículas obtidas após o preparo da emulsão e a massa inicial de polímero carregada (0,3g de PBS). As sínteses foram feitas em triplicata e a média dos valores de rendimento obtida encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3: Percentual de rendimento para as microesferas vazias

	Média (%)	Desvio padrão
PBS Clorofórmio	73,50	8,06
PBS Diclorometano	78,91	6,20

Fonte: Elaborado pelo autor

Os rendimentos da produção de microesferas de PBS foram elevados, maiores que 70%. Porém, podem ter ocorrido perdas durante a recuperação das microesferas na etapa de lavagem das partículas.

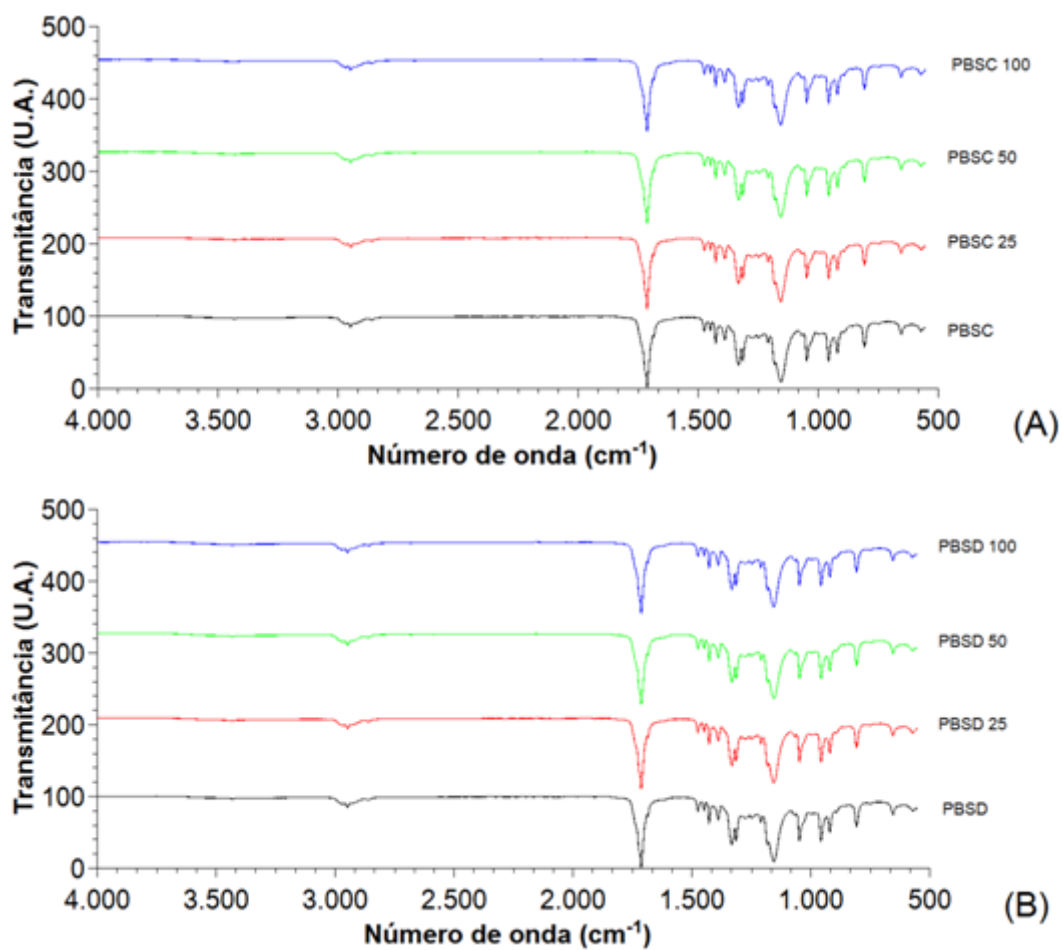
Após a pesagem dos materiais para verificação de rendimento, as amostras foram divididas em 4 conjuntos sendo uma mantida sem irradiação para controle e as outras três irradiadas à 25kGy (PBS 25), 50kGy (PBS 50) e 100kGy (PBS 100).

5.2.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com reflectancia total atenuada

Na análise de infravermelho é possível a identificação qualitativa do material através das ligações químicas da estrutura comparando-as com o encontrado na literatura (SILVERSTEIN *et al.*, 2014). Os espectros obtidos para as microesferas de PBS, variando o solvente utilizado e a dose de radiação, encontram-se na Figura 16.

Conforme observado, não é possível a visualização de diferenças significativas entre as bandas dos espectros. Devido a isso, podem ser usadas outras ferramentas para esta comparação. Especificamente neste caso, optou-se pelo uso da técnica dos mínimos quadrados, que permite calcular a correlação e o erro médio quadrático (RMSE) entre a população em estudo e a modelo. Entre estes dois, o RMSE está relacionado com o ajuste entre os dados experimentais e o modelo, sendo considerado uma importante ferramenta de comparação entre as populações (KELLEY E LAI, 2011).

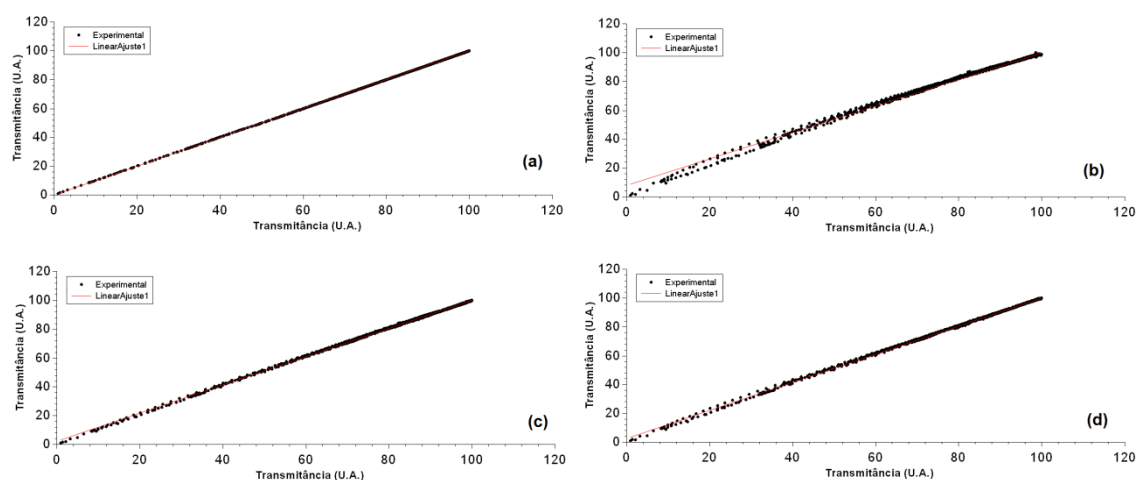
Figura 16: Espectro FTIR das microesferas preparadas a partir do PBS, variando o solvente orgânico. Em (a) clorofórmio e em (b) diclorometano.



Fonte: Elaborado pelo autor

A Figura 17 e Figura 18 apresentam as principais observações obtidas com o uso desta técnica.

Figura 17: Análise comparativa das transmitâncias das microesferas usando clorofórmio (a) não irradiadas e não irradiada, (b) não irradiada e 25kGy, (c) não irradiada e 50kGy e (d) não irradiadas e 100kGy



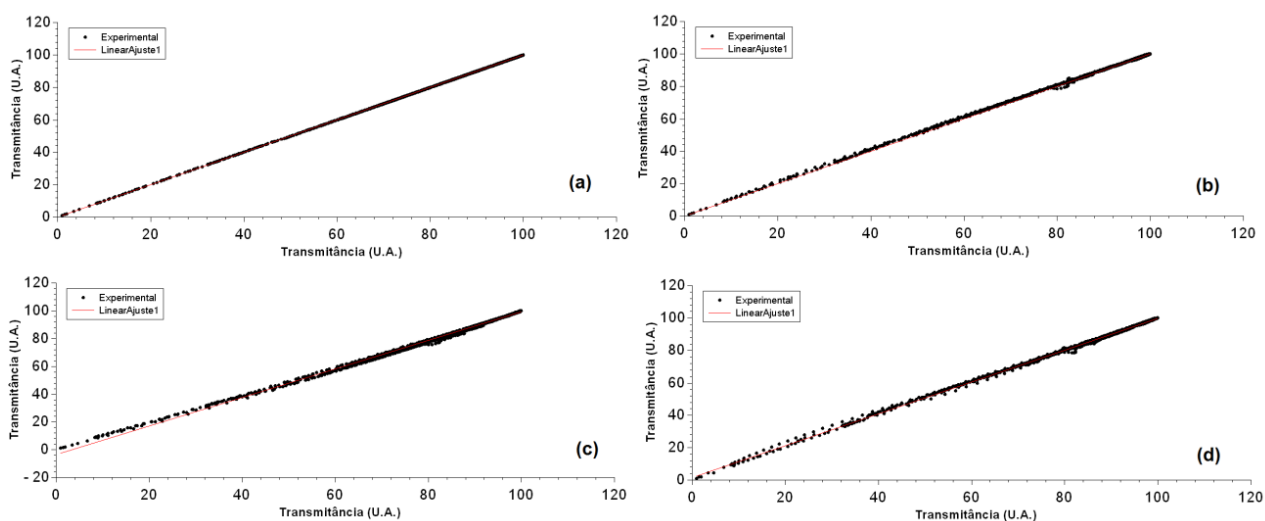
Fonte: Elaborado pelo autor

A Figura 17 mostra a transmitância das amostras irradiadas em comparação com a transmitância da formulação de microesfera, não irradiada. Para a Figura 17(a), a transmitância do PBSC é comparada com a transmitância do próprio PBSC. Essa comparação serve de base para os outros sistemas, permitindo o cálculo da correlação e do RMSE, fornecendo valores iguais a 1,0 e 0,0, respectivamente.

A Figura 17(b) apresenta a comparação entre a transmitância do PBSC irradiado a 25kGy *versus* a transmitância do PBSC não irradiado. É possível perceber um pequeno desvio da linearidade. A mesma comparação foi feita para a Figura 17 (c) que compara o PBSC irradiado a 50kGy e para a Figura 17 (d) que compara o PBSC irradiado a 100kGy.

A mesma análise foi proposta para as formulações de PBS em diclorometano e são apresentadas na Figura 18.

Figura 18: Análise comparativa das transmitâncias das microesferas usando diclorometano (a) não irradiadas e não irradiada, (b) não irradiada e 25kGy, (c) não irradiada e 50kGy e (d) não irradiadas e 100kGy



Fonte: Elaborado pelo autor

A comparação entre os dados de RMSE dos sistemas após diferentes dosagens de irradiação- γ é apresentada na Tabela 4. Na formulação de PBSC, a radiação de 25kGy é a que provoca um maior desajuste entre os dados experimentais e o modelo. Com o aumento da dose de radiação, os valores de RMSE são reduzidos. Já para as formulações de PBS com diclorometano a irradiação de 50kGy provocou um maior desajuste, conseqüentemente, maior alteração na estrutura química das microesferas.

Tabela 4: Relação entre os espectros de FTIR do polímero à 0kGy e irradiados a diferentes doses

Sistemas	RMSE	Sistemas	RMSE
PBSC	0,000	PBSD	0,000
PBSC 25	0,956	PBSD 25	0,340
PBSC 50	0,360	PBSD 50	0,836
PBSC 100	0,350	PBSD 100	0,445

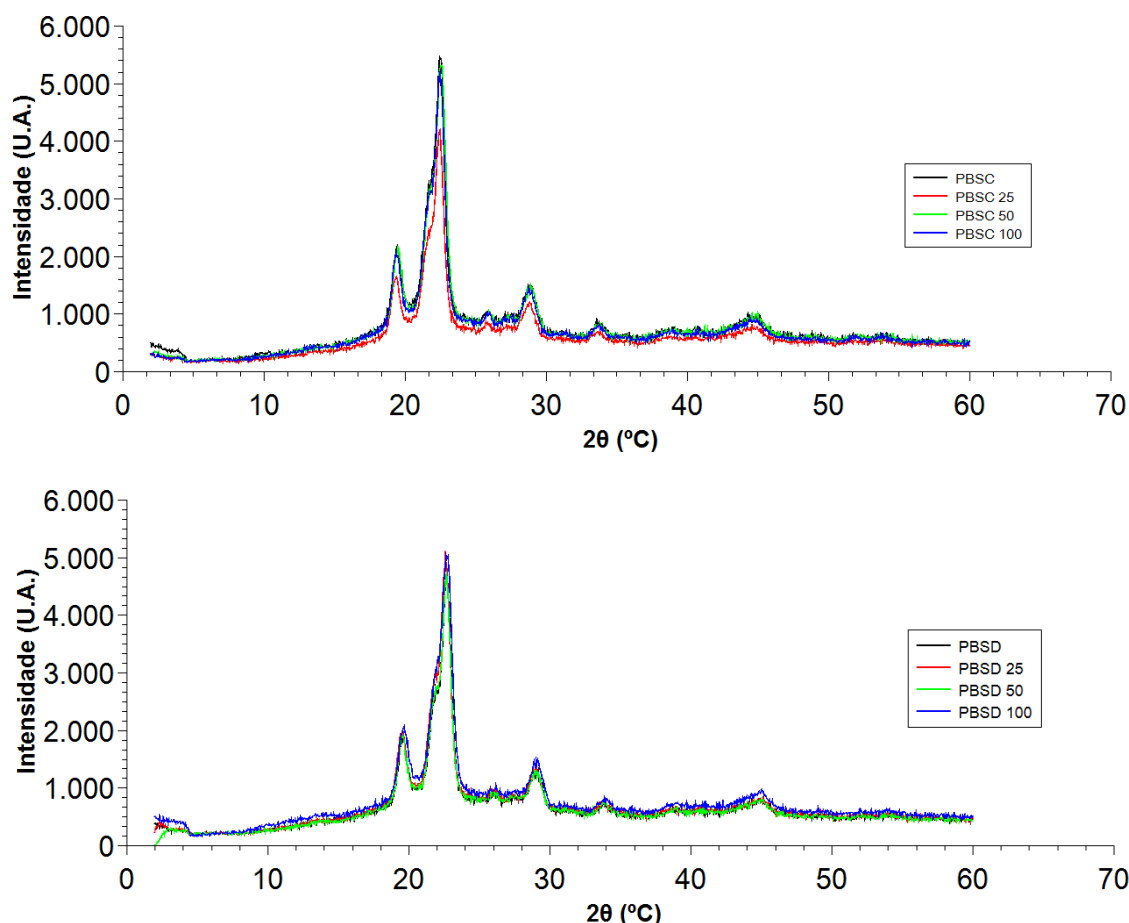
Fonte: Elaborado pelo autor

5.2.3 Difração de raios X (XRD)

O espectro de XRD das microesferas não irradiadas e irradiadas a diferentes doses é mostrado na Figura 19. Os picos de difração principais ocorrem em 2θ , aproximadamente, 19.45° , 22.45° e 28.95° (NIKOLIC;

DJONLAGIC, 2001). O perfil dos halos mostra que as microesferas de PBS são parcialmente cristalinas com uma fase amorfa dominante.

Figura 19: Padrões de difração de raios-x para as microesferas após irradiação preparadas com clorofórmio (a) e diclorometano (b).



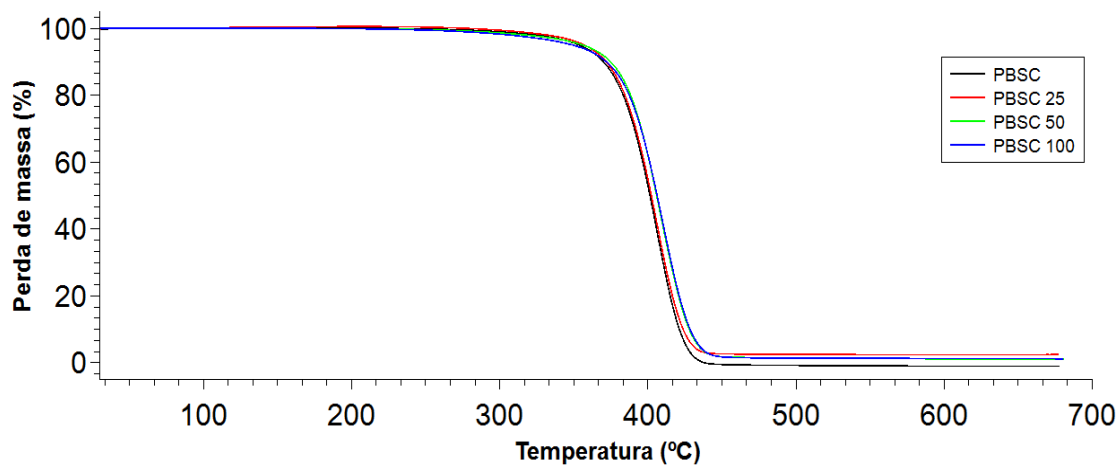
Fonte: Elaborado pelo autor

É interessante notar que há ligeiro aumento da intensidade dos picos de difração a dose de 50kGy e 100kGy. O aumento na intensidade de pico sugere um arranjo mais ordenado após a irradiação gama (MALLICK *et al.*, 2006).

5.2.4 Análise Termogravimétrica e Fluxo de Calor simultâneo

O comportamento térmico dos materiais após a irradiação foi estudado por análise TG/DSC simultâneo. A Figura 20 apresenta o termograma das microesferas de PBS antes e após a irradiação. A perda de peso inicial do PBS ocorre cerca de 240 °C, valor igualmente próximo para todas as amostras irradiadas.

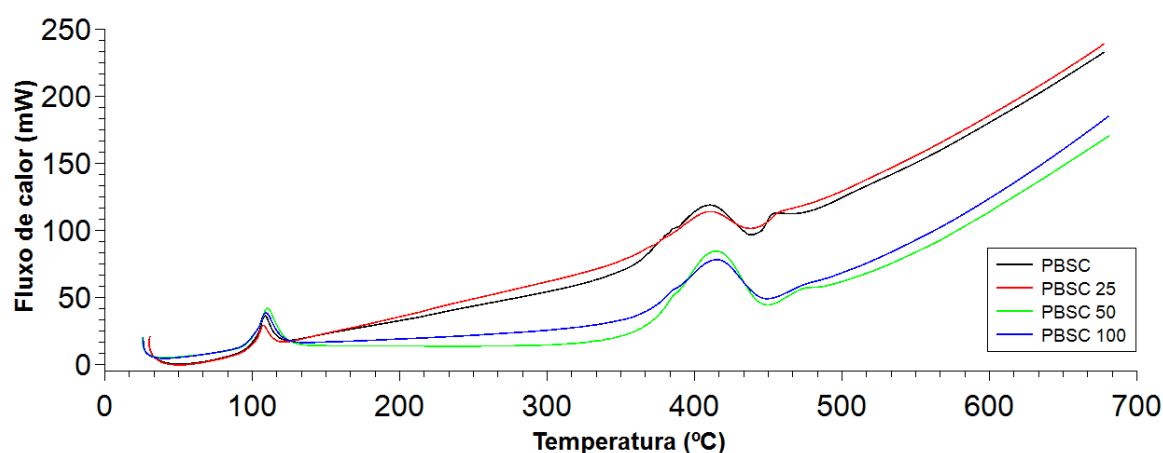
Figura 20: Termograma das microesferas de clorofórmio não irradiadas e irradiadas à 25kGy, 50kGy e 100kGy



Fonte: Elaborado pelo autor

A curva de DSC das microesferas com clorofórmio antes e após a irradiação encontra-se na Figura 21. A diferença nas curvas de PBSC e PBSC 25 em comparação às curvas de PBSC 50 e PBSC 100 está relacionada a capacidade calorífica do material.

Figura 21: Curva DSC das microesferas de clorofórmio não irradiadas e irradiadas à 25kGy, 50kGy e 100kGy

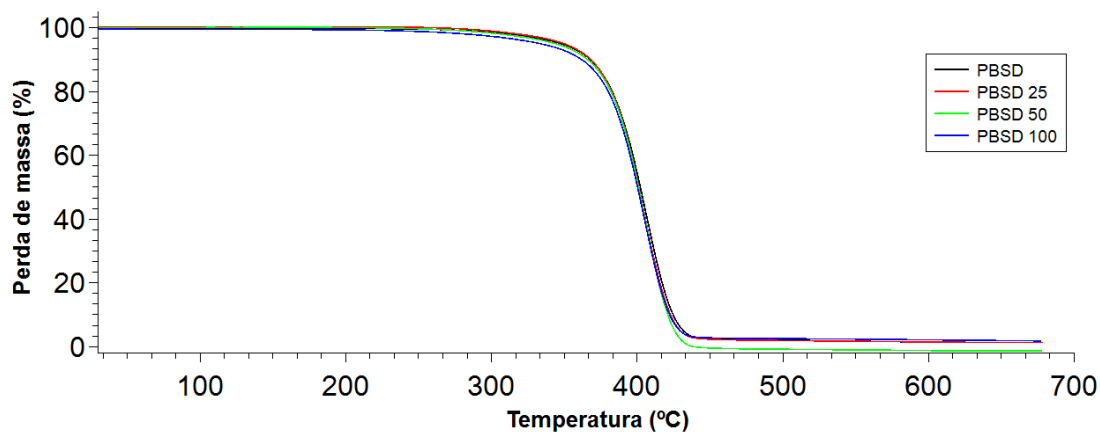


Fonte: Elaborado pelo autor

Para as microesferas de PBS preparadas usando diclorometano, as curvas de TG e DSC estão apresentadas na Figura 22 e Figura 23,

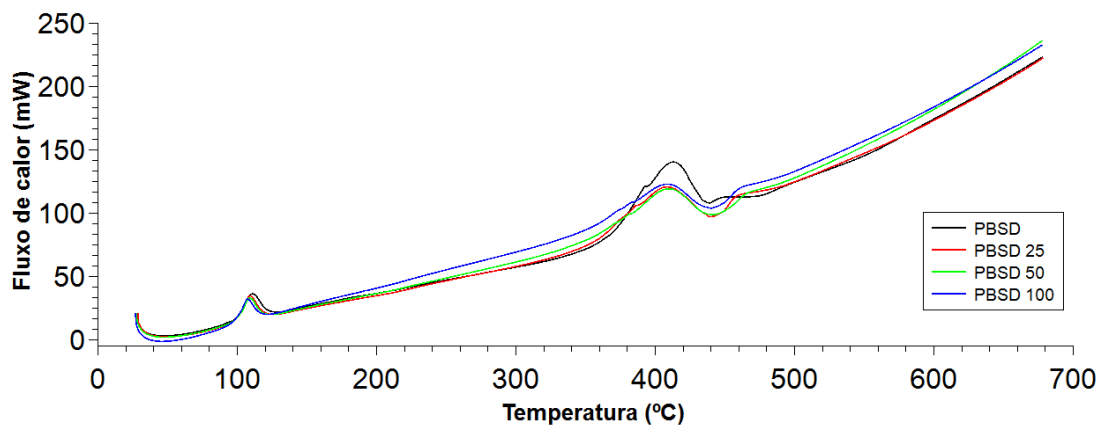
respectivamente. Semelhante à Figura 20, as amostras de PBS com diclorometano não irradiadas e irradiadas começam a sua perda de peso inicial na região de 210°C-240°C e degradam-se principalmente acima de 300°C.

