

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

Hanniman Denizard Cosme Barbosa

**5-FLUOROURACIL ENCAPSULADO EM MICROESFERAS DE
BIONANOCOMPÓSITOS QUITOSANA/ARGILA: PREPARAÇÃO E
CARACTERÍSTICAS DE LIBERAÇÃO**

Campina Grande – PB

2018

Hanniman Denizard Cosme Barbosa

**5-FLUOROURACIL ENCAPSULADO EM MICROESFERAS DE
BIONANOCOMPÓSITOS QUITOSANA/ARGILA: PREPARAÇÃO E
CARACTERÍSTICAS DE LIBERAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de **Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais**.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Suédina Maria de Lima Silva

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Luis Canedo

Campina Grande – PB

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

B238c Barbosa, Hanniman Denizard Cosme.
5-Fluorouracil encapsulado em microesferas de bionanocompósitos quitosana/argila : preparação e características de liberação / Hanniman Denizard Cosme Barbosa. – Campina Grande, 2018.
141 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2108.
"Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Suédina Maria de Lima Silva, Prof. Dr. Eduardo Luis Canedo".
Referências.

1. Quitosana. 2. 5-Fluorouracil. 3. Microesferas. 4. Montmorilonita.
I. Carvalho, Laura Hecker de. II. Canedo, Eduardo Luis. III. Título.

CDU 667.473(043)

VITAE DO CANDIDATO

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- Graduação em Licenciatura em Química pela Universidade Federal da Paraíba - UFPB – João Pessoa – PB, 2003.
- Graduação em Bacharelado em Química pela Universidade Federal da Paraíba - UFPB – João Pessoa – PB, 2008.
- Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Campina Grande - UFCG – Campina Grande – PB, 2008.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

- Técnico em química - REPET NORDESTE RECICLAGEM LTDA, Alhandra–PB. Entre 1999 - 2003.
- Químico responsável - REPET NORDESTE RECICLAGEM LTDA, Alhandra–PB. Entre 2003 - 2010.
- Professor de Química - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, IFAM, campus Tabatinga. Entre 2010 - 2012.
- Professor de Química - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba, IFPB, campus Esperança. Desde 2012.

HANNIMAN DENIZARD COSME BARBOSA

5-FLUOROURACIL ENCAPSULADO EM MICROESFERAS DE
BIONANOCOMPÓSITOS QUITOSANA/ARGILA: PREPARAÇÃO E
CARACTERÍSTICAS DE LIBERAÇÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Engenharia de
Materiais como requisito parcial à
obtenção do título de **Doutor em Ciência
e Engenharia de Materiais**.

Aprovado em: 06/02/2018

Suédina M. de L. Silva

Dr.^a Suédina Maria de Lima Silva
Orientadora
PPG-CEMat/UAEMA/UFCG

Eduardo Canedo

Dr. Eduardo Luis Canedo
Orientador
PPG-CEMat/UAEMA/UFCG

Laura Hecker de Carvalho

Dr.^a Laura Hecker de Carvalho
Examinadora Interna
PPG-CEMat/UAEMA/UFCG

Marcelo S. Rabello

Dr. Marcelo Silveira Rabello
Examinador Interno
PPG-CEMat/UAEMA/UFCG

Itamara Farias Leite

Dr.^a Itamara Farias Leite
Examinadora Externa
-DEMAT-UFPB

Nadja Maria da Silva Oliveira

Dr.^a Nadja Maria da Silva Oliveira
Examinadora Externa
DO-UEPB

Dedico este trabalho à minha família:
Aos meus pais, Anchieta e Ivonete, que sempre se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus; à minha filha, Luanna, que brincando sempre dilui minhas angústias e alegra-me; e à minha esposa, Amanda, pelo apoio, incentivo e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dr.^a Suédina Maria de Lima Silva, agradeço sua disponibilidade e principalmente pela confiança em meu trabalho. Devo a ela uma contribuição inestimável para o meu amadurecimento intelectual e pessoal.

Ao meu coorientador, Dr. Eduardo Luis Canedo, agradeço sua disponibilidade e o ensino da visão matemática dos fenômenos físicos.

Aos membros da banca examinadora por terem aceitado o convite e pelas valiosas contribuições.

Aos amigos, que sempre estiveram disponíveis para ajudar – Bárbara, Albaniza, Aracelle, Cristiano, Pedro e Samuel Bitu. Obrigado por me darem força e apoio quando precisei.

A Márcia e André, secretários do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, pela atenção e dedicação.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba, pelo apoio à qualificação docente, possibilitando-me o afastamento remunerado para a realização desta pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram para essa conquista.

RESUMO

Neste trabalho, microesferas de quitosana e quisotana/montmorilonita (MMT), contendo o fármaco antitumoral 5-Fluorouracil (5-FU), foram produzidas pela técnica de inversão de fase usando um equipamento simples e de baixo custo desenvolvido durante a execução deste trabalho. Os efeitos da presença da montmorilonita e da morfologia das microesferas foram estudados com base nos perfis de liberação do 5-FU *in vitro* em solução tampão fosfato (PBS) em pH 1,2; 7,4 e 10, difratometria de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e simulações computacionais. Os resultados indicaram que o equipamento desenvolvido permitiu produzir esferas reprodutíveis e uniformes e que a incorporação de MMT a quitosana levou a formação de bionanocompósitos, o que resultou em um aumento na eficiência de encapsulamento e redução do coeficiente de difusão do 5-FU nas microesferas, favorecendo a uma taxa de liberação mais lenta devido a uma maior acomodação das moléculas do 5-FU nas galerias da MMT. Em PBS pH 1,2 a liberação do 5-FU ocorreu por dissolução das microesferas, resultando em um comportamento de liberação não-Fickiano. Com relação à morfologia das microesferas, foi observado que microesferas de menor diâmetro apresentaram maior liberação de 5-FU no ambiente gastrointestinal simulado. As microesferas com bionanocompósito apresentaram características de liberação controlada com potencial para ultrapassar a barreira gástrica e liberar o 5-FU no ambiente intestinal. Além disso, apresentam morfologia compatível para uso em local específico, através de técnicas de quimioembolização. Assim, este estudo sugere que a metodologia utilizada foi adequada para a síntese de microesferas de bionanocompósitos quitosana/montmorilonita com alta eficiência de encapsulamento e com características controladas de liberação do fármaco, indicando que os bionanocompósitos podem ser sistemas promissores de administração do 5-FU por uma terapia menos invasiva do que a via venosa.

Palavras-chave: Quitosana, 5-Fluorouracil, microesferas, montmorilonita.

ABSTRACT

In this work, chitosan and chitosan/montmorillonite (MMT) microspheres, containing the 5-Fluorouracil (5-FU) antitumor drug, were produced by phase inversion technique using a simple and low cost equipment developed during the development of this study. The effects of montmorillonite and microspheres morphology were studied based on 5-FU release profiles *in vitro* in phosphate buffered saline (PBS) at pH 1.2; 7,4 and 10, X-ray diffractometry (XRD), scanning electron microscopy (SEM) and computational simulations. The results indicated that the developed equipment allowed manufacturing reproducible and uniform spheres and the incorporation of MMT to chitosan contributed to bionanocomposites formation. The production of bionanocomposites result in an increase in the encapsulation efficiency and reduction of 5-FU diffusion coefficient in the microspheres, contributed to 5-FU slower release rate due to a greater accommodation of the 5-FU molecules in the MMT galleries. In PBS pH 1.2 the release of 5-FU was by microspheres dissolution, resulting in a non-Fickian release behavior. Regarding the microsphere morphology, it was observed that smaller diameter microspheres showed higher release of 5-FU in the simulated gastrointestinal environment. The microspheres with bionanocomposites presented controlled release characteristics with potential to overcome the gastric barrier and release 5-FU into the intestinal environment. In addition, demonstrated compatible morphology for application in specific place, through chemoembolization techniques. Thus, this study suggests that the methodology used was appropriate for chitosan/montmorillonite bionanocomposite microspheres synthesis with high drug encapsulation efficiency and controlled release characteristics, indicating that the bionanocomposites can be promising systems of 5-FU administration by a less invasive therapy than the venous route.

Keywords: Chitosan, 5-Fluorouracil, microspheres, montmorillonite.

PUBLICAÇÕES

BARBOSA, H. D. C.; SANTOS, B. F. F.; TAVARES, A. A.; BARBOSA, R. C.; FOOK, M. V. L.; CANEDO, E. L.; SILVA, S. M. L. Inexpensive apparatus for fabricating microspheres for 5-fluorouracil controlled release systems. *International Journal of Chemical Engineering*, v. 2018, p. 8, 2018.

MACIEL, M. A.; SANTOS, B. F. F.; CANEDO, E. L.; SILVA, S. M. L.; **BARBOSA, H. D. C.** Dispositivo de baixo custo e com sistema automatizado de fluxo de injeção para produção de microesferas de quitosana. In: XIX Congresso dos Estudantes de Ciência e Engenharia de Materiais do Mercosul, 2017, Belo Horizonte. *Anais XIX Congresso dos Estudantes de Ciência e Engenharia de Materiais do Mercosul*, 2017.

MACIEL, M. A.; **BARBOSA, H. D. C.;** SANTOS, A. A.; SILVA, S. M. L.; CANEDO, E. L.; SANTOS, B. F. F. Preparação de bionanocompósitos quitosana/montmorilonita para uso em sistemas carreadores de fármacos. In: XIV Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais e Engenharia de Tecidos, 2017, Maresias-SP. *Anais XIV Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais e Engenharia de Tecidos*, 2017.

SANTOS, B. F. F.; **BARBOSA, H. D. C.;** CANEDO, E. L.; TAVARES, A. A.; SILVA, S. M. L. Encapsulamento do fármaco ibuprofeno em bionanocompósitos quitosana/montmorilonita visando à liberação controlada do mesmo. In: XIV Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos, 2017, Maresias-SP. *Anais XIV Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos*, 2017.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Curvas de concentração após ingestão de doses terapêuticas: (A) liberação convencional; (B) liberação controlada (Gomes, 2015). | 21 |
| Figura 2 - (A) Microesfera – o agente ativo está distribuído em uma matriz polimérica; (B) Microcápsula – o agente ativo está envolvido por um agente encapsulante (Suave <i>et al.</i> , 2006). | 22 |
| Figura 3 - Ilustração dos sistemas poliméricos de liberação de fármacos, (A) em reservatório e (B) matricial (Adaptado de Gomes (2015)) | 23 |
| Figura 4 - Processo de difusão (A) e erosão (B) em matriz polimérica . Adaptado de Manadas <i>et al.</i> (2002). | 26 |
| Figura 5 - (A) Inicialmente, a placa de cerâmica apresenta um perfil nulo de concentração de A; (B) no instante de tempo $t = 0$, coloca-se A sobre a superfície superior da placa; (C) para $t > 0$, ocorre o desenvolvimento da distribuição $C_A(y,t)$ em regime transiente e em (D) com $t \gg 0$, estabelecimento de um perfil de $C_A(y)$ em regime permanente (Livi, 2000). | 28 |
| Figura 6 - Representação das coordenadas esféricas. | 30 |
| Figura 7 - Estrutura química da quitosana, porção N-acetil-D-glucosamina (A) e porção D-glucosamina (B) (Araújo, 2015). | 36 |
| Figura 8 - Representação esquemática da esmectita (Coelho <i>et al.</i> , 2007). .. | 38 |
| Figura 9 - Estrutura molecular do 5-FU (Azhar e Olad, 2014). | 40 |
| Figura 10 - Vias de ativação metabólicas do 5-FU. difosfato de floxuridina (FUDP); monofosfato de floxuridina (FUMP); trifosfato de floxuridina (FUTP); fluorodesoxiuridina (FUDR); difosfato de fluorodesoxiuridina (FdUDP); monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP); trifosfato de fluorodesoxiuridina (FduTP); 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP); timidilato sintase (TS); ribonucleotídeo redutase (RR); timidina quinase (TK); dihidrofluorouracil (DHFU); dihidropirimidina desidrogenase (DPD); uridina fosfatase (UP); uridina quinase (UK); fluoridina (FUR); fosforribosiltranserese (OPRT); fosfato de timidina (TP) (Longley <i>et al.</i> , 2003). | 41 |
| Figura 11 - (A) Esquema do sistema de obtenção das microesferas contendo compressor de ar (1), sistema de gotejamento (2), solução coagulante (3) e bomba de aquário (4); (B) Imagem do sistema de obtenção das microesferas (Prado <i>et al.</i> , 2010). | 47 |
| Figura 12 - Microcontrolador Arduino Uno (Arduino, 2015). | 48 |

| | |
|---|----|
| Figura 13 - Software Integrated Development Environment (IDE) (Arduino, 2015). | 49 |
| Figura 14 - Sistema de injeção microcontrolado. | 50 |
| Figura 15 - Condições periódicas de contorno em três dimensões. | 54 |
| Figura 16 - Imagem do modelo MMT/5-FU de simulação em dinâmica molecular (Bellon, 2014). | 55 |
| Figura 17 - Diagrama esquemático (A), detalhe do sistema de gotejamento (B) e equipamento (C), usado para preparar microesferas de quitosana: (1) microcontrolador eletrônico, (2) bomba de injeção, (3) ventura, (4) agitador, (5) rotâmetro, (6) bomba de ar. | 57 |
| Figura 18 - Fluxograma do programa ProglInjeção. | 58 |
| Figura 19 - Sistema de agitação/aquecimento adaptado para preparar a solução de quitosana com (1) sensor Pt 100, (2) agitador-aquecedor, (3) microcontrolador PID, (4) temporizador. | 59 |
| Figura 20 - Diagrama de blocos de um sistema de controle em malha fechada, baseado no microprocessador PID (Bezerra, 2010). | 60 |
| Figura 21 - Definição dos ângulos diedros φ e ψ ao redor da ligação glicosídica. | 67 |
| Figura 22 - Regularidade dos deslocamento do parafuso nos fluxos estudados: 0,150 mL.min ⁻¹ (V_1), 0,300 mL.min ⁻¹ (V_2) e 0,600 mL.min ⁻¹ (V_3). | 70 |
| Figura 23 - Imagens, obtidas por microscopia ótica, das microesferas de quitosana preparadas com três fluxos de injeção: 0,150 mL.min ⁻¹ (V_1), 0,300 mL.min ⁻¹ (V_2) e 0,600 mL.min ⁻¹ (V_3) e quatro fluxos de ar (2,5; 5,0; 7,5 e 10 L.min ⁻¹). | 71 |
| Figura 24 - Superfície de resposta tridimensional (A), Superfície de contorno bidimensional (B). | 73 |
| Figura 25 - Valores estimados e experimentais para o modelo. | 74 |
| Figura 26 - Diâmetro das microesferas preparadas em diferentes fluxos de ar. | 75 |
| Figura 27 - Formação das gotas com diferentes fluxos de ar. | 76 |
| Figura 28 - Curvas de pressão das microesferas V_1 -2,5 (A) e V_1 -10 (B). | 76 |
| Figura 29 - MEV dos padrões de rupturas e esfericidade de V_1 -2,5 (A) e V_3 -10 (B). | 78 |
| Figura 30 - Imagens obtidas por MO das microesferas com 5-FU. | 79 |
| Figura 31 - Perda de esfericidade V_1 -2,5-FA (A) e V_1 -10-FA (B). | 80 |

| | |
|---|----|
| Figura 32 - Interação do 5-FU com a hidroxila HO3-O3. Esta imagem foi captuada na simulação em 50 °C..... | 81 |
| Figura 33 - Interação do N2 com a hidroxila HO3-O3 na temperatura de 50 °C. | 81 |
| Figura 34 - Interação entre o hidrogênio do N1e o O1 da quitosana (A); Interação entre o Fluor e a hidroxila HO3-O3 (B); Interação 5-FU com o grupo amino (C). | 82 |
| Figura 35 - Evolução temporal do número de pontes de hidrogênio formadas entre o 5-FU e o filamento de quitosana nas simulações..... | 83 |
| Figura 36 - Evolução temporal das distâncias médias entre o 5-FU e o filamento de quitosana. | 84 |
| Figura 37 - Difração de raio X quitosana (A), 5-FU/quitosana/MMT(B) e MMT pura(C). | 85 |
| Figura 38 - Curvas de absorção UV-vis do 5-FU em água de lavagem (A) e curva de calibração 5-FU em água de lavagem no $\lambda_{max} = 283$ nm (B)..... | 86 |
| Figura 39 - Possível arranjo estrutural 5-FU/MMT (Azhar e Olad, 2014)..... | 87 |
| Figura 40 - Curvas de absorção UV do 5-FU em PBS pH 1.2 (A) e curva de calibração 5-FU em PBS pH 1.2 (B)..... | 88 |
| Figura 41 - Curvas de absorção UV do 5-FU em PBS pH 7.4 (A) e curva de calibração 5-FU em PBS pH 7.4 (B)..... | 89 |
| Figura 42 - Curvas de absorção UV do 5-FU em PBS pH 10 (A) e curva de calibração 5-FU em PBS pH 10 (B)..... | 89 |
| Figura 43 - Perfil de liberação do 5-FU das microesferas em PBS pH 1,2 sem MMT (A) e com MMT (B)..... | 91 |
| Figura 44 - Rugosidade das microesferas V ₁ -2,5-F (A), V ₁ -10-F (B), V ₁ -2,5-FA (C) e V ₁ -10-FA (D)..... | 93 |
| Figura 45 - Perfil de liberação do 5-FU das microesferas em PBS pH 7,4 sem MMT (A) e com MMT (B)..... | 96 |
| Figura 46 - Perfil de liberação do 5-FU das microesferas em PBS pH 10 sem MMT (A) e com MMT (B)..... | 96 |
| Figura 47 - Desestabilização e estabilização da ligação de hidrogênio intramolecular O3–HO3O5 (Silva <i>et al.</i> , 2011)..... | 97 |
| Figura 48 - Simulação <i>in vitro</i> de liberação gastrointestinal do 5-FU das microesferas sem MMT (A) e com MMT (B)..... | 98 |

| | |
|---|-----|
| Figura 49 - Esquema ilustrativo das frentes de movimento (intumescimento, difusão e erosão) durante a liberação de fármacos a partir de sistemas matriciais intumescíveis (Lopes <i>et al.</i> , 2005)..... | 99 |
| Figura 50 - Taxa de liberação $V_{1-2,5-F}$ e V_{1-10-F} (A) e $V_{1-2,5-FA}$ e $V_{1-10-FA(B)}$ em PBS pH 7,4. | 100 |
| Figura 51 - Taxa de liberação $V_{1-2,5-F}$ e V_{1-10-F} (A) e $V_{1-2,5-FA}$ e $V_{1-10-FA(B)}$ em PBS pH 10. | 101 |
| Figura 52 - MEV renderizada $V_{1-2,5-FA}$ antes da liberação (A); $V_{1-2,5-FA}$ pós liberação em pH 7,4 (B) e pH 10 (C); $V_{1-10-FA}$ antes da liberação (D); $V_{1-10-FA}$ pós liberação pH 7,4 (E) e pH 10 (F). | 103 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1 - Expoente n da Equação de Korsmeyer e mecanismo de liberação de fármaco. | 34 |
| Tabela 2 - Nomenclatura das microesferas em relação ao processamento e composição. | 61 |
| Tabela 3 - Grau de desacetilação da quitosana. | 69 |
| Tabela 4 - Dados dimensionais das microesferas de quitosana. | 72 |
| Tabela 5 - Coeficientes de correlação de Pearson, R^2 e erro padrão. | 77 |
| Tabela 6 - Dados dimensionais das microesferas com 5-FU. | 79 |
| Tabela 7 - Dados de eficiência de encapsulação do 5-FU. | 87 |
| Tabela 8 - Média das absorvâncias do 5-FU em pH 1,2, 7,4 e 10. | 88 |
| Tabela 9- Limites de detecção e quantificação das curvas de calibração de 5-FU em pH 1.2, 7.4 e 10. | 90 |
| Tabela 10 - Parâmetros de dissolução do modelo de Hixson-Crowell das microesferas em pH 1,2. | 90 |
| Tabela 11 – Dados de fração liberada (%) de 5-FU de V_1 -2,5-F e V_1 -10-F em pH 1.2; 7.4 e 10. | 94 |
| Tabela 12 - Dados de fração liberada (%) de 5-FU de V_1 -2,5-FA e V_1 -10-FA em pH 1,2; 7,4 e 10. | 94 |
| Tabela 13 - Parâmetros de regressão da equação de Korsmeyer na liberação 5-FU V_1 -2,5-F e V_1 -10-F em PBS pH 7,4 e 10. | 101 |
| Tabela 14 - Parâmetros de regressão da equação de Korsmeyer na liberação 5-FU V_1 -2,5-FA e V_1 -10-FA em PBS pH 7,4 e 10. | 102 |
| Tabela 15 - Número de microesferas (N), coeficientes q_n e α da liberação <i>in vitro</i> | 104 |
| Tabela 16 - Coeficientes de difusão (D) das microesferas em PBS pH 7,4 e 10. | 104 |
| Tabela 17 - Massa de 5-FU liberada pelas microesferas V_1 -2.5-F em PBS pH 1.2. | 130 |
| Tabela 18 - Massa de 5-FU liberada pelas microesferas V_1 -10-F em PBS - pH 1,2. | 130 |
| Tabela 19 - Massa de 5-FU liberada pelas microesferas V_1 -2.5-F em PBS pH 7,4. | 131 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 20 - Massa de 5-FU liberada pelas microesferas V ₁ -10-F em PBS pH 7,4..... | 131 |
| Tabela 21 - Massa de 5-FU liberada pelas microesferas V ₁ -2.5-F em PBS pH 10..... | 132 |
| Tabela 22 - Massa de 5-FU liberada pelas microesferas V ₁ -10-F em PBS pH 10..... | 132 |
| Tabela 23 - Massa de 5-FU liberada pelas microesferas V ₁ -2.5-FA em PBS pH 1.2..... | 133 |
| Tabela 24 - Massa de 5-FU liberada pelas microesferas V ₁ -10-FA em PBS - pH 1,2..... | 133 |
| Tabela 25 - Massa de 5-FU liberada pelas microesferas V ₁ -2.5-FA em PBS - pH 7,4..... | 134 |
| Tabela 26 - Massa de 5-FU liberada pelas microesferas V ₁ -10-FA em PBS - pH 7,4..... | 134 |
| Tabela 27 - Massa de 5-FU liberada pelas microesferas V ₁ -2.5-FA em PBS - pH 10..... | 135 |
| Tabela 28 - Massa de 5-FU liberada pelas microesferas V ₁ -10-FA em PBS - pH 10..... | 135 |
| Tabela 29 - Número de microesferas presentes em 500 mg..... | 136 |

SUMÁRIO

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 18 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 20 |
| 2.1 | Liberação Prolongada de Fármacos | 20 |
| 2.2 | Sistemas Erosivos..... | 25 |
| 2.3 | Transporte de Massa por Difusão Molecular..... | 26 |
| 2.3.1 | Método para Determinação do q_n | 31 |
| 2.4 | Perfil e Cinética de Liberação do Fármaco..... | 32 |
| 2.5 | Biopolímeros | 34 |
| 2.5.1 | Quitosana..... | 35 |
| 2.6 | Montmorilonita..... | 38 |
| 2.7 | 5-Fluorouracil | 39 |
| 2.7.1 | Encapsulamento do 5-Fluorouracil..... | 43 |
| 2.7.2 | Individualização Farmacocinética do 5-Fluorouracil | 46 |
| 2.8 | Equipamento para Obtenção de Microesferas Poliméricas..... | 46 |
| 2.8.1 | Microcontrolador | 47 |
| 2.9 | Modelagem Molecular | 50 |
| 2.9.1 | Dinâmica Molecular..... | 52 |
| 2.9.1.1 | Condições Periódicas de Contorno..... | 53 |
| 2.9.1.2 | Dinâmica Molecular do Complexo 5-FU/MMT | 54 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 56 |
| 3.1 | Materiais..... | 56 |
| 3.2 | Métodos..... | 56 |
| 3.2.1 | Preparação das Microesferas de Quitosana e Quitosana/Argila..... | 56 |
| 3.2.2 | Encapsulamento do 5-Fluorouracil | 61 |
| 3.2.3 | Caracterização..... | 62 |
| 3.2.3.1 | Grau de desacetilação quitosana | 62 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 3.2.3.2 | Microscopia Ótica | 62 |
| 3.2.3.3 | Correlação dos parâmetros de processamento | 63 |
| 3.2.3.4 | Difratometria de Raios X (DRX)..... | 63 |
| 3.2.3.5 | Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)..... | 63 |
| 3.2.3.6 | Eficiência de encapsulação | 63 |
| 3.2.3.7 | Liberção do 5-FU | 64 |
| 3.2.3.8 | Coeficiente de difusão e q_n | 67 |
| 3.2.3.9 | Simulação por dinâmica molecular | 67 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 69 |
| 4.1 | Grau de Desacetilação da Quitosana..... | 69 |
| 4.2 | Correlação entre o Processamento e a Morfologia | 69 |
| 4.3 | Localização dos Sítios de Interação entre a Quitosana e o 5-FU..... | 80 |
| 4.4 | Difratometria de Raios X (DRX) | 84 |
| 4.5 | Eficiência de Encapsulação do 5-FU..... | 85 |
| 4.6 | Perfil de Liberação do 5-FU <i>in vitro</i> | 87 |
| 4.6.1 | Simulação Liberação Gastrointestinal | 97 |
| 4.6.2 | Cinética de Liberação..... | 100 |
| 4.6.3 | Coeficiente de Difusão | 104 |
| 4.6.4 | Dosagem e Individualização..... | 105 |
| 5 | CONCLUSÃO | 107 |
| 6 | SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 108 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 109 |
| 8 | APÊNDICE 1..... | 127 |
| 9 | APÊNDICE 2..... | 129 |
| 10 | APÊNDICE 3 | 136 |

1 INTRODUÇÃO

O 5-fluorouracil (5-FU) é um dos compostos quimioterapêuticos mais utilizados para o tratamento de câncer, especificamente para o câncer de mama (Longley *et al.*, 2003), gástrico (Dickson e Cunningham, 2004), do pâncreas (Pasetto *et al.*, 2004), de colo-retal (Dodov *et al.*, 2009) e tumores cerebrais (Lesniak e Brem, 2004). Uma das limitações deste quimioterápico é sua rápida metabolização resultando em uma semi-vida biológica de apenas 10-20 min (Rejinold *et al.*, 2011). Além disso, a absorção oral não é uniforme; ocorrem efeitos secundários tóxicos sobre o trato gastrointestinal e há uma ação não-seletiva contra células saudáveis (Joshi *et al.*, 2009). Assim, para obter uma concentração eficaz deste fármaco no sangue, muitas vezes se aumenta a quantidade do mesmo ou se faz a administração continuamente ou repetidamente, o que aumenta os efeitos colaterais tóxicos do 5-FU (Azhar e Olad, 2014).

Para minimizar os efeitos colaterais tóxicos do 5-FU, o encapsulamento deste fármaco em matrizes poliméricas como algina (alginato de sódio) (Arica *et al.*, 2002), policaprolactona (Martini *et al.*, 1995), gelatina (Narayani e Rao, 1996), poliácido láctico (PLA) (Zhu *et al.*, 2003) e, principalmente quitosana (Denkbaş *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2007; Arias, 2008; Zhang, 2008; Li *et al.*, 2009; Lin e Fu, 2009; Zhu *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2010; Ganguly *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Rejinold, N. S. *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2011; Anitha *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2012; Lam *et al.*, 2012; Nagarwal *et al.*, 2012; Tıǧlı Aydın e Pulat, 2012; Li *et al.*, 2013; Puga *et al.*, 2013; Anitha *et al.*, 2014; Fu *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014) tem sido proposto.