Figura 22: Termograma das microesferas de diclorometano não irradiadas e irradiadas à 25kGy, 50kGy e 100kGy



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 23: Curva DSC das microesferas de diclorometano não irradiadas e irradiadas à 25kGy, 50kGy e 100kGy



Fonte: Elaborado pelo autor

A Tabela 5 apresenta as informações obtidas dos gráficos acima, como a temperatura de fusão (T_m), a entalpia de fusão cristalina (ΔH_f) e os valores de temperatura de máxima degradação encontrados tanto para a curva de DSC quanto para a curva de TG. Além disso, com a entalpia de fusão cristalina é possível calcular a cristalinidade de cada material preparado.

Tabela 5: Efeito da irradiação sobre o comportamento térmico das microesferas

	Tm (°C)	ΔH_f (J/g)	Xc (%)	Td (°C)*	ΔH_d (J/g)	Td (°C)**
PBSC	108,97	88,90	80,60	407,35	419,84	406,46
PBSC 25	107,60	84,20	76,34	407,49	379,85	409,82
PBSC 50	110,67	105,33	95,49	412,43	386,39	410,41
PBSC 100	109,77	101,12	91,68	413,01	357,98	410,60
PBSD	110,69	83,37	75,58	411,40	447,20	404,33
PBSD 25	109,36	83,84	76,01	406,14	468,79	405,69
PBSD 50	108,92	80,55	73,03	407,60	447,02	407,15
PBSD 100	107,56	80,89	73,34	406,80	422,71	407,25

Fonte: Elaborado pelo autor

*dado obtido da curva de DSC

**dado obtido da curva de TG

Verificou-se que para as microesferas preparadas com diclorometano o valor de Tm é diminuído com o aumento da irradiação, tal como observado em outro estudo (SUHARTINI *et al.*, 2003). Entretanto este comportamento não pôde ser observado nas microesferas preparadas em clorofórmio.

Este comportamento da Tm nas micropartículas de PBSD está intimamente relacionado com o tamanho do cristalito. Segundo autores, a diminuição da temperatura de fusão nesses casos pode ser atribuída à diminuição do tamanho do cristalito, resultando na diminuição da região cristalizável nas moléculas de PBS (KIM *et al.*, 2015). É mencionado que a reticulação por radiação ionizante pode levar à diminuição do tamanho de cristalito das moléculas de PBS e conseqüentemente, responsável pela diminuição da temperatura de fusão do PBS (KIM *et al.*, 2015).

Além disso, os resultados apresentados de Xc indicam alterações na cristalinidade do PBS com diferentes doses absorvidas. Para a formulação de PBSC, a dose de radiação de 25kGy provoca uma diminuição da cristalinidade enquanto que para doses de 50-100 kGy, a cristalinidade aumenta. Já nas formulações de PBSD, os valores de Xc variam de acordo com a dose de radiação aplicada.

5.2.5 Espalhamento de luz (Mastersizer)

A análise de dispersão de luz dinâmica foi proposta a fim de verificar a influência de diferentes parâmetros experimentais, na etapa de emulsificação, sobre o tamanho médio das microesferas. Os parâmetros avaliados foram secagem das partículas e tipo de solvente orgânico.

As amostras foram analisadas antes da liofilização e posteriormente ao processo de liofilização até total remoção de água dos materiais. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6: Efeito da etapa de secagem e do tipo de solvente no tamanho médio das microesferas preparadas

	D (v; 0,1) μm	D (v; 0,5) μm	D (v; 0,9) μm
PBSD - antes liofilização	6,26 \pm 1,48	15,33 \pm 1,48	109,79 \pm 1,48
PBSD - após liofilização	7,00 \pm 1,30	15,72 \pm 1,30	90,63 \pm 1,30
PBSC - antes liofilização	7,92 \pm 3,39	16,55 \pm 3,39	25,49 \pm 3,39
PBSC - após liofilização	9,69 \pm 3,06	17,04 \pm 3,06	25,30 \pm 3,06

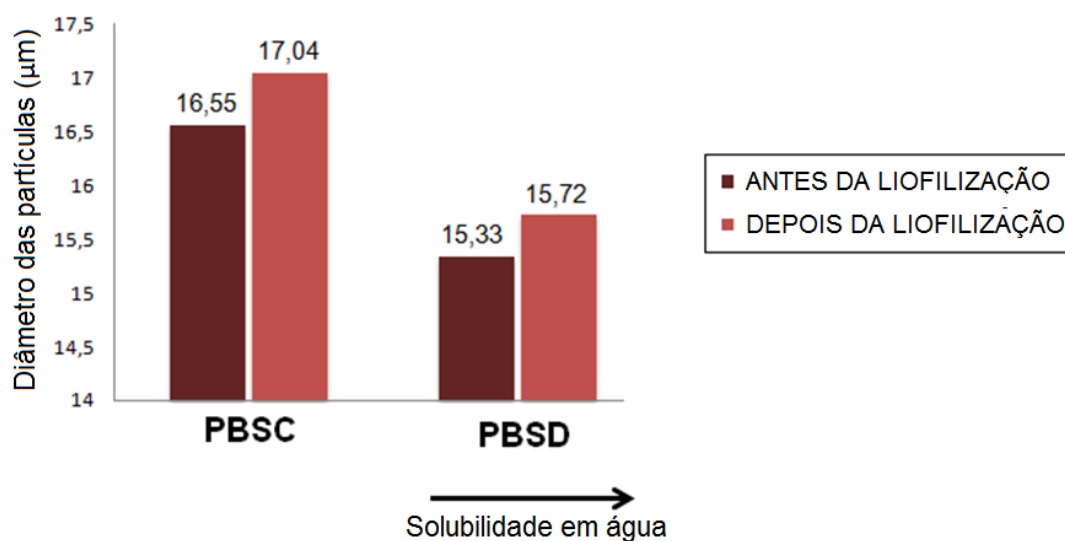
Fonte: Elaborado pelo autor

As esferas de PBS preparadas com diclorometano apresentam tamanho médio em torno de 15,33 μm e posteriormente à liofilização, o valor médio encontra-se em torno de 15,72 μm . Essa diferença está dentro da faixa de erro, entretanto, é possível observar uma maior distribuição de tamanho para as micropartículas antes da secagem dos materiais. O mesmo efeito pode ser observado para as microesferas usando clorofórmio como solvente: antes da liofilização as microesferas apresentaram tamanho médio de 16,55 μm e após a liofilização, esse valor aumentou ligeiramente para 17,04 μm . Com isso, é possível afirmar que a etapa de secagem das microesferas de PBS preparadas não altera a distribuição de tamanho das partículas, sem gerar fatores indesejáveis como a aglomeração.

Além disso, de acordo com a solubilidade do PBS, os solventes utilizados na fase orgânica foram diclorometano e clorofórmio. Como mostrado na Figura 24, menores valores de tamanho foram encontrados utilizando diclorometano (15,72 μm) enquanto o uso de clorofórmio resultou em partículas de tamanho médio maior (17,04 μm). Esse efeito é consequência da maior

miscibilidade de diclorometano em água, enquanto a miscibilidade é diminuída em clorofórmio/água (HANSEN, 2007). Conforme há um aumento da miscibilidade entre a fase orgânica e a fase aquosa na etapa de emulsificação, a difusão do solvente na água é melhorada e mais rapidamente acontece a dispersão de polímero em água, resultando na formação de gotículas menores e mais homogêneas (FESSI *et al.*, 1989).

Figura 24: Influência do solvente e liofilização sobre o tamanho das partículas



Fonte: Elaborado pelo autor

O efeito da irradiação- γ sobre a distribuição de tamanho das microesferas de PBS também foi investigada pelo Mastersizer para ambas as formulações, como mostrado na Tabela 7. As microesferas tem seu tamanho micrométrico preservado após a irradiação. Entretanto, é possível observar que a irradiação provoca um ligeiro acréscimo de tamanho nas microesferas, comparados aos valores de diâmetros para as partículas não irradiadas.

Tabela 7: Efeito da irradiação- γ sobre o tamanho médio das microesferas

	D (v; 0,5) µm
PBSC (não irradiada)	17,04 ± 3,25
PBSC 25	18,15 ± 2,67
PBSC 50	20,52 ± 2,53
PBSC 100	18,32 ± 3,01
PBSD (não irradiada)	15,72 ± 2,87
PBSD 25	24,78 ± 3,32

PBSD 50	23,74 ± 2,67
PBSD 100	24,31 ± 2,71

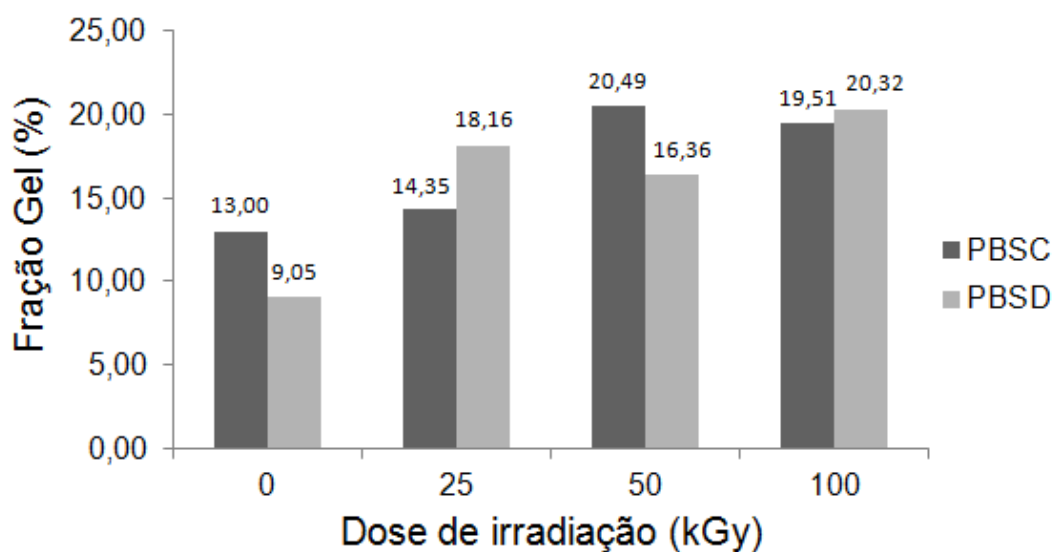
Fonte: Elaborado pelo autor

5.2.6 Medição de fração gel

A avaliação da fração gel das microesferas após a irradiação- γ é apresentada na Figura 25. As frações de gel de microesferas de PBS não irradiadas apresentam valores de 13% para as esferas preparadas em clorofórmio e 9,05% para as esferas preparadas em diclorometano, indicando que ocorre uma geleificação mínima dos materiais (KIM *et al.*, 2015). Após a irradiação de 25kGy a fração de gel das microesferas preparadas é abruptamente aumentada para 14,35% e 18,16% nas microesferas preparadas com clorofórmio e diclorometano, respectivamente. É possível verificar que para as microesferas em clorofórmio a fração gel aumentou gradualmente para 20,49% à 50kGy e posteriormente, ao receber a dose de 100kGy, teve sua fração gel ligeiramente diminuída à 19,51%.

Para as microesferas preparadas com diclorometano, com o aumento da irradiação para 50kGy e 100kGy, os valores encontrados para a fração gel foram de 16,36% e 20,32%, respectivamente.

Figura 25: Efeito da dose de radiação- γ na fração de gel de PBS puro e microesferas de PBS irradiadas a 25kGy, 50kGy e 100kGy



Fonte: Elaborado pelo autor

5.2.7 Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC)

A modificação da massa molar média de microesferas de PBS, preparadas com diferentes solventes, após irradiação gama é mostrada na Tabela 8.

Tabela 8: Resultados de massa molar e polidispersão das amostras de PBS

	Mn (Da)	Mw (Da)	Polidispersão (Mw/Mn)
PBS	2760	11862	4,30
PBSC 25	3821	7921	2,07
PBSC 50	5001	7758	1,55
PBSC 100	2680	6255	2,33
PBSD 25	4179	8160	1,95
PBSD 50	5326	8857	1,66
PBSD 100	4613	8444	1,83

Fonte: Elaborado pelo autor

Verificou-se que massa molar média (Mn) das microesferas é de 2760 Da na amostra não irradiada, sendo possível observar um ligeiro aumento nos valores de massa molar média quando as amostras foram submetidas à irradiação. Entretanto, é possível observar que a massa ponderal média (Mw) apresenta resultados opostos.

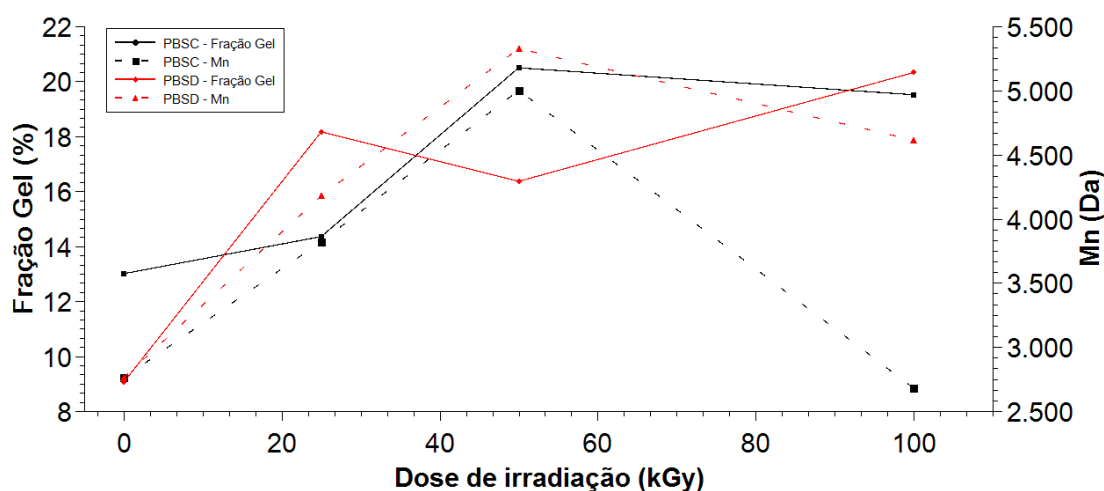
As cadeias maiores de PBS são mais representativas no valor de Mw. É possível observar que, com a irradiação e posterior aumento da dose, os valores de Mw tendem a diminuir significativamente. Este resultado leva a crer que, de fato, a irradiação seja um processo que gere concomitantemente, competição entre a degradação e reticulação dos materiais. As cadeias maiores de PBS tendem a quebrar, diminuindo os valores observados em Mw, enquanto que a alteração nos valores de Mn pode ser devido à ligação das cadeias menores de PBS que são recombinadas, aumentando os valores de Mn até um ponto ótimo de 50kGy.

Além disso, é possível verificar o efeito da irradiação sobre a polidispersão dos materiais. A polidispersão (PDI) do PBS antes da irradiação é de 4,30, resultado esperado para polímeros produzidos por policondensação (YOKOZAWA; YOKOYAMA, 2007). Depois que esses materiais são atingidos por raios gama sofrendo um processo de reticulação das cadeias, a PDI é alterada para valores que chegam a 46% e 64% menores que o valor inicial,

para o PBSC100 e PBSC50, respectivamente. Entretanto, para as amostras irradiadas a 100kGy é possível verificar um leve acréscimo no valor de PDI. Isso pode estar relacionado à ramificação das cadeias (HAUGEN *et al.*, 2007).

A relação entre a Mn dos materiais e o teor de reticulado pode ser observada na Figura 26.

Figura 26: Alterações na fração gel do polímero (linha contínua) e na massa molar numérica média (Mn - linha tracejada) em função da dose de radiação.



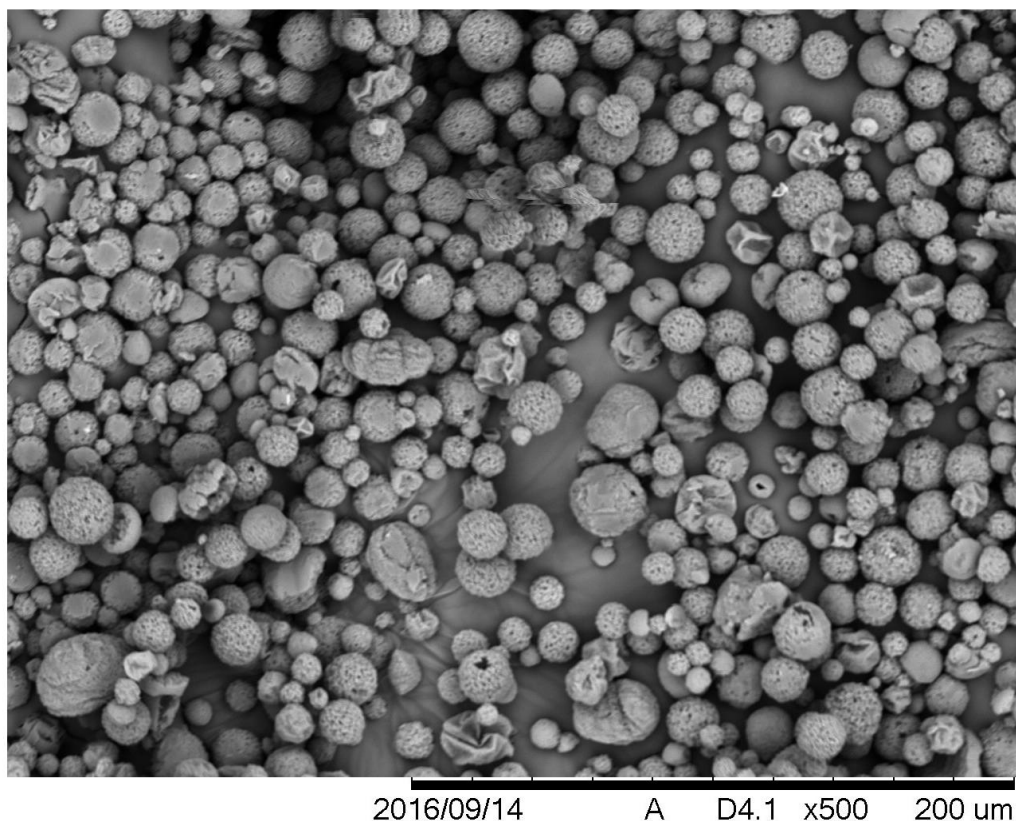
Fonte: Elaborado pelo autor

É possível perceber que, com o aumento da irradiação (linha contínua) há um aumento da Mn das microesferas em 25kGy e 50kGy, devido à ligação e aumento das cadeias poliméricas. Entretanto, em 100kGy, há uma redução do valor de Mn embora o teor de reticulação tenha aumentado. Isso ocorre devido à fração gel dos materiais aumentar e conseqüentemente, tornar mais difícil à solubilização das amostras. Como o material é filtrado antes de ser injetado no GPC, a fração gel fica retida e somente a fração solúvel é analisada, gerando menores valores de Mn.

5.2.8 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

A morfologia das microesferas antes da irradiação e posteriormente ao tratamento com irradiação gama foi analisada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (SEM). As imagens para as microesferas produzidas utilizando diclorometano como solvente são apresentadas na Figura 27 e Figura 28.

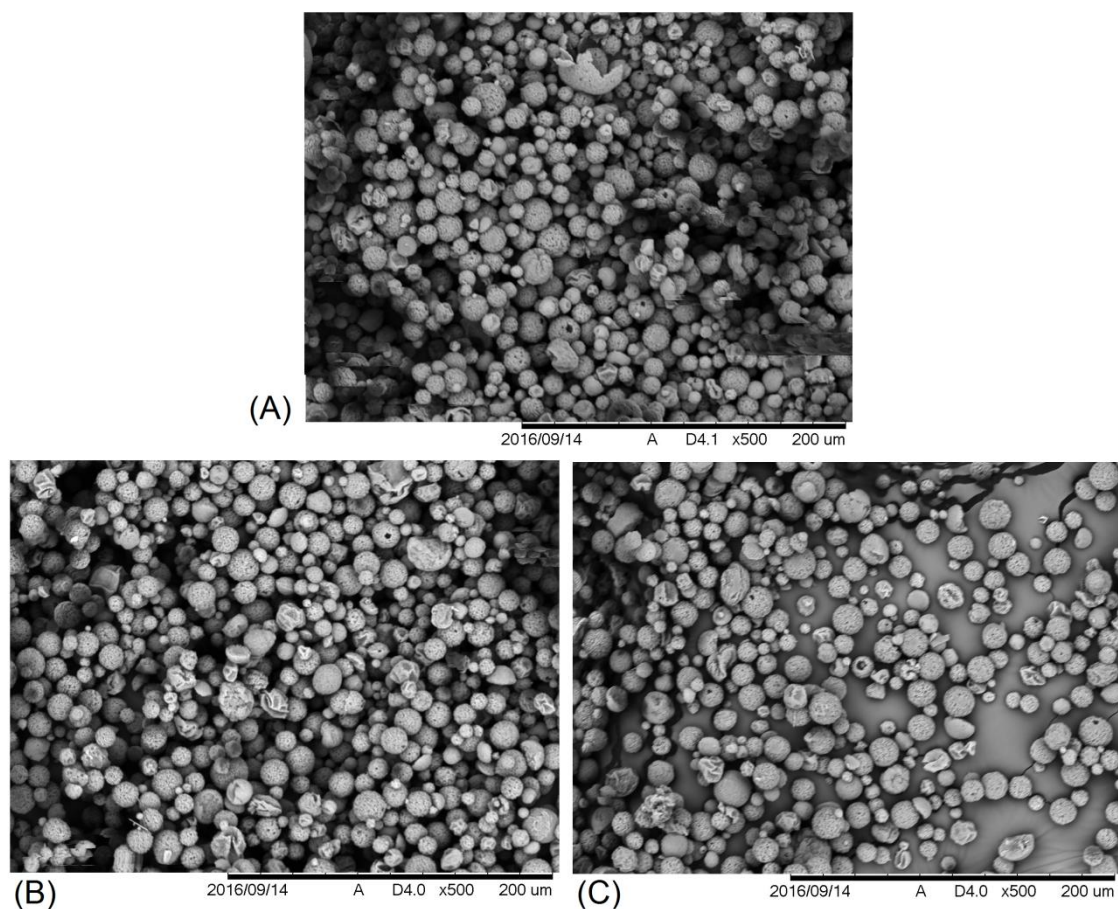
Figura 27: Microscopia das microesferas de PBS preparadas com diclorometano sem irradiação.