O uso da quitosana para encapsulamento do fármaco 5-FU é interessante não só por ser este polímero, oriundo de um recurso renovável abundante e de baixo custo, mas também por ser biocompatível, biodegradável, apresentar capacidade antioxidante, propriedade antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante e quando em contato com células humanas não provocar reações adversas. Além do mais, pode ser degradado por enzimas amplamente encontradas no corpo humano gerando resíduos não tóxicos (Bagheri-Khoulenjani *et al.*, 2009; Dash *et al.*, 2011). Entretanto, em comparação com os fármacos a base de proteínas (colágeno, albumina, gelatina), a liberação controlada de fármacos anticancerígenos, a exemplo do 5-FU, com massas molares baixas por meio de encapsulação em polissacarídeos

como quitosana ainda apresenta certas limitações. Devido ao elevado grau de intumescimento dos polissacarídeos, seguido da erosão e dissolução em meio aquoso ou apenas intumescimento através de hidratação com formação de uma rede polimérica ligada transversalmente (sem dissolução), a liberação de fármacos de baixa massa molar, geralmente, não pode ser eficazmente controlada e a taxa de liberação é alta (Gupta *et al.*, 2002; Aulton e Ortega, 2008; Yu *et al.*, 2008; Bizerra e Silva, 2016). A busca pelo encapsulamento eficiente e pela taxa de liberação lenta do 5-FU tem motivado a condução de pesquisas envolvendo a preparação de híbridos de quitosana/argila (Kevadiya, B. D. *et al.*, 2012; Azhar e Olad, 2014).

Como o número de estudos que trata do encapsulamento do fármaco 5-FU no híbrido quitosana/argila é muito limitado (Kevadiya, B. D. *et al.*, 2012; Azhar e Olad, 2014) e sabendo-se dos vários benefícios que podem ser alcançados para a liberação controlada do 5-FU com a associação de quitosana com montmorilonita (Yuan *et al.*, 2010), a condução deste estudo poderá resultar na elucidação de fatores ainda não esclarecidos no que se refere à eficiência de encapsulamento e liberação lenta do composto quimioterapêutico 5 FU, usado no tratamento de câncer. Além disso, como os sistemas comerciais de produção de microesferas de quitosana variam de R\$ 6 mil¹ (ultrassom) até R\$ 50 mil²(Spray drying) (Rorrer *et al.*, 1993; Luz *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2009; Prado *et al.*, 2009; Prado *et al.*, 2010); a construção de um sistema simples e de baixo (menor que R\$ 100) para obtenção de microesferas de quitosana/argila, encapsuladas com o fármaco 5-FU, baseado no equipamento apresentado por Dias *et al.* (2008) e aperfeiçoado por Prado *et al.* (2010) é de grande interesse.

O objetivo deste estudo foi encapsular o 5-FU, quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de câncer de mama, gástrico, de pâncreas, de fígado, do colo e retal e tumor cerebral, em microesferas de bionanocompósitos quitosana/argila visando sua administração por uma terapia menos invasiva do que a via venosa, que é a única disponível no mercado para utilização clínica do referido fármaco. As microesferas foram preparadas empregando um sistema simples e de baixo custo, construído durante a execução deste trabalho.

¹ Orçamento obtido da empresa Biovera Equipamentos e Serviços, referente ao equipamento Sonifier 450, em 11/03/2015.

² Orçamento obtido da empresa Buchi Brasil, referente ao equipamento Spray Dryer B-290, em 23/04/2015.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Liberação Prolongada de Fármacos

Sistemas de liberação controlada de fármacos são todos aqueles que têm como objetivo fornecer uma dose terapêutica de uma droga para um local predeterminado do corpo, e manter a concentração desejada (Gennaro, 2004), de modo controlado em velocidade e tempo apropriado, buscando também manter os níveis sanguíneos terapêuticos ótimos (Allen Jr *et al.*, 2013) e evitar, a níveis plasmáticos, a problemática da toxicidade e/ou doses tóxicas (Azevedo, 2002). Desta forma, esse sistema faz com que o fármaco seja liberado gradativamente, a um ritmo ditado pelas necessidades do corpo, por um período específico de tratamento (Gennaro, 2004).

Os tratamentos convencionais utilizados para combater processos infecciosos (soluções, suspensões, pílulas, entre outros) requerem uma administração por um longo período de tempo, visando manter os níveis terapêuticos do fármaco no organismo. Muitas vezes, tais níveis não são alcançados, pois o tratamento não exhibe resultados ou apresenta efeitos colaterais devido à alta concentração do fármaco. A manutenção da concentração do medicamento na corrente sanguínea, dentro da faixa terapêutica do medicamento, leva à redução no número de doses requeridas e ao aumento na eficácia do tratamento, pois desta forma diminui a possibilidade de alcançar níveis tóxicos ou subterapêuticos (Mishra *et al.*, 2010).

A Figura 1 ilustra a comparação entre o método convencional de multidosagem e o sistema de liberação controlada. Com sistemas convencionais tais como comprimidos ou injeções, o nível da droga no sangue segue o perfil mostrado na Figura 1 (A), no qual a concentração aumenta após cada administração da droga e então diminui até a próxima administração, proporcionando variações consideráveis na concentração do fármaco no plasma sanguíneo, podendo não haver efeito farmacológico ou ocasionar intoxicação, pois há uma faixa de concentração efetiva para a ação no organismo. Em sistemas com liberação controlada de drogas, o nível da droga no sangue segue um perfil mostrado na Figura 1 (B), permanecendo constante entre o máximo e o mínimo desejado por um longo período de tempo e proporcionando uma pequena variação na concentração

do fármaco com o tempo, impossibilitando, dessa forma, inefetividade ou toxicidade (Terence, 2002; Gomes, 2015).

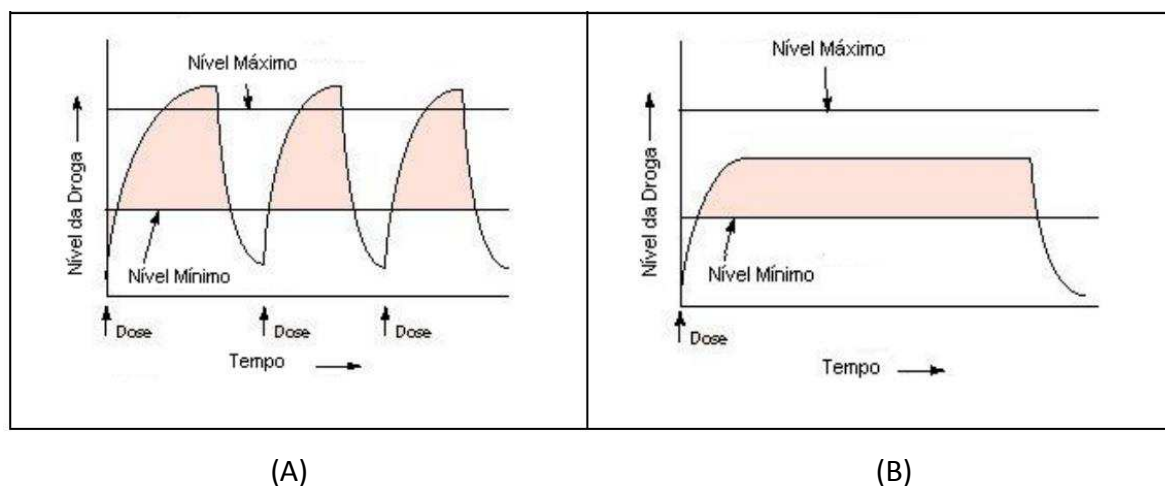


Figura 1 - Curvas de concentração após ingestão de doses terapêuticas: (A) liberação convencional; (B) liberação controlada (Gomes, 2015).

Em resumo, quando comparados aos sistemas convencionais de administração de fármacos, os sistemas de liberação controlada oferecem algumas vantagens como, por exemplo, maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco; diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação; administração segura (sem reações inflamatórias locais) e conveniente (menor número de doses); direcionamento a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas e tanto substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas podem ser incorporadas (Gennaro, 2004; Aulton, 2005; Choudhary e Devi, 2015).

Várias técnicas vêm sendo desenvolvidas e aplicadas para se promover uma liberação controlada do fármaco, com o objetivo de regular a sua velocidade de liberação, manter seu nível terapêutico constante por um maior período de tempo (processo conhecido como liberação de ordem zero), além de direcionar sua ação a um tecido específico. Dentre elas a técnica de microencapsulamento tem sido bastante estudada.

O termo microencapsulamento abrange a obtenção de diferentes produtos, como microcápsulas, microesferas, micropartículas e aprisionamento de substâncias ativas, as quais diferem entre si quanto à distribuição do componente ativo na matriz encapsulante. Sinha *et al.* (2004) e Suave *et al.* (2006) definem microesferas (Figura

2-A) como sendo partículas compactadas constituídas por uma rede polimérica na qual a substância ativa encontra-se distribuída. Já as microcápsulas (Figura 2-B) são as partículas constituídas por um núcleo interno contendo o agente ativo recoberto por uma camada de polímero de espessura variável; micropartícula é um termo que pode ser aplicado em ambas situações.

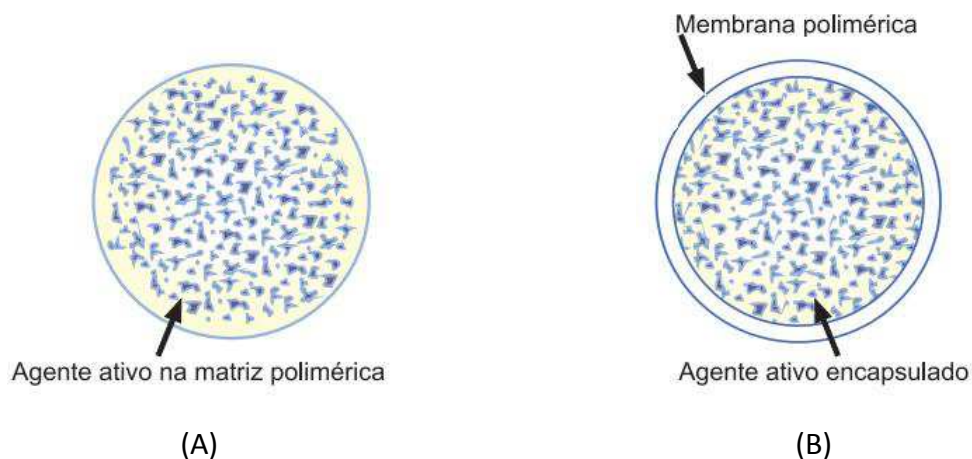


Figura 2 - (A) Microesfera – o agente ativo está distribuído em uma matriz polimérica; (B) Microcápsula – o agente ativo está envolvido por um agente encapsulante (Suave *et al.*, 2006).

As partículas formadas podem ter tamanhos e formas variadas. Partículas com tamanhos $>5000 \mu\text{m}$, de $0,2\text{-}5000 \mu\text{m}$ e $<0,2 \mu\text{m}$ são denominadas, respectivamente, macrocápsulas, microcápsulas e nanocápsulas. O formato das mesmas pode ser esférico, alongado, monolíticos ou agregados, com paredes simples ou múltiplas (De Villiers *et al.*, 2008).

Conceitualmente, existem dois tipos gerais de sistemas de liberação, de acordo com a disposição da substância ativa na matriz polimérica, chamados de sistema reservatório e sistema matricial (Kreuter, 2007). Esses sistemas podem ser observados na Figura 3. O material revestido é denominado núcleo ou material encapsulado. Já o material que forma o revestimento, é conhecido como matriz, material de parede ou encapsulante.

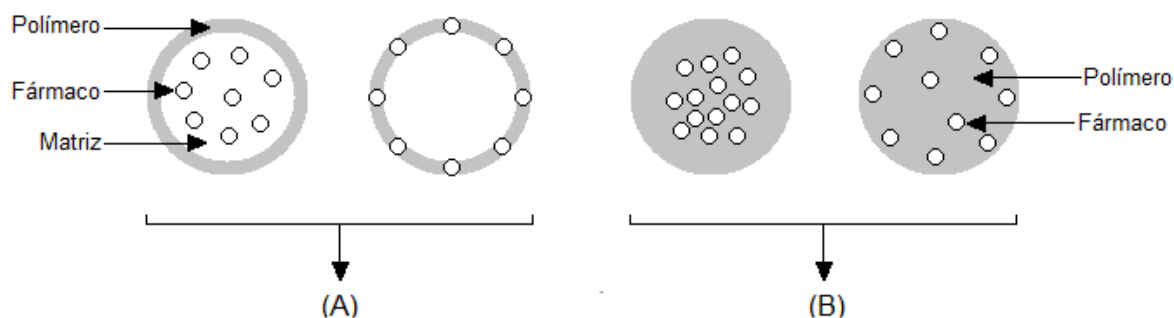


Figura 3 - Ilustração dos sistemas poliméricos de liberação de fármacos, (A) em reservatório e (B) matricial (Adaptado de Gomes (2015))

O sistema reservatório, representado por (A), é caracterizado por um envoltório polimérico que cobre o interior onde se encontra uma matriz com fármaco ou substância que será liberada. Por outro lado, o sistema matricial (B), é caracterizado por uma esfera polimérica maciça na qual se encontra partículas do fármaco distribuídas por toda a sua extensão (Anderson e Shive, 2012).

Dois são as propriedades fundamentais que devem ser avaliadas durante o desenvolvimento de um sistema de liberação de fármaco: a carga (quantidade) do fármaco incorporada ao sistema de liberação e a liberação do fármaco. O carregamento do fármaco na matriz de suporte é o processo de incorporação do fármaco dentro da matriz ou capsula. A liberação do fármaco é o processo inverso pelo qual as moléculas do fármaco são liberadas da fase sólida e tornam-se disponíveis para absorção e ação farmacológica. A quantidade do fármaco incorporada a uma matriz e a liberação do fármaco, podem ser avaliadas *in vitro*. Estudos *in vitro* permitem também se ter um controle de qualidade do sistema de liberação, obter informação sobre a estrutura interna do sistema carreador, obter informação sobre a interação fármaco-matriz de suporte e pode ser usado para prever o comportamento *in vivo* (Washington, 1990; Chorny *et al.*, 2002).

A eficiência da retenção do fármaco é outro parâmetro importante e está relacionada com a eficácia do método de preparação para incorporar o fármaco no sistema carreador (transportador). Idealmente, um carregamento elevado do fármaco com um carregamento nominal mínimo é desejado porque isso melhora a eficiência de retenção. Além disso, a quantidade de fármaco aprisionada também determina o desempenho do sistema de liberação do fármaco, uma vez que influencia a taxa e extensão da liberação do fármaco a partir do sistema. Tanto a

carga de fármaco quanto a eficácia de encapsulação dependem das propriedades físico-químicas e das interações entre o fármaco, a matriz de suporte e o ambiente (De Villiers *et al.*, 2008).

O fármaco pode ser incorporado na matriz por ligação de hidrogênio, interação iônica, interação dipolo, retenção física (ou encapsulação), precipitação, ligação covalente ou ser adsorvido na superfície. Na maioria dos sistemas de liberação de fármaco, mais de um mecanismo de incorporação está envolvido. Diferentes técnicas são utilizadas para investigar o mecanismo de carregamento. Estes incluem espectrofotometria no ultravioleta (UV), ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia no infravermelho (FTIR), difratometria de raios X (DRX) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) para avaliar a interação. Espectroscopia de elétrons é empregada para análise química assim como espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS) é usada para investigar a química da superfície (De Villiers *et al.*, 2008).

Em geral, dois modos de incorporação do fármaco podem ser distinguidos: carregamento do fármaco durante a formação das nanopartículas e após a preparação das nanopartículas (Allémann *et al.*, 1993). Se nanopartículas pré-formados são incubadas numa solução de um fármaco para incorporação do mesmo, o fármaco pode ser extensivamente adsorvido à grande área da superfície das nanopartículas que por sua vez pode resultar na explosão inicial de liberação, o que é mais pronunciado quanto menor o tamanho da nanopartícula (Chorny *et al.*, 2002; Pohlmann *et al.*, 2004; Lecaroz *et al.*, 2006). Além disso, este método resulta, em geral, em menor incorporação do fármaco (Illum *et al.*, 1986; Bapat e Boroujerdi, 1992; Lopes *et al.*, 2000; Soppimath *et al.*, 2001). Além disso, o tempo de incubação pode também influenciar a quantidade de fármaco incorporado na matriz de suporte, e o tempo de incubação tem que ser suficiente para atingir o equilíbrio para a máxima incorporação (Lopes *et al.*, 2000).

Um fator importante durante o incorporação de fármacos é a interação entre o fármaco e o sistema carreador (matriz de suporte) porque com o aumento desta interação (fármaco-matriz de suporte), tanto a incorporação quanto a eficiência de retenção do fármaco aumentam; entretanto, a taxa de liberação diminui. Para alta eficiência de retenção, é necessário que o fármaco interaja preferencialmente com a

matriz de suporte (polímero, lipídios) em vez de interagir com o meio circundante (Opanasopit *et al.*, 2006).

Conforme reportado na literatura (De Villiers *et al.*, 2008; Porte *et al.*, 2011), a liberação do fármaco pode ocorrer por diferentes mecanismos: sistemas difusivos, onde a liberação do fármaco é feita pela sua difusão através da membrana polimérica e sistemas erosivos que envolvem dois processos sequenciais, dependentes do tempo, que são a difusão do meio para o interior da matriz com consequente dilatação com formação de um gel e a degradação/dissolução, que podem ocorrer até a completa desagregação das cadeias poliméricas (Manadas *et al.*, 2002). Em ambos, o polímero tem um papel-chave na disponibilidade e liberação do fármaco. Esses mecanismos podem ocorrer por ação de hidrólise ou de enzimas.

2.2 Sistemas Erosivos

A forma farmacêutica é o estado final que os fármacos apresentam depois de serem submetidas às operações farmacêuticas necessárias, a fim de facilitar a sua administração e obter o maior efeito terapêutico (Brunton *et al.*, 2012). Nessas formas a liberação do fármaco ocorre por dissolução a partir de partículas que sofreram erosão (Figura 4). A liberação de fármacos solúveis a partir da matriz envolve o processo sequencial de difusão do meio para a matriz, hidratação e dilatação da matriz, dissolução do fármaco e difusão através dos canais intersticiais da matriz para o meio, o que é em grande parte dependente do grau de viscosidade do gel formado (Katzhändler *et al.*, 1997). O diferente modo como a erosão ocorre condiciona fortemente o perfil de liberação do fármaco. Para fármacos muito solúveis, a liberação é determinada principalmente pela difusão do fármaco através da camada gelificada, mas para fármacos pouco ou muito pouco solúveis a liberação será controlada pelo processo de erosão (Manadas *et al.*, 2002).

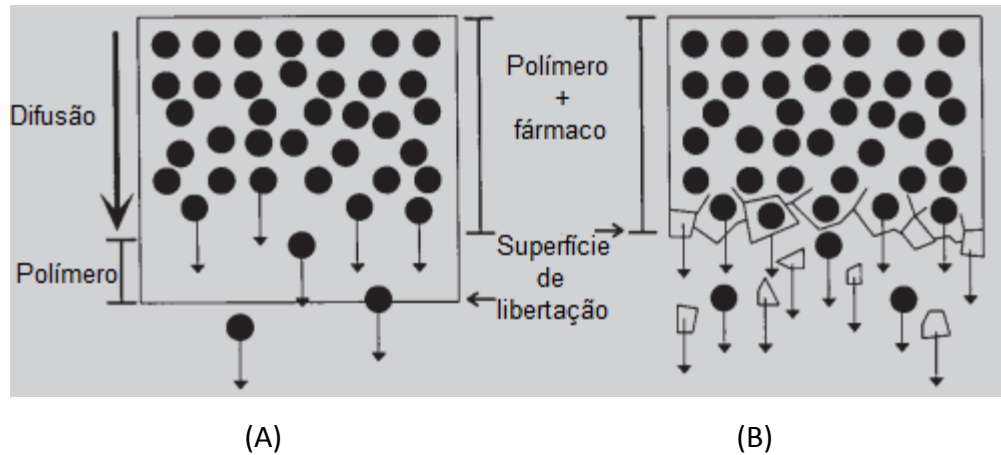


Figura 4 - Processo de difusão (A) e erosão (B) em matriz polimérica . Adaptado de Manadas *et al.* (2002).

O modelo matemático de Hixson e Crowell (1931), conforme citado por Shen *et al.* (2003), é utilizado para descrever a dissolução de medicamentos em um meio. Nesse modelo teórico a dissolução ocorre em planos que são paralelos à superfície do medicamento e que as dimensões diminuem proporcionalmente, de tal modo que a forma geométrica inicial se mantém constante durante todo o processo (Costa e Lobo, 2001; Manadas *et al.*, 2002). O modelo leva em consideração que a área do medicamento é proporcional à raiz cúbica do volume e pode ser descrita da seguinte forma:

$$W_0^{\frac{1}{3}} - W_t^{\frac{1}{3}} = K_s t \quad (1)$$

Onde:

W_0 é a quantidade inicial de fármaco;

W_t é a quantidade restante de fármaco no tempo t ;

t é o tempo;

K_s é a constante que incorpora a relação superfície/volume.

2.3 Transporte de Massa por Difusão Molecular

A transferência de massa ocorre pelo mecanismo de convecção e difusão. O modo de convecção se caracteriza por um transporte massa causado pelo movimento do meio. O mecanismo de difusão se caracteriza pela transferência de

massa pelo movimento molecular devido à existência de uma gradiente de concentração de uma substância. A difusão pode ser descrita pela lei de Fick, em que ocorre transferência de massa de um componente A através de uma mistura de componentes A e B , devido à existência e um gradiente de concentração da espécie A (Livi, 2000).

Consideremos uma mistura binária de componentes A e B , sendo \forall o volume da mistura, m_A a massa do componente A e m_B a massa do componente B , de forma que a massa total da massa da mistura de volume \forall é $m = m_A + m_B$. Podemos expressar a concentração de cada componente e a massa específica da mistura através da definição da massa específica:

$$\rho_A = \lim_{\Delta\forall \rightarrow \Delta\delta} \frac{\Delta m_A}{\Delta\forall} \quad (2)$$

$$\rho_B = \lim_{\Delta\forall \rightarrow \Delta\delta} \frac{\Delta m_B}{\Delta\forall} \quad (3)$$

$$\rho = \lim_{\Delta\forall \rightarrow \Delta\delta} \frac{\Delta m_A + \Delta m_B}{\Delta\forall} \quad (4)$$

Logo:

$$\rho = \rho_A + \rho_B \quad (5)$$

Portanto a concentração do componente A pode ser definida como uma fração de massa, da seguinte forma:

$$C_A = \frac{\rho_A}{\rho} \quad (6)$$

Consideremos um processo unidimensional de transferência do componente A , por difusão molecular, através de uma placa cerâmica, homogênea, de grandes dimensões e espessura d pequena, conforme mostrado no esquema da figura abaixo (A):

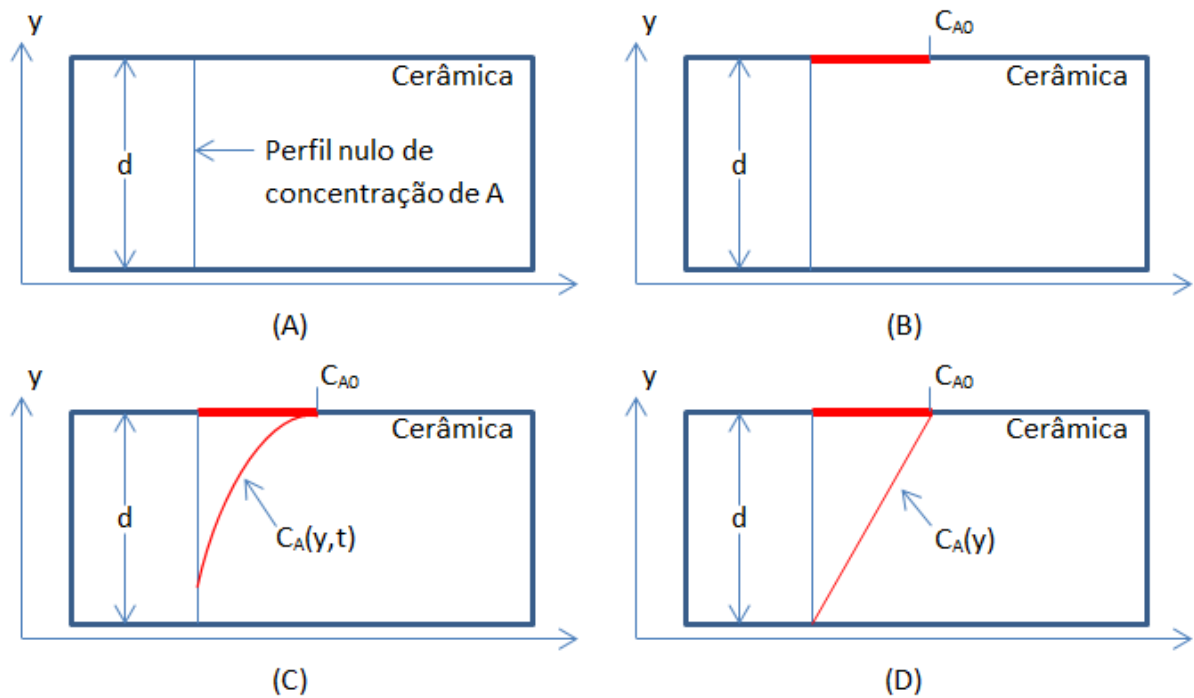


Figura 5 - (A) Inicialmente, a placa de cerâmica apresenta um perfil nulo de concentração de A; (B) no instante de tempo $t = 0$, coloca-se A sobre a superfície superior da placa; (C) para $t > 0$, ocorre o desenvolvimento da distribuição $C_A(y,t)$ em regime transiente e em (D) com $t \gg 0$, estabelecimento de um perfil de $C_A(y)$ em regime permanente (Livi, 2000).

Inicialmente, a placa de cerâmica não apresenta suas superfícies em contato com o componente A, de maneira que existe uma distribuição nula de concentração de A na cerâmica. No instante de tempo $t = 0$ (Figura 5-B) coloca-se A sobre a placa, de forma que a cerâmica junto à superfície superior passa a apresentar uma concentração C_{A0} . O restante da cerâmica ainda apresenta concentração nula de A. Para $t > 0$ (Figura 5-C), observa-se o desenvolvimento de uma distribuição de concentração de A $C_A(y,t)$, em regime transiente, na placa de cerâmica. Com $t \gg 0$ fica estabelecido um regime permanente (Figura 5-D), resultando em um perfil de concentração $C_A(y)$ que é linear para essa geometria do sistema.

Verifica-se, experimentalmente, que a densidade de fluxo de massa (J) por difusão molecular é diretamente proporcional ao gradiente de concentração. Assim, para um processo unidimensional, genérico, de difusão molecular do componente A numa mistura binária A e B, que tem uma fase dependente do tempo no qual $C_A = C_A(y,t)$, tem-se:

$$J_{A,y} = -D_{AB} \frac{\partial \rho_A}{\partial y} = -D_{AB} \frac{\partial(\rho C_A)}{\partial y} \quad (7)$$

Onde, $J_{A,y}$ é a densidade de fluxo de massa por difusão molecular do componente A através da mistura na direção y, $\frac{\partial \rho_A}{\partial y}$ é gradiente de concentração e D_{AB} é o coeficiente de difusão molecular do componente A.

A Equação 7 é conhecida como primeira lei de Fick e é o ponto inicial de numerosos modelos de difusão em sistemas poliméricos (Masaro e Zhu, 1999). Esta equação mostra que o fluxo mássico da espécie difusiva é proporcional ao gradiente de concentração da mesma no sistema polimérico. A segunda lei de difusão de Fick, que descreve o estado não-estacionário, que refletem condições experimentais, ou seja:

$$\frac{\partial C^*}{\partial t} = -\nabla \cdot J \quad (8)$$

Substituindo J na equação, tem-se:

$$\frac{\partial C^*}{\partial t} = -\nabla \cdot (-D \nabla C^*) \quad (9)$$

Admitindo que o sistema é isotrópico

$$\frac{\partial C^*}{\partial t} = D \nabla^2 C^* \quad (10)$$

O coeficiente de difusão (D), da espécie a ser difundida, pode ser determinado a partir da Equação 10 para a difusão em uma microesfera. Neste caso, a Equação 10 pode ser expressa em coordenadas esféricas tal que (Crank, 1979):

$$\frac{\partial C^*}{\partial t} = D \left(\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial C^*}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2 \sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin \theta \frac{\partial C^*}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{r^2 \sin^2 \theta} \frac{\partial^2 C^*}{\partial \phi^2} \right) \quad (11)$$

Genericamente representada pela figura abaixo.

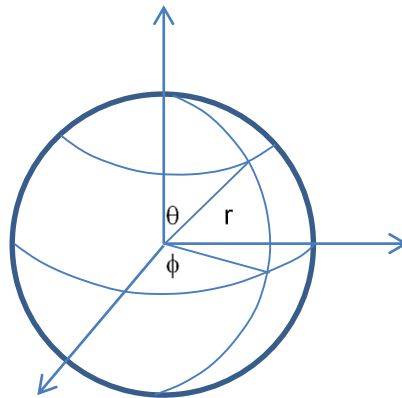


Figura 6 - Representação das coordenadas esféricas.

Sob circunstância onde a difusão depende apenas da direção do raio (r), a Equação 11 simplifica-se a:

$$\frac{\partial C^*}{\partial t} = D \left(\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial C^*}{\partial r} \right) \right) \quad (12)$$

Quando microesferas são carregadas com um fármaco e são colocadas na solução de liberação sob agitação, para facilitar a transferência de massa entre a microesfera e a solução, o transporte ocorrerá por difusão, sendo dada pela Equação 12. Desta forma as condições de contorno são:

Condições iniciais:

$$t = 0, 0 < r < a, C^* = C_0$$

Condições de contorno:

$$t > 0, r = 0, \frac{\partial C^*}{\partial r} = 0$$

$$t > 0, r = a, C^* = M_t/V$$

Sendo “a” o raio da microesfera e C* a concentração do fármaco. Assim, a transferência de massa da espécie difusiva é dada pela resolução da Equação 13, usando o método de transformada de Laplace (Crank, 1979):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6\alpha(1+\alpha)e^{-Dq_n^2 t/a^2}}{9 + 9\alpha + q_n^2 \alpha^2} \quad (13)$$

Onde:

t é o tempo;

V é o volume da solução;

N é o número de esferas;

α é definido $\frac{(V/N)}{(4\pi a^3 K/3)}$;

K é o coeficiente de partição;

a é o raio das microesferas;

q_n é o termo da raiz positiva e diferente de zero dado por $\tan q_n = \frac{3q_n}{3+\alpha q_n^2}$;

M_t representa a quantidade absoluta de fármaco liberada no tempo t;

M_∞ representa a quantidade total de fármaco liberado num tempo infinito.

2.3.1 Método para Determinação do q_n

Para solução numérica da equação envolvendo q_n podem ser utilizados diversos métodos, nesse estudo foi escolhido o método das secantes para o cálculo das raízes de q_n , pois o método das secantes apresenta bons resultados na determinação de zeros de equação algébrica não linear. Esse método é uma modificação do método de Newton (Equação 14) e visa eliminar a desvantagem de cálculo de derivadas, isso é alcançado com uma modificação que consiste em substituir a derivada $f'(x)$ pelo quociente das diferenças (Equação 15) (Franco, 2006).

$$x_{n+1} = x_n - \frac{f(x)}{f'(x)} \quad (14)$$

$$f'(x) \cong \frac{f(x_n) - f(x_{n-1})}{x_n - x_{n-1}} \quad (15)$$

Prossegue-se repetindo os cálculos, até que a precisão desejada seja atingida. Pode-se usar como critério de parada a falta de progressão nos dados, ou seja, quando a diferença de dois iterados torna-se muito pequena.

2.4 Perfil e Cinética de Liberação do Fármaco

O modelo de cinética de ordem zero baseia-se na liberação lenta da substância ativa a partir de formas farmacêuticas que não se desagregam. Este modelo pode ser expresso pela seguinte expressão (Lopes *et al.*, 2005):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_0 t + b \quad (16)$$

Onde K_0 é uma constante cinética e b é a quantidade inicial de fármaco na solução. Muitas vezes, esta quantidade inicial do fármaco resulta de uma liberação imediata ("burst effect") motivada ou pela liberação do fármaco existente à superfície do sistema matricial ou por alterações que se verificam na estrutura do sistema com consequente liberação imediata do fármaco seguido de liberação mais lenta. Este modelo é geralmente utilizado para descrever a liberação por vários tipos de formas farmacêuticas de liberação controlada, como é o caso dos comprimidos matriciais, dos sistemas osmóticos e das formas revestidas (Varelas *et al.*, 1995). De maneira ideal, as preparações destinadas a liberar substâncias ativas de forma prolongada apresentam um perfil de liberação de ordem zero, verificando-se que a velocidade de difusão do fármaco, do interior para o exterior da matriz, é menor que a respectiva velocidade de dissolução, formando uma solução saturada, que permite a cedência constante do fármaco. Esta situação de liberação ideal é muito difícil de obter na prática. A aplicação deste modelo apresenta muitas limitações devido aos poucos fatores de ajuste ao modelo (Lopes *et al.*, 2005). Outro modelo proposto baseia-se na equação de Higuchi, frequentemente utilizada para descrever a velocidade de liberação controlada do fármaco a partir de um sistema matricial (Higuchi, 1961). A equação abaixo representa o modelo de Higuchi e expressa como a fração de massa é liberada:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_H \sqrt{t} + b \quad (17)$$

Onde K_H corresponde à constante de liberação de Higuchi, que reflete as características do desenho da formulação.

Higuchi descreve o mecanismo de liberação dos fármacos como um processo de difusão baseado na lei de Fick, estando dependente da raiz quadrada do tempo. Porém, o uso desta relação em sistemas que intumescem pode tornar-se insuficiente, pois sistemas deste tipo podem ser erodíveis, devendo-se atender ao atributo do relaxamento das cadeias poliméricas para o transporte do fármaco. Assim, a equação de Higuchi apresenta fortes limitações na interpretação dos mecanismos de liberação controlada. No entanto, o modelo de Higuchi é mais realista que o modelo de ordem zero para sistemas matriciais. Este modelo pode ser aplicado com maior exatidão a matrizes unidimensionais pouco solúveis, que não apresentem capacidade de intumescimento, como por exemplo o acetato de celulose, nas quais está incorporado um fármaco muito solúvel (Tahara *et al.*, 1996). Quando o mecanismo não está bem elucidado geralmente utiliza-se a equação semi-empírica proposta por Korsmeyer e colaboradores (Korsmeyer *et al.*, 1983). Esta equação é utilizada para descrever a liberação do soluto quando o mecanismo que prevalece é uma combinação da difusão do fármaco (transporte Fickiano) e do transporte Caso II (não-Fickiano, controlado pelo relaxamento das cadeias poliméricas) (Ritger e Peppas, 1987). Neste modelo, a relação entre a velocidade de liberação e o tempo é igual a:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n + b \quad (18)$$

Onde K é uma constante cinética, que incorpora características estruturais e geométricas do mecanismo e n é o expoente de liberação que, de acordo com o valor numérico que assume, caracteriza o mecanismo de liberação do fármaco.

A Equação 18 é geralmente utilizada para interpretar e descrever a liberação do fármaco quando o mecanismo que prevalece não é bem conhecido ou resulta da combinação de dois processos aparentemente independentes: um devido ao transporte do fármaco que obedece às leis de Fick e outro consequência dos

fenômenos de inchamento/relaxamento do gel (expansão dinâmica) e que envolve a transição de um estado semi-rígido a outro mais flexível, chamado transporte Caso II. Nos sistemas de liberação controlada, a extensão e a taxa de liberação do fármaco é o resultado da combinação da difusão com o transporte de Caso II das moléculas de fármaco através das cadeias poliméricas (Ritger e Peppas, 1987). Nestes casos, a difusão obedece às leis de Fick, enquanto o transporte de Caso II reflete a influência do relaxamento do polímero no movimento das moléculas na matriz (Enscore *et al.*, 1977). Nesta equação leva-se em conta a difusão do fármaco e o relaxamento do gel como processos determinantes na liberação do fármaco (Lopes *et al.*, 2005). Este modelo é muito utilizado para vários tipos de sistemas de liberação modificada e o valor do expoente n é utilizado para caracterizar diferentes mecanismos de liberação (Peppas, 1985). Os diferentes valores de n para diferentes formas geométricas e os respectivos mecanismos de liberação são apresentados na Tabela 1 (Siepmann e Peppas, 2001).

Tabela 1 - Expoente n da Equação de Korsmeyer e mecanismo de liberação de fármaco.

| Expoente n | | | Mecanismo de liberação |
|-----------------|-------------------|-------------------|------------------------|
| Filme fino | Cilindro | Esfera | |
| $<0,5$ | $<0,45$ | $<0,43$ | Difusão Fickiana |
| $0,5 < n < 1,0$ | $0,45 < n < 0,89$ | $0,43 < n < 0,85$ | Transporte anômalo |
| $>1,0$ | $>0,89$ | $>0,85$ | Transporte caso II |

2.5 Biopolímeros

Biopolímeros são agentes versáteis e promissores para exercer a função de agentes encapsulantes apropriados capazes de controlar a liberação de fármacos e sustentar a ação terapêutica ao longo do tempo e/ou de liberar o fármaco ao nível de um determinado tecido ou órgão alvo, pois apresentam vantagens de serem biocompatíveis e biodegradáveis. Além disso, podem ser modulados para modificar a cinética de liberação de uma substância (Bansode *et al.*, 2010).

Segundo Santos *et al.* (2012), o encapsulante ideal deve apresentar baixa viscosidade em concentrações elevadas e ser de fácil manipulação durante o processo; possuir baixa higroscopicidade, para facilitar a manipulação e evitar aglomeração; não ser reativo com o material a ser encapsulado; ter habilidade de

selar e segurar o material ativo dentro da estrutura da cápsula; liberar completamente o solvente ou outros materiais utilizados durante o processo de encapsulação; proporcionar máxima proteção ao material ativo contra condições adversas, tais como luz, pH, oxigênio e ingredientes reativos; ser solúvel em solventes comumente usados; possuir as propriedades desejadas de liberação do material ativo; não apresentar sabor desagradável no caso de consumo oral; e ser econômico.

Os biopolímeros mais utilizados, pelo setor farmacêutico, para exercer a função de agentes encapsulantes são: polissacarídeos naturais (amido, dextrinas) ou modificados (carboximetilcelulose, etilcelulose, metilcelulose, acetilcelulose, nitrocelulose, quitosana), gomas (arábica, carragena, alginato de sódio), materiais protéicos (glúten, caseína, gelatina, albumina), ceras, lipídios (parafina, triestearina, ácido esteárico, monoglicerídeos e diglicerídeos) (Nguyen *et al.*, 2012; Kah e Hofmann, 2014).

2.5.1 Quitosana

A quitosana, cuja estrutura química está apresentada na Figura 7, é um copolímero linear composto de unidades de repetição de 2-amino-2-desoxi-D-glicose (glicosamina) e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicose (N-acetilglicosamina) e pode ser obtido pela desacetilação parcial da quitina, que é um polissacarídeo encontrado na natureza em crustáceos, insetos e alguns fungos (Dash *et al.*, 2011). O grau de desacetilação (GD) da quitosana, dado que indica o número de grupos amino ao longo das cadeias, é calculado como a razão entre D-glucosamina e a soma de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina. Para ser nomeada “quitosana”, a quitina desacetilada deve conter pelo menos 60% de resíduos de D-glucosamina (Silva *et al.*, 2012; Croisier e Jérôme, 2013).

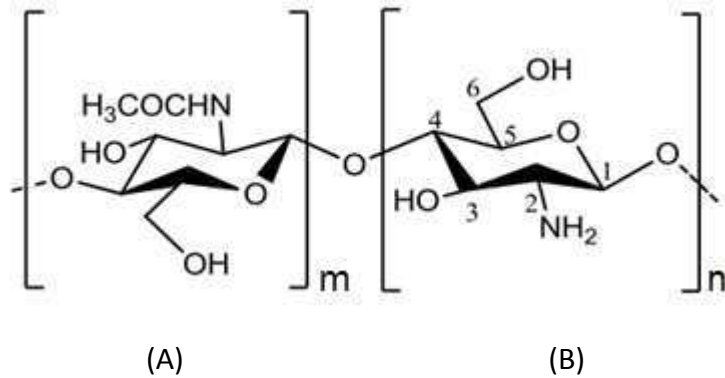


Figura 7 - Estrutura química da quitosana, porção N-acetil-D-glucosamina (A) e porção D-glucosamina (B) (Araújo, 2015).

A quitosana é considerada uma base fraca e insolúvel em água, bases, álcool e acetona, porém dissolve-se em soluções ácidas diluídas de ácidos orgânicos, como o acético, o fórmico e o cítrico, além de ácidos inorgânicos como o ácido clorídrico diluído, resultando em soluções viscosas. A solubilidade da quitosana em soluções ácidas converte a unidade glicosamina em grupos protonados ($-\text{NH}_3^+$) (Silva *et al.*, 2006).

A solubilidade da quitosana depende da sua origem biológica, massa molar e grau de desacetilação e isso afeta diretamente as aplicações deste biopolímero (Tavaria *et al.*, 2013). Devido à protonação, em meio ácido, dos grupos amino presentes em sua cadeia carbônica, além das hidroxilas provenientes dos grupos álcool, a quitosana apresenta caráter higroscópico e é capaz de formar gel, podendo absorver até 400% da sua massa inicial em meio aquoso. Fatores como pH do solvente utilizado, concentração e massa molar da quitosana estão diretamente relacionados à viscosidade do gel obtido, bem como às propriedades do biomaterial final (Campos, 2007; Nomura *et al.*, 2009). Uma propriedade fundamental na transformação metabólica da quitosana no corpo é essencial para todos os polímeros usados em sistemas carreadores de fármacos é a biodegradabilidade. Na quitosana ela pode ser de dois tipos: química ou enzimática. A química é a que se refere à degradação catalisada por ácido, tal como a que ocorre no estômago. Pela via enzimática, a quitosana pode ser degradada por enzimas, especialmente a lisozima, capaz de hidrolisar as ligações glucosamina-glucosamina, glucosamina-N acetil-glucosamina e N-acetil-glucosamina, (Laranjeira e Fávere, 2009; Kean e Thanou, 2010).

As aplicações da quitosana na área biomédica têm evoluído muito nas últimas três décadas, como biomaterial, em implantes dentários, reconstrução óssea, liberação controlada de fármacos em animais e humanos, bioadesivo, agente cicatrizador, agente antimicrobiano, material de bandagem, molde para enxerto de pele, agente hemostático, material para sutura e até mesmo material para lentes de contato, na forma de filmes, géis, cápsulas, microcápsulas ou soluções (Nomura *et al.*, 2009). Isto se deve essencialmente às suas propriedades de biocompatibilidade, capacidade bactericida, biodegradabilidade e por ser extremamente abundante, de baixo custo e renovável. Quando em contato com células humanas não provoca reações adversas; ou seja, é uma substância segura para o organismo humano.

A quitosana pode ser degradada por enzimas amplamente encontradas no corpo humano, e os oligômeros podem ativar macrófagos e estimular a síntese de ácido hialurônico. Além disso, a quitosana é reconhecida por células tumorais, e conseqüentemente, pode trazer fármacos ao seu alvo seletivamente (Costa Jr e Mansur, 2008). A alta hidrofiliçidade da quitosana, devida ao grande número de grupos hidroxila e grupos amino presentes na cadeia polimérica, permite sua utilização como biomaterial na forma de pós, flocos, microesferas, nanopartículas, gel, membranas, esponjas, colméias, fibras e fibras ocas (Dias e Silva, 2001; Del Nobile *et al.*, 2009). A quitosana exibe propriedades analgésica, mucoadesiva e antibacteriana, juntamente com atividade antifúngica e hemostática (Avella *et al.*, 2000; De Carvalho Canella e Garcia, 2001; Jiang *et al.*, 2008). Além disso, a quitosana pode ser facilmente biodegradada gerando resíduos não tóxicos e sua taxa de degradação está relacionada com a massa molar do polímero e com o grau de desacetilação (Casarin, 2004; Casarin, 2010).

A utilização da quitosana como sistema de liberação de fármacos (Drug-delivery systems) surgiu desde a década de 1980 e representa biomateriais utilizados como agente facilitador na entrega de drogas sistêmicas e locais, capaz de proporcionar uma taxa de liberação controlada e prolongada da droga com o mínimo de efeito colateral. Por ser um material seletivamente permeável, surgiu como bom candidato para liberação controlada de medicamentos no meio gastrointestinal e na mucosa oral (Kumar, 2000).

2.6 Montmorilonita

Os argilominerais do grupo da esmectita (montmorilonita, beidelita, nontrolita, volconscoita, saponita, sauconita, hectorita) são contituidos de multiplas camadas, com uma estrutura na forma de sanduíche, com duas folhas de silicatos tetraédricas envolvidas por uma folha central octaédrica unidas entre si por oxigênios comuns às folhas para formar uma camada (Figura 8). As forças eletrostáticas e de Van der Waals que mantêm as camadas unidas são relativamente fracas e a distância interlamelar (d_{001}) é em torno de 1,1 nm (na sua forma anidra); a espessura de camada é em torno de 0,96 nm e uma dimensão lateral da ordem de centenas de nanômetros (área superficial de aproximadamente $750 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) (Santos, 1989; Utracki, 2004).

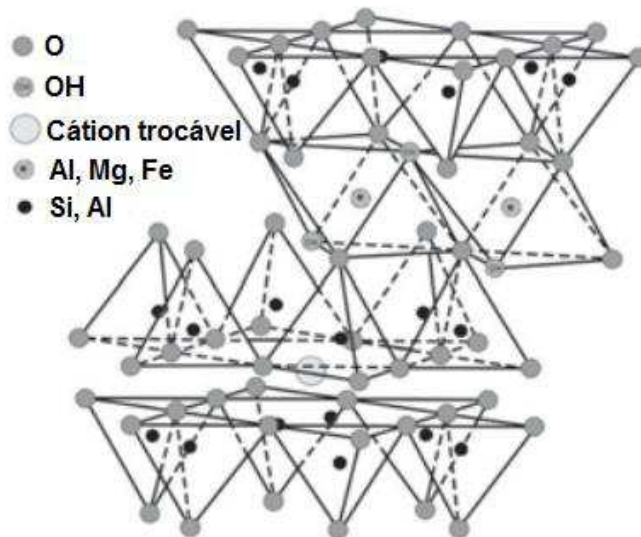


Figura 8 - Representação esquemática da esmectita (Coelho *et al.*, 2007).

O silício na lâmina tetraédrica, o alumínio e o magnésio na lâmina octaédrica estão sujeitos à substituição por outros íons de tamanho semelhante; esse processo denomina-se substituição isomórfica. Na montmorilonita pode haver substituições isomórficas em porcentagens moderadas do Al^{3+} por Mg^{2+} , que confere a cela unitária uma deficiência de cargas positivas de 0,66 cátion monovalente, essa carga elétrica negativa é balanceada por um cátion M^+ hidratado entre as camadas estruturais, eles podem ser chamados de “cátions neutralizantes” ou “cátions trocáveis” uma vez que pode ser trocado de forma reversível, por outros cátions. Quando argilominerais montmoriloníticos anidros são colocados em água, os cátions

trocáveis se hidratam e o espaçamento basal aumenta, nesse momento os cátions interlamelares são susceptíveis de serem trocados por outros cátions por uma reação química estequiométrica. A ligação frouxa entre as camadas e o elevado grau de substituição isomórfica torna fácil a clivagem das partículas em meio líquido, havendo uma tendência grande (especialmente quando os cátions são Na^+ , K^+ , Li^+ , NH_4^+) à separação das camadas estruturais em meio aquoso, podendo ir até monocamada estrutural de 10 Å (Santos, 1989; Coelho *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2012).

A associação quitosana/montmorilonita é possível uma vez que a quitosana, devido à sua natureza hidrofílica e policatiônica em meio ácido, apresenta boa dispersão com este tipo de silicato, podendo ser intercalada entre as suas lamelas, por meio de troca catiônica e ligações de pontes de hidrogênio (Darder *et al.*, 2003). O mecanismo de troca catiônica envolve interações entre a carga positiva do grupo amina protonada (NH_3^+) da quitosana e os sítios carregados negativamente na estrutura da argila (Darder *et al.*, 2005). Dentre os benefícios que podem ser conseguidos com esta associação se destacam: (a) a intercalação da quitosana catiônica nas galerias da argila pode resultar na neutralização da forte ligação da droga (fármaco) catiônica com a argila aniônica; (b) a solubilidade da quitosana no pH do suco gástrico irá diminuir e com isso minimizar a liberação prematura da droga; (c) a quitosana catiônica, ao contrário da argila, proporciona a possibilidade de carregamento (imobilização) de drogas carregadas negativamente e (d) os grupos amina presentes na quitosana são sítios para imobilização do fármaco. A solubilidade limitada, no pH gástrico, dos híbridos quitosana/argila carregados com o fármaco oferece vantagens significativas para liberação da droga em sítios específicos pois não são destruídos pelo pH ácido do estômago e na presença de enzimas digestivas. Além disso, a propriedade mucoadesiva da quitosana pode melhorar a biodisponibilidade de medicamentos no trato gastrointestinal (Yuan *et al.*, 2010). Portanto, os híbridos de quitonana/montmorilonita têm um grande potencial como carreadores de fármacos.

2.7 5-Fluorouracil

O fármaco 5-FU é uma substância sólida, fornecido na forma de cristais, estável à temperatura ambiente, branco e solúvel em água (12,2 mg/mL). Sua

fórmula molecular é $C_4H_3FN_2O_2$ e sua estrutura molecular está representada na Figura 9. Seu espectro de UV-Vis apresenta uma banda característica de uma transição $\pi-\pi^*$, com absorção em 266 nm e fluorescência em 391 nm quando excitada em 315 nm (Bayomi e Al-Badr, 1990).

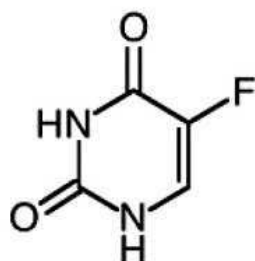


Figura 9 - Estrutura molecular do 5-FU (Azhar e Olad, 2014).

O mecanismo de ação do 5-FU exige sua conversão enzimática no nucleotídeo (ribosilação e fosforilação) para exercer atividade citotóxica. Existem diversas vias disponíveis para formação dos agentes citotóxicos trifosfato de floxuridina (FUTP), monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP) e difosfato de fluorodesoxiuridina (FdUTP) (Figura 10). A estratégia é inibir a síntese de DNA através de precursores, capazes de entrar facilmente nas células tumorais e sofrer ativação por enzimas intracelulares. Por exemplo, o 5-FU é convertido em desoxinucleotídeo, o FdUMP, que, por sua vez, bloqueia a enzima timidilato sintase (TS), necessária para conversão fisiológica do monofosfato de desoxiuridina (dUMP) em monofosfato de desoxitimidina (dTMP), que é um componente do DNA. Em células tratadas com 5-FU, o FdUTP incorpora-se ao DNA, em lugar do trifosfato de timidina (TTP) que sofreu depleção fisiológica, apesar do significado da incorporação não estar completamente esclarecido, presume-se que a incorporação ao DNA desencadeia o processo de excisão-reparo. Esse processo resulta na quebra de filamento de DNA, visto que o processo de reparo do DNA necessita de TTP. Entretanto, esse substrato está ausente em consequência da inibição do TS. A incorporação dos metabólitos do 5-FU ao RNA também causa citotoxicidade, em consequência dos principais efeitos observados sobre o processamento e as funções do RNA (Brunton *et al.*, 2012).

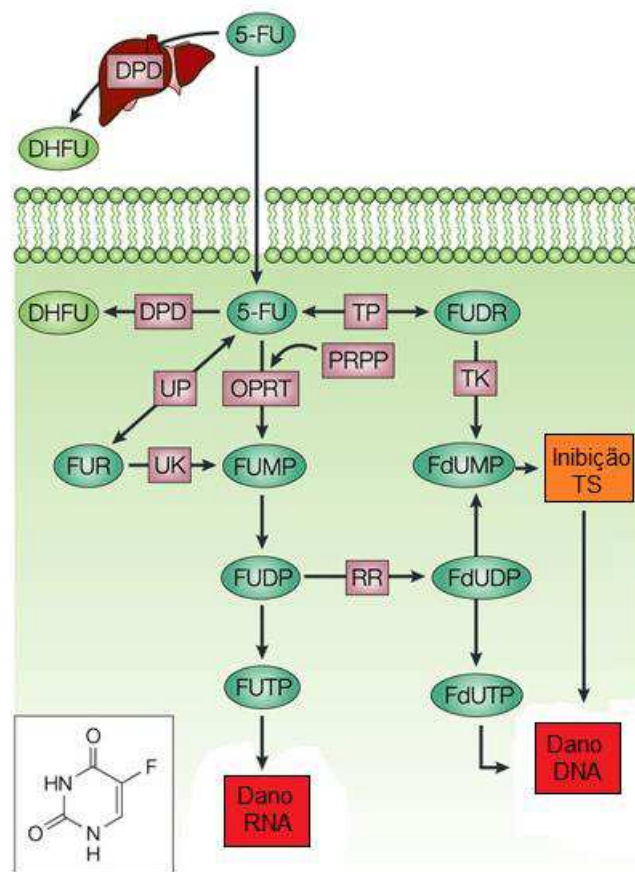


Figura 10 - Vias de ativação metabólicas do 5-FU. difosfato de floxuridina (FUDP); monofosfato de floxuridina (FUMP); trifosfato de floxuridina (FUTP); fluorodesoxiuridina (FUDR); difosfato de fluorodesoxiuridina (FdUDP); monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP); trifosfato de fluorodesoxiuridina (FduTP); 5-fosforribosil-1-piروفosfato (PRPP); timidilato sintase (TS); ribonucleotídeo redutase (RR); timidina quinase (TK); dihidrofluorouracil (DHFU); dihidropirimidina desidrogenase (DPD); uridina fosfatase (UP); uridina quinase (UK); fluoridina (FUR); fosforibosiltranserase (OPRT); fosfato de timidina (TP) (Longley *et al.*, 2003).

Os metabólitos do 5-FU têm estrutura análoga aos componentes do DNA e atuam inibindo a síntese do DNA ou são incorporados ao RNA ou ambos, agindo em fase específica do ciclo celular. Portanto, tende a ser mais útil primariamente no tratamento de linfomas e leucemias, patologias em que a proliferação celular é mais intensa que tumores sólidos que crescem mais lentamente (Foye, 1995). Após sua descoberta, 5-FU ainda permanece como um dos principais agentes quimioterápicos para o tratamento de câncer de cólon. A estratégia mais usada na administração de 5-FU é seu uso com Leucovorin, que também é um inibidor da enzima TS e aumenta a eficácia do 5-FU. Inicialmente, 5-FU era administrado via oral. A administração por essa via foi estudada por diversos autores no tratamento de diversos carcinomas,

dentre eles adenocarcinoma recorrente e de metástase (Douglass e Mittelman, 1974; Brunton *et al.*, 2012). Douglass e Mittelman (1974) estudaram dois pacientes com metástase de carcinoma de cólon via administração oral, intravenosa e intra-hepática de 5-FU radioativo e observaram que após duas horas de uma administração intravenosa praticamente não havia 5-FU detectável no plasma periférico e na secreção biliar; quanto a via intrahepática, o 5-FU não foi detectado, indicando que o fígado degrada rapidamente o fármaco; já pela via oral, houve aumento de concentração inicial após ingestão com uma infusão contínua de até 3 h após a ingestão. Porém essa via não foi mais utilizada após a publicação de Hahn *et al.* (1975) mostrando que a intravenosa era mais efetiva devido à absorção do fármaco no intestino ser variável quando administrado oralmente. Em outro estudo realizado por Thomas (1978), a administração de 5-FU em cachorros da raça beagle demonstrou que a absorção de 5-FU no lúmen estomacal é baixa, o que torna improvável a eficiência de administração desse fármaco pela via oral. Além disso, a mucosa gastrointestinal contém DPD, uma das enzimas que catabolizam o 5-FU e dependendo do indivíduo, a concentração dessa enzima é elevada, reduzindo os níveis deste fármaco no plasma.