Fonte: Elaborado pelo autor

As microesferas não irradiadas e preparadas com diclorometano apresentam formato esférico e superfície porosa, com uma estrutura de poros abertos. Este tipo de morfologia superficial áspera é típico de sistemas preparados com PBS (BRUNNER *et al.*, 2011). Além disso, as gotas de água presas no interior das microesferas após a liofilização deixam espaços vazios nos materiais. Como a energia superficial da água é muito alta, as gotas de água internas podem coalescer umas com as outras, produzindo uma matriz porosa (YANG, 2001).

Figura 28: Microscopia das esferas de PBS preparadas com diclorometano (A) irradiada à 25kGy, (B) irradiada à 50kGy e (C) irradiada à 100kGy

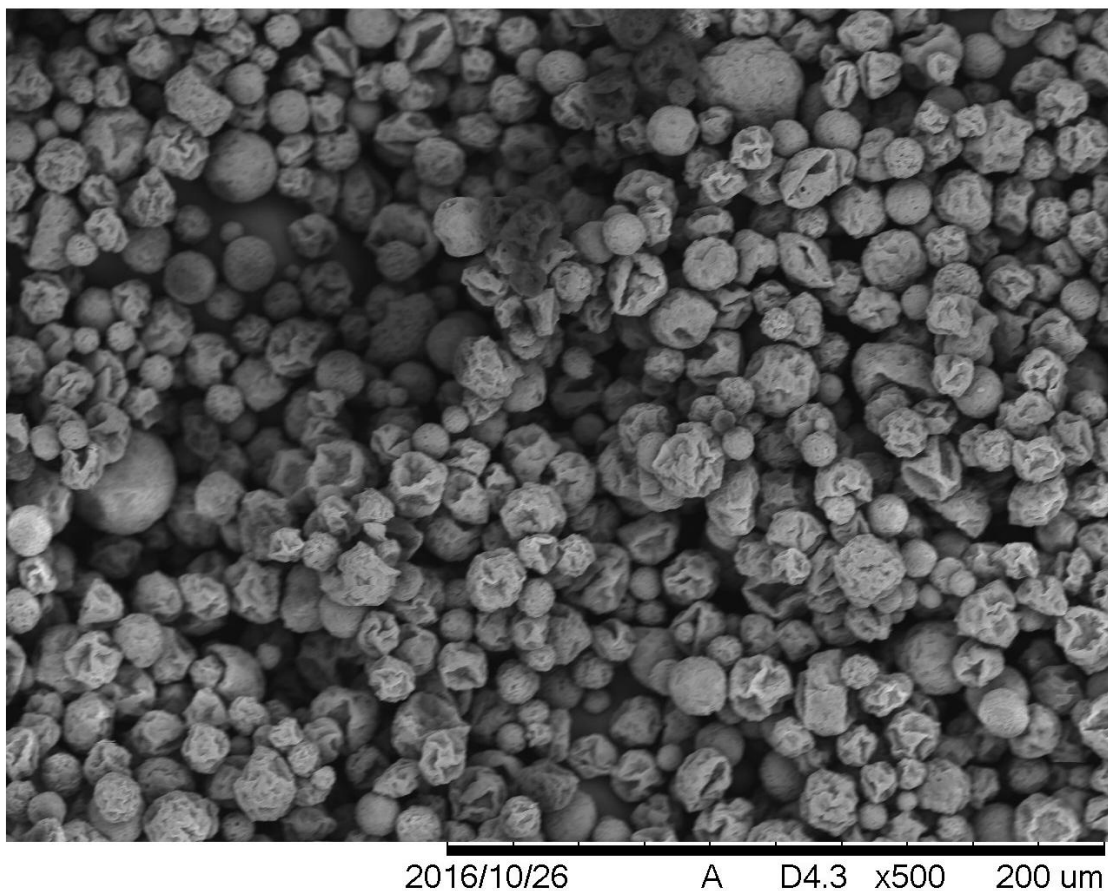


Fonte: Elaborado pelo autor

Embora aplicada dose de radiação de 25kGy, 50kGy e 100kGy nas microesferas de PBS com diclorometano, a morfologia superficial dos materiais permanece inalterada pela irradiação- γ , como descrito por outros trabalhos (MOHR; WOLFF; KISSEL, 1999). Além disso, alguns trabalhos afirmam que a irradiação- γ pode causar aglomeração ou agregação nas micropartículas preparadas (FERNÁNDEZ-CARBALLIDO *et al.*, 2006). Os materiais preparados nesse trabalho não parecem ter sofrido com aglomeração após o tratamento com a radiação ionizante, mantendo estabilidade dimensional e morfológica.

A microscopia também foi utilizada para avaliar a morfologia das microesferas produzidas com clorofórmio e é apresentada na Figura 29.

Figura 29: Microscopia das microesferas de PBS preparadas com clorofórmio, antes da irradiação

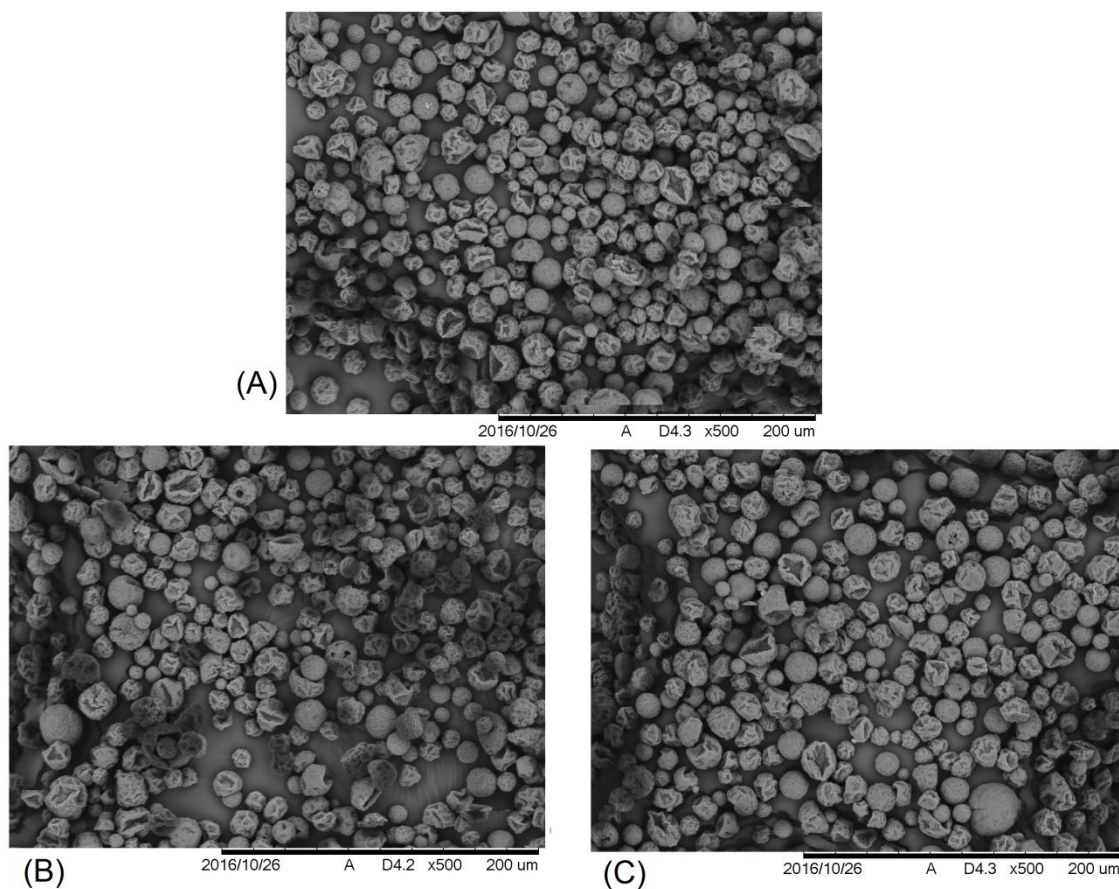


Fonte: Elaborado pelo autor

Pode ser visto que o preparo com clorofórmio confere uma superfície mais rugosa para as partículas, com um design de “uva passa”. Além disso, embora pequenas microesferas esféricas possam ser vistas, as microesferas com clorofórmio apresentaram maior irregularidade dimensional, diferentemente das preparadas com diclorometano onde era possível observar maior esfericidade.

A Figura 30 mostra a morfologia do exterior de microesferas de PBS submetidas a diferentes doses de irradiação.

Figura 30: Microscopia de microesferas de PBSC nas condições: (A) irradiada à 25kGy, (B) irradiada à 50kGy e (C) irradiada à 100kGy



Fonte: Elaborado pelo autor

É possível que o solvente além de influenciar no tamanho das partículas preparadas também seja responsável pela alteração na morfologia das esferas, uma vez que o tipo de solvente altere a viscosidade da fase orgânica e a taxa de evaporação. O diclorometano apresenta viscosidade de 0,44 enquanto o clorofórmio 0,57. À medida que a solução de polímero se torna mais viscosa pelo tipo de solvente, é necessária mais energia para quebrar a energia de superfície para formar as gotículas. Este fato pode aumentar a irregularidade da população de microesferas. Além disso, durante a fase de evaporação do solvente, estas partículas podem coalescer principalmente quando a taxa de evaporação do solvente for menor (no caso, para o clorofórmio), contribuindo para a formação de estruturas superficiais complexas (BRUNNER *et al.*, 2011).

5.2.9 Análise estatística e correlação dos resultados anteriores

Devido ao grande número de respostas encontradas nas caracterizações das microesferas vazias de PBS, foi proposta uma análise estatística de todas as variáveis estudadas, de modo a facilitar a visualização e compreensão dos resultados obtidos. As propriedades mensuradas nesse tópico para as microesferas de PBS sem a presença de algum ativo (microesferas vazias) foram inseridas no programa Statistica para avaliação da correlação entre os resultados. Nesse estudo, os parâmetros (fatores) levados em consideração foram o solvente usado (clorofórmio e diclorometano) e a dose de radiação. Os dados de entrada para a construção dessa análise encontra-se no Anexo 1. Os resultados de saída são mostrados na Tabela 9.

Em relação à influência do solvente nas características das microesferas obtidas, é possível observar que esta variável de entrada provoca alterações estatisticamente significativas na entalpia de fusão dos materiais e na entalpia de degradação. A mudança de clorofórmio para diclorometano provoca uma diminuição nos valores de entalpia de fusão e, conseqüentemente, provoca uma diminuição na cristalinidade dos materiais (X_c). Com isso, as microesferas produzidas com clorofórmio (apolar) são mais cristalinas do que as microesferas preparadas com o uso de diclorometano (polar) como solvente. Isso demonstra que mesmo pequena, a polaridade do diclorometano aumenta as interações entre esse solvente e a cadeia polimérica, o que facilita a dissolução, mas impede a completa remoção, levando a necessidade de menores valores de entalpia para a fusão do material.

Por outro lado, a dose de radiação produz alterações estatisticamente significativas na massa molar ponderal média (M_w) e na fração gel dos materiais. O aumento da irradiação afeta majoritariamente as cadeias maiores, fazendo com que as cadeias se quebrem e isso seja perceptível na diminuição de M_w . Entretanto, as cadeias grandes que foram quebradas ficam instáveis e logo são rearranjadas, ligando-se nas cadeias menores e provocando reticulação da matriz polimérica. Esse efeito da conseqüente reticulação é confirmado pelo teor de gel dos materiais. Com o aumento da dose de radiação, a fração gel ou fração insolúvel das micropartículas preparadas é aumentada.

Além disso, os dados da Tabela 9 permitem estabelecer correlações entre as variáveis complementares, ou seja, entre as respostas obtidas. Como exemplo, os valores de massa molar numérica média (M_n) influenciam diretamente na polidispersão e no diâmetro das micropartículas. O aumento de M_n é consequência da quebra de cadeias maiores (observado em M_w). Este rearranjo de ligações acaba tornando mais uniforme o tamanho das cadeias, influenciando na polidispersão. Quando maior o M_n , maior o rearranjo e menor é a polidispersão. Além disso, quanto ao diâmetro das partículas, o aumento de M_n gera microesferas de tamanho maiores.

A fração gel é outra variável complementar que apresenta significância estatística com a alteração de M_w e polidispersão. Com o aumento da fração gel os valores de M_w são diminuídos devido a quebra das cadeias mais longas e rearranjo das mesmas, aumentando a reticulação entre as cadeias. Além disso, os valores de polidispersão são diminuídos, consequência de cadeias mais homogêneas.

Tabela 9: Tabela de correlações gerada no Statistica. As correlações que apresentam significância estatística apresentam $p < 0.05$

	Solvente	Dose	Mn	Mw	PDI	Fr.Gel	Diam.	Tm	dHf	Td DSC	dHdeg	Td TGA	RMSE
Solvente	1.0000 p= ---	0.0000 p=1.00	.3285 p=.427	.2375 p=.571	-.0599 p=.888	-.1144 p=.787	.5467 p=.161	-.0534 p=.900	-.7168 p=.045	-.4028 p=.322	.8406 p=.009	-.7412 p=.035	-.0176 p=.967
Dose	0.0000 p=1.00	p=1.00 p= ---	.2828 p=.497	-.7445 p=.034	-.6278 p=.096	.8006 p=.017	.4444 p=.270	-.2432 p=.562	.2713 p=.516	.2137 p=.611	-.4442 p=.270	.5466 p=.161	.2932 p=.481
Mn	.3285 p=.427	.2828 p=.497	1.0000 p= ---	-.3586 p=.383	-.7954 p=.018	.5422 p=.165	.7861 p=.021	-.2135 p=.612	-.1301 p=.759	-.3015 p=.468	.2267 p=.589	.1660 p=.694	.5944 p=.120
Mw	.2375 p=.571	-.7445 p=.034	-.3586 p=.383	1.0000 p= ---	.8462 p=.008	-.8152 p=.014	-.4345 p=.282	.1649 p=.696	-.4183 p=.302	-.1989 p=.637	.5304 p=.176	-.7688 p=.026	-.5716 p=.139
PDI	-.0599 p=.888	-.6278 p=.096	-.7954 p=.018	.8462 p=.008	1.0000 p= ---	-.8207 p=.013	-.7468 p=.033	.2831 p=.497	-.1385 p=.744	.1036 p=.807	.1865 p=.658	-.5635 p=.146	-.7290 p=.040
Fr.Gel	-.1144 p=.787	.8006 p=.017	.5422 p=.165	-.8152 p=.014	-.8207 p=.013	1.0000 p= ---	.6699 p=.069	-.1544 p=.715	.4295 p=.288	.0501 p=.906	-.3234 p=.435	.6004 p=.116	.2972 p=.475
Diam.	.5467 p=.161	.4444 p=.270	.7861 p=.021	-.4345 p=.282	-.7468 p=.033	.6699 p=.069	1.0000 p= ---	-.3436 p=.405	-.2910 p=.484	-.5239 p=.183	.4199 p=.300	-.0508 p=.905	.4026 p=.323
Tm	-.0534 p=.900	-.2432 p=.562	-.2135 p=.612	.1649 p=.696	.2831 p=.497	-.1544 p=.715	-.3436 p=.405	1.0000 p= ---	.5642 p=.145	.7408 p=.036	.0483 p=.910	-.0984 p=.817	-.5825 p=.130
dHf	-.7168 p=.045	.2713 p=.516	-.1301 p=.759	-.4183 p=.302	-.1385 p=.744	.4295 p=.288	-.2910 p=.484	.5642 p=.145	1.0000 p= ---	.7784 p=.023	-.6965 p=.055	.6945 p=.056	-.2333 p=.578
Td DSC	-.4028 p=.322	.2137 p=.611	-.3015 p=.468	-.1989 p=.637	.1036 p=.807	.0501 p=.906	-.5239 p=.183	.7408 p=.036	.7784 p=.023	1.0000 p= ---	-.5649 p=.145	.4270 p=.291	-.3028 p=.466
dHdeg	.8406 p=.009	-.4442 0	.2267 p=.589	.5304 p=.176	.1865 p=.658	-.3234 p=.435	.4199 p=.300	.0483 p=.910	-.6965 p=.055	-.5649 p=.145	1.0000 p= ---	-.8995 p=.002	-.2098 p=.618
Td TGA	-.7412 p=.035	.5466 p=.161	.1660 p=.694	-.7688 p=.026	-.5635 p=.146	.6004 p=.116	-.0508 p=.905	-.0984 p=.817	.6945 p=.056	.4270 p=.291	-.8995 p=.002	1.0000 p= ---	.4707 p=.239
RMSE	-.0176 p=.967	.2932 p=.481	.5944 p=.120	-.5716 p=.139	-.7290 p=.040	.2972 p=.475	.4026 p=.323	-.5825 p=.130	-.2333 p=.578	-.3028 p=.466	-.2098 p=.618	.4707 p=.239	1.0000 p= ---

Fonte: Elaborado pelo autor

Outra análise estatística proposta para observação dos resultados pode ser apresentado em um gráfico de análise de componentes principais (PCA). Neste tipo de análise, os eixos principais representam os fatores arbitrários capazes de representar a distribuição das variáveis estudadas e a importância de cada uma sobre a variação total dos dados. A Tabela 10 mostra os fatores encontrados para esse estudo e a variância total de cada um deles. Temos três fatores com autovalores maiores que 1, entretanto, é importante destacar que os fatores PCA ou “supervariáveis” 1 e 2 são responsáveis por 74,39% da variância total das respostas estudadas.

Tabela 10: Tabela de autovalores

	Autovalores	Variância total (%)	Autovalor acumulativo	Acumulativo (%)
1	5,384	41,413	5,384	41,413
2	4,287	32,980	9,671	74,393
3	1,653	12,719	11,324	87,111
4	0,821	6,318	12,146	93,429
5	0,567	4,365	12,713	97,794
6	0,259	1,993	12,972	99,787
7	0,028	0,213	13,000	100,000

Fonte: Elaborado pelo autor

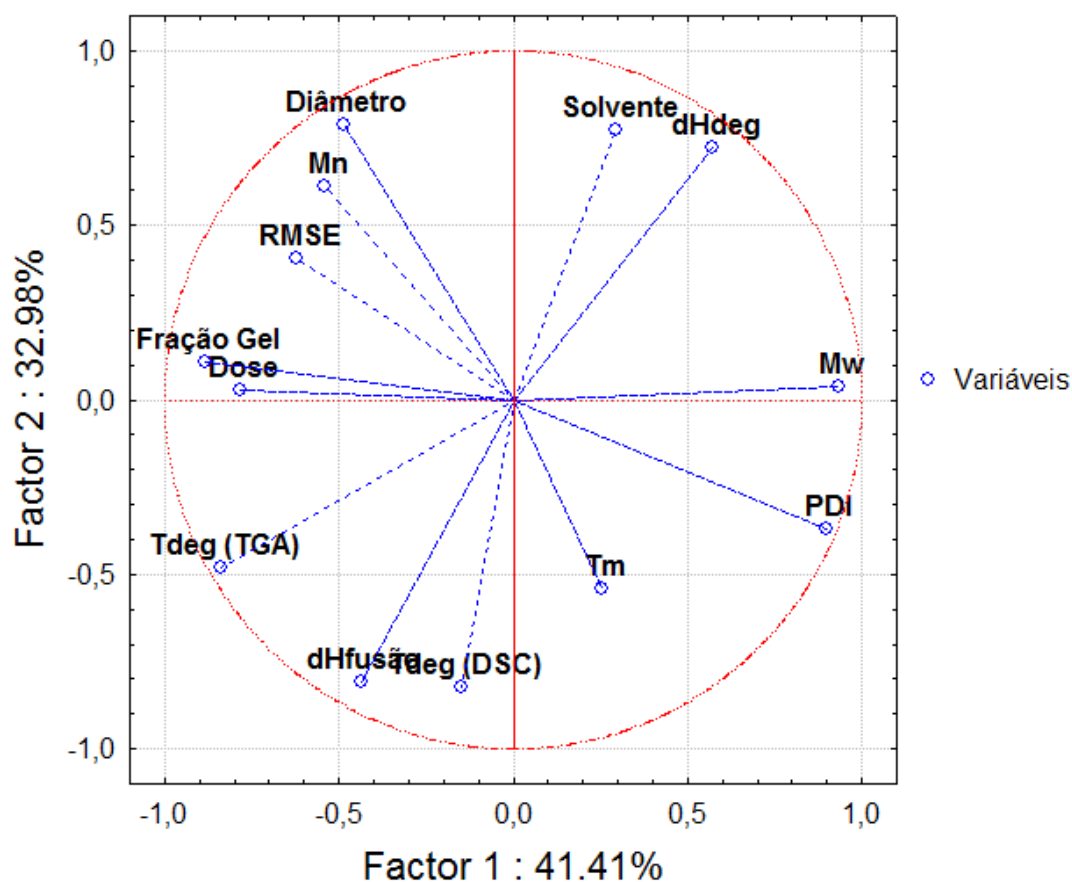
Cada variável de entrada, obtida nesse trabalho, é um autovetor. Os autovetores representam o peso de cada variável original sobre cada componente e são mostrados na Tabela 11. Os autovetores variam de -1 a +1 e quanto mais próximo da unidade, maior é a significância da variável sobre o componente. O gráfico de PCA é mostrado na Figura 31.

Tabela 11: Tabela de autovetores

	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4	Fator 5	Fator 6	Fator 7
Solvente	0,1274	0,3740	0,3281	-0,1476	0,4490	0,0115	-0,3110
Dose	-0,3384	0,0127	0,1300	-0,5760	0,2899	0,3411	0,4040
Mn	-0,2328	0,2960	0,1761	0,4799	-0,1048	0,5740	-0,1522
Mw	0,4027	0,0193	-0,0330	0,0728	-0,1694	0,6269	0,1932
PDI	0,3867	-0,1783	-0,0901	-0,2050	-0,0489	0,1427	0,3803
FG	-0,3819	0,0528	0,2283	-0,2349	-0,3537	0,0090	-0,0865
Diâmetro	-0,2096	0,3808	0,2468	-0,0707	-0,2339	-0,1109	0,3057
Tm	0,1099	-0,2622	0,5689	0,3246	0,1003	-0,1974	0,3173
dHf	-0,1882	-0,3898	0,2388	0,1084	-0,3076	-0,0096	0,0944
Tdeg DSC	-0,0638	-0,3981	0,3115	0,0829	0,4656	0,1849	-0,1315
dHdeg	0,2460	0,3486	0,2779	0,0953	-0,0914	-0,2024	0,2948
Tdeg TGA	-0,3605	-0,2311	-0,1851	0,1265	-0,0286	0,0678	0,0751
RMSE	-0,2673	0,1957	-0,3645	0,3995	0,4023	-0,0975	0,4632

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 31: Projeção das variáveis no plano do fator (1 x 2)



Fonte: Elaborado pelo autor

Podemos observar que a Mw é inversamente relacionada à dose de radiação e a fração gel. Quando há um aumento da irradiação, a fração gel tende a aumentar e a Mw diminui. Esse resultado também foi previsto na correlação.