Algumas estratégias têm sido desenvolvidas para diminuir esse problema, como a co-administração de fármacos que inibem a ação de DPD, como uracil e eniluracil, e a administração oral de pró-fármacos do 5-FU que são absorvidos intactos e são metabolicamente ativados após absorção intestinal, como a capecitabina (Mayer, 2001). Paek *et al.* (2006) estudaram a administração do fármaco para o tratamento de câncer retal em camundongos pelas vias oral e retal. 5-FU administrado via supositório composto de polaxâmer 188 e propilenoglicol teve menor toxicidade sistêmica, pois permitiu o contato tópico direto com a neoplasia retal e maior concentração nos tecidos do intestino, que a administração intravenosa. Atualmente, 5-FU é administrado via intravenosa como um bólus ou como uma perfusão contínua. Em pacientes com metástases no fígado é usada perfusão intra-hepática contínua como alternativa à intravenosa, embora 50% do ativo sejam eliminados via primeira passagem pelo fígado. Como a meia vida deste fármaco no plasma é pequena (10-20 min), o protocolo envolve a administração intravenosa de doses elevadas (400-600 mg.m⁻²), semanalmente, para que sejam

alcançados níveis terapêuticos, fato que exacerba os efeitos adversos (Peters *et al.*, 1993; Hasan *et al.*, 2006).

O 5-FU atua contra células que se dividem rapidamente afetando a medula óssea e as mucosas gastrointestinal e oral. Os efeitos adversos mais frequentes incluem inicialmente anorexia e náuseas seguidas de estomatite e diarreia. Entretanto, os efeitos adversos mais sérios decorrem da mielo supressão a qual se manifesta clinicamente como leucopenia (redução da quantidade de glóbulos brancos), trombocitopenia e anemia. Ocorre, também, perda de cabelo, alterações nas unhas e dermatite. Entre as manifestações neurológicas, destaca-se a síndrome cerebelar aguda. Na administração intra-hepática podem advir complicações devidas ao atrito do cateter com a artéria gastroduodenal, resultando necrose, hemorragia e até perfuração do epitélio intestinal; causando, ainda, efeitos neurológicos, necrose do miocárdio, isquemia e reações inflamatórias como conjuntivite aguda e crônica (Peters *et al.*, 2002). Em razão disto, têm sido feitas várias tentativas para encapsular 5-FU a fim de reduzir os efeitos adversos que ele provoca (Azhar e Olad, 2014).

2.7.1 Encapsulamento do 5-Fluorouracil

Ouchi *et al.* (1989) estudaram a redução de efeitos secundários, a afinidade por células tumorais e a atividade anti-tumor de formulações de 5-FU com quitosana e quitina através de espaçadores de hexametileno, sendo esses espaçadores responsáveis por modular a interação entre a molécula do fármaco e quitosana e a quitina, via ligações carbamóil. Os ensaios *in vivo* visaram combater leucemia em ratos e inibição do crescimento de Meth-A nos fibrossarcomas. Os conjugados de quitosana, quitina e 5-FU mostraram efeito significativo sobre a inibição de Meth-A fibrossarcoma. As formulações de quitosana, quitina e 5FU não apresentaram qualquer toxicidade aguda em ratos numa dose de 800 mg/kg corpóreo.

Akbuga e Bergisadi (1996) demonstraram que as taxas de liberação *in vitro* de microesferas de quitosana e 5-FU são afetadas pela relação quitosana/5-FU, tipo de óleo, taxa de agitação e também aditivos. A liberação de 5-FU a partir de microesferas de quitosana caracteriza-se por uma liberação inicial rápida e a adição de substâncias tais como o ácido algínico, quitina, ágar, caprilato de sódio e ácido esteárico alteram as propriedades de liberação de 5-FU das microesferas.

Os parâmetros de obtenção de microesferas podem interferir na taxa de liberação e no diâmetro das microesferas de quitosana e 5-FU. No estudo de Seyyal e Pisëkin (1999) foram preparadas microesferas de quitosana na faixa de tamanho de 10 - 200 μm , para isso foram alterados parâmetros de concentração da emulsão, taxa de agitação, a relação quitosana/solvente e proporção de solução de fármaco/quitosana. O tamanho e distribuição do tamanho das microesferas diminuíram quando a taxa de concentração do emulsificante e agitação foi aumentada. Microesferas menores foram obtidas quando a razão quitosana/solvente e a relação quitosana/5-FU foram mais elevadas. Cerca de 60 % do 5-FU foi liberado nas primeiras 24 horas, em seguida as taxas de liberação tornaram-se muito lentas.

Chandy et al. (2000) demonstraram que o 5-FU pode ser encapsulado por quitosana, em microesferas com diâmetro de 10-25 μm . Nesse estudo, uma emulsão de 5-FU e ácido poliláctico (PLA) dissolvido numa mistura de acetona-diclorometano foi vertida em outra solução alcóolica (poli-vinílico) de quitosana, num homogeneizador de alta velocidade, para a formação de microesferas. A recuperação do 5-FU em microesferas variou de 44 – 66%, dependendo do polímero e dos sistemas de emulsão utilizados na preparação. A liberação do 5-FU foi inicialmente de 25%, seguida por uma liberação lenta constante por um período de estudo de 30 dias.

A eficácia antitumoral do 5-FU em nanopartículas de poli ácido D, L-láctico-glicólico (PLGA) apresenta uma dependência com a proporção do 5-FU. Nair et al. (2011) testaram duas combinações diferentes, 50-50 e 90-10, ambos sintetizados usando um método de emulsão, e sua avaliação biológica foi realizada em glioma (células U87MG) e adenocarcinoma da mama (MCF7) celulares. As nanopartículas da formulação 50-50 apresentaram menor diâmetro e eficiência de encapsulação de 66%. Análise de difração de raios X sugeriram a presença do 5-FU em forma de dispersão molecular. Nos estudos de liberação *in vitro* houve liberação prolongada de 5-FU em ambas as combinações com PLGA, entretanto a combinação 50-50 mostrou liberação mais rápida. Todos os resultados indicam que as nanopartículas 50-50 possuem uma melhor eficácia antitumoral do que as nanopartículas 90-10 e o 5-FU isoladamente. Esse estudo mostrou que a exposição em longo prazo de tecidos doentes à nanopartículas 5-FU/PLGA é mais favorável do que a

administração regular isoladamente do 5-FU, os resultados indicaram o potencial das nanopartículas 5-FU/PLGA para tratamento quimioterápico de câncer.

Segundo Aydin e Pulat (2012) nanopartículas de quitosana e 5-FU com $148,8 \pm 1,1$ nm de tamanhos, demonstraram ser sensíveis ao pH no que diz respeito a resposta de inchaço (pH: 3 - 5) e encolhimento (pH: 5 - 7,4). No estudo de liberação *in vitro* houve uma liberação controlada de 5-FU. Além disso, os perfis de liberação demonstraram significativa dependência com o pH, essas características favorecem a entrega do 5-FU em tumores localizados. Os autores relatam que as nanopartículas de 5-FU e quitosana oferecem várias vantagens em relação a terapias convencionais, pois superam os efeitos secundários em relação à dosagem e toxicidade.

Azhar e Olad (2014) incorporaram o 5-FU em montmorilonita (MMT) pelo método de intercalação, de modo a retardar a liberação da droga no ambiente gástrico. O nanocompósito 5-FU/MMT foi composto com alginato (ALG) e revestido com quitosana. De acordo com os resultados, o sistema nanocompósito 5-FU/MMT/ALG/quitosana contendo 30 % de MMT apresentou liberação controlada de 50% do fármaco num tempo de 8 horas, num pH de 7.4. Os perfis de liberação do 5-FU nos sistemas nanocompósitos foram melhor ajustados pelo modelo cinético Korsmeyer-Peppas, sugerindo que o mecanismo de liberação controlada ocorre por difusão. O sistema nanocompósito 5-FU/MMT/ALG/quitosana se mostrou adequado para a entrega de 5-FU no intestino delgado de forma controlada.

De acordo com o descrito, estudos sobre o desenvolvimento de híbridos quitosana/argila para sistemas carreadores de fármacos não tem sido tão difundidos quanto àqueles com quitosana pura. Contudo, vários benefícios podem ser alcançados para essa aplicação quando a quitosana é associada à argila. Entre os materiais argilosos, a montmorillonita tem atraído grande atenção devido à sua capacidade de liberar fármacos de uma maneira controlada, capacidade mucoadesiva para as formulações farmacêuticas, capacidade de atravessar a barreira gastrointestinal e biodisponibilidade por via oral. Ela também tem capacidade de adsorver toxinas alimentares e é atóxica (Joshi *et al.*, 2009).

2.7.2 Individualização Farmacocinética do 5-Fluorouracil

O sucesso terapêutico de um fármaco está relacionado com a quantidade do fármaco que consegue chegar aos locais de ação e quando isso ocorre. A absorção, a distribuição, o metabolismo e a excreção dos fármacos constituem os processos conhecidos como farmacocinética. O entendimento e a utilização dos princípios farmacocinéticos aumentam o sucesso terapêutico e normalmente reduz a ocorrência de efeitos adversos dos fármacos no organismo (Brunton *et al.*, 2012).

O 5-FU apresenta significativa variabilidade na resposta terapêutica e na ocorrência de toxicidade associada à sua farmacocinética variável. Blaschke *et al.* (2011) demonstraram que o ajuste das doses de 5-FU com base na área sob a curva (ASC) parece ser a melhor alternativa para todos os regimes terapêuticos de 5-FU. Evidências indicam que uma ASC entre 20-25 mg.h.L⁻¹ permitem um adequado balanço entre eficácia e redução da toxicidade no tratamento de câncer colorretal, mas tais resultados só são alcançados com uso de doses ajustadas para manutenção da ASC (Gamelin *et al.*, 2008). Nesse estudo foi observado que 17,3% dos pacientes necessitaram de redução de doses e 68% necessitaram de aumento de doses para obter a ASC determinada. Em outro estudo os pacientes submetidos ao tratamento com doses ajustadas farmacocineticamente apresentaram redução da incidência de toxicidade quando comparadas à dosagem padrão (Martins *et al.*, 2013). Alnaim (2010) relataram em estudo que 70-80% dos pacientes com doses ajustadas atingiram intervalo terapêutico adequado, enquanto apenas 20-30% dos pacientes do regime sem ajuste de dose apresentaram ASC adequado.

Portanto a individualização farmacocinética deve possibilitar o desenvolver regimes terapêuticos de 5-FU personalizados, com impactos significativos nos resultados terapêuticos e redução na toxicidade (Lee *et al.*, 2004; Blaschke *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2013).

2.8 Equipamento para Obtenção de Microesferas Poliméricas

Segundo Prado *et al.* (2010), o equipamento de atomização por *spray-drying* é utilizado para obtenção de microesferas poliméricas, porém, o custo desse aparelho gira em torno de R\$ 50 mil no mercado nacional. Para minimizar os custos do sistema de obtenção, Rorrer *et al.* (1993) e Dias *et al.* (2008) desenvolveram sistemas de baixo custo via prototipagem; esses sistemas produzem microesferas

pelo método de inversão de fase, o qual necessita de uma bomba peristáltica e um compressor de ar, a somatória dos equipamentos custa em torno de R\$ 6 mil. Em função do alto custo dos equipamentos comerciais, Prado *et al.* (2010) desenvolveram um equipamento com materiais de baixíssimo custo e que permite a obtenção de microesferas sem quaisquer problemas financeiros, pois o sistema foi construído usando um compressor de ar de 12 V com o custo de R\$ 36, uma bomba de aquário de R\$ 29, uma caneta de R\$ 1 e uma agulha hipodérmica de R\$ 0,40. A Figura 11 mostra o esquema e a imagem do sistema desenvolvido por Prado *et al.* (2010).

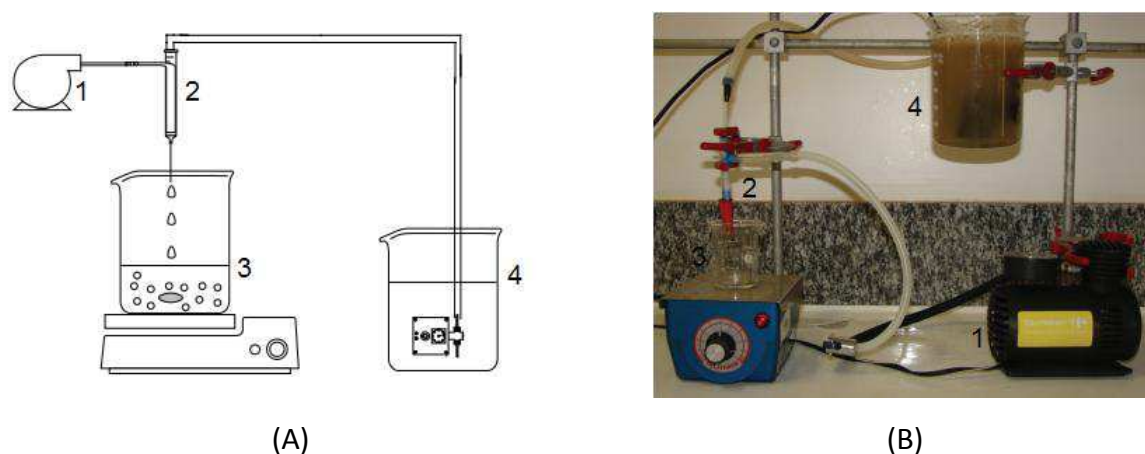


Figura 11 - (A) Esquema do sistema de obtenção das microesferas contendo compressor de ar (1), sistema de gotejamento (2), solução coagulante (3) e bomba de aquário (4); (B) Imagem do sistema de obtenção das microesferas (Prado *et al.*, 2010).

O presente trabalho seguiu a mesma estrutura do equipamento proposto por Prado *et al.* (2010), mas com automação do sistema de injeção com o uso de um microcontrolador eletrônico, que permite ajustar o fluxo de injeção da solução e eliminar o gradiente indesejável de fluxo de injeção presente nos equipamentos citados anteriormente.

2.8.1 Microcontrolador

Os microcontroladores são usados em muitos sistemas de controle com diversas vantagens, tais como: flexibilidade, facilidade de uso, custo e tamanho. Além disso, os microcontroladores apresentam baixo custo em comparação com outras tecnologias de controle.

Microcontroladores são geralmente fabricados em duas categorias: plataforma de chip único ou plataforma de circuito impresso. Segundo Banzi e Shiloh (2015) o microcontrolador Arduino é uma plataforma de circuito impresso e a escolha de um modelo para prototipagem dependerá da necessidade de cada usuário, os modelos se diferenciam pelos distintos formatos e configurações. O modelo mais popular é o Arduino Uno (Figura 12), o qual foi utilizado no sistema de injeção do presente trabalho, por sua versatilidade e baixo custo (R\$ 9,00). Ele apresenta chip ATmega328, tensão de operação de 5V, 14 pinos de entrada/saída digitais, 6 pinos de entrada/saída analógicos, 32 KB de memória flash, 2 KB de SRAM, 1 KB de EEPROM e velocidade de clock de 16 MHz.

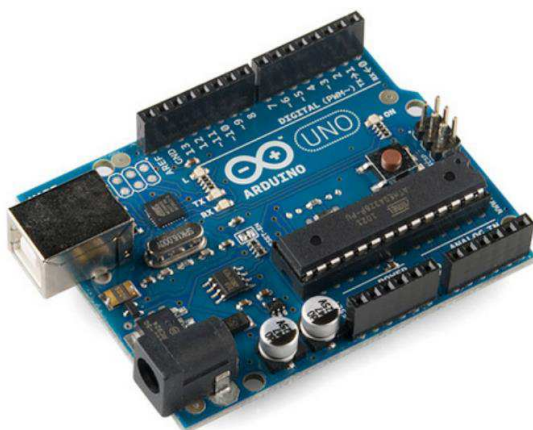


Figura 12 - Microcontrolador Arduino Uno (Arduino, 2015).

Esse microcontrolador foi criado em janeiro de 2005, no Instituto de Interatividade e Design (Itália). O principal objetivo foi criar uma ferramenta de hardware fácil de programar e de baixo custo. Os desenvolvedores criaram um ambiente de desenvolvimento integrado e uma ferramenta de software que traduz a linguagem de alto nível C/C++ (Silveira, 2011). Segundo Mcroberts (2011), o microcontrolador pode ser utilizado para desenvolver vários projetos, conectando diversos dispositivos como sensores, interruptores, motores e pode ser conectado em computadores, em redes e até mesmo à Internet, podendo assim disponibilizar os dados coletados em uma página de internet, sendo exibidos em forma de texto, gráficos e tabelas para os usuários.

Atualmente o microcontrolador é de código aberto (*open source*) que pode ser programado usando um software livre que usa uma versão simplificada da linguagem de programação C/C++. Com o microcontrolador é possível escrever um programa para controlar sistemas físicos pela leitura e gravação de sinal analógico/digital, para isso é necessário alguns sensores analógicos e o ADC (conversor analógico-digital) que é responsável por converter os sinais analógicos para sinais digitais (Al-Haija *et al.*, 2014). Para programar e configurar é utilizado o software Integrated Development Environment (IDE) mostrado na Figura 13, ele permite escrever o código fonte do programa e carrega-lo no microcontrolador através de upload, sendo o código fonte responsável pela execução das tarefas pretendidas (Arduino, 2015).

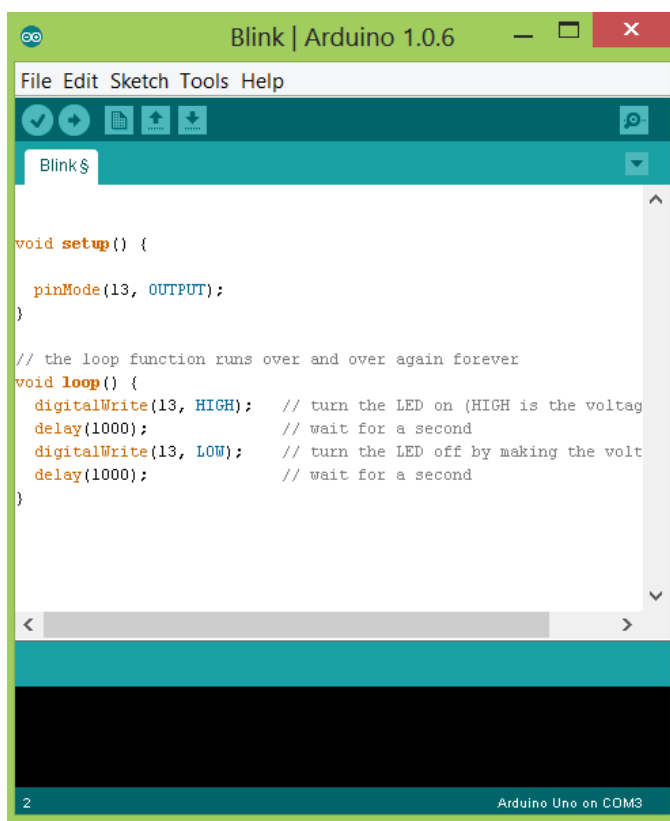


Figura 13 - Software Integrated Development Environment (IDE) (Arduino, 2015).

O uso do microcontrolador foi necessário para solucionar um problema presente nos equipamentos propostos por Prado *et al.* (2010) e Dias *et al.* (2008), pois o sistema de injeção apresenta um indesejável gradiente de fluxo de injeção, ocasionado pelo tipo de bomba de injeção utilizada no processo, esse gradiente de

fluxo ocasiona variação no diâmetro das microesferas obtidas. A função do microcontrolador é anular o gradiente de fluxo de injeção, pois no sistema microcontrolado o deslocamento do parafuso de injeção é constante, tornando o fluxo do biopolímero constante no bico de injeção. Outro aspecto relevante é que o fluxo de injeção pode ser modificado através do IHM (interface homem máquina), isso pode ser realizado com o uso de botões seletores de velocidade de rotação do motor de passo. O sistema de injeção microcontrolado está representado na Figura 14.

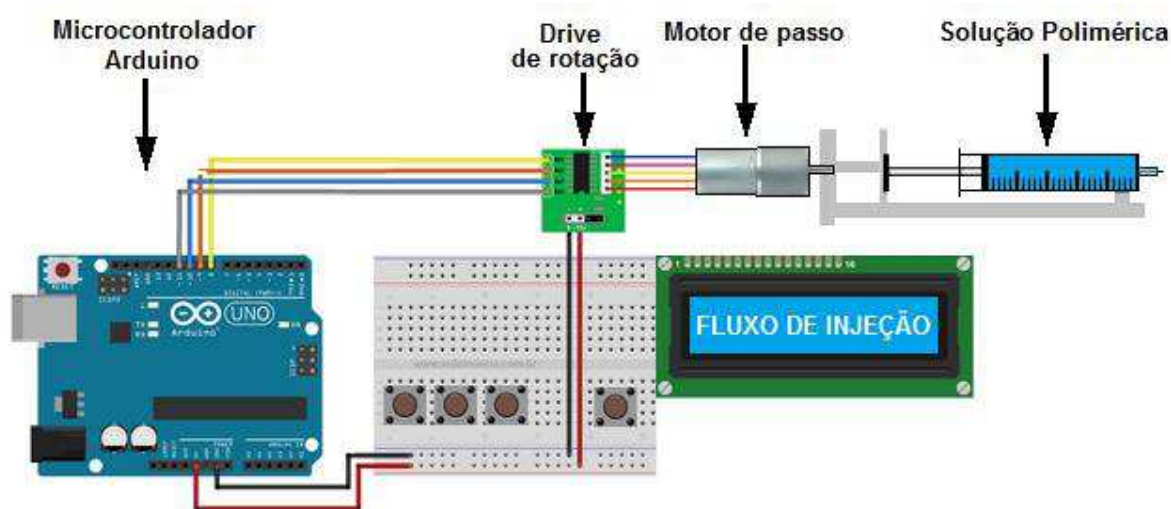


Figura 14 - Sistema de injeção microcontrolado.

2.9 Modelagem Molecular

Atualmente a aplicação de métodos computacionais no estudo de compostos bioativos tem se tornado uma prática rotineira. Esses métodos permitem estudar as interações ou reações que ocorrem entre ligantes e macromoléculas. Esta complementaridade permite o estabelecimento de interações mais ou menos específicas, como interações dipolo-dipolo e íon-íon, ligações hidrogênio e forças de dispersão, que contribuem para a energia de interação entre as moléculas. É neste ponto que a modelagem molecular pode dar sua contribuição, pois através dela pode se ter uma descrição detalhada da estrutura, interações intermoleculares, reações químicas e pode ser aplicada em estratégias de modelagem direta e indireta de novas drogas (Barreiro *et al.*, 1997; Sant, 2009).

A modelagem molecular consiste em um conjunto de ferramentas para a construção, edição e visualização, análise e armazenamento de sistemas moleculares complexos, objetivando encontrar meios de reproduzir e prever o comportamento de moléculas e sistemas moleculares (Cohen *et al.*, 1990; Barreiro *et al.*, 1997; Andrew, 2001). A base da modelagem molecular está na criação de modelos teóricos, em escala atômica, visando relacionar propriedades moleculares importantes com propriedades macroscópicas de um determinado sistema. Certos modelos teóricos utilizam métodos de Mecânica Quântica para caracterizar propriedades eletrônicas do sistema, e certos modelos utilizam métodos de Mecânica Estatística clássica (Mecânica Molecular), para a descrição física de sistemas moleculares complexos em fase condensada. Métodos teóricos tanto de mecânica molecular como da mecânica quântica (semi-empíricos, *ab initio* e híbridos) têm se tornado mais seguros quanto à previsão de estruturas e propriedades moleculares. A boa concordância com dados experimentais tem estimulado o uso de métodos teóricos e implementação de novas técnicas computacionais (Franca, 2009).

O método da Mecânica Molecular (MM) baseia-se na visão clássica de estrutura molecular como um conjunto de esferas unidas por molas com constantes de força características. O campo de forças neste caso é constituído pelo somatório de termos de energia relacionados às posições de equilíbrio do sistema (distâncias de ligação, ângulos de ligação, ângulos diedros, distâncias de van de Waals, ligações hidrogênio, interações eletrostáticas, etc.) às quais podem ser associadas penalidades energéticas para seu afastamento, isto é, as constantes de força das “molas” (Burkert e Allinger, 1982). A principal vantagem da mecânica molecular é a rapidez na avaliação de sistemas complexos. Além disso, os métodos de simulação computacional, baseados na mecânica clássica, têm permitido o entendimento das interações intermoleculares e o comportamento de moléculas orgânicas e de macromoléculas em solução. Técnicas de mecânicas estatísticas como Monte Carlo (MC) e Dinâmica Molecular (DM) são usadas para estudar estruturas, propriedades de líquidos puros, fenômenos de solvatação, termodinâmica e propriedades espectroscópicas de moléculas em solução (Allen e Tildesley, 2012).

2.9.1 Dinâmica Molecular

Na DM, as configurações sucessivas do sistema são geradas a partir da integração da equação diferencial da segunda lei de Newton:

$$\frac{F_{x_i}}{m_i} = \frac{d^2x_i}{dt^2} \quad (19)$$

A Equação 19 descreve o movimento da partícula de massa m_i ao longo da coordenada (x_i), sendo F_{x_i} a força da partícula nesta direção. A posição de cada átomo é dependente do conjunto de forças aplicadas à ele, que pode ser descrita pelo gradiente de energia potencial total. Assim, o cálculo da energia potencial obtida através do campo de força, permite obter a força F_{x_i} . A Equação 19, pode ser escrita da forma:

$$-\frac{dV}{dx_i} \cdot \frac{1}{m_i} = \frac{\partial^2 x_i}{\partial t^2} \quad (20)$$

O processo de integração para cada partícula do sistema ocorre em pequenos intervalos de tempo (Δt). Como resultado, obtém-se um conjunto de trajetórias num tempo total dado pela multiplicação do número de passos pelo intervalo de tempo de integração. Esta trajetória especifica como as posições e as velocidades das partículas do sistema variam com o tempo (Andrew, 2001). O intervalo de tempo da integração deve ser pequeno ($10^{-15} \sim 10^{-12}$ s) de forma a não suprimir eventos moleculares importantes, como vibrações moleculares, e não criar artificialidades no sistema. Em outras palavras, se o valor de Δt for muito grande, alguns eventos podem não ser descritos pela trajetória (Franca, 2009).

As propriedades macroscópicas obtidas por dinâmica molecular são extraídas do sistema no estado de equilíbrio termodinâmico. O conjunto de trajetórias em equilíbrio ocorre quando há convergência da energia total e consequente diminuição na variação estrutural (Van Der Spoel *et al.*, 2005). Os principais algoritmos disponíveis para a realização de integrações numéricas das equações de movimento são: *Verlet*, *Velocity-Verlet* e *Leap-Frog*. O esquema geral seguido por estes algoritmos consiste em: gerar o potencial de interação dado pelas posições atômicas iniciais; calcular a força aplicada aos átomos devida às interações

com os demais átomos e às condições externas (acoplamento de pressão e temperatura); obter a nova configuração pela integração da equação de movimento de Newton e registrar no disco rígido as informações atômicas de posição, velocidade, energia, pressão, temperatura e quaisquer outras. Dependendo do algoritmo escolhido pode haver pequenas variações na sequência das etapas seguidas ou adição de novas etapas (Verlet, 1967).

Uma vantagem nas simulações por métodos clássicos é a possibilidade de utilizar o modelo de solvatação explícita. A utilização deste tipo de modelo permite uma descrição mais precisa de várias propriedades que são diretamente dependes da interação com solventes, no entanto aumenta o custo computacional das simulações. Conforme a dependência do sistema em interagir com o solvente, opta-se por um modelo mais ou menos preciso. Os modelos de solventes aquosos explícitos mais utilizados são o SPC, TIP3P, TIP4P e TIP5P (Mark e Nilsson, 2001; Silva, 2013).

2.9.1.1 Condições Periódicas de Contorno

Nas simulações por dinâmica molecular, o sistema fica inserido numa caixa virtual, o qual resulta em dois principais problemas. O primeiro é o efeito de superfície criado nos átomos da margem da caixa, uma vez que estes presenciariam forças diferentes dos átomos no centro da caixa (Hinchliffe, 2005). O segundo problema refere-se ao número de partículas na caixa, que é relativamente pequeno em comparação com um sistema macroscópico, que possui o número de átomos da ordem de Avogadro. Com o intuito de amenizar esses problemas, aplica-se a condição periódica de contorno que consiste em realizar cópias da caixa de simulação em todas as direções, resultando em um arranjo periódico tridimensional (Silva, 2013).

A Figura 15 exemplifica tridimensionalmente as condições periódicas de contorno, de forma que em três dimensões, cada caixa é recoberta por outras 26 caixas idênticas. As coordenadas das partículas nas caixas replicadas são obtidas pela soma ou subtração do comprimento da caixa nas integrais. Como consequência, o movimento dos átomos na caixa original é reproduzido em imagens periódicas. Desta maneira, há a conservação do número de átomos e da densidade

do sistema, já que quando um átomo sai da caixa original, uma de suas imagens entra pela face oposta, com velocidade idêntica durante a simulação.

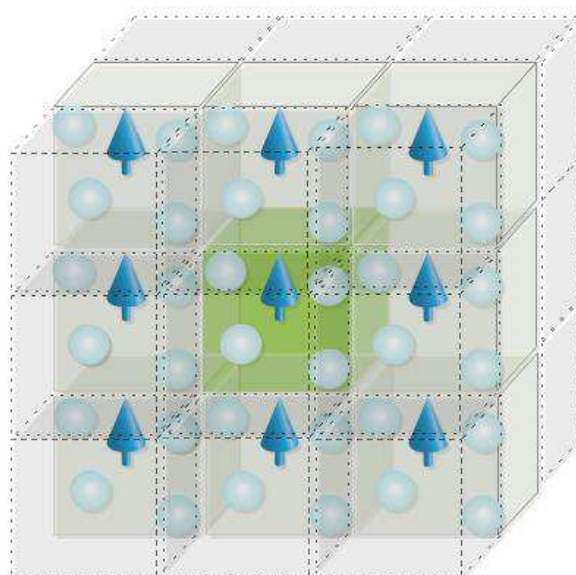


Figura 15 - Condições periódicas de contorno em três dimensões.

2.9.1.2 Dinâmica Molecular do Complexo 5-FU/MMT

Bellon (2014) realizou simulações de dinâmica molecular com quatro modelos do complexo são eles: Na-MMT/5-FU4, Na-MMT/5-FU8, Na-MMT/5-FU12 e Na-MMT/5-FU16, contendo quatro, oito, doze e dezesseis moléculas de 5FU e a MMT. O espaçamento basal do complexo Na-MMT/5-FU obtido experimentalmente foi de 15,8 Å. O modelo Na-MMT/5-FU4 teve o espaçamento basal 12,42 Å, mostrando todas as moléculas neutras de 5FU adsorvidas paralelamente formando uma camada de moléculas com orientação planar em relação à superfície lamelar sem formar nenhuma ligação hidrogênio com os átomos de oxigênio lamelar. As moléculas de 5FU, nos modelos Na-MMT/5-FU8 (média = 14,84 Å) e NaMMT/5-FU12 (média = 15,79 Å), aumentaram a distância do espaçamento basal da Na-MMT na qual as moléculas de 5FU estão adsorvidas pela interação do grupo amina do anel sobre a superfície da Na-MMT, formando ligação hidrogênio com os átomos de oxigênio presentes na superfície. O modelo Na-MMT/5-FU12 mostrou espaçamento basal muito similar ao resultado obtido experimentalmente variando de 15,04 Å a 16,01 Å durante a simulação. O modelo Na-MMT/5-FU16 (média = 17,85 Å) variou dentro da faixa de 18 Å onde as moléculas de 5FU realizaram ligação

hidrogênio com os átomos de oxigênio da superfície lamelar. A Figura 16 mostra a imagem do modelo Na-MMT/5-FU12 em 1 nanosegundo (ns) de dinâmica molecular. O 5FU é um fármaco que apresenta-se na forma neutra e os dados demonstraram uma boa correlação entre os dados experimentais e simulados, com adsorção no espaço interlamelar.

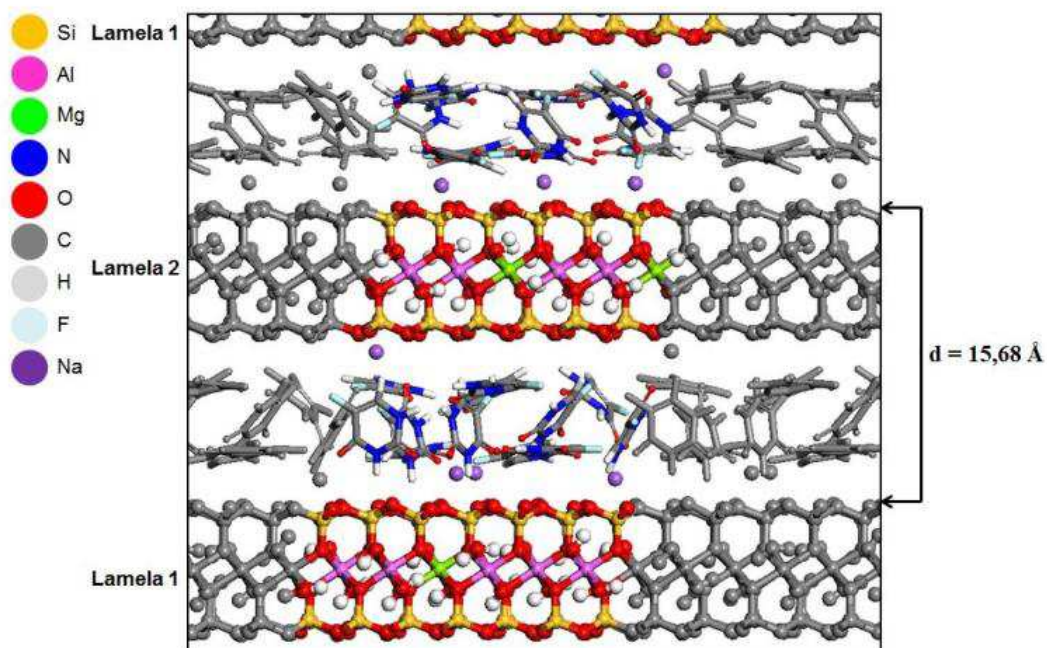


Figura 16 - Imagem do modelo MMT/5-FU de simulação em dinâmica molecular (Bellon, 2014).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Quitosana, fornecida na forma de pó pela Polymar/Brasil, com grau de desacetilação de 93,3%, conforme informações do fornecedor e estão de acordo com os valores determinados neste estudo, por espectrofotometria UV-vis. Montmorilonita sódica comercial Cloisite[®] Na⁺ (CL), na forma de pó, produzida pela Southern Clay Products, Texas/EUA e adquirida da Buntech, São Paulo/ Brasil. Esta argila apresenta distância interplanar basal (d_{001}) de 1,17 nm e densidade de 2,86 g/cm³, de acordo com a ficha técnica. Ácido acético glacial P.A. de 99,9% e hidróxido de sódio 99,9% P.A., ambos adquiridos da Vetec Química Fina. Acetato de sódio tri-hidratado 99,5% P.A., fornecido pela Dinâmica Química. Substância ativa 5-Fluorouracil (5-FU), fórmula molecular C₄H₃FN₂O₂, massa molar 130,1 g.mol⁻¹ e pureza ≥ 99%, fornecida pela Sigma-Aldrich e solução tampão fosfato (PBS) com pH 7,2 adquirida da Vetec Química fina.

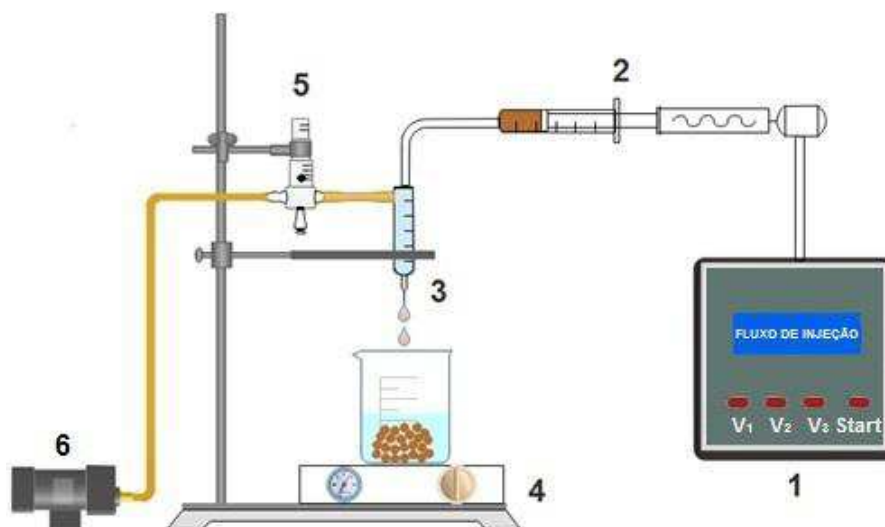
O microcontrolador, drive de rotação UNL2003, motor de passo DC 5V 28YBJ-48, tela LCD 16x2 com interface I2C, temporizador Tempus I, microprocessador MKT 1120, relé de estado sólido Teletronic T6675Z e as interfaces homem-máquina (IHM) foram adquiridos da Shen Zhen Blue Sky Technology. Os demais itens para construção do equipamento foram adquiridos no mercado local.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação das Microesferas de Quitosana e Quitosana/Argila

A preparação das microesferas de quitosana foi realizada adaptando-se o método proposto por Prado *et al.* (2010) e com simulação do fluxo de ar no software Solidworks Simulation versão 24.0.05025. Em resumo, uma solução de quitosana 4% (m/v) foi preparada em solução de ácido acético 5% (v/v) e, com o auxílio do equipamento de injeção (Figura 17), foi gotejada em uma solução coagulante de hidróxido de sódio 8% (m/m) mantida sob 50 rpm de agitação. O sistema de gotejamento foi construído utilizando-se tubos poliméricos e uma agulha (0,45 mm Ø; 13 mm), para a preparação das microesferas. O sistema de fluxo de injeção foi construído para não gerar gradiente de fluxo no processo de obtenção das

microesferas, além disso possibilita modificação no fluxo para controle do diâmetro das microesferas.



(A)



(B)



(C)

Figura 17 - Diagrama esquemático (A), detalhe do sistema de gotejamento (B) e equipamento (C), usado para preparar microesferas de quitosana: (1) microcontrolador eletrônico, (2) bomba de injeção, (3) venturi, (4) agitador, (5) rotâmetro, (6) bomba de ar.

O controle do fluxo de injeção foi obtido por meio do controle da frequência de pulsos fornecido ao motor DC 5V 28YBJ-48 que gira o parafuso de deslocamento do êmbolo. Para isso, foi desenvolvido um programa para modulação da frequência de pulsos. As principais funções do programa chamado *Proginjeção* são:

estabelecer a comunicação entre o drive UNL2003 e o motor DC 5V 28YBJ-48; ajustar a posição do parafuso de injeção e selecionar o fluxo de injeção desejado. Na Figura 18 é mostrado um fluxograma do *ProgInjeção*.

Para estabelecer correlações entre os parâmetros de processo e o diâmetro das microesferas, foram testados três fluxos de injeção da solução polimérica (0,150; 0,300 e 0,600 mL.min⁻¹), codificados como V₁, V₂ e V₃, respectivamente, e quatro fluxos de ar no sistema de arraste (2,5; 5,0; 7,5 e 10 L.min⁻¹). A solução coagulante contendo as microesferas foi filtrada em papel qualitativo com abertura de poros de 14 µm e as esferas obtidas foram lavadas com água destilada até pH 7,5 e secas à 50 °C durante 24 hs.

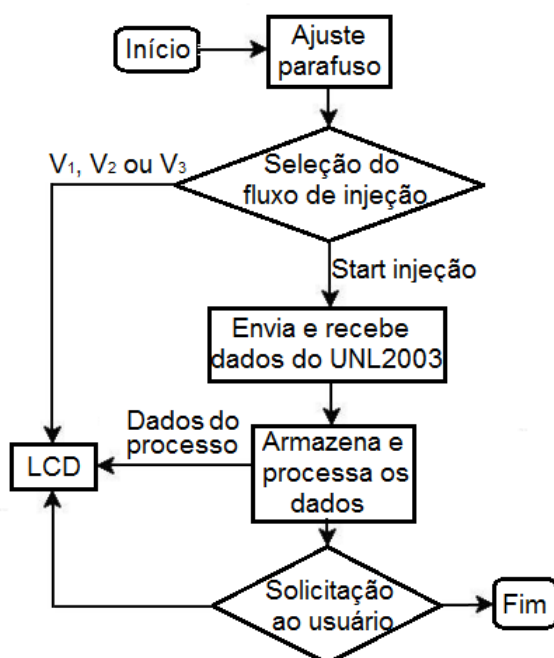


Figura 18 - Fluxograma do programa ProgInjeção.

Para obtenção das microesferas de quitosana/argila, foi seguida a mesma metodologia empregada para fabricação das microesferas de quitosana. A solução de quitosana a 4% (m/v) em ácido acético 5% (v/v) teve o pH ajustado para 4,9 com adição de uma solução de hidróxido de sódio a 1 molar sob agitação magnética a temperatura ambiente. Em seguida, uma dispersão de argila foi preparada na concentração de 10% argila/água com auxílio do agitador/aquecedor PID (Figura 19), com uma rotação de 400 rpm e 50 ± 0,5°C por 30 min, essa dispersão foi

adicionada à solução de quitosana aquecida a $50 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. A mistura de quitosana/argila, foi mantida sob agitação mecânica na temperatura de $50 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 4 horas e 30 minutos. A solução coagulante contendo as microesferas de quitosana/argila foi filtrada em papel qualitativo com abertura de poros de $14 \mu\text{m}$ e as esferas obtidas foram lavadas com água destilada até pH 7,5 e secas à 50°C durante 24 hs.



Figura 19 - Sistema de agitação/aquecimento adaptado para preparar a solução de quitosana com (1) sensor Pt 100, (2) agitador-aquecedor, (3) microcontrolador PID, (4) temporizador.

Para obtenção das microesferas encapsuladas com 5-FU foi necessário automatizar o controle de temperatura durante a mistura do 5-FU/quitosana e 5-FU/quitosana/argila. Normalmente o controle utilizado em placas de aquecimento é um controle ON/OFF, que é uma forma mais simples e barata de controle, mas a temperatura é controlada com dois valores, normalmente 0% e 100% da razão cíclica. Na prática, existe uma zona diferencial de liga e desliga, histerese, que se deve às características mecânicas do próprio controlador e gera uma amplitude indesejada em torno da temperatura programada. Outro aspecto negativo do controle ON/OFF é que o sensor de temperatura geralmente é acoplado na placa de aquecimento, ocasionado dificuldade no controle de temperatura do meio reacional (Ogata *et al.*, 2003). Para evitar flutuações de temperatura foi utilizado um sensor de

temperatura Pt 100 em contato direto com a solução de quitosana e adaptado um microprocessador MKT 1120 com PID (Proporcional, integral e derivativo) no agitador/aquecedor Fanem Modelo 258. O microcontrolador PID implementado apresenta relação entre saída e o sinal de erro dado por:

$$u(t) = K_p \left(e(t) + \frac{1}{T_i} \int_0^t e(\tau) dt + T_d \frac{de(t)}{dt} \right) \xrightarrow{L} U(s) = K_p \left(1 + \frac{1}{T_i \cdot s} + T_d \cdot s \right) E(s) \quad (21)$$

Onde K_p é o ganho proporcional, T_i é o tempo integral e T_d é o tempo derivativo.

A implementação do controle PID possibilitou o controle de temperatura com precisão de $\pm 0,5$ °C na faixa dinâmica de temperatura de 40 até 95°C, essa precisão foi obtida em função da velocidade de *feedback* entre os blocos de controle em malha fechada, conforme diagrama de blocos abaixo (Figura 20):

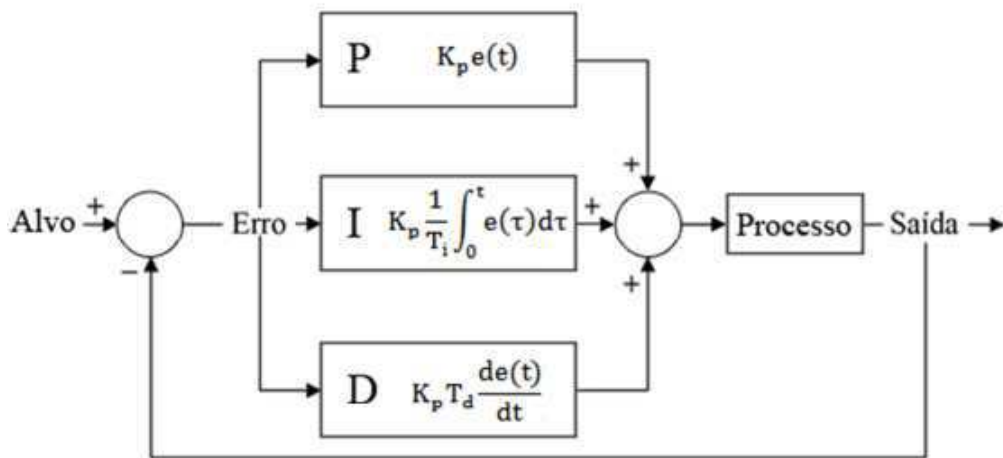


Figura 20 - Diagrama de blocos de um sistema de controle em malha fechada, baseado no microprocessador PID (Bezerra, 2010).

Durante a adaptação, o sistema primário de controle de aquecimento ON/OFF do agitador/aquecedor foi desativado, essa medida possibilitou implementar o relé de estado sólido Teletronic T6675Z no circuito elétrico de aquecimento do agitador. Outra melhoria foi desligamento automático do aquecimento com a adição de um temporizador da Full Gauge modelo Tempus I. Esse temporizador foi programado para desligar o sistema de agitação/aquecimento com 4:30 h de processamento, entretanto ele pode ser programado entre 1 até 6039 minutos.

3.2.2 Encapsulamento do 5-Fluorouracil

Para incorporação do 5-FU nas microesferas de quitosana, foi realizada uma dissolução do 5-FU (100 mg) em 10 mL da solução de quitosana (4%) com adição do acetato de sódio (400 mg), obtendo uma relação 5-FU/quitosana/acetato de 1:4:4. Para incorporação do fármaco nas microesferas de quitosana/argila, foi realizada a dissolução do 5-FU (150 mg) em 18 mL da mistura de quitosana/argila, obtendo uma relação mássica 5-FU/argila/quitosana de 1:2:4 conforme sugerido por Huang *et al.* (2010). Para a etapa de gotejamento foi adicionado acetato de sódio (600 mg) à dispersão 5-FU/argila/quitosana obtendo-se uma relação mássica de 1:2:4:4 (5-FU/argila/quitosana/acetato). As dispersões foram gotejadas em uma solução coagulante de hidróxido de sódio 8% e mantidas sob leve agitação, empregando o sistema de gotejamento apresentado na Figura 17. A solução coagulante contendo as microesferas foi filtrada em papel filtro qualitativo com abertura de poros de 14 μm ; as microesferas obtidas foram lavadas com água destilada até pH 7,5 e secas à 50 °C durante 24 h.

As microesferas preparadas apresentam diferentes condições de processamento e composições na mistura. Cada microesfera recebeu a nomenclatura considerando os parâmetros de processamento, presença do fármaco e da argila na composição, conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Nomenclatura das microesferas em relação ao processamento e composição.

| Fluxo de Injeção | V ₁ | V ₂ | V ₃ | V ₁ | V ₁ |
|------------------|------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|------------------------|
| Fluxo de ar | Ausência de 5-FU e MMT | | | Presença do 5-FU | Presença do 5-FU e MMT |
| 2,5 | V _{1-2,5} | V _{2-2,5} | V _{3-2,5} | V _{1-2,5-F} | V _{1-2,5-FA} |
| 5,0 | V _{1-5,0} | V _{2-5,0} | V _{3-5,0} | * | * |
| 7,5 | V _{1-7,5} | V _{2-7,5} | V _{3-7,5} | * | * |
| 10,0 | V ₁₋₁₀ | V ₂₋₁₀ | V ₃₋₁₀ | V _{1-10-F} | V _{1-10-FA} |

*Microesferas não preparadas.

3.2.3 Caracterização

3.2.3.1 Grau de desacetilação quitosana

O grau de acetilação da quitosana foi determinado por espectrofotometria UV-vis em triplicata. As amostras de quitosana foram dissolvidas em solução de ácido clorídrico 0,1 M e tiveram suas absorbâncias medidas no comprimento de onda de 201 nm. O grau de acetilação foi calculado conforme Equação 22 (Liu *et al.*, 2006):

$$\text{Grau de Acetilação (\%)} = \frac{161,1 \cdot \text{Abs} \cdot V - 0,0218 \cdot m}{3,3615 \cdot m - 42,1 \cdot \text{Abs} \cdot V} \cdot 100 \quad (22)$$

Onde *Abs* é a absorbância no comprimento de onda (λ) 201 nm; *V* é o volume em litros da solução de HCl (0,1 M) e *m* é a massa de quitosana em miligramas.

3.2.3.2 Microscopia Ótica

A microscopia ótica (MO) das microesferas foi conduzida em um microscópio modelo Q734ZT série 059 da DP Instrumentos Científicos LTDA. As micrografias foram obtidas com escala de 1:2,04 (pix:µm) e foram utilizadas as Equações 23 e 24 na determinação dos diâmetros equivalentes (D_v e D_s), Equação 25 para o volume (*V*), Equação 26 para área superficial (*S*) e Equação 27 para esfericidade (*E*) das microesferas preparadas, com o auxílio do software Pixcavator 5.

$$D_v = \left(\frac{4 \cdot A}{\pi} \right)^{1/2} \quad (23)$$

$$D_s = \left(\frac{P}{\pi} \right) \quad (24)$$

$$V = \frac{\pi \cdot D_v^3}{6} \quad (25)$$

$$S = \pi \cdot D_s^2 \quad (26)$$

$$E = \frac{D_V}{D_S} \quad (27)$$

Onde A é a área da partícula e P é o perímetro.

3.2.3.3 Correlação dos parâmetros de processamento

Foi utilizada correlação empírica na obtenção das funções de transferência (polinomial) dos parâmetros do processo. Os parâmetros de processo (fluxo de injeção e fluxo de ar) que apresentaram melhor coeficiente de correlação de Pearson e coeficiente de determinação (R^2) foram utilizados na preparação das microesferas incorporadas com 5-FU.

3.2.3.4 Difratomia de Raios X (DRX)

O espaçamento basal d_{001} da argila no sistema 5-FU/quitosana/MMT foi determinada por difratometria de raios X em um equipamento Shimadzu XDR – 7000, utilizando radiação K_{α} do cobre ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), tensão de 40 kV, corrente 30 mA, varredura 2θ de 2 a 70° e velocidade de varredura de $1^\circ.\text{min}^{-1}$. A MMT pura foi examinada no intervalo 2θ de 2 até 12° e velocidade de varredura de $1^\circ.\text{min}^{-1}$.

3.2.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das microesferas de quitosana e quitosana/argila preparadas na ausência e presença do 5-FU foi observada em um microscópio eletrônico de varredura (MEV). Para análise das áreas superficiais as microesferas foram recobertas com uma fina camada de ouro utilizando um metalizador e a análise foi conduzida em microscópio eletrônico de varredura Shimadzu modelo SSY-550. As imagens foram renderizadas na escala de cinza no software MATLAB 9.02 para obtenção das dispersões luminosas que causam interferências destrutivas e construtivas (speckle).

3.2.3.6 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulamento (EE) do 5-FU nas microesferas foi determinada através da absorção UV-vis da água de lavagem das microesferas. Para determinar a quantidade de 5-FU liberada na lavagem das microesferas, foi

feita uma curva de calibração para o 5-FU empregando sete soluções de concentrações diferentes e os respectivos valores de absorvância foram medidos no comprimento de onda 283 nm (Figura 38). A eficiência de encapsulação de 5-FU nos sistemas foi calculada de acordo com a seguinte equação (Papadimitriou *et al.*, 2008):

$$EE (\%) = \frac{W_t - W_f}{W_t} * 100 \quad (28)$$

Onde W_t representa a massa de 5-FU presente nas microesferas; W_f a massa de 5-FU liberada durante o processo de lavagem. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e os valores foram calculados de acordo com as seguintes equações:

$$W_t = \frac{\text{Massa das microesferas lavadas}}{\text{Relação mássica}_{(5-FU)}} \quad (29)$$

$$W_f = V_{\text{lavagem}} * C \quad (30)$$

A Relação mássica para as microesferas sem argila foi de 9 (1:4:4) e para microesferas com argila foi de 11 (1:4:4:2). O volume de lavagem (V_{lavagem}) das microesferas foi de 2200 mL e a concentração (C) foi obtida através de curva de calibração UV-Vis. A curva de calibração foi obtida a partir de 7 níveis de concentração do 5-FU, equidistante distribuídos entre 0-30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ numa solução de hidróxido de sódio a 0,18%. O memorial de cálculo está descrito no Apêndice 1.

3.2.3.7 Liberação do 5-FU

O estudo da liberação do fármaco foi realizado *in vitro* empregando 500 mg das microesferas e 50 mL da solução PBS em diferentes pH (1,2; 7,4 e 10) à $37^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ sob agitação constante de 100 rpm. Após pesagem de uma amostra de microesferas, a mesma foi colocada em erlemeyer e adicionada à solução PBS: para evitar a evaporação da solução PBS o orifício do erlemeyer foi fechado com filme de PVC. A concentração do 5-FU liberado no meio foi determinada a partir dos espectros de absorvância coletado em um espectrofotômetro UV-vis da Perkim

Elmer modelo Lambda 35. Para determinar a concentração do fármaco liberado, foram construídas curvas de calibração para o 5-FU empregando seis soluções de concentrações diferentes, os respectivos valores de absorbância foram medidos em comprimento de onda 266 nm para o PBS com pH 1,2 e pH 7,4 (Figura 40 e Figura 41) e em 267 nm para o PBS com pH 10 (Figura 42), todas as medidas foram realizadas em triplicata. Em seguida, foi plotado um gráfico com os valores de absorbância versus a concentração correspondente. Depois as curvas foram linearizadas para obtenção das curvas de calibração do 5-FU, conforme Equação 31. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram obtidos através das Equações 32 e 33. O LD representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental, já o LQ representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida (Ich, 1995).

$$Abs = A + B.C \quad (31)$$

$$LD = 3,3. \frac{s}{B} \quad (32)$$

$$LQ = 10. \frac{s}{B} \quad (33)$$

Onde:

Abs = Valores de absorbância;

C = Concentração do 5-FU ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$);

A = Interseção;

B = Coeficiente angular da reta;

s = Desvio padrão do branco.

O estudo, *in vitro*, da liberação do 5-FU foi realizado com as microesferas V₁-2,5-F, V₁-10-F, V₁-2,5-FA e V₁-10-FA. Foram retiradas alíquotas de 5 mL da solução PBS de liberação, na faixa de 15 min até 4320 min (0,25-72 h), seguido de reposição da solução PBS. A concentração do fármaco contido na alíquota de PBS foi obtida através do valor médio da absorbância, a partir de duas leituras, aplicando a equação da curva de calibração do 5-FU no pH correspondente.