Outra discussão importante é quanto ao diâmetro médio obtido por meio do Mastersizer. Estudos relatam que a irradiação leva à agregação de microesferas e que quando esses materiais apresentam estrutura porosa, quebram-se muito facilmente após a irradiação (DORATI *et al.*, 2005). Este fenômeno de aglomeração foi proposto após avaliação da Tabela 7, entretanto, esses resultados não apresentam significância estatística. A análise estatística permite, com exatidão, indicar que não há alterações na distribuição de tamanho das microesferas de PBS com o aumento da dose de radiação.

Outra correlação estatisticamente relevante ocorreu entre polidispersão e o RMSE dos materiais (obtidos na análise de FTIR-ATR). Entretanto, como são comparados as esferas irradiadas contra o PBS sintetizado, essa análise não é conclusiva, já que o preparo das esferas pode funcionar como uma etapa de purificação que impacta nos resultados de RMSE e de PDI obtidos.

5.3 CARACTERIZAÇÕES DAS MICROESFERAS CARREGADAS COM FOSFOETANOLAMINA E MELOXICAN

5.3.1 Percentual de rendimento

O percentual de rendimento das microesferas contendo a Fosfoetanolamina e o Meloxicam é apresentado na Tabela 12.

Os valores baixos de rendimento para as microesferas contendo Fosfoetanolamina são devidos à perda do ativo durante o processo de emulsificação, já que este ativo é hidrofílico. Como o rendimento é calculado levando em consideração a massa inicial adicionada de ativo e polímero, com a migração da fosfoetanolamina o valor do numerador da Equação 3 é diminuído, contribuindo para o baixo valor de rendimento.

Esse fato não acontece para as diferentes formulações de PBS contendo Meloxicam, fármaco lipofílico. Nesses sistemas o rendimento m/m

dos sistemas chega a 86% para a formulação com clorofórmio e 93% para a formulação com o diclorometano.

Tabela 12: Percentual em massa das microesferas carregadas com ativos modelos

	Rendimento (%)	Desvio padrão		Rendimento (%)	Desvio padrão
PBSC F	43,31	2,89	PBSC M	86,91	6,17
PBSD F	43,05	1,78	PBSD M	93,47	1,93

Fonte: Elaborado pelo autor

5.3.2 Eficiência de encapsulamento (EE)

A eficiência de encapsulamento (EE) para a Fosfoetanolamina e para o Meloxicam nas microesferas de PBS é mostrada na Tabela 13.

Tabela 13: Eficiência de encapsulamento para as microesferas de PBS

	Eficiência de Encapsulamento (%)	Desvio Padrão
PBSC F	0,862	0,055
PBSD F	0,946	0,203
PBSC M	82,43	-
PBSD M	89,32	-

Fonte: Elaborado pelo autor

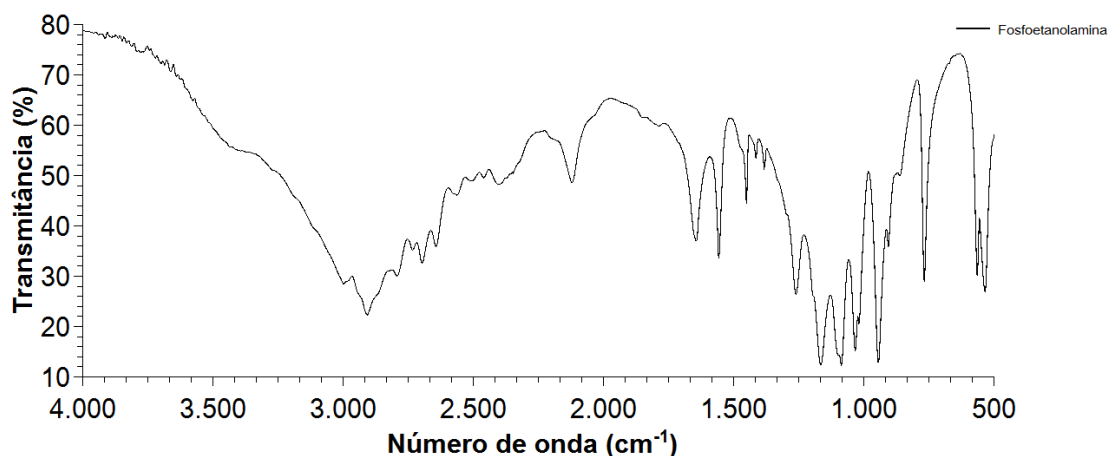
É possível verificar que a eficiência de encapsulamento para a fosfoetanolamina é muito baixa, de 0,862% para o PBSC F e 0,946% para o PBSD F, uma vez que os compostos hidrofílicos podem difundir facilmente para a fase aquosa externa durante a etapa de emulsificação e precipitação do polímero (BRUNNER *et al.*, 2011). Por outro lado, a EE do Meloxicam nas microesferas do poliéster é elevada: 82% e 89% para as formulações de PBSC M e PBSD M, respectivamente. Estas altas eficiências de encapsulamento podem ser explicadas pela fraca solubilidade em água do fármaco e solubilidade facilitada em soluções de polímeros hidrofóbicos.

5.3.3 Espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR)

O espectro FTIR-ATR da Fosfoetanolamina é apresentado na Figura 32. Esse composto é uma etanol amina ligada a um grupo fosfato. A banda larga

em 3080 cm^{-1} e 2989 cm^{-1} é atribuída a amina livre presente na estrutura, As bandas características ao grupo fosfato podem ser observadas na região de 1096 cm^{-1} e em 960 cm^{-1} . A banda em 750 cm^{-1} é característica da etanolamina (KRAFFT *et al.*, 2005).

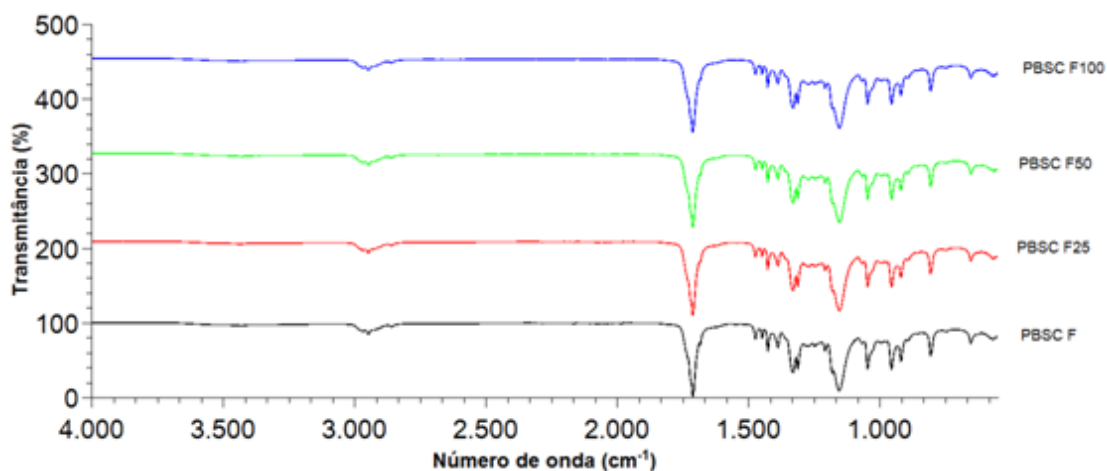
Figura 32: Espectro FTIR-ATR da Fosfoetanolamina



Fonte: Elaborado pelo autor

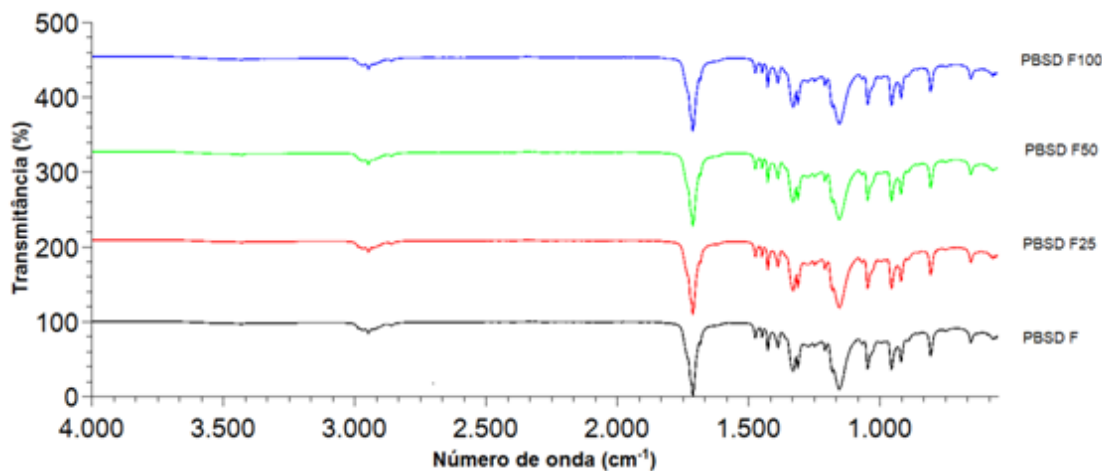
Os espectros de FTIR-ATR das microesferas de PBS contendo fosfoetanolamina não irradiadas e irradiadas são mostrados na Figura 33 e 34. Todas as bandas dominantes observadas são as bandas características da matriz polimérica de PBS.

Figura 33: Espectro FTIR-ATR para as microesferas contendo fosfoetanolamina, preparadas com clorofórmio e irradiadas a diferentes doses.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 34: Espectro FTIR-ATR para as microesferas contendo fosfoetanolamina, preparadas com diclorometano e irradiadas a diferentes doses.



Fonte: Elaborado pelo autor

De modo semelhante ao proposto para as microesferas vazias, o uso de ferramentas para comparação através dos mínimos quadrados permitiu calcular a correlação e o erro quadrático médio (RMSE) entre as transmitâncias das microesferas contendo Fosfoetanolamina, em diferentes doses de irradiação, e as transmitâncias de cada formulação de microesferas vazias. Os valores são apresentados na Tabela 14.

É possível perceber que os valores de RMSE são ligeiramente maiores do que os encontrados para as microesferas vazias, onde somente a irradiação provocava o desvio de linearidade. Na Tabela 14, embora haja o efeito da irradiação e do encapsulamento de Fosfoetanolamina, é possível perceber que há um máximo no valor de RMSE para os materiais submetidos a 50kGy de radiação, efeito também observado para os polímeros irradiados sem ativo. Devido a isso, é possível que haja maior contribuição no desvio da linearidade como efeito da matriz do que de modificação do fármaco.

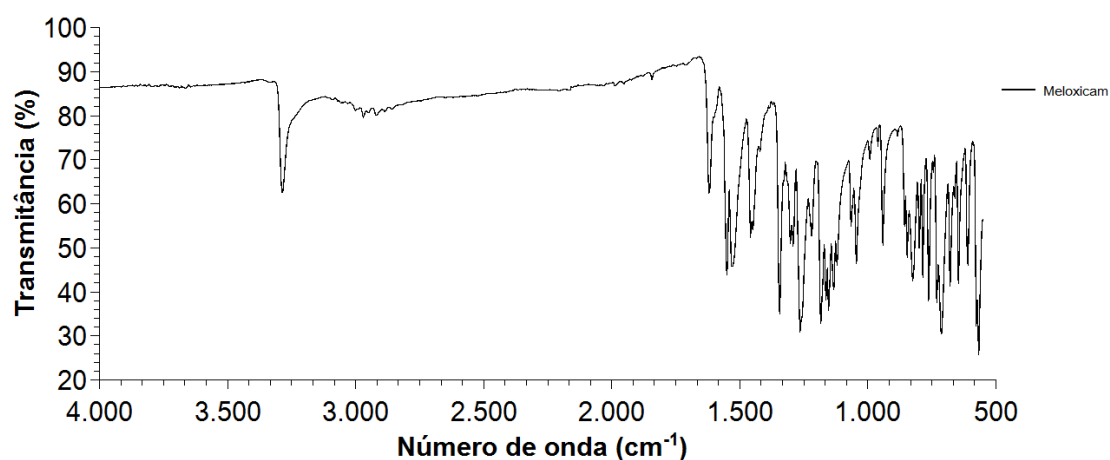
Tabela 14: Erro quadrático médio (RMSE) dos sistemas contendo Fosfoetanolamina

Sistemas	R ²	RMSE	Sistemas	R ²	RMSE
PBSC F	0,999	0,614	PBSD F	0,996	1,114
PBSC F25	0,996	1,028	PBSD F25	0,994	1,270
PBSC F50	0,995	1,194	PBSD F50	0,992	1,501
PBSC F100	0,995	1,146	PBSD F100	0,994	1,334

Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de FTIR-ATR do Meloxicam, segundo ativo usado neste trabalho, é apresentado na Figura 35. Os picos principais para o meloxicam estão presentes em 3126 cm^{-1} atribuído ao estiramento de NH, 1620 cm^{-1} estiramento vibracional de CN e em 1580 cm^{-1} ao estiramento de CO. Os picos correspondentes a 1340 cm^{-1} e 1180 cm^{-1} referem-se à ligação S=O. Além disso, os picos na faixa de 528 cm^{-1} a 845 cm^{-1} são característicos da flexão do anel aromático CH (YAR *et al.*, 2016).

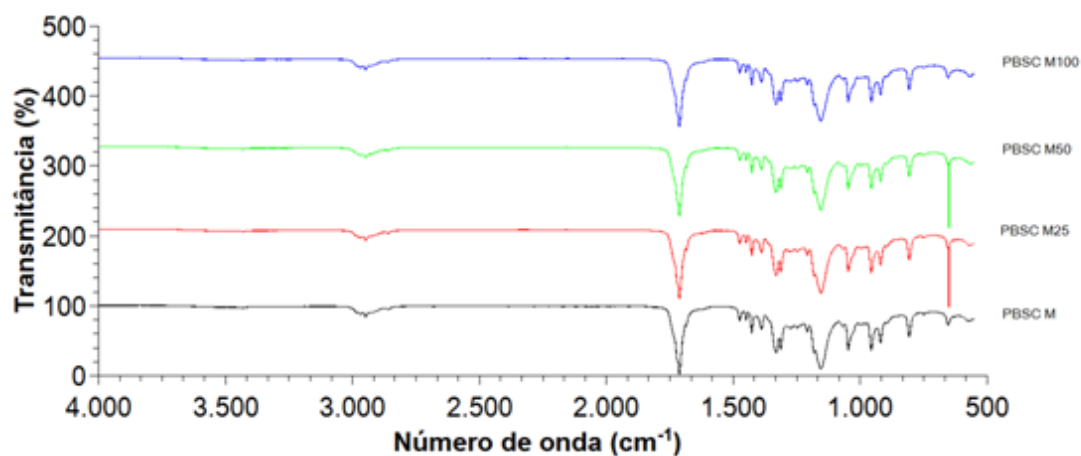
Figura 35: FTIR-ATR do Meloxicam



Fonte: Elaborado pelo autor

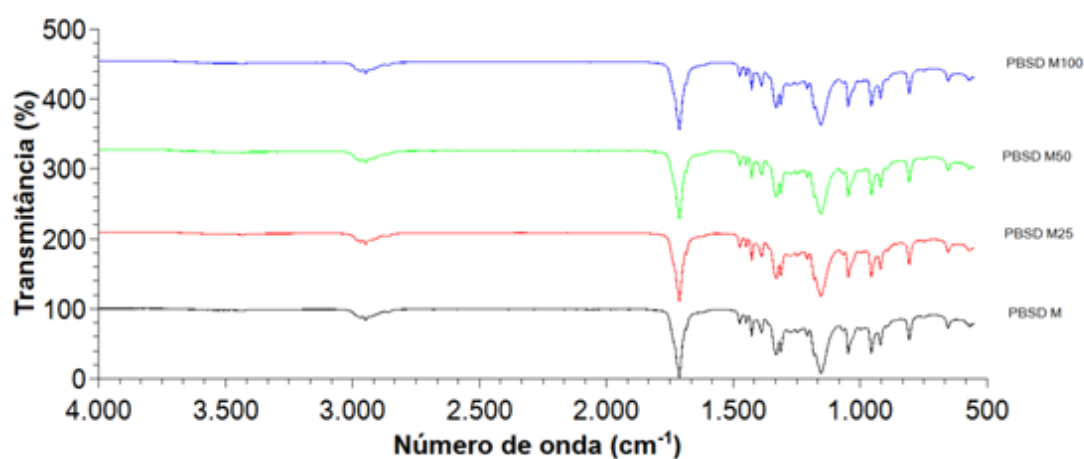
O espectro IR correspondente para as formulações de microesferas de PBS contendo meloxicam são apresentadas na Figura 36 e Figura 37.

Figura 36: Espectro FTIR-ATR para as microesferas em clorofórmio contendo meloxicam e irradiadas a diferentes doses.



Fonte: Elaborado pelo autor

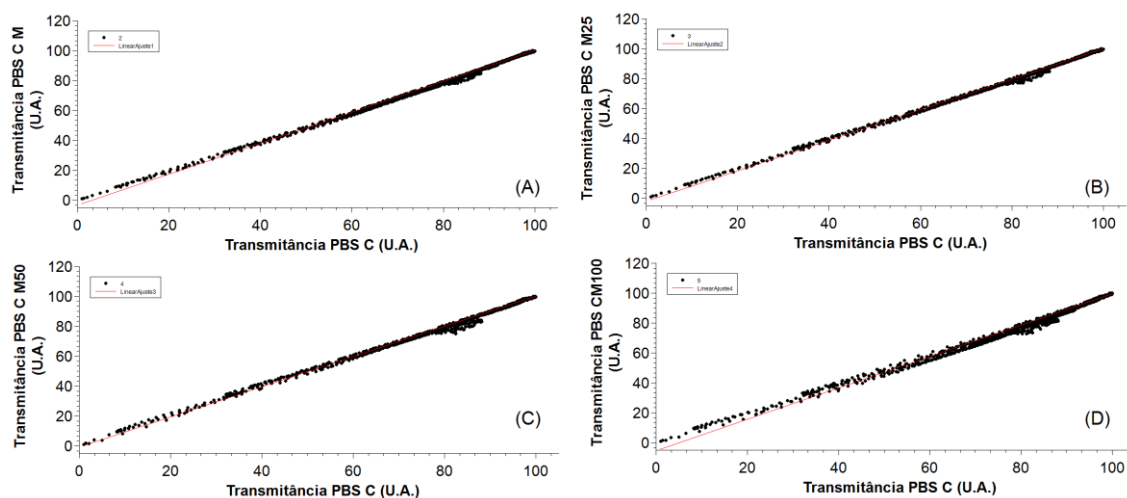
Figura 37: Espectro FTIR-ATR para as microesferas em diclorometano contendo meloxicam e irradiadas a diferentes doses.



Fonte: Elaborado pelo autor

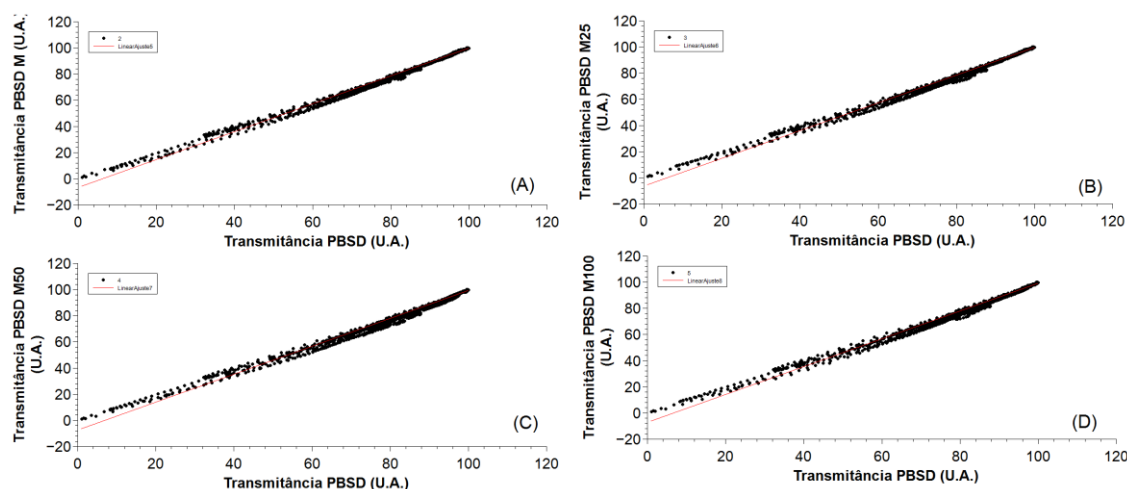
O mesmo tratamento estatístico dos mínimos quadrados foi usado para esses materiais, avaliando a diferença entre os espectros na Figura 38 e Figura 39.

Figura 38: Comparação entre as transmitâncias das microesferas puras (PBSC - eixo das abscissas) e as microesferas contendo Meloxicam (eixo das ordenadas): (A) PBSC M, (B) PBSC M25, (C) PBSC M50 e (D) PBSC 100



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 39: Comparação entre as transmitâncias das microesferas puras (PBSD - eixo das abscissas) e as microesferas contendo Meloxicam (eixo das ordenadas): (A) PBSD M, (B) PBSD M25, (C) PBSD M50 e (D) PBSD 100



Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados estatísticos deste estudo são mostrados na Tabela 15. É também possível notar que os valores de RMSE dos materiais aumentam ligeiramente com o aumento da irradiação e do encapsulamento do fármaco. Entretanto, novamente é possível observar um valor de RMSE máximo para a dose de 50kGy. Essa observação juntamente com a pequena diferença entre

os valores de RMSE antes e após o encapsulamento indica maior influência da irradiação sobre a matriz que o fármaco.

Tabela 15: Erro médio quadrático para as microesferas contendo Meloxicam

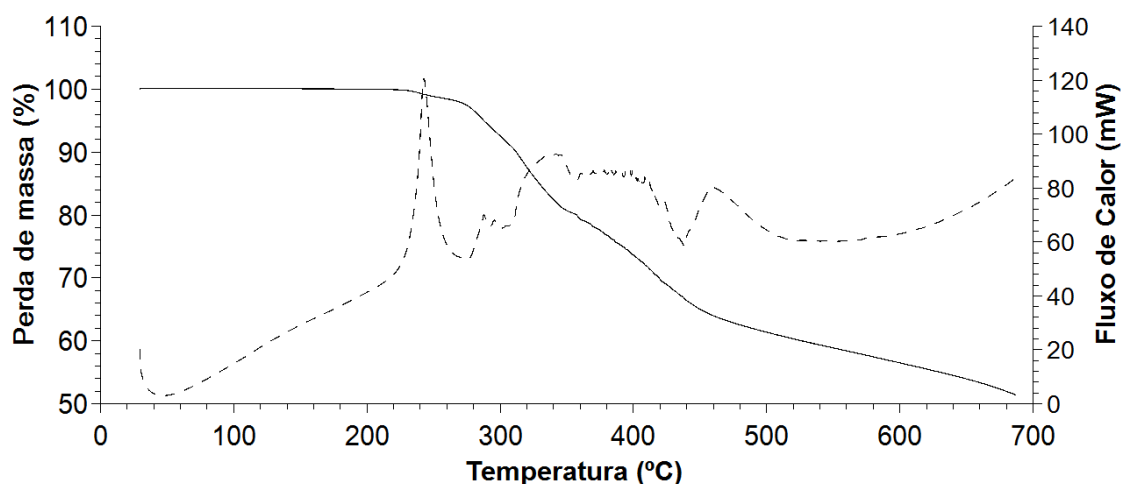
Sistemas	R ²	RMSE	Sistemas	R ²	RMSE
PBSC M	0,997	0,818	PBSD M	0,994	1,316
PBSC M25	0,990	1,631	PBSD M25	0,993	1,419
PBSC M50	0,987	1,801	PBSD M50	0,991	1,646
PBSC M100	0,992	1,489	PBSD M100	0,991	1,588

Fonte: Elaborado pelo autor

5.3.4 Análise Termogravimétrica e Fluxo de Calor simultâneo

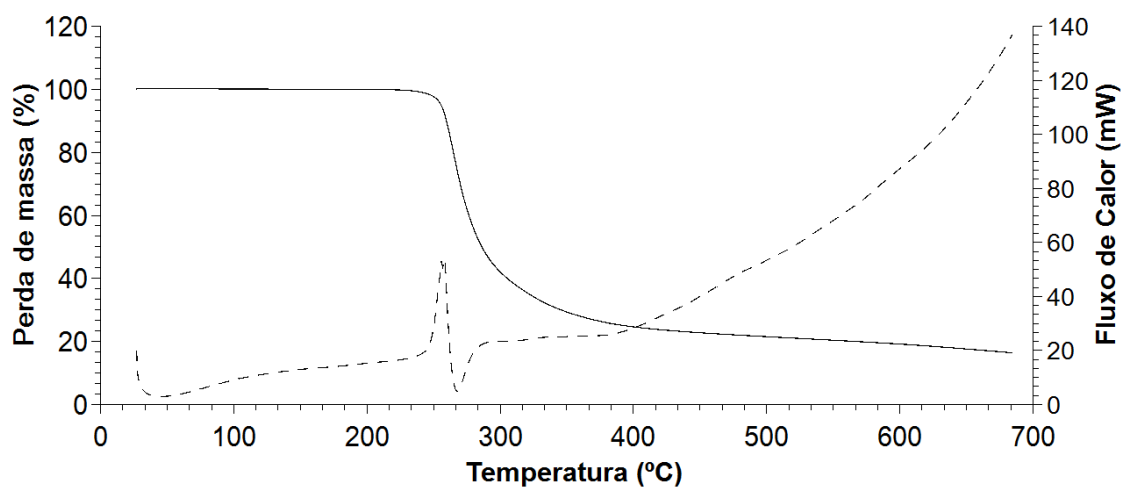
As Figuras 40 e 41 mostram os termogramas dos ativos usados no trabalho. Na Figura 40, a termogravimetria (linha contínua) da Fosfoetanolamina indica duas regiões de perda de massa, a primeira na região 210°C-310°C e a segunda na faixa de 360°C a 500°C. Em 700°C, a fosfoetanolamina ainda apresenta um resíduo de 51,33% de massa residual. A curva de DSC (linha tracejada) mostra um efeito endotérmico na região de 241°C-243°C, onde ocorre a decomposição do fármaco.

Figura 40: Termograma (linha contínua) e curva calorimétrica (linha pontilhada) para a Fosfoetanolamina



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 41: Termograma (linha contínua) e curva calorimétrica (linha pontilhada) para o Meloxicam



Fonte: Elaborado pelo autor

A curva termogravimétrica (linha contínua) de meloxicam indicou T_g a 251°C com uma perda de massa para 42,05% a 300°C. A massa residual em 700°C é de 16,26%. A curva de DSC (linha tracejada) mostra um efeito endotérmico na região de 250°C, onde ocorre a decomposição do fármaco (JAIN; PATHAK, 2010).

As esferas contendo ambos os fármacos foram avaliadas pela mesma técnica e os dados térmicos obtidos para cada formulação são apresentados na Tabela 16 e Tabela 17.

Tabela 16: Resultados térmicos para as microesferas contendo Fosfoetanolamina

	T_m (°C)	ΔH_f (J/g)	X_c (%)	T_d (°C)*	ΔH_d (J/g)	T_d (°C)**
PBSC F	111,24	75,05	68,04	415,67	322,15	413,32
PBSC F25	110,81	77,50	70,27	409,61	335,01	406,41
PBSC F50	110,08	39,90	36,17	413,36	178,74	411,34
PBSC F100	110,20	88,97	80,67	411,86	322,43	408,90
PBSD F	113,10	90,14	81,72	411,17	330,89	414,84
PBSD F25	111,33	90,21	81,78	413,53	361,24	413,94
PBSD F50	110,53	83,68	75,87	413,03	313,16	411,15
PBSD F100	111,50	49,02	44,45	412,42	320,77	409,11

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 17: Dados térmicos para as microesferas contendo Meloxicam

	Tm (°C)	DeltaHf (J/g)	Xc (%)	Td (°C)*	DeltaHd (J/g)	Td (°C)**
PBSC M	113,96	95,52	86,60	414,25	303,33	411,07
PBSC M25	108,77	86,56	78,48	409,87	364,47	408,66
PBSC M50	107,94	87,93	79,72	410,73	363,31	411,30
PBSC M100	107,31	83,86	76,03	413,60	353,92	412,12
PBSD M	114,44	91,87	83,29	409,83	380,62	410,95
PBSD M25	112,72	91,53	82,99	413,04	339,02	409,79
PBSD M50	112,05	78,32	71,00	413,77	328,33	410,95
PBSD M100	106,38	61,08	55,38	413,10	327,61	408,53

Fonte: Elaborado pelo autor

5.3.5 Medição de fração gel

Os resultados de teor de reticulação das microesferas de PBS contendo Fosfoetanolamina são mostrados na Tabela 18. É possível perceber que não há uma tendência de aumento linear da fração gel com o aumento da irradiação. Isso pode ser ocasionado pela dispersão do ativo na matriz polimérica.

Tabela 18: Teor de gel para as microesferas contendo Fosfoetanolamina

Sistemas	Fração Gel (%)	Sistemas	Fração Gel (%)
PBSC F	7,34	PBSD F	10,30
PBSC F25	5,38	PBSD F25	4,07
PBSC F50	11,61	PBSD F50	10,00
PBSC F100	3,37	PBSD F100	15,66

Fonte: Elaborado pelo autor

A Tabela 19 apresenta os resultados de fração gel para as microesferas contendo Meloxicam. Nesses materiais, o aumento de irradiação provoca um aumento do teor de gel dos materiais. Esses resultados serão essenciais para a avaliação da cinética de liberação dos fármacos, apresentados mais a frente.

Tabela 19: Medição do teor de gel para as microesferas contendo Meloxicam

Sistemas	Fração Gel (%)	Sistemas	Fração Gel (%)
PBSC M	3,09	PBSD M	4,60
PBSC M25	10,68	PBSD M25	5,29
PBSC M50	13,86	PBSD M50	5,83
PBSC M100	7,06	PBSD M100	10,04

Fonte: Elaborado pelo autor

5.3.6 Teste de crescimento microbiano

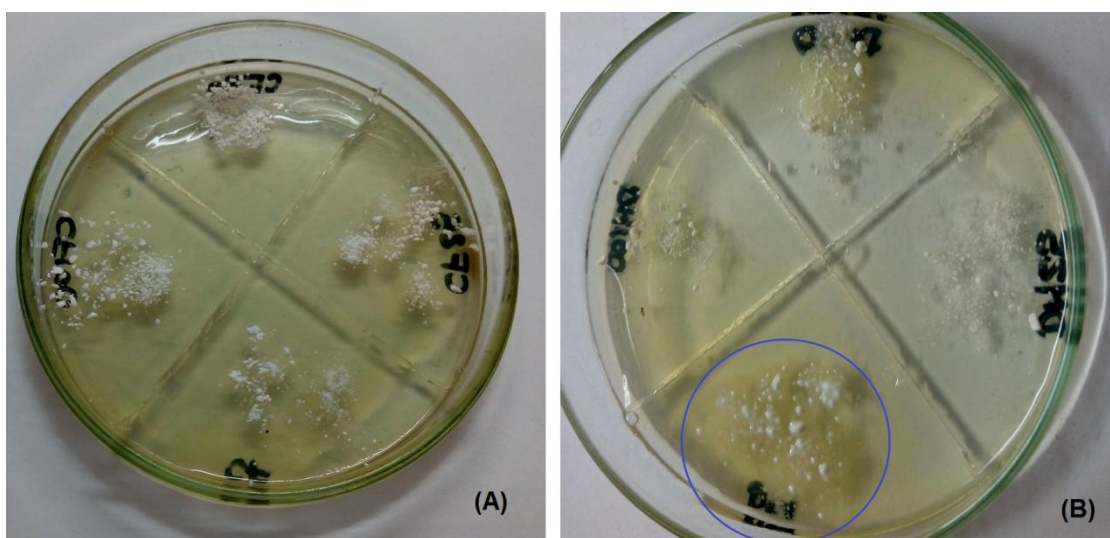
As microesferas contendo a Fosfoetanolamina e o Meloxicam foram colocadas sobre o gel solidificado de nutriente Agar e as placas divididas em quadrantes, recebendo cada placa a mesma formulação de esferas. Cada quadrante recebeu um tipo de material, sendo eles: microesferas não irradiadas, microesferas irradiadas à 25kGy, microesferas irradiadas à 50kGy e à 100kGy.

Os testes realizados para as formulações contendo Fosfoetanolamina são apresentados nas Figuras 42 e Figura 43. As imagens mostram as placas antes e após a incubação, para medir a zona de inibição.

É possível observar que para todas as microesferas de PBSC irradiadas não houve aparecimento de halos referentes ao crescimento de fungos. Entretanto, para a microesfera não irradiada marcada na imagem, houve aparecimento de um pequeno halo, indicando crescimento fúngico.

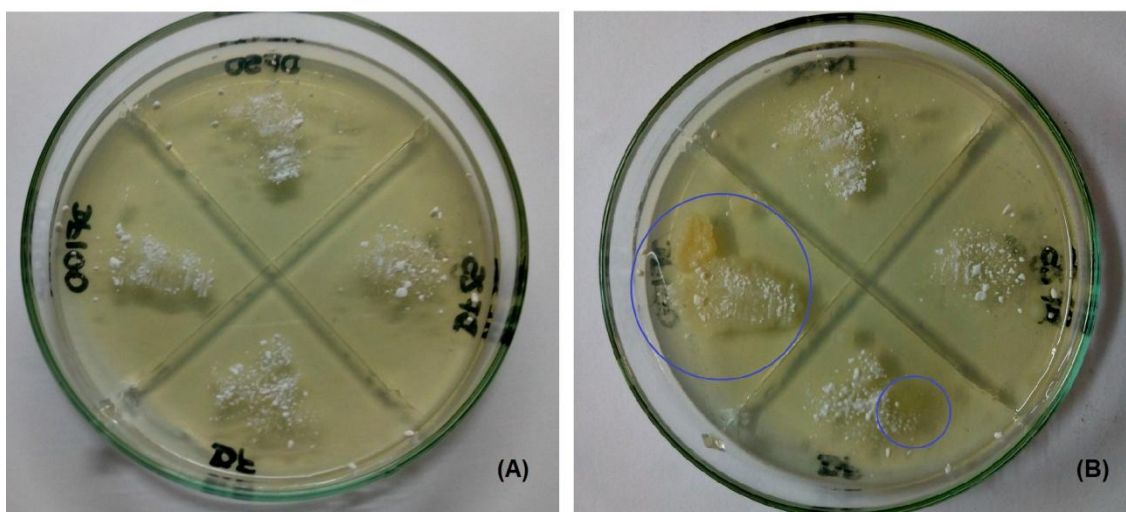
Para os materiais de PBSD contendo fosfoetanolamina, as duas regiões marcadas na imagem após 48h mostram a adsorção de fungos nas microesferas, para o quadrante referente ao PBSD F não irradiado e PBSD F100 (irradiado a 100kGy). A adsorção de fungos na amostra de PBSD 100kGy pode ter ocorrido devido a contaminação durante a manipulação da amostra e preparação das placas.

Figura 42: Placas testadas para crescimento microbiano nas microesferas de PBSC contendo Fosfoetanolamina, no início do teste (A) e após 48h de incubação (B).



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 43: Placas testadas para crescimento microbiano nas microesferas de PBSD contendo Fosfoetanolamina, no início do teste (A) e após 48h de incubação (B).

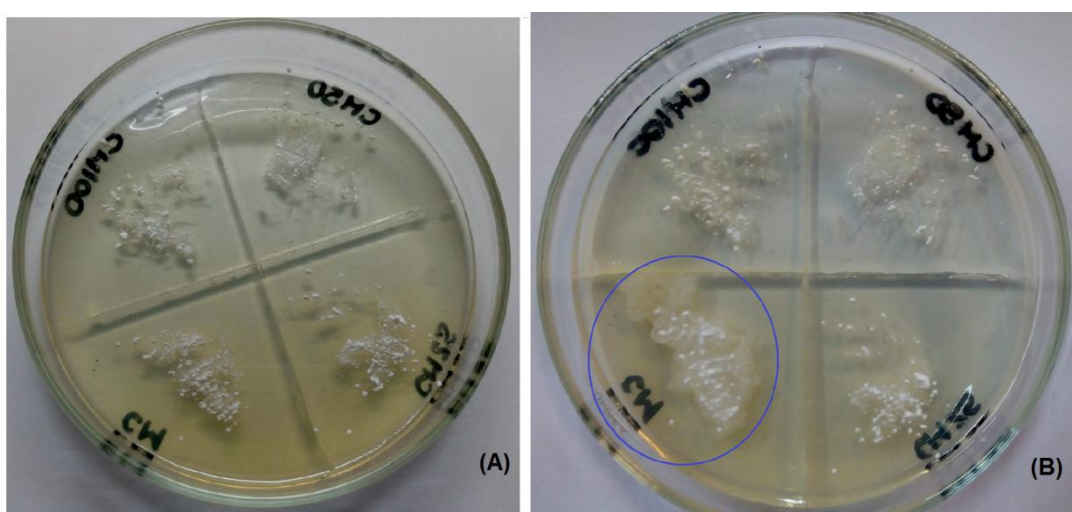


Fonte: Elaborado pelo autor

As placas testadas para as formulações com Meloxicam são apresentadas nas Figuras 44 e 45. É possível observar que as microesferas de PBSC e PBSD contendo Meloxicam e sem irradiação mostraram crescimento de fungos na superfície das micropartículas. Já as microesferas irradiadas, em todas as doses de irradiação propostas, não apresentaram esse crescimento.

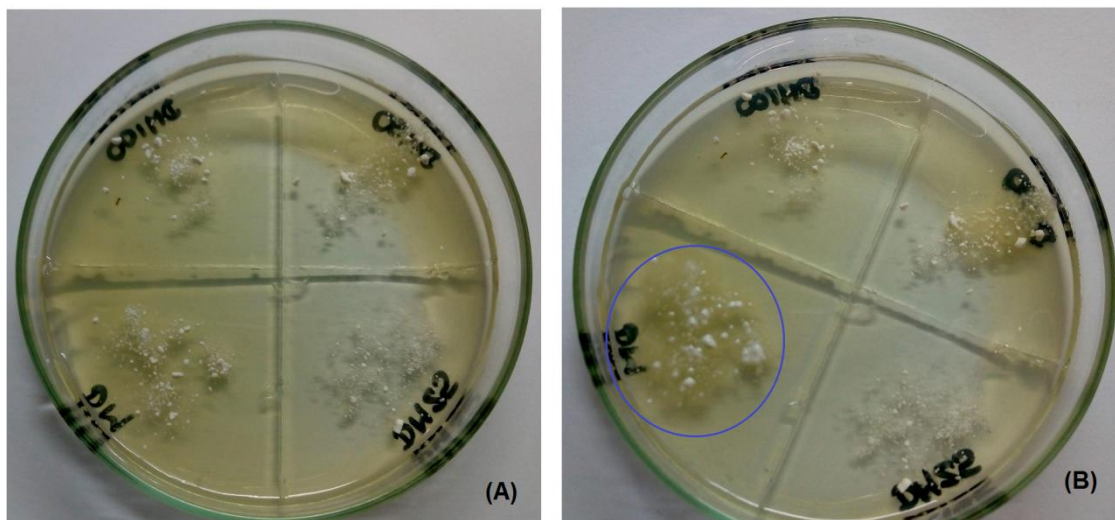
O resultado mostra que as micropartículas após a irradiação- γ podem, efetivamente, impedir tal adsorção/adesão de fungos nos materiais, indicando que há esterilização destes materiais.

Figura 44: Crescimento microbiano nas microesferas de PBSC contendo Meloxicam, no início do teste (A) e após 48h de incubação (B).



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 45: Crescimento microbiano nas microesferas de PBSD contendo Meloxicam, no início do teste (A) e após 48h de incubação (B).



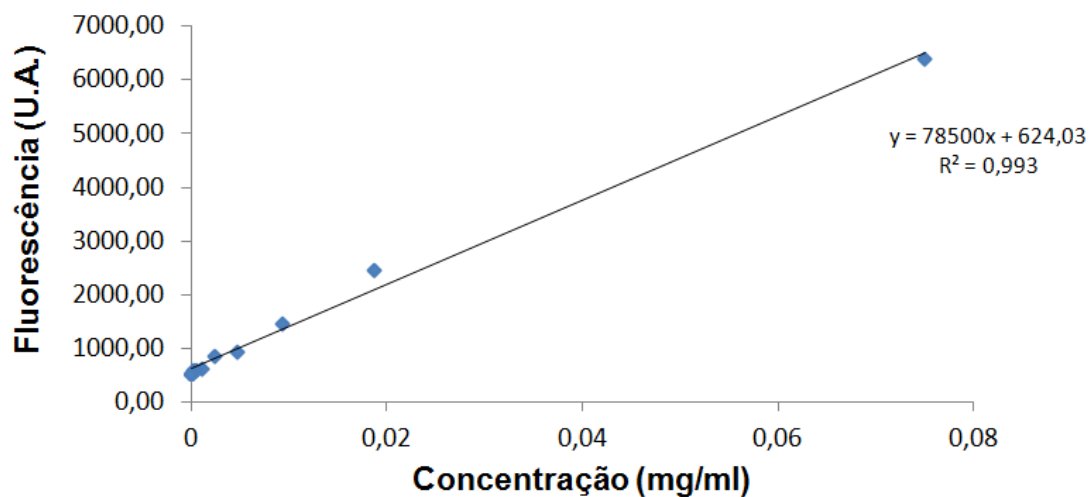
Fonte: Elaborado pelo autor

5.3.7 Espectrometria

As microesferas preparadas contendo a Fosfoetanolamina (F) e o Meloxicam (M) foram usados para o estudo do perfil de dissolução.

Para a construção da curva analítica da Fosfoetanolamina foi utilizada a técnica de espectrofluorimetria com reação química com a fluorescamina. Para isso, foi preparada uma solução mãe com a concentração máxima do fármaco estabelecido para o teste proposto e diversas diluições foram realizadas, usando o meio da dissolução, a fim de conseguir o maior número de pontos para a construção da curva analítica (Figura 46).

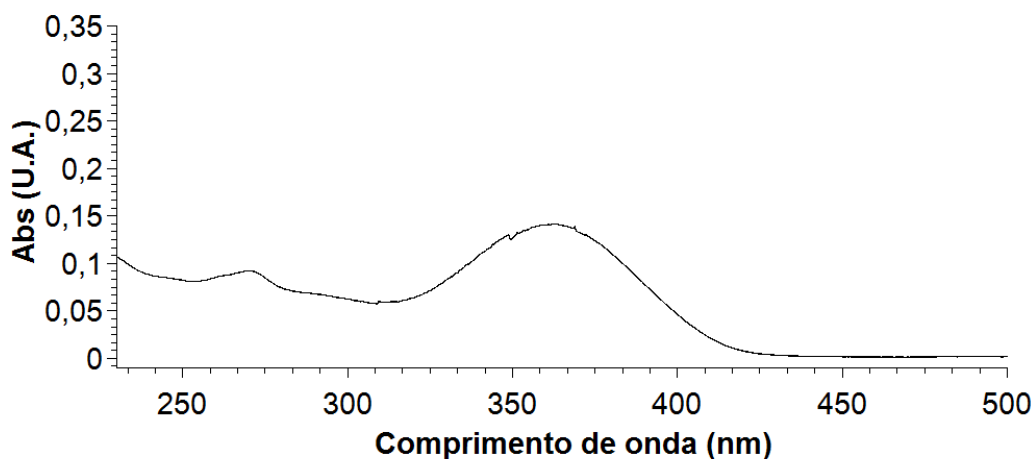
Figura 46: Curva analítica para a Fosfoetanolamina



Fonte: Elaborado pelo autor

Para o Meloxicam, inicialmente foi realizada uma varredura no UV-Vis para determinação do comprimento de onda a ser feita a quantificação, observando um pico característico para o fármaco em 362nm, como mostra a Figura 47. O comprimento de onda correspondente encontra-se condizente com a literatura (AMBRUS *et al.*, 2009)

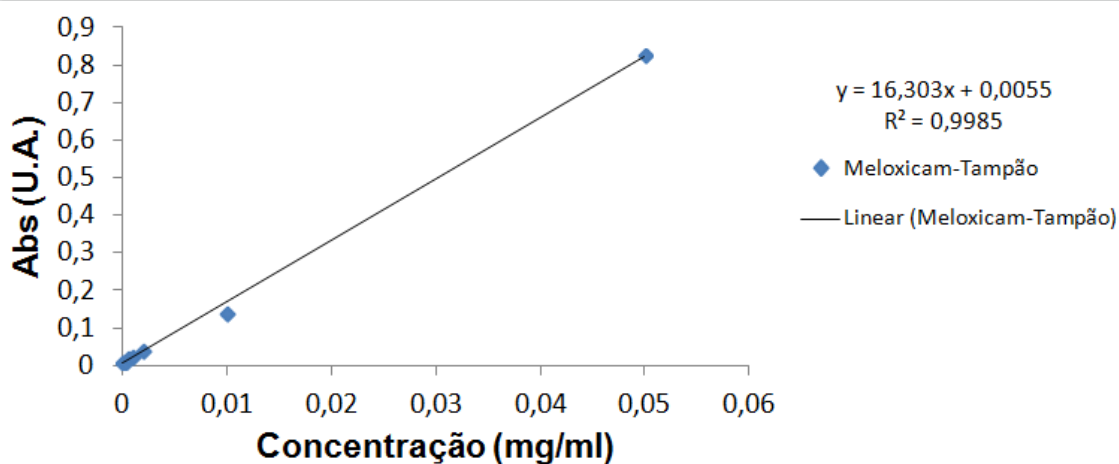
Figura 47: Espectro de UV do Meloxicam



Fonte: Elaborado pelo autor

Diversas concentrações de Meloxicam em solução tamponada de fosfato salino (pH 7,4) também foram preparadas de modo a construir a curva analítica para a quantificação do fármaco. Os dados obtidos encontram-se na Figura 48.