As massas do 5-FU das alíquotas retiradas foram quantificadas e acumuladas utilizando a Equação 34, onde o número 2 representa o volume em mL das alíquotas. A massa liberada em cada intervalo de tempo foi calculada utilizando a Equação 35, onde o número 50 representa o volume em mL do meio PBS de liberação. A massa do fármaco presente no $t = 0$ s foi calculada utilizando a Equação 36, essa equação leva em consideração a EE e relação mássica. A relação mássica das microesferas sem argila foi 9 (1:4:4) e com argila 11 (1:4:4:2). Com esses dados foi possível calcular a fração liberada de 5-FU, utilizando a Equação 37.

$$A_{(t)} = \left(\sum_{i=1}^{t-1} A_i \right) + 2 \cdot C_t \quad (34)$$

$$\text{Massa liberada}_{(t)} = A_{(t-1)} + 50 \cdot C_{(t)} \quad (35)$$

$$\text{Massa do fármaco}(\mu\text{g}) = \frac{5 \cdot 10^5 \cdot \text{EE}}{\text{Relação mássica}_{(5\text{-FU})}} \quad (36)$$

$$\text{Fração liberada}_{(t)} = \frac{\text{Massa liberada}_{(t)}}{\text{Massa do fármaco}} \cdot 100 \quad (37)$$

Onde $A_{(t)}$ representa a massa de 5-FU acumulada das alíquotas analisadas e $C_{(t)}$ a concentração de 5-FU na solução de liberação.

A taxa de liberação foi calculada utilizando a Equação 38, onde $M_{(\infty)}$ é a massa total de 5-FU que foi liberada durante o ensaio de liberação.

$$\text{Taxa de liberação}_{(t)} = \frac{\text{Massa liberada}_{(t)}}{M_{(\infty)}} \quad (38)$$

Para simulação das condições do trato gastrointestinal foram determinadas as quantidades de 5-FU liberadas das microesferas retirando um volume do sistema de liberação em diferentes tempos. Para simular as condições de trânsito estomacal foram retiradas alíquotas até duas horas da solução PBS pH 1.2, entre 2 até 6 horas

foram retiradas amostras da solução PBS em pH 7.4 e em pH 10 de 6 até 24 horas para simular as condições de trânsito intestinal e cecal (Josué *et al.*, 2000).

3.2.3.8 Coeficiente de difusão e q_n

O coeficiente de difusão foi calculado analiticamente através da Equação 13 e o valor do coeficiente de partição adotado foi de $K = 1$, conforme estudos anteriores (Crank, 1979; Cruz, 2004; Zhao *et al.*, 2008). O coeficiente q_n foi obtido através do método das secantes, o critério de parada na aproximação para o método das secantes foi um $|\text{Erro}_{\text{relativo}}| \leq 0,001$. Os cálculos de iteração para cálculo das raízes estão representados no Apêndice 3.

3.2.3.9 Simulação por dinâmica molecular

Todas as simulações e análises foram realizadas utilizando o pacote computacional GROMACS 5.0.x (Van Der Spoel *et al.*, 2005). O campo de força utilizado é uma adaptação do GROMOS53a6 (Lins e Hünenberger, 2005). Os sistemas quitosana/5-FU consistiram em um filamento de quitosana solvatado e as interações foram definidas através de uma caixa cúbica de simulação de 3 nm de aresta. A estrutura inicial para o filamento de quitosana foi composta de 3 monômeros de polissacarídeos com conformação inicial totalmente randômica, apresentando ângulos $\varphi \sim -90^\circ$ e $\psi \sim +90^\circ$ (sendo φ e ψ definido pelos átomos O5–C1–O1–C4 e C1–O1–C4–C3, respectivamente). A Figura 21 mostra a representação dos ângulos φ e ψ .

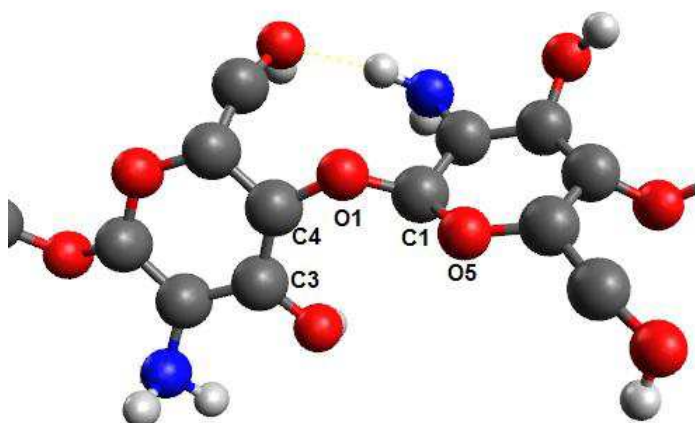


Figura 21 - Definição dos ângulos diedros φ e ψ ao redor da ligação glicosídica.

Inicialmente o filamento de quitosana e o 5-FU foram colocados na caixa de simulação e solvatados com moléculas de água SPC (Single Point Charge). Seguidamente realizada a minimização de energia de cada sistema quitosana/5-FU através de 10000 passos, utilizando o algoritmo *steepest descent*. Em seguida, a temperatura do sistema foi aumentada realizando-se sucessivas simulações por dinâmica molecular à 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C. Finalmente foi realizada a dinâmica molecular do sistema, no intervalo de integração de tempo de 4000 ps para cada temperatura de interesse. Todas as simulações foram realizadas em um *ensemble* isotérmico-isobárico (NPT) utilizando o algoritmo *Leap-Frog* (Hockney, 1970). As coordenadas de todos os átomos do sistema foram coletadas a cada 1 ps para a realização das análises. A pressão foi mantida em 1 bar pelo acoplamento do barostato de Berendsen (Berendsen *et al.*, 1984) com um tratamento isotrópico e tempo de relaxação de 0,1 ps e compressibilidade de $4,5 \cdot 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ (Franca, 2009).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Grau de Desacetilação da Quitosana

O grau de desacetilação é um importante parâmetro que está relacionado ao número de grupos aminos presentes na cadeia polimérica da quitosana, que por sua vez exerce influência sobre propriedades como hidrofobia, solubilidade e viscosidade de suas soluções (Gonsalves *et al.*, 2011). Os dados de desacetilação da quitosana utilizada nesse estudo estão representados na Tabela 3.

Tabela 3 - Grau de desacetilação da quitosana.

| Massa (mg) | Absorbância (201 nm) | Volume HCl 0,1 M (L) | Grau de acetilação | Grau de desacetilação |
|------------|----------------------|----------------------|--------------------|-----------------------|
| 8,0 | 0,245732 | 0,05 | 6,84% | 93,16% |
| 10,5 | 0,329946 | 0,05 | 7,02% | 92,98% |
| 6,8 | 0,191729 | 0,05 | 6,22% | 93,78% |

Pode-se observar que a média do grau de desacetilação foi de 93,31% com um desvio padrão de 0,32%. Schatz *et al.* (2003) estudaram o comportamento relacionado às propriedades físico-químicas da quitosana em solução aquosa de ácido acético em função do grau de acetilação. Eles concluíram que a quitosana apresenta três comportamentos diferentes de acordo com o valor do grau de acetilação: 1) quitosana com grau de desacetilação acima de 80% comporta-se como polieletrólito catiônico e as interações eletrostáticas são predominantes; 2) as interações hidrofílicas e hidrofóbicas estão em equilíbrio para as amostras com valores de grau de desacetilação entre 50 e 80 %; 3) para quitosana com grau de desacetilação abaixo de 50 %, predominam as interações hidrofóbicas e surgem as associações entre as cadeias do polímero. Portanto, as soluções de quitosana utilizadas na obtenção das microesferas devem comportar-se predominantemente como um polieletrólito catiônico.

4.2 Correlação entre o Processamento e a Morfologia

Inicialmente avaliou-se a influência do fluxo de injeção da solução de quitosana e do fluxo de ar do sistema de arraste nas dimensões das microesferas de

quitosana preparadas. Os fluxos de injeção avaliados foram $0,150 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $0,300 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $0,600 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; essa faixa e valores foi estabelecida em função do torque máximo do motor de passo do sistema. Cada fluxo de injeção foi testado com fluxos de ar pré-estabelecidos (2,5; 5,0; 7,5 e $10 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$). A altura entre o bico de injeção e a solução coagulante foi fixada em 5 cm, pois alturas superiores influenciaram na morfologia das microesferas formadas.

A automação do controle do fluxo de injeção com o microcontrolador eletrônico permitiu monitorar, via IDE e porta serial, a regularidade do fluxo de injeção. De acordo com a Figura 22, o comportamento dos fluxos de injeção estudados foram lineares. Isto indica que a pressão de injeção no bico do gotejador foi constante, isto é, não foi detectado qualquer gradiente de fluxo entre o início e o fim do processo. Isto permitiu a preparação de microesferas de quitosana com distribuição de tamanho uniforme usando o aparelho desenvolvido em nosso laboratório, como pode ser comprovado pelos valores de diâmetro e esfericidade, determinados a partir de microscopias ópticas, com o auxílio do software Pixcavator 5 (Tabela 4).

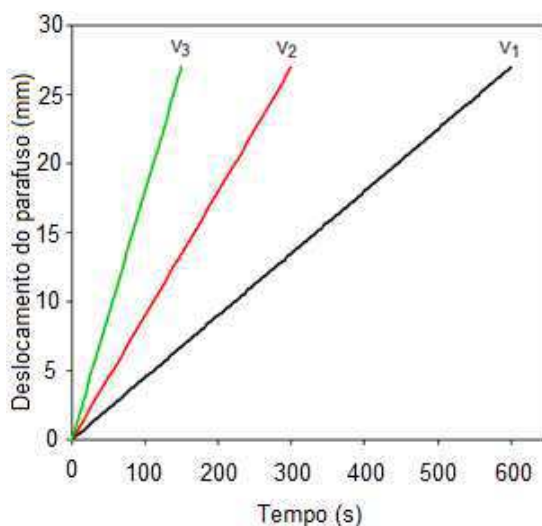


Figura 22 - Regularidade dos deslocamento do parafuso nos fluxos estudados: $0,150 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (V_1), $0,300 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (V_2) e $0,600 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (V_3).

A Figura 23 mostra as imagens das microesferas de quitosana obtidas por microscopia ótica (MO). Observa-se que o fluxo de injeção e o fluxo de ar afetaram as dimensões das microesferas de quitosana, o que pode ser observado pelos

valores do diâmetro, volume, área superficial e esfericidade das microesferas, obtidos das análises das imagens de MO (Tabela 4).

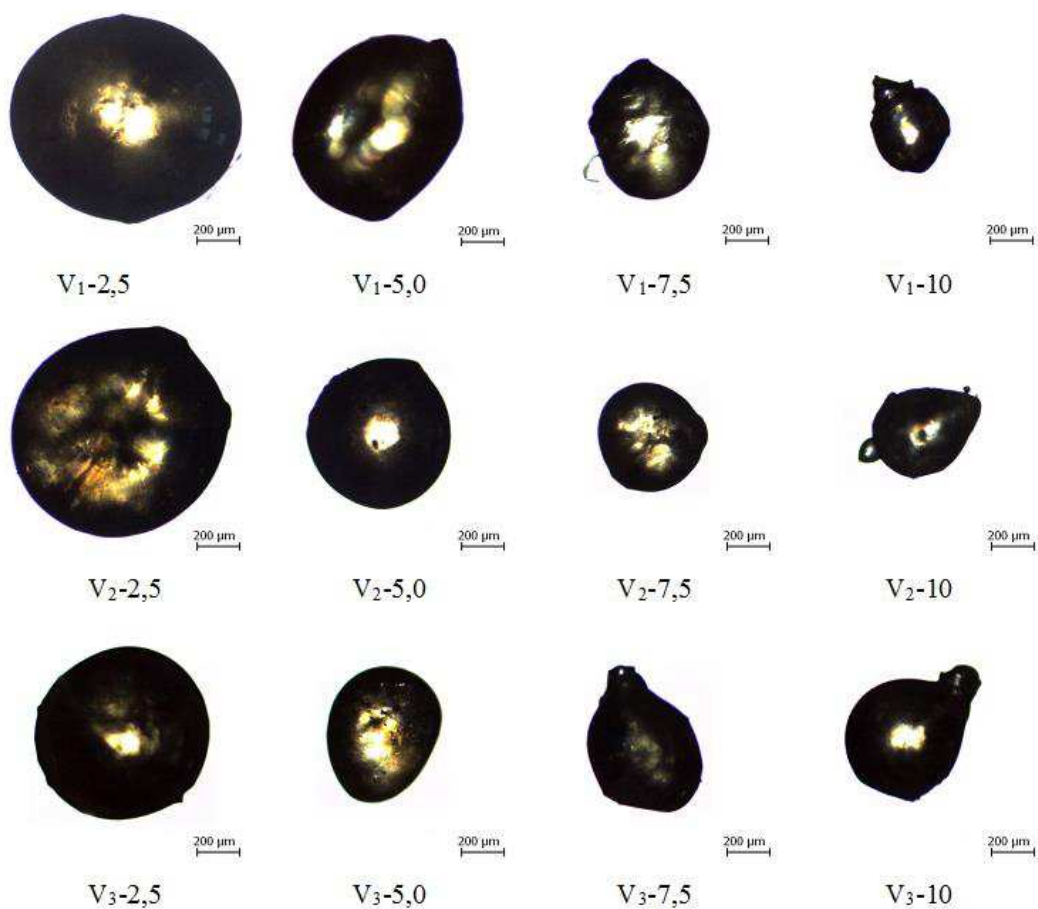


Figura 23 - Imagens, obtidas por microscopia ótica, das microesferas de quitosana preparadas com três fluxos de injeção: 0,150 mL.min⁻¹(V_1), 0,300 mL.min⁻¹(V_2) e 0,600 mL.min⁻¹(V_3) e quatro fluxos de ar (2,5; 5,0; 7,5 e 10 L.min⁻¹).

Tabela 4 - Dados dimensionais das microesferas de quitosana.

| Parâmetros de processo | Diâmetro equivalente (mm) | Volume (mm ³) | Área superficial (mm ²) | Esfericidade |
|------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------------|---------------|
| V ₁ -2,5 | 0,993 ± 0,018 | 0,513 ± 0,028 | 3,568 ± 0,120 | 0,932 ± 0,011 |
| V ₁ -5,0 | 0,776 ± 0,047 | 0,247 ± 0,042 | 2,442 ± 0,093 | 0,880 ± 0,043 |
| V ₁ -7,5 | 0,615 ± 0,031 | 0,123 ± 0,018 | 1,558 ± 0,263 | 0,878 ± 0,036 |
| V ₁ -10 | 0,437 ± 0,044 | 0,045 ± 0,013 | 1,040 ± 0,497 | 0,795 ± 0,105 |
| V ₂ -2,5 | 0,987 ± 0,037 | 0,505 ± 0,058 | 3,483 ± 0,240 | 0,938 ± 0,004 |
| V ₂ -5,0 | 0,669 ± 0,010 | 0,157 ± 0,007 | 1,839 ± 0,303 | 0,881 ± 0,072 |
| V ₂ -7,5 | 0,494 ± 0,020 | 0,063 ± 0,007 | 0,908 ± 0,073 | 0,920 ± 0,033 |
| V ₂ -10 | 0,514 ± 0,098 | 0,077 ± 0,045 | 1,100 ± 0,298 | 0,870 ± 0,054 |
| V ₃ -2,5 | 0,832 ± 0,019 | 0,302 ± 0,021 | 2,480 ± 0,100 | 0,937 ± 0,005 |
| V ₃ -5,0 | 0,634 ± 0,051 | 0,135 ± 0,033 | 1,485 ± 0,322 | 0,928 ± 0,025 |
| V ₃ -7,5 | 0,560 ± 0,016 | 0,092 ± 0,008 | 1,254 ± 0,080 | 0,887 ± 0,043 |
| V ₃ -10 | 0,579 ± 0,015 | 0,102 ± 0,008 | 1,329 ± 0,103 | 0,892 ± 0,023 |

As superfícies de resposta com as variáveis estudadas estão representadas na Figura 24. Em geral, as superfícies de resposta indicaram uma interação simples entre as duas variáveis. O modelo proposto para estudar a influência dos parâmetros foi um polinômio de segunda ordem que está representado pela Equação 39.

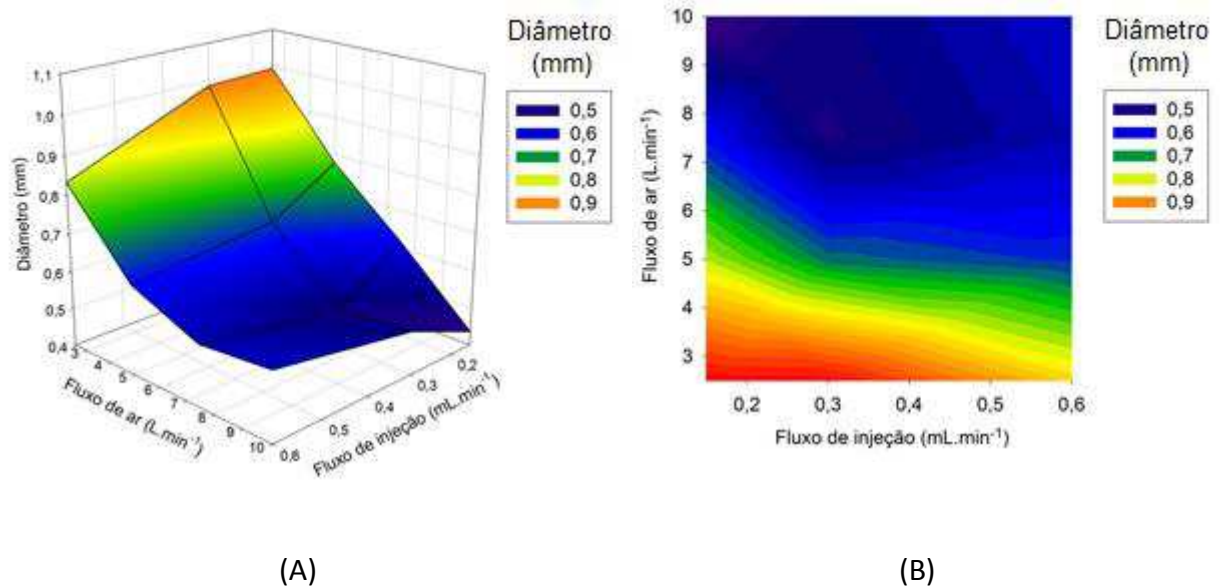


Figura 24 - Superfície de resposta tridimensional (A), Superfície de contorno bidimensional (B).

$$Z = 1,566 - 1,039X - 0,187Y + 0,472X^2 + 0,008Y^2 + 0,090XY \quad (39)$$

Onde Z representa o diâmetro das microesferas, X representa o fluxo de ar e Y representa o fluxo de injeção da solução de quitosana. O erro associado de 0,01206 e coeficiente de correlação R^2 de 0,9412 sugerem que o modelo apresentado para a superfície de resposta descreve bem os dados experimentais obtidos. O maior erro associado foi do termo linear do fluxo de ar ($\pm 0,508$) e para o termo quadrático da mesma variável ($\pm 0,621$). A sustentabilidade da Equação 39 pelo modelo, que representa os valores ótimos para as respostas, foi testada e está de acordo com os valores estimados (Figura 25). Pode-se observar que os diâmetros das microesferas apresentam uma maior dependência com o fluxo de ar, fato que fica evidenciado pela magnitude dos índices da variável X . Os resultados permitem concluir que os diâmetros são afetados em diferentes graus pelas variáveis fluxo de ar e fluxo de injeção. Dentro das condições estudadas é possível observar que valores crescentes, aplicados simultaneamente, para fluxo de ar e fluxo de injeção, acarretaram em redução no diâmetro das microesferas. Foi possível, durante os ensaios, determinar os valores máximos para as variáveis estudadas. Valores de fluxo de ar maiores que 10 L.min⁻¹ causaram turbulência no arraste das microesferas, ou seja, causaram irregularidade no crescimento das microesferas.

Fluxos de injeção superiores a $0,600 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ geraram corrente elétrica (amperagem) acima da corrente máxima admitida pelo motor de passo utilizado no sistema, ocasionando travamento motor e zeragem do fluxo de injeção da solução de quitosana.

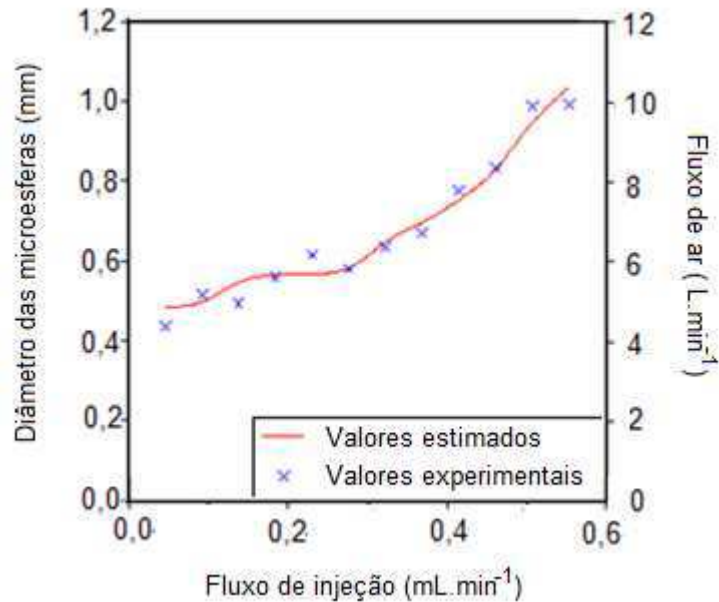


Figura 25 - Valores estimados e experimentais para o modelo.

A Figura 26 mostra os diâmetros das microesferas como função do fluxo de ar para cada fluxo de injeção da solução de quitosana (V_1 , V_2 e V_3). Observa-se que os diâmetros das microesferas diminuem quando há um aumento no fluxo ar. O fluxo de ar que flui paralelamente à agulha é o principal responsável pela resistência à queda da gota, impedindo o seu crescimento. Assim, quanto maior o fluxo de ar, maior a força de arrasto, impedindo o crescimento da gota, resultando em microesferas com diâmetro menor (Dias *et al.*, 2008).

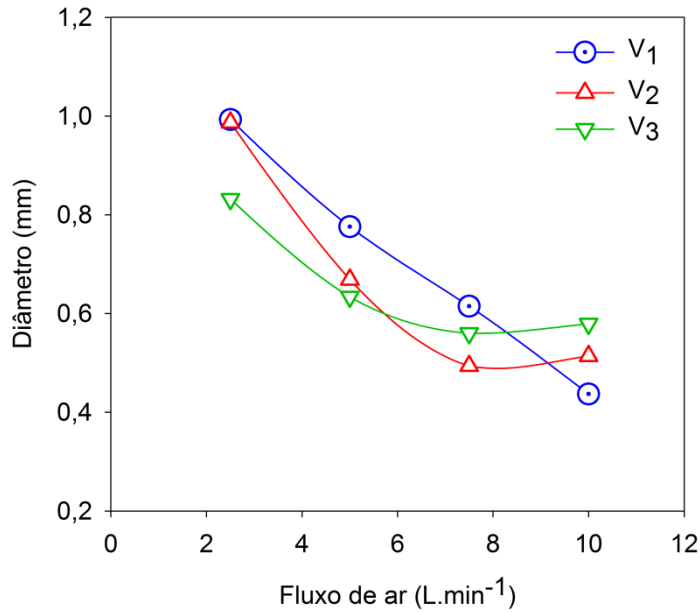


Figura 26 - Diâmetro das microesferas preparadas em diferentes fluxos de ar.

O atrito entre as partículas de ar e a superfície da gota, causa transferência de momento entre as partículas de ar e as partículas da gota (Figura 27). Essa transferência de momento decresce da superfície da gota até o eixo central da gota, formando um gradiente de momento. O gradiente gera uma força (F_y) que arrasta a gota para baixo, F_y deve ser proporcional à área da gota (A) e ao gradiente de velocidade do fluxo de ar (dV_y/dy), conforme equação:

$$F_y \propto A \cdot \frac{dV_y}{dy} \therefore \frac{|F_y|}{A} = K \cdot \frac{dV_y}{dy} \quad (40)$$

Onde K é uma constante associada às características da solução de quitosana injetada. A F_y não é ortogonal à área superficial da gota e admitindo que o fluxo de ar é paralelo à superfície da gota, podemos concluir que a Equação 40 assume uma dimensão de cisalhamento. Com base na Equação 40, podemos afirmar que o fluxo de ar é inversamente proporcional à área superficial da microesfera e conseqüentemente ao diâmetro, como pode ser constatado nos diâmetros e fluxos de ar 2,5; 5,0 e 7,5 L.min⁻¹.

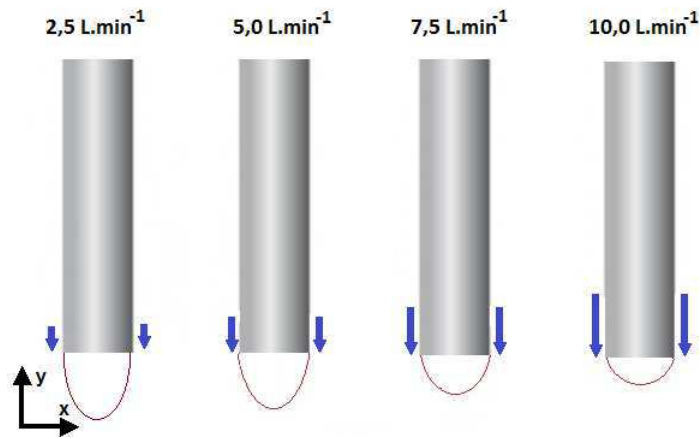


Figura 27 - Formação das gotas com diferentes fluxos de ar.

Nas simulações computacionais o fluxo de ar apresentou maior gradiente de cisalhamento nas microesferas obtidas com fluxo de ar 10 L.min^{-1} , assumindo uma turbulência de 2% em todas as simulações. As curvas de pressão geradas pelo ar na superfície das microesferas, durante o processo de obtenção das microesferas $V_1-2,5$ e V_1-10 , estão representadas na Figura 28. Os dados obtidos nas simulações estão de acordo com a transferência de momento gerado na obtenção das microesferas.

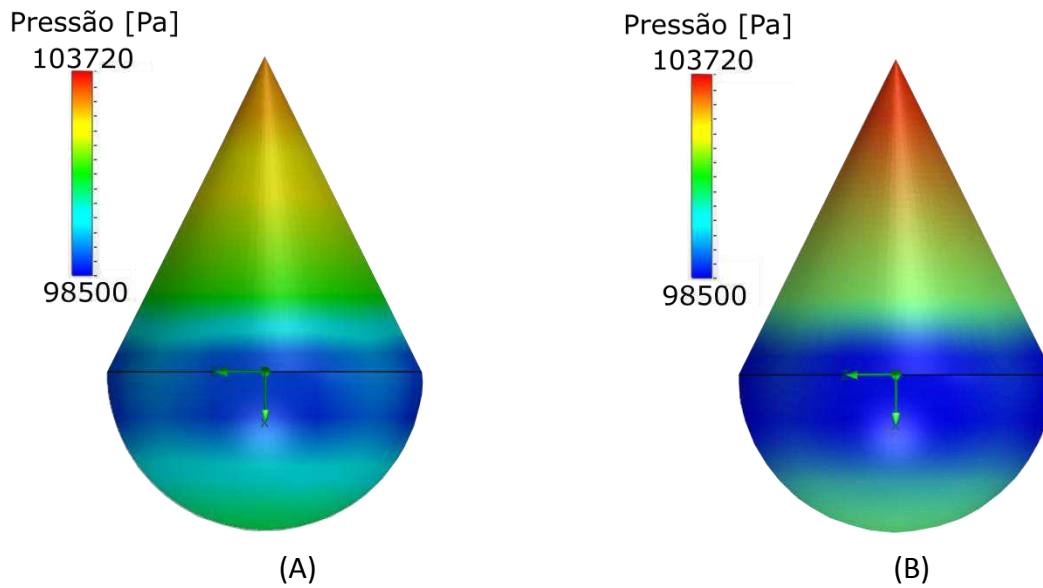


Figura 28 - Curvas de pressão das microesferas $V_1-2,5$ (A) e V_1-10 (B).