Figura 48: Curva analítica para o Meloxicam



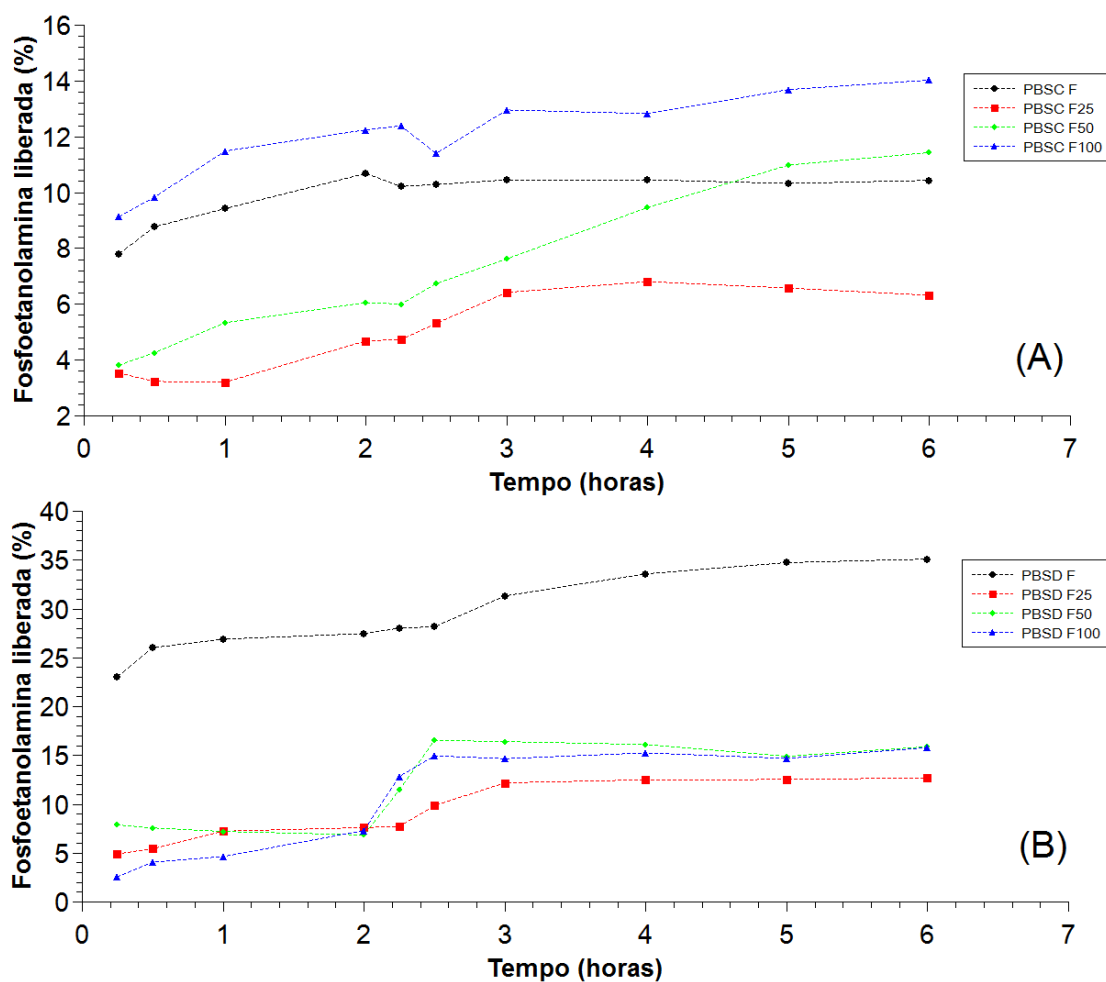
Fonte: Elaborado pelo autor

Com as equações de reta para ambos os fármacos e valores satisfatórios de R^2 , foi possível quantificar os ativos modelos liberados em cada teste de dissolução ao longo de 6 horas.

5.4 ESTUDO DE DISSOLUÇÃO

O estudo de dissolução utilizando tampão fosfato (pH 7,4) durante 6 horas foi feito para as microesferas contendo Fosfoetanolamina e Meloxicam, em todas as condições de irradiação. As curvas de dissolução para a fosfoetanolamina são mostradas na Figura 49.

Figura 49: Teste de liberação para as esferas contendo a Fosfoetanolamina, em clorofórmio (A) e em diclorometano (B)



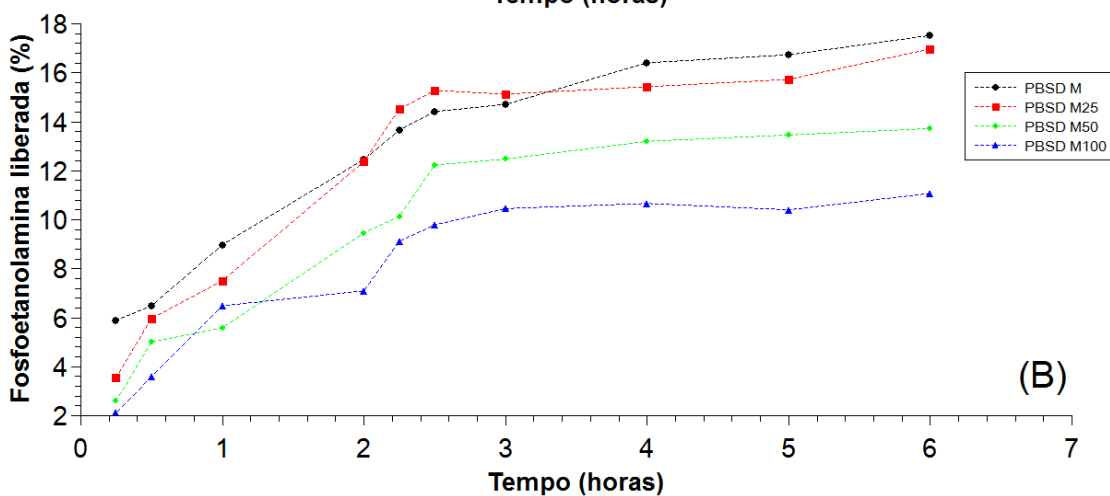
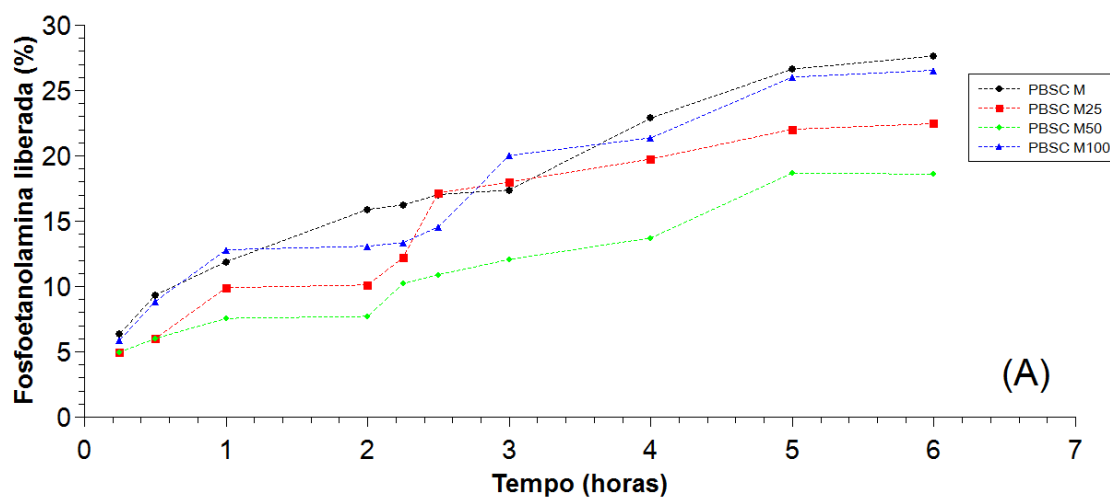
Fonte: Elaborado pelo autor

Em todas as curvas observou-se um efeito de liberação na primeira hora, seguido por um aumento gradual de liberação nas próximas 5 horas em

pH 7,4. Os efeitos da irradiação- γ parecem ocorrer de modo aleatório na cinética de liberação de fosfoetanolamina.

As curvas de dissolução para as formulações de microesferas contendo Meloxicam são apresentadas na Figura 50. A ordem de liberação para as formulações em clorofórmio foi $M > M100 > M25 > M50$ e para as formulações em diclorometano foi de $M > M25 > M50 > M100$. Essa cinética deve ser discutida tendo em consideração parâmetros relacionados à estrutura física das microesferas. A irradiação- γ afeta a fração gel dos materiais, como mostrado na Tabela 17. É possível perceber que há uma relação direta, nas formulações de Meloxicam, da fração gel com a cinética de liberação das microesferas. Conforme há um aumento no teor de fração gel, ou reticulação dos materiais, a liberação do fármaco se torna mais lenta.

Figura 50: Teste de dissolução para as microesferas preparadas com clorofórmio (A) e diclorometano (B), usando Meloxicam



Fonte: Elaborado pelo autor

Os sistemas estudados na dissolução foram correlacionados no Statística. As variáveis de entrada são apresentadas no Anexo 2, sendo: Solvente, fármaco encapsulado, dose de radiação, tempo de liberação e quantidade de fármaco liberado. A Tabela 18 indica a correlação entre estas variáveis.

É importante destacar que, o coeficiente de correlação linear de Pearson indica a intensidade da associação linear existente entre as variáveis, podendo ser quantificada (ZOU; TUNCALI; SILVERMAN, 2003). Nesse estudo, observa-se que há uma correlação estatisticamente significativa ($p < 0.05$) tanto entre a dose de radiação e a quantidade de fármaco liberado quanto para o tempo de análise e a liberação. Entretanto, o coeficiente de correlação entre a dose e a liberação dos fármacos ($r = -0,2230$) é classificado como fraca enquanto a correlação entre o tempo e liberação, $r = 0,5185$ é moderada.

Tabela 20: Tabela de correlação para o estudo de liberação

	Solvente	Fármaco	Dose	Tempo	Fármaco Liberado
Solvente	1.0000 p= ---	-0.0000 p=1.00	0.0000 p=1.00	0.0000 p=1.00	0.1051 p=0.186
Fármaco	-0.0000 p=1.00	1.00 p= ---	0.0000 p=1.00	-0.0000 p=1.00	0.0544 p=0.494
Dose	0.0000 p=1.00	0.0000 p=1.00	1.00 p= ---	0 p=1.00	-0.2230 p=0.005
Tempo	0 p=1.00	-0 p=1.00	0 p=1.00	1.00 p= ---	0.5185 p=0.000
Fármaco Liberado	0.1051 p=.186	0.0544 p=.494	-0.2230 p=.005	0.5185 p=.000	1.0000 p= ---

Fonte: Elaborado pelo autor

A análise de componentes principais (PCA) também é proposta para observar a importância de cada variável. Os fatores e respectivos autovalores são apresentados na Tabela 21. Os dois fatores serão nossas “supervariáveis” e são responsáveis por 51,53% da variância total das respostas estudadas.

Tabela 21: Tabela de autovalores

	Autovalores	Variância total (%)	Autovalores acumulativos	Acumulativo (%)
1	1,5767	31,533	1,5767	31,53
2	1,0000	20,000	2,5767	51,53
3	1,0000	20,000	3,5767	71,53
4	1,0000	20,000	4,5767	91,53
5	0,4233	8,467	5,0000	100,00

Fonte: Elaborado pelo autor

A Tabela 22 mostra os autovetores e representam o peso de cada variável original sobre cada componente.

Tabela 22: Tabela de autovetores

	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4	Fator 5
Solvente	-0,1289	-0,6918	0,1283	0,6869	-0,1289
Farmaco	-0,0667	-0,6843	0,0413	-0,7219	-0,0667
Dose	0,2735	-0,1905	-0,8989	0,0787	0,2735
Tempo	-0,6357	0,1301	-0,4170	-0,0296	-0,6357
FL	-0,7071	0,0000	0,0000	0,0000	0,7071

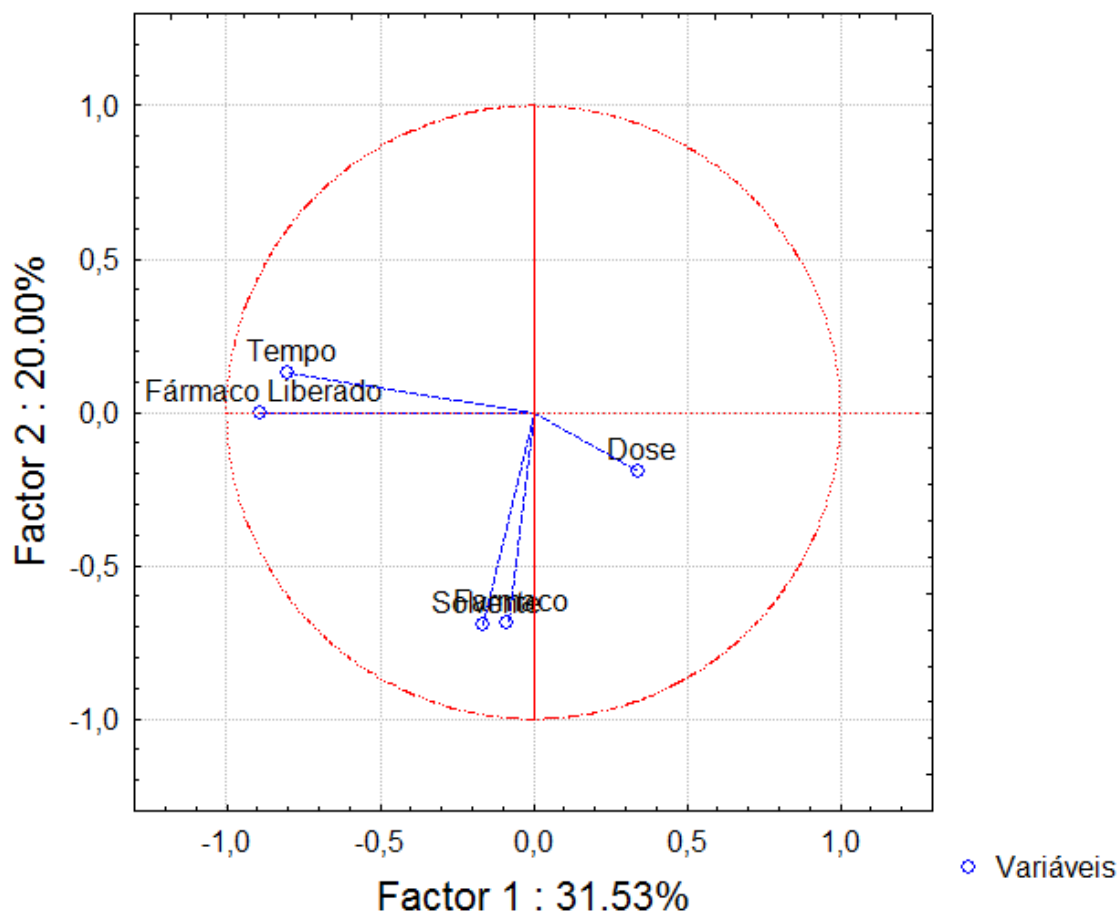
Fonte: Elaborado pelo autor

O gráfico de PCA encontrado para este estudo de liberação é apresentado na Figura 51. Nesse PCA, observa-se que o autovetor da dose pode ser relacionado com os autovetores do tempo de liberação e quantidade de fármaco liberado. Os autovetores para o solvente e fármaco não indicam significância estatística, estando apenas organizados na mesma direção,

A liberação pode ser afetada por muitos fatores, incluindo a degradação do polímero, a massa molar, a cristalinidade e a afinidade de ligação entre o polímero e o fármaco. Neste estudo usando dois fármacos de características hidrossolúveis diferentes, não é possível identificar uma correlação estatística entre o fármaco e a taxa de liberação, podendo ser previsto que a taxa de liberação nesses sistemas é determinada pela difusão do fármaco através da matriz polimérica das microesferas.

Como equivalente ao observado na tabela de correlação, podemos verificar uma tendência no aumento da dose de radiação provocar uma redução na cinética de liberação do fármaco. Além disso, a quantidade de fármaco liberado é aumentada conforme aumento do tempo de análise.

Figura 51: Projeção das variáveis nos fatores 1x2 (Método biplot)



Fonte: Elaborado pelo autor

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os parâmetros avaliados, solvente e etapa de secagem dos materiais, não acarretaram em alterações críticas nas características morfológicas e físico-químicas das micropartículas, indicando que o preparo desses materiais pode ser realizado de acordo com o desejado.

O estudo da esterilização por irradiação- γ também foi proposto nesse trabalho. As microesferas sintetizadas de PBS foram irradiadas a diferentes doses de radiação, sendo observado através da microscopia eletrônica de varredura que não houve aglomeração dos materiais. Esse resultado também foi confirmado pela técnica de espalhamento de luz. Entretanto, o aumento da dose de radiação dos materiais levou ao aumento da reticulação, como observado nas análises de fração gel e cromatografia por exclusão de tamanho.

Quanto ao encapsulamento de diferentes ativos pela técnica proposta, foi possível verificar que o encapsulamento de fosfoetanolamina é muito baixo devido à afinidade do ativo pela fase aquosa. Entretanto, a eficiência de encapsulamento do meloxicam é próxima a 90%, devido às características lipofílicas desse fármaco.

Os perfis de liberação de ambos os ativos se mostraram bastante sustentados para todos os sistemas estudados no intervalo de 6 horas, liberando, no máximo, 35,06% de fosfoetanolamina no sistema de PBSD não irradiado e 27,61% de meloxicam para o sistema de PBSC não irradiado. As mudanças na cinética de liberação para os ativos modelos são diretamente relacionadas pela irradiação- γ , sendo observado que o aumento da dose de radiação provoca uma diminuição da quantidade de fármaco liberado.

7 SUGESTÕES

Como sugestões deste trabalho ficam:

- Fazer a purificação do PBS sintetizado para melhorar a homogeneidade do sistema;
- Fazer a análise de ressonância magnética nuclear de carbono para confirmar a reticulação dos materiais preparados;
- Fazer duplicatas para os testes de fração gel das microesferas contendo meloxicam e fosfoetanolamina;
- Avaliar por microscopia eletrônica de varredura a morfologia dos materiais preparados contendo os dois ativos modelos e verificar por espectroscopia de energia (EDS) a composição dos sistemas;
- Verificar o tamanho das microesferas e a influência no teste de dissolução
- Repetir os testes de dissolução para verificar o desvio padrão entre as cinéticas de liberação;
- Fazer microesferas de PBS com Fosfoetanolamina por emulsão dupla, a fim de verificar a eficiência de encapsulamento nesses sistemas;

REFERÊNCIAS

ALDERLIESTEN, M. C.; KLARENBECK, J. B.; VAN DER LUIT, A. H.; VAN LUMMEL, M.; JONES, D.R.; ZERP, S.; DIVECHA, N.; VERHEIJ, M.; VAN BLITTERSWIJK, W. J. Phosphoinositide phosphatase SHIP-1 regulates apoptosis induced by edelfosine, Fas ligation and DNA damage in mouse lymphoma cells. **The Biochemical Journal**, [S.l.], v. 440, n. 1, p. 127–135, 15 nov. 2011. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21793801>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

AMBRUS, R.; AMBRUS, R.; KOCBEK, P.; KRISTL, J.; ŠIBANC, R.; RAJKÓ, R.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P. Investigation of preparation parameters to improve the dissolution of poorly water-soluble meloxicam. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 381, n. 2, p. 153–159, nov. 2009. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517309004621>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

AYOUB, M.; Ahmed, N.; Kalaji, N.; Charcosset, C.; Magdy, A.; Fessi, H.; Elaissari, A. Study of the Effect of Formulation Parameters/Variables to Control the Nanoencapsulation of Hydrophilic Drug via Double Emulsion Technique. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, [S.l.], v. 7, n. 2, p. 255–262, 1 abr. 2011. Disponível em <<http://www.ingentaconnect.com/content/asp/jbn/2011/00000007/00000002/art00004>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

BERKLAND, C.; KIM, K.; PACK, D. W. Fabrication of PLG microspheres with precisely controlled and monodisperse size distributions. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 73, n. 1, p. 59–74, maio 2001. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365901002899>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

BODMEIER, R.; OH, K. H.; CHEN, H. The effect of the addition of low molecular weight poly(dl-lactide) on drug release from biodegradable poly(dl-lactide) drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 51, n. 1, p. 1–8, 1 abr. 1989. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378517389900689>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

BOZDAG, S.; SU, H. Influence of irradiation sterilization on poly (lactide-co-glycolide) microspheres containing anti-inflammatory drugs. **Il Farmaco**, [S.l.], v. 57, p. 55 – 62, 2002. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014827X01011715>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

BRUNNER, C. T.; BARAN, E. T.; PINHO, E. D.; REIS, R. L.; NEVES, N. M. Performance of biodegradable microcapsules of poly(butylene succinate), poly(butylene succinate-co-adipate) and poly(butylene terephthalate-co-adipate) as drug encapsulation systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S.I.], v. 84, n. 2, p. 498–507, 2011. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776511000671>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

CHAISRI, W.; GHASSEMI, A. H.; HENNINK, W. E.; OKONOGI, S. Enhanced gentamicin loading and release of PLGA and PLHMGA microspheres by varying the formulation parameters. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S.I.], v. 84, n. 2, p. 508–14, jun. 2011. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776511000683>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