O diâmetro das microesferas preparadas com fluxo de injeção V_1 demonstra uma relação linear com o fluxo de ar, com um coeficiente de correlação de $R^2 = 0,994$ e erro padrão de 0,0032 (Tabela 5). Com V_2 e V_3 , a dependência é não linear, sugerindo interferência no processo de formação da gota de quitosana.

Tabela 5 - Coeficientes de correlação de Pearson, R^2 e erro padrão.

| Curva | Pearson | R^2 | Erro Padrão |
|-------|----------|--------|-------------|
| V_1 | -0,99807 | 0,9942 | 0,00322 |
| V_2 | -0,90318 | 0,7236 | 0,02143 |
| V_3 | -0,86364 | 0,6188 | 0,01375 |

Os diâmetros das microesferas produzidas com V_2 e V_3 são menores do que com V_1 até fluxo de ar de $7,5 \text{ L.min}^{-1}$, com fluxo de ar acima dessa faixa ocorre um aumento dos diâmetros das microesferas, isso pode ser justificado pela redução da velocidade média do ar paralela à superfície da gota, pois com fluxo de ar maior que 8 L.min^{-1} o regime deixa de ser laminar e passa para turbulento na proximidade do bico de injeção. Essa constatação foi evidenciada durante o processo de fabricação das microesferas, pois ocorreu forte agitação da superfície do líquido de coagulação, redução da esfericidade das microesferas obtidas com V_3 e alteração no padrão de ruptura (Figura 29). As setas em vermelho na Figura 29 - B indicam que o gotejamento ocorreu com oscilação lateral da gota formada com fluxo de ar 10 L.min^{-1} , essa oscilação ficou preservada na superfície da microesfera em função da coagulação instantânea. No fluxo de ar $2,5 \text{ L.min}^{-1}$ não é possível observar o mesmo padrão de ruptura, indicando que o processo de desprendimento da gota ocorre sem grandes oscilações laterais (Figura 29 - A).

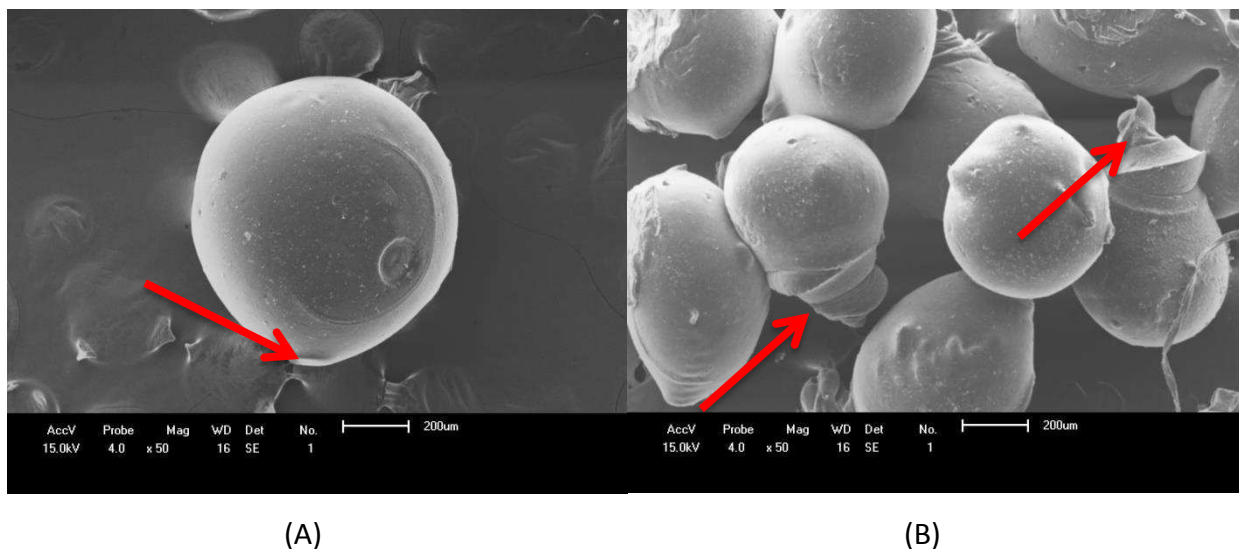


Figura 29 - MEV dos padrões de rupturas e esfericidade de $V_1-2,5$ (A) e V_3-10 (B).

O fluxo de injeção V_1 foi escolhido para obtenção das microsferas carregadas com 5-FU e MMT, pois esse fluxo apresentou melhor linearidade e regularidade com os dados dimensionais das microsferas. As microsferas carregadas com 5-FU foram preparadas com fluxos de ar $2,5 \text{ L.min}^{-1}$ e $10,0 \text{ L.min}^{-1}$ sem MMT ($V_1-2,5-F$ e V_1-10-F) e com MMT ($V_1-2,5-FA$ e $V_1-10-FA$). Esses fluxos de ar foram escolhidos para estudar a relação da área superficial das microsferas com o perfil de liberação do 5-FU. As microsferas $V_1-2,5-F$, V_1-10-F , $V_1-2,5-FA$ e $V_1-10-FA$ estão representadas na Figura 30.

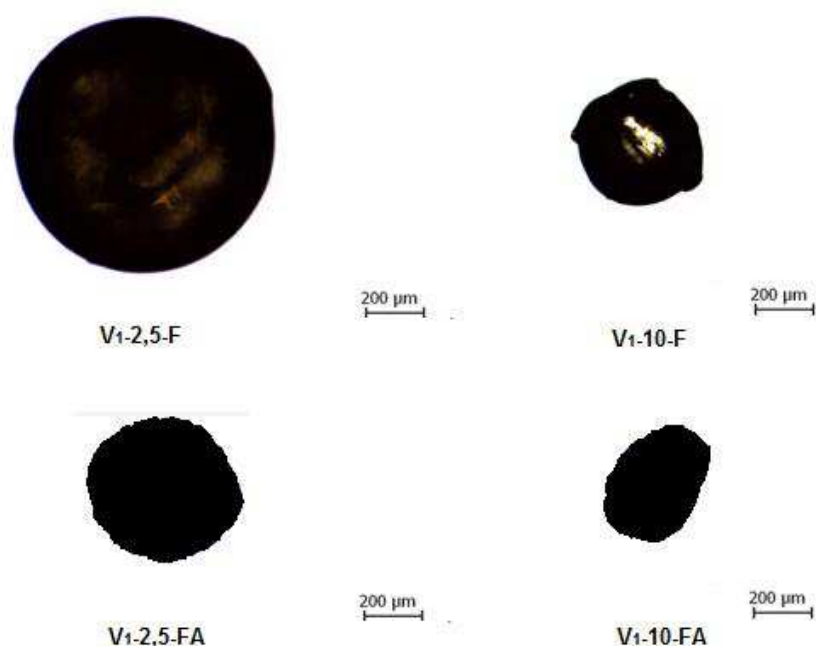


Figura 30 - Imagens obtidas por MO das microsferas com 5-FU.

As microsferas $V_{1-2,5-F}$ e V_{1-10-F} apresentaram valores dimensionais similares às microsferas sem 5-FU (Tabela 6), pois essas microsferas preservaram a esfericidade após o processo de secagem. Os dados demonstram que $V_{1-2,5-FA}$ e $V_{1-10-FA}$ sofreram redução no volume e área superficial. Segundo Sinha *et al.* (2004) essa modificação pode estar relacionada com a proporção quitosana/solvente. A solução de injeção utilizada na obtenção de $V_{1-2,5-FA}$ e $V_{1-10-FA}$ apresentou uma proporção 20% maior de solvente por causa da dispersão de MMT. A Figura 31 demonstra que houve perda do formato esférico com formação de pequenos cilindros rugosos, esses cilindros apresentam altura média de 0,151 mm ($V_{1-2,5-FA}$) e 0,096 mm ($V_{1-10-FA}$).

Tabela 6 - Dados dimensionais das microsferas com 5-FU.

| Amostra | Diâmetro equivalente (mm) | Volume (mm ³) | Área superficial (mm ² .g ⁻¹) |
|----------------|---------------------------|---------------------------|--|
| $V_{1-2,5-F}$ | $0,836 \pm 0,042$ | $0,310 \pm 0,043$ | $1428,0 \pm 227,9$ |
| V_{1-10-F} | $0,451 \pm 0,014$ | $0,048 \pm 0,004$ | $2138,9 \pm 302,5$ |
| $V_{1-2,5-FA}$ | $0,560 \pm 0,023$ | $0,037 \pm 0,001$ | $2172,9 \pm 198,9$ |
| $V_{1-10-FA}$ | $0,413 \pm 0,015$ | $0,013 \pm 0,001$ | $2475,9 \pm 84,8$ |

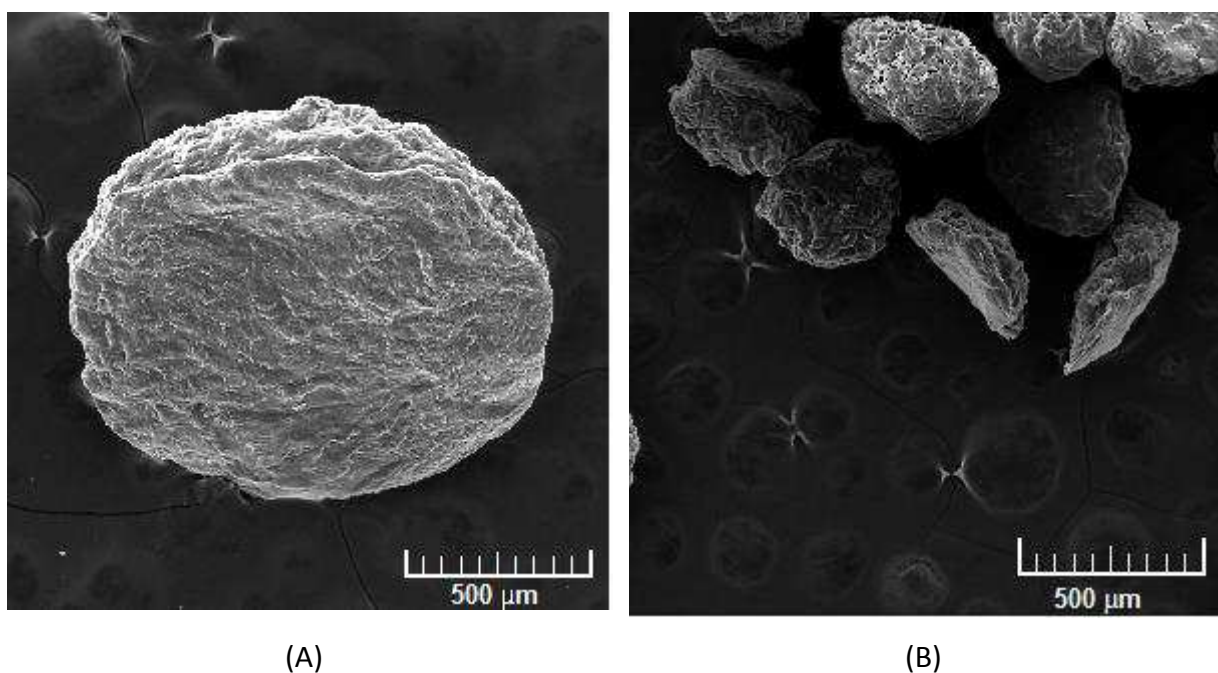


Figura 31 - Perda de esfericidade V₁-2,5-FA (A) e V₁-10-FA (B).

4.3 Localização dos Sítios de Interação entre a Quitosana e o 5-FU

Os resultados obtidos por dinâmica molecular mostraram a ocorrência de interações de pontes de hidrogênio entre o 5-FU e a quitosana, principalmente com a hidroxila e o grupo amino da quitosana. As interações entre o 5-FU e a quitosana ocorreram em sítios específicos. O hidrogênio ligado ao N1 apresentou interações mais efetivas com hidroxilas HO3-O3 e/ou HO4-O4. A Figura 32 mostra o posicionamento do 5-FU em relação à quitosana em determinado instante da simulação.

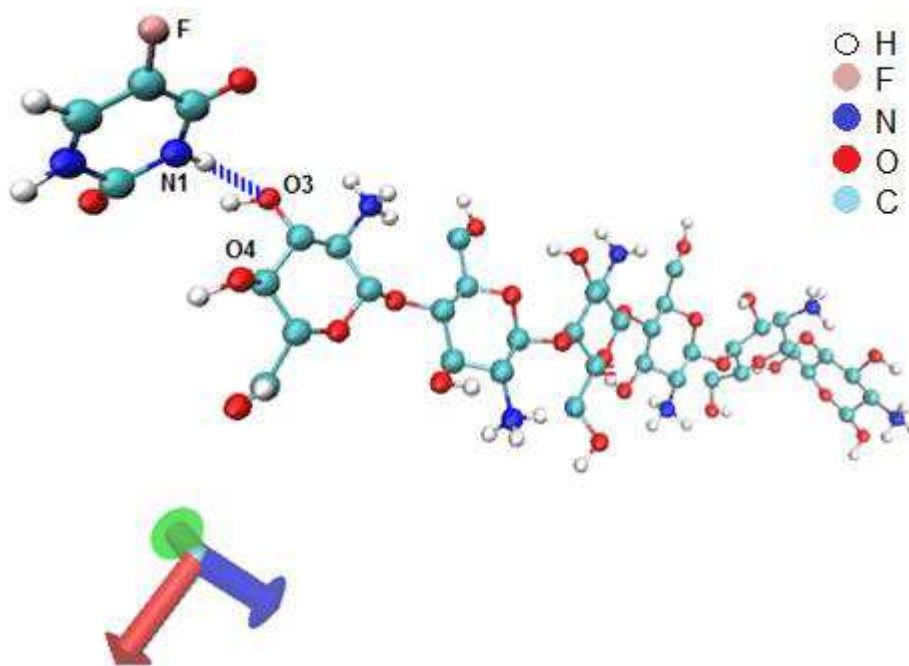


Figura 32 - Interação do 5-FU com a hidroxila HO3-O3. Esta imagem foi captuada na simulação em 50 °C.

Ocorreram interações entre o N2 do 5-FU e a hidroxila HO3-O3, conforme representação na Figura 33, entretanto essa interação não ocorreu com a hidroxila HO4-O4. Estes dois sítios de interações foram observados em todas as simulações realizadas.

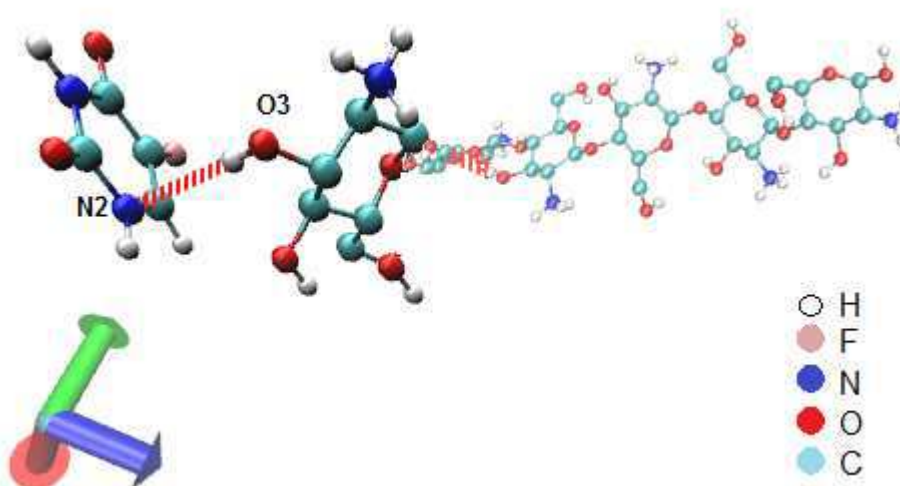


Figura 33 - Interação do N2 com a hidroxila HO3-O3 na temperatura de 50 °C.

A interação com menor efetividade ocorreu entre o hidrogênio do N1 e o oxigênio da ligação glicosídica (Figura 34-A), pois a função de distribuição radial de pares, $g(r)$, apresentou baixo pico de interação. A interação do 5-FU com as hidroxilas do filamento de quitosana foi expressiva, principalmente entre os hidrogênios flúor do 5-FU e as hidroxilas do filamento polimérico (Figura 34-B); já com o grupo amino (Figura 34-C) a interação foi mínima, ocasionado pela protonação do grupo amina. Em nenhum sistema simulado foi observado uma interação efetiva entre o 5-FU e um grupo amino.

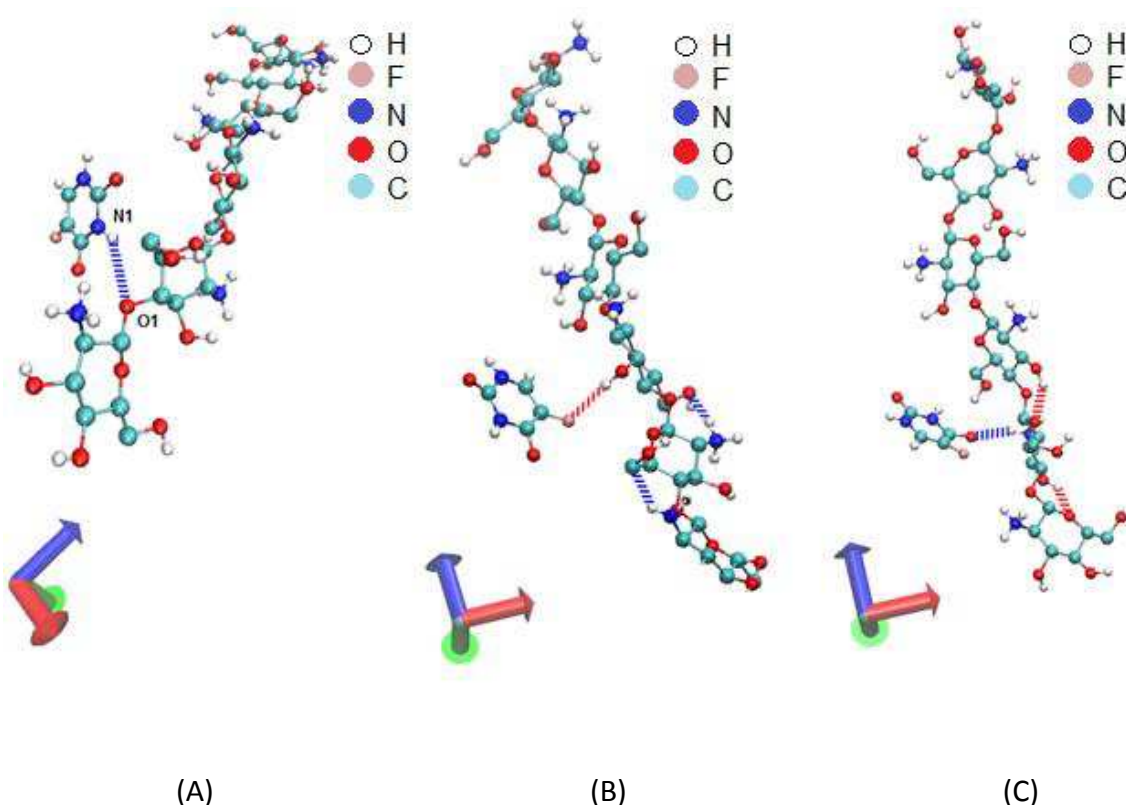


Figura 34 - Interação entre o hidrogênio do N1e o O1 da quitosana (A); Interação entre o Fluor e a hidroxila HO3-O3 (B); Interação 5-FU com o grupo amino (C).

A evolução temporal das diversas simulações do número de pontes de hidrogênio entre a molécula de 5-FU e o filamento de quitosana está representada na Figura 35. Nota-se, que ocorreu um maior número de interações nas temperaturas 50 e 80 °C, o que refletiu numa menor distância de interação e com menor variação neste valor, ao contrário das outras simulações. Em função dessa informação a temperatura de 50 °C foi utilizada para dissolução do 5-FU na obtenção das microesferas. A temperatura 80 °C apresentou limitações em sua utilização, pois a solução de solvente de ácido acético (5%) volatiliza durante o

processo de mistura. Essa análise de perfil permite selecionar a temperatura que favorece a maior interação e menor distância entre o filamento de quitosana e o 5-FU.

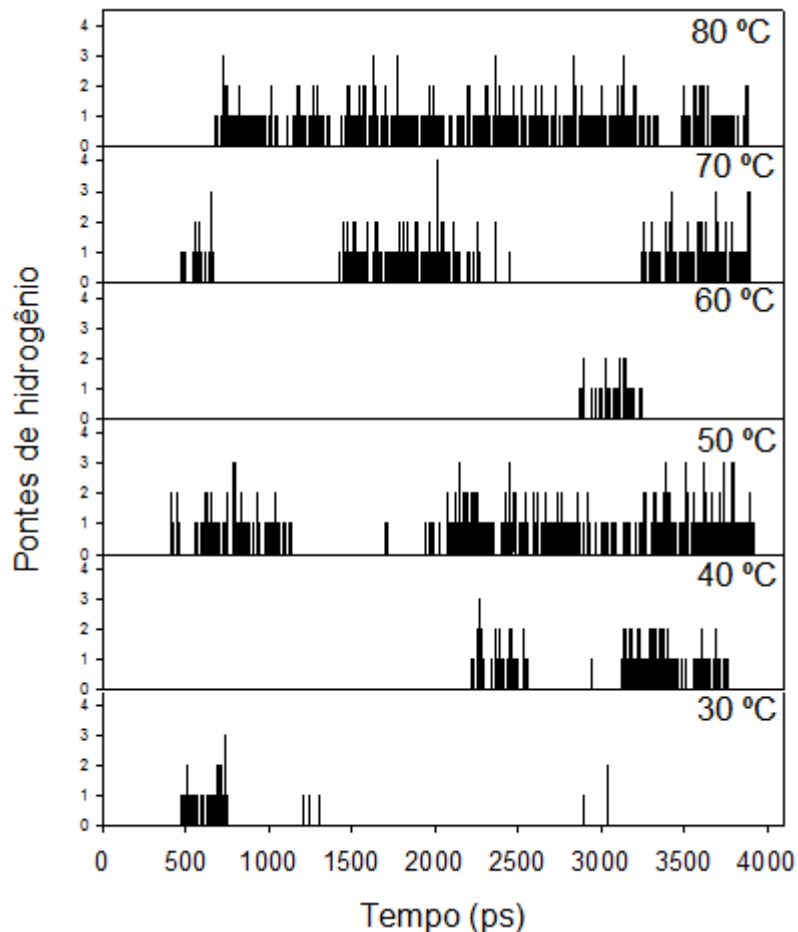


Figura 35 - Evolução temporal do número de pontes de hidrogênio formadas entre o 5-FU e o filamento de quitosana nas simulações.

Na Figura 36 as setas apontam para os valores médios das distâncias entre o 5-FU e o filamento de quitosana e entre parênteses o desvio padrão. As menores distâncias entre o 5-FU e a quitosana variaram de 0,3 a 3,4 Å. As interações mais efetivas ocorreram em 50 °C e 80 °C, pois nessas temperaturas ocorreram as menores distâncias entre o filamento de quitosana e o 5-FU, essa informação confirma os resultados anteriores com formação de maior número de pontes de hidrogênio (Figura 35).

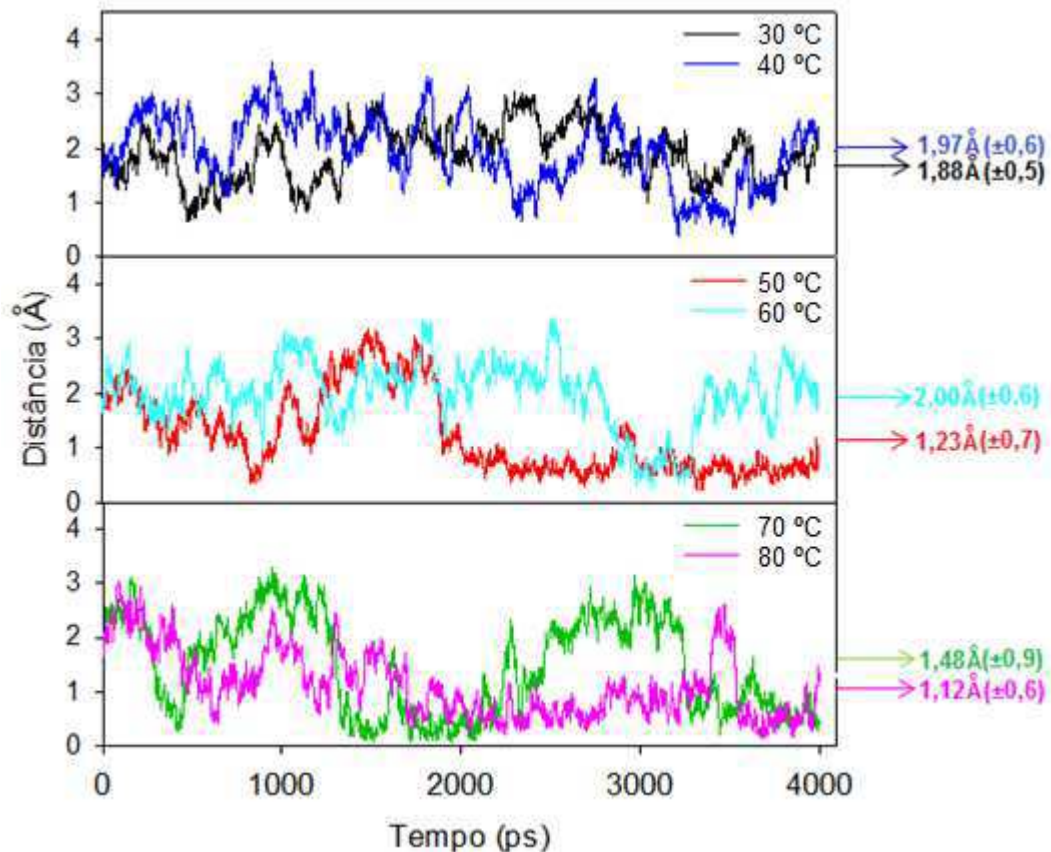


Figura 36 - Evolução temporal das distâncias médias entre o 5-FU e o filamento de quitosana.

4.4 Difractometria de Raios X (DRX)

A difratometria de raios X é uma técnica que é usada para a identificação das fases cristalinas presentes em materiais sólidos e análise das propriedades estruturais. Os padrões de DRX da quitosana e 5-FU/quitosana/MMT estão representados na Figura 37. O padrão de DRX da quitosana apresenta dois picos de difração característicos em 10° e 20° (Figura 37A), o mesmo observado na literatura (Lizardi-Mendoza *et al.*, 2016). A MMT pura apresentou pico característico em $2\theta = 6^\circ$ (Figura 37 C), o que corresponde a um espaçamento basal de 1,47 nm. No nanocompósito 5-FU/quitosana/MMT (Figura 37B), o pico característico relacionado ao argilo mineral foi deslocado para um grau menor ($2\theta = 4,87^\circ$), correspondendo a uma distância interplanar basal (d_{001}) de 1,81 nm, calculada com base na equação de Bragg. Isto indica que nanocompósitos intercalados foram obtidos e que possivelmente bicamadas de quitosana e 5-FU foram posicionadas entre as camadas da montmorilonita. Esta intercalação é favorecida pela interação

eletrostática dos grupos -NH_3^+ da segunda camada com os íons acetato da solução de quitosana tornando acessíveis os sítios para troca aniônica (Tan *et al.*, 2008). Considerando que a espessura de camada de silicato é de 0,96 nm (Azhar e Olad, 2014), a quitosana e o 5-FU aumentaram o espaço intercalar até 1,47 nm, indicando a intercalação do 5-FU no espaço intercalar e obtenção do bionanocompósito intercalado 5-FU/quitosana/MMT.