CHAKOLI, A. N.; HE, J.; CHAYJAN, M. A.; HUANG, Y.; ZHANG, B. Irradiation of poly(L-lactide) biopolymer reinforced with functionalized MWCNTs. **RSC Advances**, [S.I.], v. 5, n. 68, p. 55544–55549, 22 jun. 2015. Disponível em <<http://pubs.rsc.org/content/articlelanding/2015/ra/c5ra08319b/unauth#!divAbstract>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

CHMIELEWSKI, A. G.; HAJI-SAEID, M.; AHMED, S. Progress in radiation processing of polymers. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, [S.I.], v. 236, n. 1–4, p. 44–54, jul. 2005. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168583X0500474X>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

CHO, K.; LEE, J.; KWON, K. Hydrolytic degradation behavior of poly (butylene succinate) s with different crystalline morphologies. **Journal of applied polymer science**, [S.I.], v. 79, p. 1025–1033, 2001. Disponível em <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-4628\(20010207\)79:6%3C1025::AID-APP50%3E3.0.CO;2-7/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-4628(20010207)79:6%3C1025::AID-APP50%3E3.0.CO;2-7/full)>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

CHRISAFIS, K.; PARASKEVOPOULOS, K. M.; BIKIARIS, D. N. Thermal degradation mechanism of poly(ethylene succinate) and poly(butylene succinate): Comparative study. **Thermochimica Acta**, [S.I.], v. 435, n. 2, p. 142–150, 15 set. 2005. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040603105002509>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

CROONENBORGHS, B.; SMITH, M. A.; STRAIN, P. X-ray versus gamma irradiation effects on polymers. **Radiation Physics and Chemistry**, [S.l.], v. 76, n. 11–12, p. 1676–1678, 2007. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969806X07002228>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

CRUCHO, C. I. C.; BARROS, M. T. Formulation of Functionalized PLGA polymeric nanoparticles for targeted drug delivery. **Polymer**, [S.l.], v. 68, p. 41–46, 2015. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386115004309>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

CUSINATO, R.; PACENTI, M.; MARTELLO, T.; FATTORI, P.; MORRONI, M.; PALÙ, G. Effectiveness of hydrogen peroxide and electron-beam irradiation treatment for removal and inactivation of viruses in equine-derived xenografts. **Journal of Virological Methods**, [S.l.], v. 232, p. 39–46, jun. 2016. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093416000434>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

DAI, Z.; RONHOLM, J.; TIAN, Y.; SETHI, B.; CAO, X. Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications. **Journal of Tissue Engineering**, [S.l.], v. 7, p. 2041731416648810, 1 jan. 2016. Disponível em <<http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/2041731416648810>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

DE BERNARDO, S.; WEIGELE, M.; TOOME, V.; MANHART, K.; LEIMGRUBER, W.; BÖHLEN, P.; UDENFRIEND, S. Studies on the reaction of fluorescamine with primary amines. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S.l.], v. 163, n. 1, p. 390–399, jul. 1974. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003986174904901>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

DEARTH, C. L.; KEANE, T. J.; CARRUTHERS, C. A.; REING, J. E.; HULEIHEL, L.; RANALLO, C. A.; BADYLAK, S. F. The effect of terminal sterilization on the material properties and in vivo remodeling of a porcine dermal biologic scaffold. **Acta Biomaterialia**, [S.l.], v. 33, p. 78–87, 15 mar. 2016. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706116300381>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

DELGADO, M.; LÁZARO, A.; MAZO, J.; ZALBA, B. Review on phase change material emulsions and microencapsulated phase change material slurries: Materials, heat transfer studies and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S.l.], v. 16, n. 1, p. 253–273, jan. 2012. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032111003996>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

DENG, L. M.; WANG, Y. Z.; YANG, K. K.; WANG, X. L.; ZHOU, Q.; DING, S. D. A new biodegradable copolyester poly(butylene succinate-co-ethylene succinate-co-ethylene terephthalate). **Acta Materialia**, [S.l.], v. 52, n. 20, p. 5871–5878, 2004. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359645404005439>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

DEYOUNG, M. B.; MACCONELL, L.; SARIN, V.; TRAUTMANN, M.; HERBERT, P. Encapsulation of Exenatide in Poly-(d,l-Lactide-Co-Glycolide) Microspheres Produced an Investigational Long-Acting Once-Weekly Formulation for Type 2 Diabetes. **Diabetes Technology & Therapeutics**, [S.l.], v. 13, n. 11, p. 1145–1154, 13 jul. 2011. Disponível em <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/dia.2011.0050>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; McNEIL, S. E. **Handbook of Immunological Properties of Engineered Nanomaterials**. Vol. 1. World Scientific, 2016.

DORATI, R.; GENTA, I.; MONTANARI, L.; CILURZO, F.; BUTTAFAVA, A.; FAUCITANO, A.; CONTI, B. The effect of γ -irradiation on PLGA/PEG microspheres containing ovalbumin. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 107, n. 1, p. 78–90, 20 set. 2005. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016836590500252X>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

EL-SAY, K. M.; EL-SAWY, H. S. Polymeric nanoparticles: promising platform for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], jun. 2017. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517317305604>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

ELSABAHY, M.; WOOLEY, K. L. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. **Chemical Society Reviews**, [S.l.], v. 41, n. 7, p. 2545–2561, 12 mar. 2012. Disponível em <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2012/cs/c2cs15327k>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

ERDEMLI, Ö.; KESKIN, D.; TEZCANER, A. Influence of excipients on characteristics and release profiles of poly(ϵ -caprolactone) microspheres containing immunoglobulin G. **Materials Science and Engineering: C**, [S.l.], v. 48, p. 391–399, 1 mar. 2015. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092849311400842X>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

FERNÁNDEZ-CARBALLIDO, A.; PUEBLA, P.; HERRERO-VANRELL, R.; PASTORIZA, P. Radiosterilisation of indomethacin PLGA/PEG-derivative microspheres: Protective effects of low temperature during gamma-irradiation. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 313, n. 1–2, p. 129–135, 26 abr. 2006. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517306000858>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

FERREIRA, A. K.; MENEGUELO, R.; PEREIRA, A.; R. FILHO, O. M.; CHIERICE, G. O.; MARIA, D. A. Synthetic Phosphoethanolamine Induces Apoptosis Through Caspase-3 Pathway by Decreasing Expression of Bax/Bad Protein and Changes Cell Cycle in Melanoma. **Journal of Cancer Science & Therapy**, [S.l.], v. 3, n. 3, 5 fev. 2011. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332213000152>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

FERREIRA, A. K.; MENEGUELO, R.; MARQUES, F. L. N.; RADIN, A., R. FILHO, O. M.; NETO, S. C.; MARIA, D. A. Synthetic phosphoethanolamine a precursor of membrane phospholipids reduce tumor growth in mice bearing melanoma B16-F10 and in vitro induce apoptosis and arrest in G2/M phase. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.l.], v. 66, n. 7, p. 541–548, out. 2012. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332212000571>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

FERREIRA, L. P.; MOREIRA, A. N.; PINTO, J. C.; DE SOUZA, F. G. Synthesis of poly(butylene succinate) using metal catalysts. **Polymer Engineering & Science**, [S.l.], v. 55, n. 8, p. 1889–1896, 2015. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pen.24029/full>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 55, n. 1, p. R1–R4, 1 out. 1989. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378517389902810>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: Reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 102, n. 2, p. 313–332, 2005. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365904004845>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

GAJATE, C.; DAKIR, E. L.; FONTERIZ, R. I.; ALVAREZ, J.; MOLLINEDO, F. Antitumor alkyl-lysophospholipid analog edelfosine induces apoptosis in pancreatic cancer by targeting endoplasmic reticulum. **Oncogene**, [S.l.], v. 31, n. 21, p. 2627–2639, 24 maio 2012. Disponível em <<http://search.proquest.com/openview/47dfd786ec2e5b2772c1c43c53dcfc36/1?pq-origsite=gscholar&cbl=36330>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

GERT, S.; RAMAZANI, F.; CHEN, W.; VAN NOSTRUM, C. F.; KIESSLING, F.; LAMMERS, T.; KOK, R. J. Strategies for encapsulation of small hydrophilic and amphiphilic drugs in PLGA microspheres: state-of-the-art and challenges. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 499, n. 1–2, p. 358–367, 2016. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517316300205>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

GIGLI, M.; FABBRI, M.; LOTTI, N.; GAMBERINI, R.; RIMINI, B.; MUNARI, A. Poly(butylene succinate)-based polyesters for biomedical applications: A review. **European Polymer Journal**, [S.l.], v. 75, p. 431–460, 2016. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305716300167>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

GRAGE, K.; JAHNS, A. C.; PARLANE, N.; PALANISAMY, R.; RASIAH, I. A.; ATWOOD, J. A.; REHM, B. H. Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. **Biomacromolecules**, [S.l.], v. 10, n. 4, p. 660–669, 13 abr. 2009. Disponível em <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm801394s>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

GUALANDI, C.; SOCCIO, M.; SAINO, E.; FOCARETE, M. L.; LOTTI, N.; MUNARI, A.; VISAI, L. Easily synthesized novel biodegradable copolyesters with adjustable properties for biomedical applications. **Soft Matter**, [S.l.], v. 8, n. 20, p. 5466–5476, 2012. Disponível em <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2012/sm/c2sm25308a>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

GUERREIRO, L. H.; GIRAD-DIAS, W.; MIRANDA, K. R. D.; LIMA, L. M. T. A fluorescence-based assay for octreotide in kinetic release from depot formulations. **Química Nova**, [S.l.], v. 35, n. 5, p. 1025–1029, 2012. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422012000500029&script=sci_arttext>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

HANSEN, C. M. **Hansen Solubility Parameters: A User's Handbook**, Second Edition. [s.l.] CRC Press, 2007.

HAUGEN, H. J.; BRUNNER, M.; PELLKOFER, F.; AIGNER, J.; WILL, J.; WINTERMANTEL, E. Effect of different γ -irradiation doses on cytotoxicity and material properties of porous polyether-urethane polymer. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, [S.l.], v. 80B, n. 2, p. 415–423, 1 fev. 2007. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.b.30612/full>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

HERRERO-VANRELL, R.; BRAVO-OSUNA, I.; ANDRÉS-GUERRERO, V.; VICARIO-DE-LA-TORRE, M.; MOLINA-MARTÍNEZ, I. T. The potential of using biodegradable microspheres in retinal diseases and other intraocular pathologies. **Progress in Retinal and Eye Research**, [S.l.], v. 42, p. 27–43, set. 2014. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350946214000263>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

IGARTUA, M.; HERNÁNDEZ, R. M.; ROSAS, J. E.; PATARROYO, M. E.; PEDRAZ, J. L. γ -Irradiation effects on biopharmaceutical properties of PLGA microspheres loaded with SPf66 synthetic vaccine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S.l.], v. 69, n. 2, p. 519–526, jun. 2008. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641107004201>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

ITO, H.; ISLAM, M. S. Effect of dose rate on inactivation of microorganisms in spices by electron-beams and gamma-rays irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, [S.l.], v. 43, n. 6, p. 545–550, 1 jun. 1994. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0969806X94901651>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

JAIN, D.; PATHAK, K. Design, Characterization, and Evaluation of Meloxicam Gel Prepared by Suspension and Solution Polymerization Using Solubility Parameter as the Basis for Development. **AAPS PharmSciTech**, [S.l.], v. 11, n. 1, p. 133–142, 1 mar. 2010. Disponível em <<http://link.springer.com/article/10.1208/s12249-009-9369-0>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

JEONG, J.O.; JEONG, S. I.; SHIN, Y. M.; PARK, J. S.; GWON, H. J.; AN, S. J.; LIM, Y. M. Development of Acrylic Acid Grafted Polycaprolactone (PCL)/Biphasic Calcium Phosphate (BCP) Nanofibers for Bone Tissue Engineering Using Gamma-Irradiation. **Polymer Korea**, [S.l.], v. 39, n. 3, p. 418–425, 2015. Disponível em <http://www.koreascience.or.kr/article/ArticleFullRecord.jsp?cn=GBJHCY_2015_v39n3_418>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

JO, S. Y.; PARK, J. S.; GWON, H. J.; SHIN, Y. M.; KHIL, M. S.; NHO, Y. C.; LIM, Y. M. Degradation behavior of poly (l-lactide-co-glycolide) films through gamma-ray irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, [S.l.], v. 81, n. 7, p. 846–850, jul. 2012. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969806X12001600>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

KANJICKAL, D. G.; LOPINA, S. T. Modeling of Drug Release from Polymeric Delivery Systems — A Review. **Critical reviews in therapeutic drug carrier systems**, [S.l.], v. 21, n. 5, p. 345–386, 2004. Disponível em <<http://www.dl.begellhouse.com/journals/3667c4ae6e8fd136,3531fe42318c587e,361d6a6553c179ed.html>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

KATOU, H.; WANDREY, A. J.; GANDER, B. Kinetics of solvent extraction/evaporation process for PLGA microsphere fabrication. **International journal of pharmaceutics**, [S.l.], v. 364, n. 1, p. 45–53, 2008. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517308005425>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

KELES, H.; NAYLOR, A.; CLEGG, F.; SAMMON, C. Investigation of factors influencing the hydrolytic degradation of single PLGA microparticles. **Polymer Degradation and Stability**, [S.l.], v. 119, p. 228–241, set. 2015. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391015001627>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

KEMALA, T.; BUDIANTO, E.; SOEGIYONO, B. Preparation and characterization of microspheres based on blend of poly(lactic acid) and poly(ϵ -caprolactone) with poly(vinyl alcohol) as emulsifier. **Arabian Journal of Chemistry**, [S.l.], v. 5, n. 1, p. 103–108, jan. 2012. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535210001450>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

KHALIL, A.; ALBACHIR, M.; ODEH, A. Effect of Gamma Irradiation on Some Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Wheat Grains. **Polycyclic Aromatic Compounds**, [S.l.], v. 36, n. 5, p. 873–883, 19 out. 2016. Disponível em <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10406638.2015.1042551>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

KIM, B. K.; CHO, D.; KWON, O. H.; PARK, W. H.; LEE, J. H. Effects of electron beam irradiation on the gel fraction, thermal and mechanical properties of poly(butylene succinate) crosslinked by multi-functional monomer. **Materials & Design**, [S.l.], v. 87, p. 428–435, dez. 2015. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264127515302951>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

KIM, D. J.; KIM, W. S.; LEE, D. H.; MIN, K. E.; PARK, L. S.; KANG, I. K.; SEO, K. H. Modification of poly(butylene succinate) with peroxide: Crosslinking, physical and thermal properties, and biodegradation. **Journal of Applied Polymer Science**, [S.l.], v. 81, n. 5, p. 1115–1124, 1 ago. 2001. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/app.1534/full>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

KIM, H. S.; KIM, H. J.; LEE, J. W.; CHOI, I. G. Biodegradability of bio-flour filled biodegradable poly(butylene succinate) bio-composites in natural and compost soil. **Polymer Degradation and Stability**, [S.l.], v. 91, n. 5, p. 1117–1127, maio 2006. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391005003150>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

KIM, S.; Lim, C. K.; Na, J.; Lee, Y. D.; Kim, K.; Choi, K.; Kwon, I. C. **Conjugated polymer nanoparticles for biomedical in vivo imaging**. [S.l.], v. 46, n. 10, p. 1617–1619, 14 mar. 2010. Disponível em <<http://pubs.rsc.org/is/content/articlehtml/2010/cc/b923309a>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

KOBIASI, M. A.; CHUA, B. Y.; TONKIN, D.; JACKSON, D. C.; MAINWARING, D. E. Control of size dispersity of chitosan biopolymer microparticles and nanoparticles to influence vaccine trafficking and cell uptake. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, [S.l.], v. 100A, n. 7, p. 1859–1867, 1 jul. 2012. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.a.34153/full>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

KOTHA, S. B.; RAMAKRISHNAIAH, R.; DEVANG DIVAKAR, D.; CELUR, S. L.; QASIM, S.; MATINLINNA, J. P. Effect of disinfection and sterilization on the tensile strength, surface roughness, and wettability of elastomers. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, [S.l.], p. n/a-n/a, [s.d.]. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jicd.12244/full>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

KRAFFT, C.; NEUDERT, L.; SIMAT, T.; SALZER, R. Near infrared Raman spectra of human brain lipids. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [S.l.], v. 61, n. 7, p. 1529–1535, maio 2005. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386142504005852>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

LEE, T. H.; WANG, J.; WANG, C. H. Double-walled microspheres for the sustained release of a highly water soluble drug: Characterization and irradiation studies. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 83, n. 3, p. 437–452, 2002. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365902002353>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

LI, L.; MAK, K. Y.; SHI, J.; LEUNG, C. H.; WONG, C. M.; LEUNG, C. W.; PONG, P. W. T. Sterilization on dextran-coated iron oxide nanoparticles: Effects of autoclaving, filtration, UV irradiation, and ethanol treatment. **Microelectronic Engineering**, [S.l.], v. 111, p. 310–313, nov. 2013. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167931713001226>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches. **International journal of pharmaceutics**, [S.l.], v. 363, n. 1–2, p. 26–39, 2008. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037851730800522X>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

LIANG, E.; CHESSIC, K.; YAZDANIAN, M. Evaluation of an accelerated Caco-2 cell permeability model. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 89, n. 3, p. 336–345, 1 mar. 2000. Disponível em <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1520-6017\(200003\)89:3%3C336::AID-JPS5%3E3.0.CO;2-M/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1520-6017(200003)89:3%3C336::AID-JPS5%3E3.0.CO;2-M/full)>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

LOPES, C. M. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 41, n. 2, p. 142–154, 2005. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/rbcf/v41n2/28035.pdf>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

LUCIANI, A.; COCCOLI, V.; ORSI, S.; AMBROSIO, L.; NETTI, P. A. PCL microspheres based functional scaffolds by bottom-up approach with predefined microstructural properties and release profiles. **Biomaterials**, [S.l.], v. 29, n. 36, p. 4800–4807, dez. 2008. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961208006844>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

LUK, J. Z.; COOPER-WHITE, J.; RINTOUL, L.; TARAN, E.; GRØNDAHL, L. Functionalised polycaprolactone films and 3D scaffolds via gamma irradiation-induced grafting. **Journal of Materials Chemistry B**, [S.l.], v. 1, n. 33, p. 4171–4181, 31 jul. 2013. Disponível em <<http://pubs.rsc.org/content/articlehtml/2013/tb/c3tb20267d>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

LYONS, J. G.; BLACKIE, P.; HIGGINBOTHAM, C. L. The significance of variation in extrusion speeds and temperatures on a PEO/PCL blend based matrix for oral drug delivery. **International journal of pharmaceuticals**, [S.l.], v. 351, n. 1–2, p. 201–8, 2008. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517307008253>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

MA, X.; SANTIAGO, N.; CHEN, Y. S.; CHAUDHARY, K.; MILSTEIN, S. J.; BAUGHMAN, R. A. Stability Study of Drug-loaded Proteinoid Microsphere Formulations during Freeze-drying. **Journal of Drug Targeting**, [S.l.], v. 2, n. 1, p. 9–21, 1 jan. 1994. Disponível em <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10611869409015889>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

MALLICK, B.; Patel, T.; Behera, R. C.; Sarangi, S. N.; Sahu, S. N.; Choudhury, R. K. Microstrain analysis of proton irradiated PET microfiber. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, [S.l.], v. 248, n. 2, p. 305–310, ago. 2006. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168583X06006410>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

MEMISOGLU-BILENSOY, E.; HINCAL, A. A. Sterile, injectable cyclodextrin nanoparticles: Effects of gamma irradiation and autoclaving. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 311, n. 1–2, p. 203–208, 2006. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517305008471>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

MITRAGOTRI, S.; BURKE, P. A.; LANGER, R. Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies. **Nature reviews. Drug discovery**, [S.l.], v. 13, n. 9, p. 655–72, 2014. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4455970/>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

MIYATA, K.; CHRISTIE, R. J.; KATAOKA, K. Polymeric micelles for nano-scale drug delivery. **Reactive and Functional Polymers**, Special Issue in Celebration of the 60th Birthday of Professor Kazunori Kataoka. [S.l.], v. 71, n. 3, p. 227–234, mar. 2011. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381514810001835>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

MOHANRAJ, K.; SETHURAMAN, S.; KRISHNAN, U. M. Development of poly(butylene succinate) microspheres for delivery of levodopa in the treatment of Parkinson's disease. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, [S.l.], v. 101 B, n. 5, p. 840–847, 2013. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.b.32888/full>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

MOHR, D.; WOLFF, M.; KISSEL, T. Gamma irradiation for terminal sterilization of 17 β -estradiol loaded poly-(d,l-lactide-co-glycolide) microparticles. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 61, n. 1–2, p. 203–217, ago. 1999. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365999001182>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

MONACO, G.; CHOLAS, R.; SALVATORE, L.; MADAGHIELE, M.; SANNINO, A. Sterilization of collagen scaffolds designed for peripheral nerve regeneration: Effect on microstructure, degradation and cellular colonization. **Materials Science and Engineering: C**, [S.l.], v. 71, p. 335-344, 2017. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493116317787>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

MONTANARI, L.; CILURZO, F.; VALVO, L.; FAUCITANO, A.; BUTTAFAVA, A.; GROppo, A.; CONTI, B. Gamma irradiation effects on stability of poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing clonazepam. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 75, n. 3, p. 317–330, ago. 2001. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365901004011>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

NGUYEN, T. T. T.; GHOSH, C.; HWANG, S. G.; CHANUNPANICH, N.; PARK, J. S. Porous core/sheath composite nanofibers fabricated by coaxial electrospinning as a potential mat for drug release system. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 439, n. 1–2, p. 296–306, 15 dez. 2012. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517312008848>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

NIKOLIC, M. S.; DJONLAGIC, J. Synthesis and characterization of biodegradable poly(butylene succinate-co-butylene adipate)s. **Polymer Degradation and Stability**, [S.l.], v. 74, n. 2, p. 263–270, jan. 2001. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391001001562>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

NINAYA, Z. H. A.; HAMID, Z. A.; AHMAD, Z.; JAAFAR, M.; YAHAYA, B. H. Development and Evaluation of Surface Modified Poly (lactic acid) Microsphere via Irradiation Techniques for Drug Delivery System. **Procedia Chemistry**, [S.l.], v. 19, p. 373–380, 2016. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876619616000723>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

NIU, Y.; CAO, L.; WEI, J.; MA, Y.; SONG, S.; WENG, W.; SU, J. Development of a bioactive composite of nano fluorapatite and poly(butylene succinate) for bone tissue regeneration. **Journal of Materials Chemistry B**, [S.l.], v. 2, n. 9, p. 1174–1181, 2014. Disponível em <<http://pubs.rsc.org/-/content/articlehtml/2014/tb/c3tb21371d>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

NUGROHO, P.; MITOMO, H.; YOSHII, F.; KUME, T.; NISHIMURA, K. Improvement of processability of PCL and PBS blend by irradiation and its biodegradability. **Macromolecular Materials and Engineering**, [S.l.], v. 286, n. 5, p. 316–323, 2001. Disponível em <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1439-2054\(20010501\)286:5%3C316::AID-MAME316%3E3.0.CO;2-N/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1439-2054(20010501)286:5%3C316::AID-MAME316%3E3.0.CO;2-N/full)>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

PARK, S. J.; LEE, Y. M.; HONG, S. K. Release behaviors of porous poly(butylene succinate)/poly(ϵ -caprolactone) microcapsules containing indomethacin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S.l.], v. 47, n. 2, p. 211–215, 2006. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092777650500353X>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

PATEL, B.; GUPTA, V.; AHSAN, F. PEG–PLGA based large porous particles for pulmonary delivery of a highly soluble drug, low molecular weight heparin. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 162, n. 2, p. 310–320, 10 set. 2012. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365912005433>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

PEREIRA, E. D.; CERRUTI, R.; FERNANDES, E.; PEÑA, L.; SAEZ, V.; PINTO, J. C.; SOUZA JÚNIOR, F. G. D. Influence of PLGA and PLGA-PEG on the dissolution profile of oxaliplatin. **Polímeros**, [S.l.], v. 26, p. 137–143, 2016. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010414282016000200137&script=sci_arttext>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

PHUA, Y. J.; CHOW, W. S.; MOHD ISHAK, Z. A. The hydrolytic effect of moisture and hygrothermal aging on poly(butylene succinate)/organomontmorillonite nanocomposites. **Polymer Degradation and Stability**, [S.l.], v. 96, n. 7, p. 1194–1203, jul. 2011. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391011001674>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

PLAPIED, L.; DUHEM, N.; DES RIEUX, A.; PRÉAT, V. Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, [S.l.], v. 16, n. 3, p. 228–237, jun. 2011. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359029411000033>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

RAI, R.; TALLAWI, M.; ROETHER, J. A.; DETSCH, R.; BARBANI, N.; ROSELLINI, E.; BOCCACCINI, A. R. Sterilization effects on the physical properties and cytotoxicity of poly(glycerol sebacate). **Materials Letters**, [S.I.], v. 105, p. 32–35, 15 ago. 2013. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167577X13004989>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

RAŽEM, D.; KATUŠIN-RAŽEM, B. The effects of irradiation on controlled drug delivery/controlled drug release systems. **Radiation Physics and Chemistry**, [S.I.], v. 77, n. 3, p. 288–344, 2008. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969806X07002824>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

ROGERS, W. J. Steam and dry heat sterilization of biomaterials and medical devices. **Sterilisation of Biomaterials and Medical Devices**. Woodhead Publishing, 2012, cap. 2, p. 20–55.

ROGOBETE, A. F.; DRAGOMIRESCU, M.; BEDREAG, O. H.; SANDESC, D.; CRADIGATI, C. A.; SARANDAN, M.; PREDA, G. New aspects of controlled release systems for local anaesthetics: A review. **Trends in Anaesthesia and Critical Care**, [S.I.], v. 9, p. 27–34, set. 2016. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221084401630017X>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

SAKAR, F.; ÖZER, A. Y.; ERDOGAN, S.; EKIZOGLU, M.; KART, D.; ÖZALP, M.; ZENCIR, Y. Nano drug delivery systems and gamma radiation sterilization. **Pharmaceutical Development and Technology**, [S.I.], v. 22, n. 6, p. 775-784, 2017. Disponível em <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10837450.2016.1163393>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

SAKATA, N.; AOKI, T.; YOSHIMATSU, G.; TSUCHIYA, H.; HATA, T.; KATAYOSE, Y.; UNNO, M. Strategy for clinical setting in intramuscular and subcutaneous islet transplantation. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, [S.I.], v. 30, n. 1, p. 1–10, 1 jan. 2014. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dmrr.2463/full>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

SANDLE, T. Steam sterilisation. **Sterility, Sterilisation and Sterility Assurance for Pharmaceuticals**. Woodhead Publishing, 2013, cap. 7, p. 93–109.

SANSDRAP, P.; MOËS, A. J. Influence of manufacturing parameters on the size characteristics and the release profiles of nifedipine from poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 98, n. 1–3, p. 157–164, 1993. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037851739390052H>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

SAVARIS, M.; SANTOS, V. DOS; BRANDALISE, R. N. Influence of different sterilization processes on the properties of commercial poly(lactic acid). **Materials Science and Engineering: C**, [S.l.], v. 69, p. 661–667, 2016. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493116307056>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

SEFAT, F.; McKEAN, R.; DESHPANDE, P.; RAMACHANDRAN, C.; HILL, C. J.; SANGWAN, V. S.; MACNEIL, S. Production, Sterilisation and Storage of Biodegradable Electrospun PLGA Membranes for Delivery of Limbal Stem Cells to the Cornea. **Procedia Engineering**, [S.l.], v. 59, p. 101–116, 2013. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877705813010138>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

SEYEDNEJAD, H.; GHASSEMI, A. H.; VAN NOSTRUM, C. F.; VERMONDEN, T.; HENNINK, W. E. Functional aliphatic polyesters for biomedical and pharmaceutical applications. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 152, n. 1, p. 168–176, 2011. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365911000095>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

SHALABY, S. W. Radiation Effects on Polymers of Biomedical Significance. In: **Irradiation of Polymeric Materials**, [S.l.], v. 527, p. 315–319, 1993. Disponível em <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-1993-0527.ch020>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

SHARMA, G.; VALENTA, D. T.; ALTMAN, Y.; HARVEY, S.; XIE, H.; MITRAGOTRI, S.; SMITH, J. W. Polymer particle shape independently influences binding and internalization by macrophages. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 147, n. 3, p. 408–412, 2010. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365910006437>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

SHEN, J.; CHOI, S.; QU, W.; WANG, Y.; BURGESS, D. J. In vitro-in vivo correlation of parenteral risperidone polymeric microspheres. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 218, p. 2–12, 28 nov. 2015. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365915301516>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

SHISHATSKAYA, E.; GOREVA, A.; KALACHEVA, G.; VOLOVA, T. Biocompatibility and Resorption of Intravenously Administered Polymer Microparticles in Tissues of Internal Organs of Laboratory Animals. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, [S.l.], v. 22, n. 16, p. 2185–2203, 1 jan. 2011. Disponível em <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1163/092050610X537138>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J.; BRYCE, D. L. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. John Wiley & Sons, 2014.

SOMMERFELD, P.; SCHROEDER, U.; SABEL, B. A. Sterilization of unloaded polybutylcyanoacrylate nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 164, n. 1–2, p. 113–118, 13 abr. 1998. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517397003943>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

SONG, C.; YOSHII, F.; KUME, T. Radiation Crosslinking of Biodegradable Poly(Butylene Succinate) At High Temperature. **Journal of Macromolecular Science - Part A**, [S.l.], v. 38, n. 9, p. 961–971, 2001. Disponível em <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/MA-100104947>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

SPADARO, G.; DISPENZA, C.; GIAMMONA, G.; PITARRESI, G.; CAVALLARO, G. Cytarabine release from α , β -poly (N-hydroxyethyl)-dl-aspartamide matrices cross-linked through γ -radiation. **Biomaterials**, [S.l.], v. 17, n. 10, p. 953–958, 1996. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0142961296846680>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

STAFF, R. H.; SCHAEFFEL, D.; TURSHATOV, A.; DONADIO, D.; BUTT, H. J.; LANDFESTER, K.; CRESPIY, D. Particle Formation in the Emulsion-Solvent Evaporation Process. **Small**, [S.l.], v. 9, n. 20, p. 3514–3522, 25 out. 2013. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/smll.201300372/full>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

SUHARTINI, M.; MITOMO, H.; NAGASAWA, N.; YOSHII, F.; KUME, T. Radiation crosslinking of poly(butylene succinate) in the presence of low concentrations of trimethylol isocyanurate and its properties. **Journal of Applied Polymer Science**, [S.l.], v. 88, n. 9, p. 2238–2246, 2003. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/app.11944/full>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

SUTTHIPHONG, S.; PAVASANT, P.; SUPAPHOL, P. Electrospun 1,6-diisocyanatohexane-extended poly(1,4-butylene succinate) fiber mats and their potential for use as bone scaffolds. **Polymer**, [S.l.], v. 50, n. 6, p. 1548–1558, 6 mar. 2009. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386109000822>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

TABATABAEI, S. J.; NABID, M. R.; NIKNEJAD, H.; ENTEZAMI, A. A. Multifunctional and thermoresponsive unimolecular micelles for tumor-targeted delivery and site-specifically release of anticancer drugs. **Polymer**, [S.l.], v. 53, n. 16, p. 3485–3497, 19 jul. 2012. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386112004818>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

TACCA, M. D.; COLUCCI, R.; FORNAI, M.; BLANDIZZI, C. Efficacy and Tolerability of Meloxicam, a COX-2 Preferential Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug. **Clinical Drug Investigation**, [S.l.], v. 22, n. 12, p. 799–818, 1 dez. 2002. Disponível em <<http://link.springer.com/article/10.2165/00044011-200222120-00001>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

TAGHIPOUR, B.; YAKHCHALI, M.; HARIRIAN, I.; TAMADDON, A. M.; SAMANI, S. M. The effects of technical and compositional variables on the size and release profile of bovine serum albumin from PLGA based particulate systems. **Research in Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 9, n. 6, p. 407–420, 2014. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4326979/>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

THOMARAYIL MATHEW, S.; DEVI SUBBIAH, G.; VISWANADHAN VASANTHA, P.; BALAN, V. Characterization and Pharmacokinetic Evaluation of Gamma Sterilized Ketorolac Tromethamine Loaded Albumin Microspheres for Intramuscular Administration. **Current Drug Delivery**, [S.l.], v. 10, n. 2, p. 158–166, 2013. Disponível em <<http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cdd/2013/00000010/00000002/art00002>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

TIAN, X.; WEI, F.; WANG, T. X.; WANG, D.; WANG, J.; LIN, X. N.; REN, L. Blood–brain barrier transport of Tat peptide and polyethylene glycol decorated gelatin–siloxane nanoparticle. **Materials Letters**, [S.l.], v. 68, p. 94–96, 2012. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167577X11012043>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

TRAN, T. T.-D.; TRAN, P. H.-L.; LEE, B.-J. Dissolution-modulating mechanism of alkalizers and polymers in a nanoemulsifying solid dispersion containing ionizable and poorly water-soluble drug. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S.l.], v. 72, n. 1, p. 83–90, maio 2009. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641108004839>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

VAN NGO, H.; NGUYEN, P. K.; VAN VO, T.; DUAN, W.; TRAN, V. T.; TRAN, P. H. L.; TRAN, T. T. D. Hydrophilic-hydrophobic polymer blend for modulation of crystalline changes and molecular interactions in solid dispersion. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 513, n. 1–2, p. 148–152, nov. 2016. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517316308389>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

VOLLAND, C.; WOLFF, M.; KISSEL, T. The influence of terminal gamma-sterilization on captopril containing poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 31, n. 3, p. 293–305, out. 1994. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168365994900124>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

WANG, H.; JI, J.; ZHANG, W.; WANG, W.; ZHANG, Y.; WU, Z.; CHU, P. K. Rat calvaria osteoblast behavior and antibacterial properties of O₂ and N₂ plasma-implanted biodegradable poly(butylene succinate). **Acta Biomaterialia**, [S.l.], v. 6, n. 1, p. 154–159, jan. 2010. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706109003122>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

WANG, J.; NG, C. W.; WIN, K. Y.; SHOEMAKERS, P.; LEE, T. K. Y.; FENG, S. S.; WANG, C. H. Release of paclitaxel from polylactide-co-glycolide (PLGA) microparticles and discs under irradiation. **Journal of microencapsulation**, [S.l.], v. 20, n. 3, p. 317–327, 2003. Disponível em <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/02652040309178072>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

WANG, Q. S.; WANG, G. F.; ZHOU, J.; GAO, L. N.; CUI, Y. L. Colon targeted oral drug delivery system based on alginate-chitosan microspheres loaded with icariin in the treatment of ulcerative colitis. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 515, n. 1–2, p. 176–185, 30 dez. 2016. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037851731630936X>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

WEBSTER, D. M.; SUNDARAM, P.; BYRNE, M. E. Injectable nanomaterials for drug delivery: Carriers, targeting moieties, and therapeutics. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S.l.], v. 84, n. 1, p. 1–20, 2013. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641112004262>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

XU, J.; GUO, B. H. Poly(butylene succinate) and its copolymers: Research, development and industrialization. **Biotechnology Journal**, [S.l.], v. 5, n. 11, p. 1149–1163, 2010. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/biot.201000136/full>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

YAMAN, A. Alternative methods of terminal sterilization for biologically active macromolecules. **Current opinion in drug discovery & development**, [S.l.], v. 4, n. 6, p. 760–763, 2001. Disponível em <<http://europepmc.org/abstract/med/11899616>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

YANG, Y. Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. **Biomaterials**, [S.l.], v. 22, n. 3, p. 231–241, fev. 2001. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961200001782>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

YAR, M.; FAROOQ, A.; SHAHZADI, L.; KHAN, A. S.; MAHMOOD, N.; RAUF, A.; UR REHMAN, I. Novel meloxicam releasing electrospun polymer/ceramic reinforced biodegradable membranes for periodontal regeneration applications. **Materials Science and Engineering: C**, [S.l.], v. 64, p. 148–156, 2016. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493116302478>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

YOKOZAWA, T.; YOKOYAMA, A. Chain-growth polycondensation: The living polymerization process in polycondensation. **Progress in Polymer Science**, 50 years of living polymerization. [S.l.], v. 32, n. 1, p. 147–172, jan. 2007.

Disponível em

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670006000669>>.

Acesso em: 20 de jun. 2017.

YOSHIOKA, S.; ASO, Y.; OTSUKA, T.; KOJIMA, S. The effect of γ -irradiation on drug release from poly(lactide) microspheres. **Radiation Physics and Chemistry**, [S.l.], v. 46, n. 2, p. 281–285, ago. 1995. Disponível em

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0969806X9500025S>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

YU, W. W.; CHANG, E.; DREZEK, R.; COLVIN, V. L. Water-soluble quantum dots for biomedical applications. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S.l.], v. 348, n. 3, p. 781–786, set. 2006. Disponível em

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X06016421>>.

Acesso em: 20 de jun. 2017.

YUAN, Y.; LI, S. M.; MO, F. K.; ZHONG, D. F. Investigation of microemulsion system for transdermal delivery of meloxicam. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 321, n. 1–2, p. 117–123, set. 2006. Disponível em

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517306004868>>.

Acesso em: 20 de jun. 2017.

ZEMBOUAI, I.; KACI, M.; BRUZAUD, S.; PILLIN, I.; AUDIC, J. L.; SHAYANFAR, S.; PILLAI, S. D. Electron beam radiation effects on properties and ecotoxicity of PHBV/PLA blends in presence of organo-modified montmorillonite. **Polymer Degradation and Stability**, [S.l.], v. 132, p. 117–126, 2016. Disponível em

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391016300714>>.

Acesso em: 20 de jun. 2017.

ZHAO, J. H.; WANG, X. Q.; ZENG, J.; YANG, G.; SHI, F. H.; YAN, Q.

Biodegradation of poly(butylene succinate) in compost. **Journal of Applied Polymer Science**, [S.l.], v. 97, n. 6, p. 2273–2278, 2005. Disponível em

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/app.22009/full>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

ZHU, L.; BAKOVIC, M. Breast cancer cells adapt to metabolic stress by increasing ethanolamine phospholipid synthesis and CTP:ethanolaminephosphate cytidyltransferase-Pcyt2 activity. **Biochemistry and Cell Biology**, [S.l.], v. 90, n. 2, p. 188–199, 16 fev. 2012. Disponível em <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/o11-081>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

ZOU, K. H.; TUNCALI, K.; SILVERMAN, S. G. Correlation and Simple Linear Regression. **Radiology**, [S.l.], v. 227, n. 3, p. 617–628, 1 jun. 2003. Disponível em <<http://pubs.rsna.org/doi/abs/10.1148/radiol.2273011499>>. Acesso em: 20 de jun. 2017.

ANEXO A: TABELA DE ENTRADA PARA AS CORRELAÇÕES DAS MICROESFERAS VAZIAS

	Solvente	Dose	Mn	Mw	PDI	Fração Gel	D (v; 0,5)	Tm (°C)	DeltaHf (J/g)	Td (°C)-DSC	DeltaHd (J/g)	Td (°C)-TGA	RMSE
PBSC	C	0	2760	11862	4,3	13,000	17,04	108,97	88,90	407,35	419,84	406,46	0,000
PBSC 25	C	25	3821	7921	2,07	14,354	18,15	107,60	84,20	407,49	379,85	409,82	0,956
PBSC 50	C	50	5001	7758	1,55	20,488	20,52	110,67	105,33	412,43	386,39	410,41	0,360
PBSC 100	C	100	2680	6255	2,33	19,512	18,32	109,77	101,12	413,01	357,98	410,60	0,350
PBSD	D	0	2760	11862	4,3	9,045	15,72	110,69	83,37	411,40	447,20	404,33	0,000
PBSD 25	D	25	4179	8160	1,95	18,164	24,78	109,36	83,84	406,14	468,79	405,69	0,340
PBSD 50	D	50	5326	8857	1,66	16,355	23,74	108,92	80,55	407,60	447,02	407,15	0,836
PBSD 100	D	100	4613	8444	1,83	20,324	24,31	107,56	80,89	406,80	422,71	407,25	0,445

**ANEXO B: TABELA DE ENTRADA PARA AS CORRELAÇÕES DO ESTUDO
DE LIBERAÇÃO**

Solvente	Farmaco	Dose	Tempo	Liberado
D	M	0	0,25	5,878
D	M	0	0,5	6,476
D	M	0	1	8,966
D	M	0	2	12,447
D	M	0	2,25	13,648
D	M	0	2,5	14,399
D	M	0	3	14,691
D	M	0	4	16,393
D	M	0	5	16,715
D	M	0	6	17,507
D	M	25	0,25	3,527
D	M	25	0,5	5,955
D	M	25	1	7,494
D	M	25	2	12,355
D	M	25	2,25	14,496
D	M	25	2,5	15,268
D	M	25	3	15,110
D	M	25	4	15,411
D	M	25	5	15,713
D	M	25	6	16,955
D	M	50	0,25	2,586
D	M	50	0,5	4,994
D	M	50	1	5,572
D	M	50	2	9,451
D	M	50	2,25	10,121
D	M	50	2,5	12,211
D	M	50	3	12,462
D	M	50	4	13,183
D	M	50	5	13,443
D	M	50	6	13,704
D	M	100	0,25	2,116
D	M	100	0,5	3,573
D	M	100	1	6,471
D	M	100	2	7,079
D	M	100	2,25	9,109
D	M	100	2,5	9,768
D	M	100	3	10,438
D	M	100	4	10,647
D	M	100	5	10,387

D	M	100	6	11,056
C	M	0	0,25	6,349
C	M	0	0,5	9,308
C	M	0	1	11,859
C	M	0	2	15,871
C	M	0	2,25	16,204
C	M	0	2,5	17,006
C	M	0	3	17,349
C	M	0	4	22,864
C	M	0	5	26,611
C	M	0	6	27,607
C	M	25	0,25	4,938
C	M	25	0,5	5,986
C	M	25	1	9,875
C	M	25	2	10,085
C	M	25	2,25	12,176
C	M	25	2,5	17,129
C	M	25	3	17,952
C	M	25	4	19,725
C	M	25	5	22,000
C	M	25	6	22,435
C	M	50	0,25	4,938
C	M	50	0,5	5,986
C	M	50	1	7,524
C	M	50	2	7,683
C	M	50	2,25	10,192
C	M	50	2,5	10,872
C	M	50	3	12,033
C	M	50	4	13,684
C	M	50	5	18,657
C	M	50	6	18,560
C	M	100	0,25	5,878
C	M	100	0,5	8,828
C	M	100	1	12,779
C	M	100	2	13,050
C	M	100	2,25	13,321
C	M	100	2,5	14,532
C	M	100	3	19,996
C	M	100	4	21,341
C	M	100	5	25,997
C	M	100	6	26,514
D	F	0	0,25	23,028
D	F	0	0,5	25,986

D	F	0	1	26,864
D	F	0	2	27,429
D	F	0	2,25	27,991
D	F	0	2,5	28,128
D	F	0	3	31,293
D	F	0	4	33,553
D	F	0	5	34,698
D	F	0	6	35,059
D	F	25	0,25	4,882
D	F	25	0,5	5,411
D	F	25	1	7,202
D	F	25	2	7,568
D	F	25	2,25	7,692
D	F	25	2,5	9,825
D	F	25	3	12,156
D	F	25	4	12,460
D	F	25	5	12,495
D	F	25	6	12,661
D	F	50	0,25	7,848
D	F	50	0,5	7,538
D	F	50	1	7,175
D	F	50	2	6,815
D	F	50	2,25	11,415
D	F	50	2,5	16,501
D	F	50	3	16,375
D	F	50	4	16,075
D	F	50	5	14,868
D	F	50	6	15,855
D	F	100	0,25	2,557
D	F	100	0,5	4,030
D	F	100	1	4,602
D	F	100	2	7,269
D	F	100	2,25	12,814
D	F	100	2,5	14,912
D	F	100	3	14,623
D	F	100	4	15,216
D	F	100	5	14,647
D	F	100	6	15,763
C	F	0	0,25	7,800
C	F	0	0,5	8,761
C	F	0	1	9,411
C	F	0	2	10,676
C	F	0	2,25	10,206

C	F	0	2,5	10,278
C	F	0	3	10,440
C	F	0	4	10,444
C	F	0	5	10,312
C	F	0	6	10,424
C	F	25	0,25	3,517
C	F	25	0,5	3,220
C	F	25	1	3,190
C	F	25	2	4,672
C	F	25	2,25	4,719
C	F	25	2,5	5,304
C	F	25	3	6,409
C	F	25	4	6,796
C	F	25	5	6,564
C	F	25	6	6,306
C	F	50	0,25	3,809
C	F	50	0,5	4,248
C	F	50	1	5,323
C	F	50	2	6,045
C	F	50	2,25	5,991
C	F	50	2,5	6,728
C	F	50	3	7,612
C	F	50	4	9,453
C	F	50	5	10,973
C	F	50	6	11,420
C	F	100	0,25	9,131
C	F	100	0,5	9,827
C	F	100	1	11,474
C	F	100	2	12,235
C	F	100	2,25	12,378
C	F	100	2,5	11,399
C	F	100	3	12,947
C	F	100	4	12,815
C	F	100	5	13,678
C	F	100	6	14,017