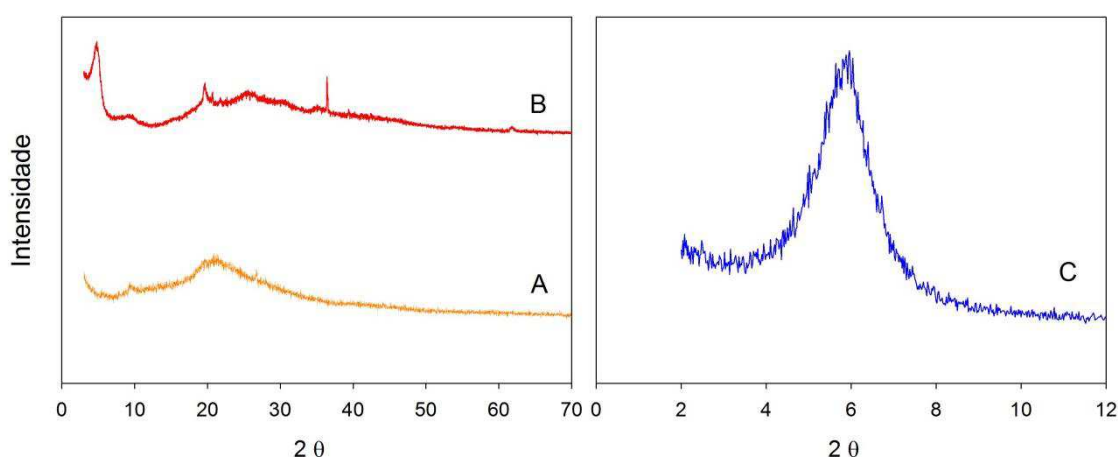


Figura 37 - Difração de raio X quitosana (A), 5-FU/quitosana/MMT(B) e MMT pura(C).

4.5 Eficiência de Encapsulação do 5-FU

As curvas de absorção e calibração do 5-FU para a água de lavagem estão representadas na Figura 38. Os coeficientes de regressão A, B e correlação (R^2) foram obtidos por regressão linear a partir dos pontos experimentais. O coeficiente de correlação foi de 0,9914, evidenciam um bom ajuste da curva de calibração em relação aos dados (Jeffery *et al.*, 2006; Skoog *et al.*, 2006).

O λ_{max} do 5-FU na água de lavagem (alcalina) sofreu um efeito batocrômico (deslocamento para o vermelho) com deslocamento do λ_{max} de 266 nm para 283 nm. Normalmente o 5-FU apresenta um pico de absorção no espectro UV-Vis, entre 250-325 nm representando transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ da forma tautomérica cetônica do 5-FU (Shah *et al.*, 2012). Esse pico pode sofrer influência do pH do meio solvente; em pH menor que 9,1, os pares isolados de elétrons do 5-FU provavelmente ficam rodeados por prótons, tornando-os indisponíveis para a transição $n \rightarrow \pi^*$, mas sob condições fortemente alcalinas, o pico correspondente à transição $n \rightarrow \pi^*$ aparece devido à disponibilidade de pares isolados de elétrons no átomos de oxigênio. O

deslocamento do pico de absorção para maiores comprimentos de onda no ambiente básico pode ser relacionado à ressonância dos grupos -NH devido à desprotonação ocasionado pelo excesso de grupos -OH do meio (Mahan e Myers, 1995; Shah *et al.*, 2012).

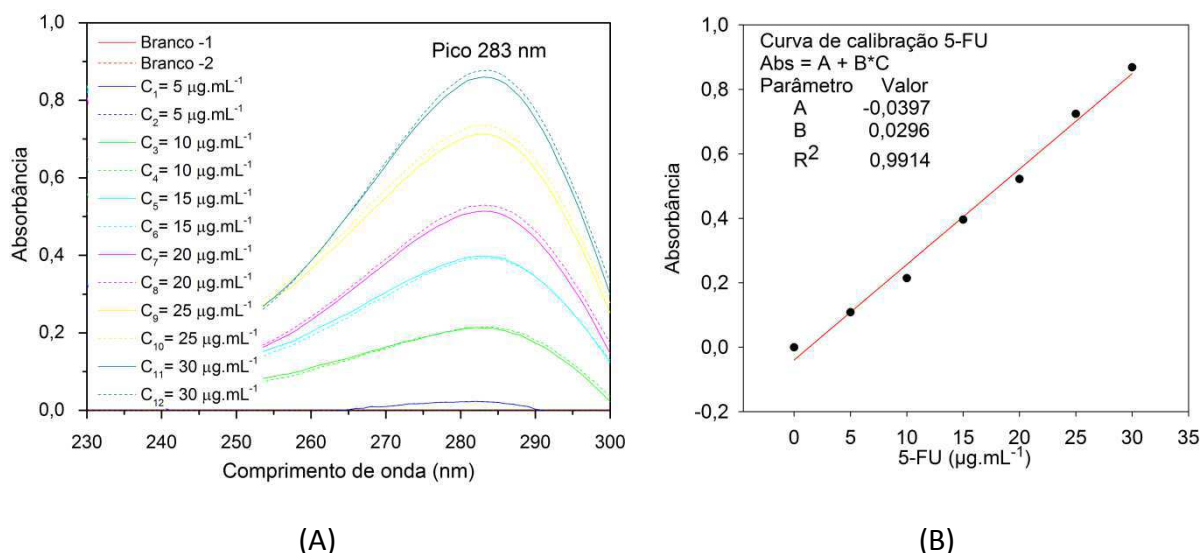


Figura 38 - Curvas de absorção UV-vis do 5-FU em água de lavagem (A) e curva de calibração 5-FU em água de lavagem no $\lambda_{\text{max}} = 283 \text{ nm}$ (B).

O processo de encapsulação do fármaco foi realizado durante a produção das microesferas de quitosana e quitosana/argila, com o 5-FU sendo dissolvido na solução de quitosana e com posterior gotejamento na solução coagulante. Dessa forma, o fármaco foi aprisionado na matriz polimérica. As eficiências de encapsulação variaram entre 29,37 e 74,99% (Tabela 7). Trabalhos anteriores relatam EE de 5-FU entre 28-69% (Yang e Hon, 2009; Aydin e Pulat, 2012; Sun *et al.*, 2017). Neste estudo, os resultados apresentaram boa correlação com os estudos relatados.

O tamanho das microesferas afetou o encapsulamento do 5-FU, esse fato foi constatado pela quantificação do 5-FU por UV-Vis na água de lavagem das microesferas. A água de lavagem das microesferas $V_1-2,5-F$; V_1-10-F ; $V_1-2,5-FA$ e $V_1-10-FA$ apresentaram teores de 19,79; 21,15; 7,07 e 8,89 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de 5-FU, evidenciando que quanto maior a área superficial das microesferas por unidade de massa, maior é a perda do fármaco durante o processo de coagulação e lavagem.

Tabela 7 - Dados de eficiência de encapsulação do 5-FU.

| Amostra | W_i (mg) | W_f (mg) | EE (%) |
|------------------------|---------------|---------------|-----------|
| V ₁ -2,5-F | 69,44 | 43,54 | 37,29 |
| V ₁ -10-F | 65,88 | 46,53 | 29,37 |
| V ₁ -2,5-FA | 62,18 | 15,55 | 74,99 |
| V ₁ -10-FA | 56,36 | 19,75 | 64,96 |

A presença da MMT aumentou significativamente a eficiência de encapsulação do 5-FU. Segundo Azhar e Olad (2014), a preparação nanocompósitos com 5-FU e MMT pode expandir o espaço interlamelar em 0,81 nm, levando à intercalação de 5-FU (Figura 39), essa intercalação pode justificar o menor teor de 5-FU na água de lavagem das microesferas V₁-2,5-FA e V₁-10-FA.

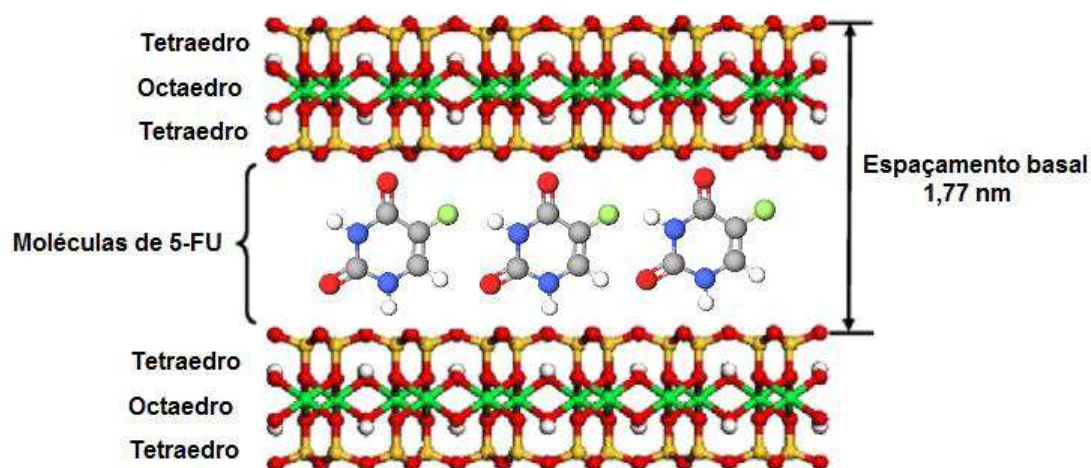


Figura 39 - Possível arranjo estrutural 5-FU/MMT (Azhar e Olad, 2014).

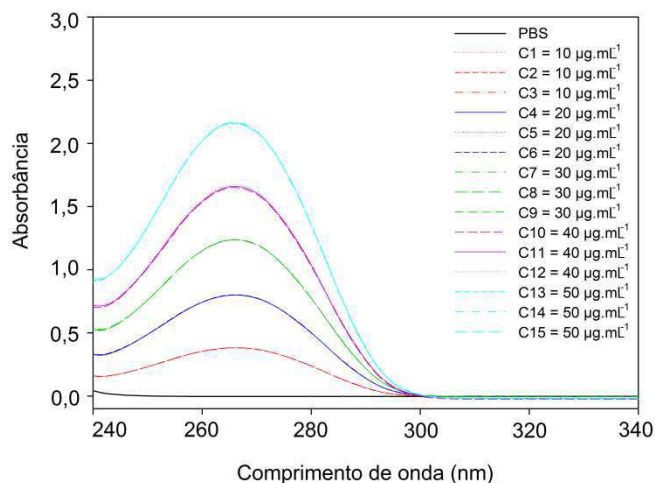
4.6 Perfil de Liberação do 5-FU *in vitro*

Os dados de absorvância das soluções de calibração de 5-FU estão representado na Tabela 8 e as curvas de absorção e calibração do 5-FU em PBS pH 1,2, 7,4 e 10 estão representadas na Figura 40, Figura 41 e Figura 42, respectivamente. Os coeficientes de regressão A , B e correlação (R^2) foram obtidos por regressão linear a partir dos pontos experimentais. Este último parâmetro permite avaliar a qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes

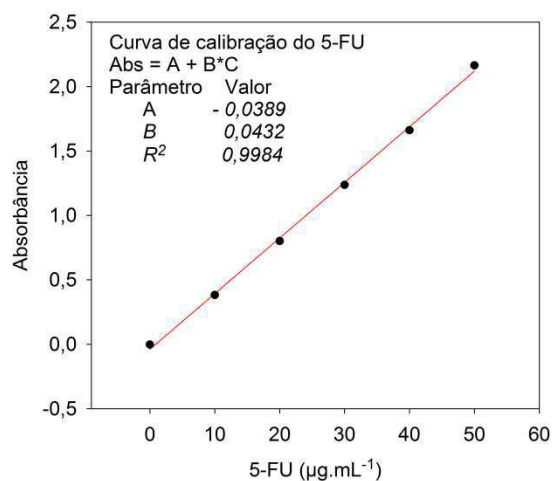
de regressão estimados (Ribani *et al.*, 2004). Os coeficientes de correlação para de 5-FU em pH 1,2, 7,4 e 10 foram 0,9964, 0,9992 e 0,9926, esses valores evidenciam um bom ajuste da curva de calibração em relação aos dados (Jeffery *et al.*, 2006; Skoog *et al.*, 2006).

Tabela 8 - Média das absorbâncias do 5-FU em pH 1,2, 7,4 e 10.

| 5-FU ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | Abs | Abs | Abs |
|--------------------------------|------------------|------------------|-----------------|
| | 266 nm pH 1,2 | 266 nm pH 7,4 | 267 nm pH 10 |
| PBS | -0,0027 | -0,0061 | 0,0040 |
| 10 | 0,3820 | 0,4613 | 0,4716 |
| 20 | 0,8004 | 0,9593 | 0,9484 |
| 30 | 1,2372 | 1,4599 | 1,3911 |
| 40 | 1,6616 | 2,0200 | 1,7822 |
| 50 | 2,1644 | 2,4639 | 2,0582 |

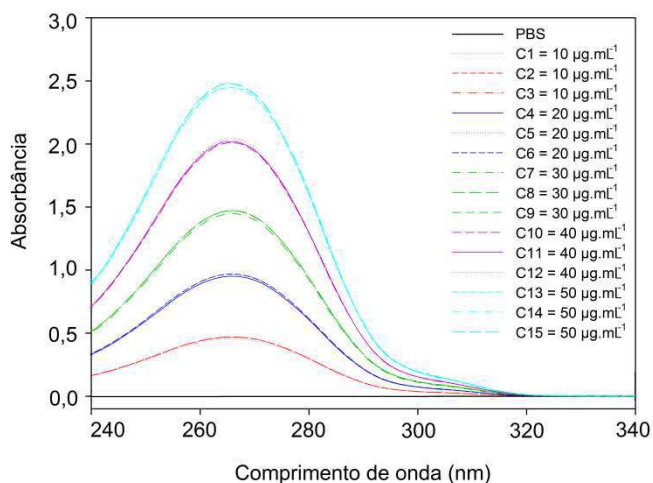


(A)

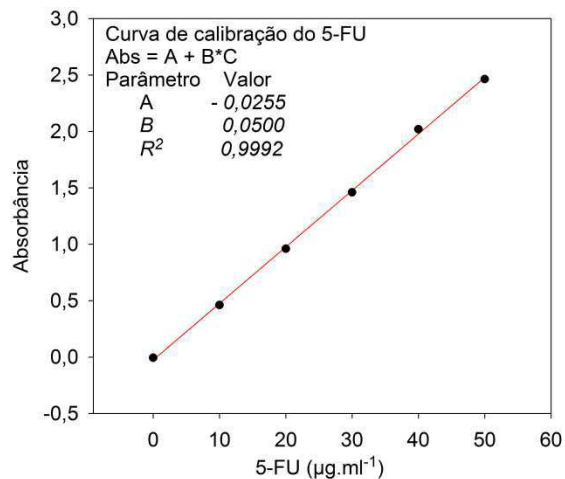


(B)

Figura 40 - Curvas de absorção UV do 5-FU em PBS pH 1,2 (A) e curva de calibração 5-FU em PBS pH 1,2 (B).

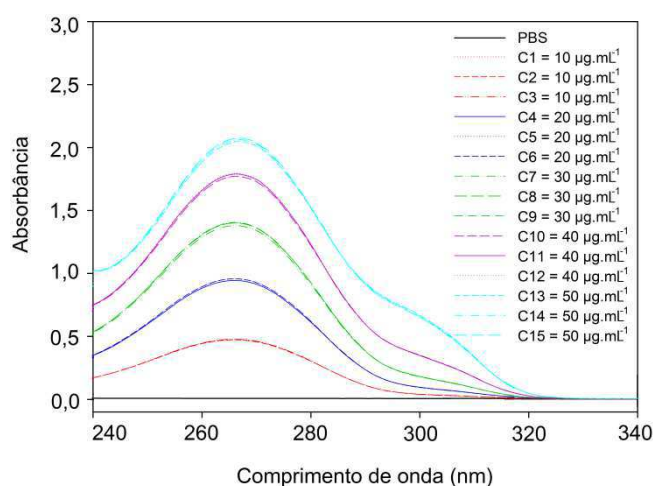


(A)

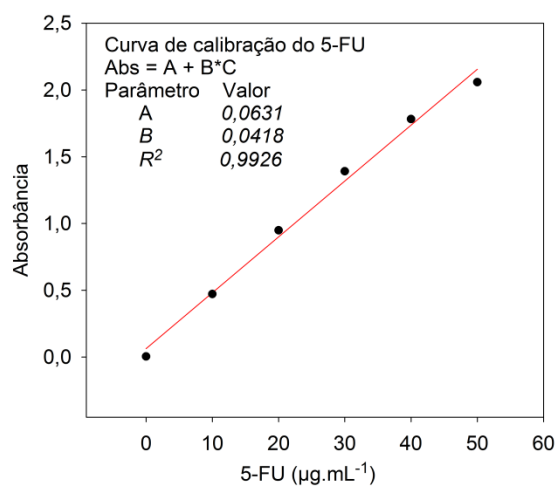


(B)

Figura 41 - Curvas de absorção UV do 5-FU em PBS pH 7.4 (A) e curva de calibração 5-FU em PBS pH 7.4 (B).



(A)



(B)

Figura 42 - Curvas de absorção UV do 5-FU em PBS pH 10 (A) e curva de calibração 5-FU em PBS pH 10 (B).

Os limites de detecção e quantificação estão representados na Tabela 9, e serviram para determinar o início da faixa útil da curva de calibração, ou seja, o início da faixa onde as medidas quantitativas podem ser realizadas. Todas as medições de liberação *in vitro* apresentaram valores acima do LQ e dentro da faixa de linearidade das curvas de calibração, evidenciando que as medições ocorreram

dentro das faixas úteis das curvas de calibração. Os dados analíticos de absorbância, concentração e massas liberadas estão representados no Apêndice 2.

Tabela 9- Limites de detecção e quantificação das curvas de calibração de 5-FU em pH 1,2, 7,4 e 10.

| Limites | pH 1,2 | pH 7,4 | pH 10 |
|------------------------------|--------|--------|-------|
| LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | 0,04 | 0,05 | 0,03 |
| LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | 0,12 | 0,15 | 0,09 |

O perfil de liberação das microesferas em PBS pH 1,2 foi avaliado pelo modelo de Hixson-Crowell e os dados de regressão estão representados na Tabela 10 e Figura 43. As microesferas V₁-2,5-FA e V₁-10-FA apresentaram um melhor ajuste ao modelo de dissolução com R² de 0,801 e 0,928. O menor valor de R² das microesferas V₁-2,5-F e V₁-10-F indica predominância de mais de um mecanismo de liberação, essa simultaneidade também foi observada no estudo de Nivethaa *et al.* (2015).

Tabela 10 - Parâmetros de dissolução do modelo de Hixson-Crowell das microesferas em pH 1,2.

| Amostra | Ks ($\text{mg}^{1/3}.\text{s}^{-1}$) | R ² |
|------------------------|---|----------------|
| V ₁ -2,5-F | $6,33.10^{-5}$ | 0,617 |
| V ₁ -10-F | $7,72.10^{-5}$ | 0,408 |
| V ₁ -2,5-FA | $2,22.10^{-4}$ | 0,801 |
| V ₁ -10-FA | $2,56.10^{-4}$ | 0,928 |

Os valores da constante Ks demonstram a forte relação entre o raio das microesferas e o perfil de liberação, pois quanto maior o valor da constante, maior é a inclinação da curva de liberação, conforme pode ser observado na Figura 43. Nair *et al.* (2011) obtiveram resultados semelhantes com microesferas de diâmetro reduzido. A explicação para a dependência diâmetro/liberação deve estar relacionada com a Lei da Raiz Cúbica de Hixson e Crowell (1931), pois a constante Ks é inversamente proporcional ao raio da microesfera, conforme equação abaixo (Shen *et al.*, 2003):

$$K_S = \frac{W_0^{1/3} \cdot \varphi \cdot C_s}{r \cdot \rho} \quad (41)$$

Onde:

φ é uma relação entre o coeficiente de difusão e a espessura de difusão;

C_s é solubilidade do fármaco;

r é o raio da partícula;

W_0 é a massa inicial do fármaco;

ρ é a densidade.

A rugosidade superficial das microesferas $V_{1-2,5-FA}$ e $V_{1-10-FA}$ também pode ter contribuído para maior liberação do 5-FU, conforme pode ser observado na Figura 44, pois o aumento da rugosidade leva à liberação mais rápida de fármacos, devido principalmente ao aumento da área para intumescimento das microesferas (Kalosakas e Martini, 2015). O aumento da rugosidade e área superficial pode ter favorecido o inchamento da microesfera e posterior difusão do 5-FU, pois o inchamento é acompanhado do aumento da frente de erosão e da frente de difusão (Lopes *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2012).

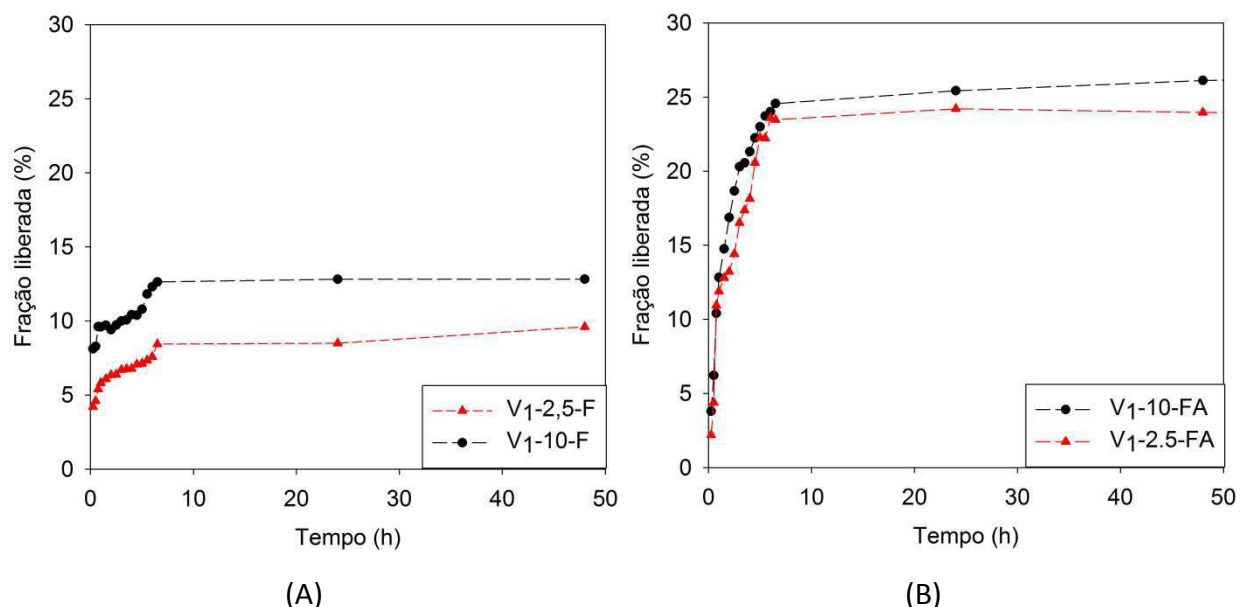
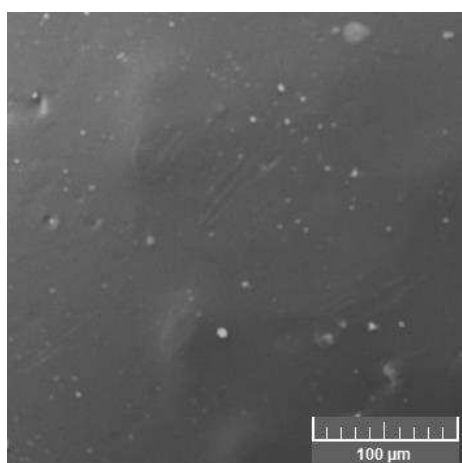
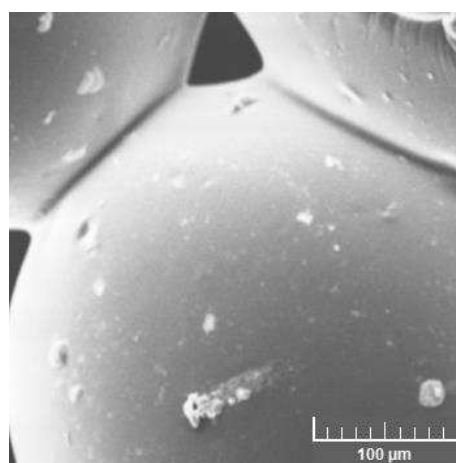


Figura 43 - Perfil de liberação do 5-FU das microesferas em PBS pH 1,2 sem MMT (A) e com MMT (B).

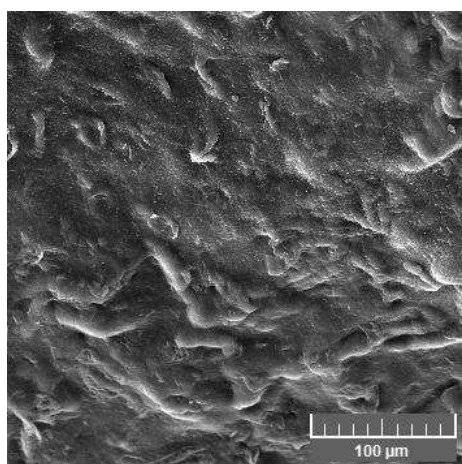
A Figura 43 mostra duas etapas de liberação, a primeira com liberação rápida (*burst*) nas horas iniciais de liberação e outra fase longa (*lag*) até o final do teste. Após 48 horas, a quantidade de 5-FU liberada foi de 1990 µg, 2092 µg, 8118 µg e 7817 µg para as microesferas V₁-2,5-F, V₁-10-F, V₁-2,5-FA e V₁-10-FA. Normalmente a liberação brusca ocorre em um período curto de tempo em comparação com todo o processo de liberação (Azhar e Olad, 2014). Esta liberação rápida do fármaco é muitas vezes indesejável porque a quantidade total do fármaco liberado é influenciada por essa alta liberação inicial (Talukdar *et al.*, 1996). A alta liberação inicial do 5-FU deve ter ocorrido principalmente pela dissolução e difusão do fármaco presente na superfície dos sistemas carregados com o 5-FU e a segunda fase de liberação deve ter envolvido difusão, seguido de dissolução da matriz polimérica.



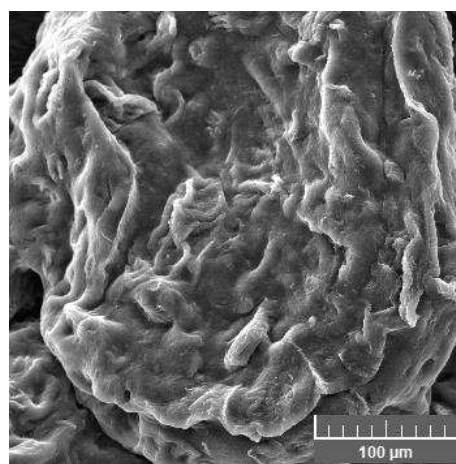
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 44 - Rugosidade das microesferas $V_{1-2,5-F}$ (A), V_{1-10-F} (B), $V_{1-2,5-FA}$ (C) e $V_{1-10-FA}$ (D).

Tabela 11 – Dados de fração liberada (%) de 5-FU de V₁-2,5-F e V₁-10-F em pH 1,2; 7,4 e 10.

| Tempo (h) | Fração liberada (%) | | | | | |
|--------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| | pH 1,2 | | pH 7,4 | | pH 10 | |
| | V ₁ -2,5-F | V ₁ -10-F | V ₁ -2,5-F | V ₁ -10-F | V ₁ -2,5-F | V ₁ -10-F |
| 0,25 | 4,20 | 8,11 | 1,25 | 3,50 | 0,43 | 2,44 |
| 0,5 | 4,59 | 8,28 | 1,27 | 3,51 | 0,53 | 2,46 |
| 0,75 | 5,39 | 9,61 | 1,31 | 3,53 | 0,55 | 2,47 |
| 1,00 | 5,81 | 9,59 | 1,30 | 3,54 | 0,55 | 2,48 |
| 2,00 | 6,35 | 9,40 | 1,32 | 3,64 | 0,62 | 2,47 |
| 3,00 | 6,70 | 9,99 | 1,32 | 3,65 | 0,67 | 2,54 |
| 4,00 | 6,78 | 10,41 | 1,34 | 3,7 | 0,66 | 2,52 |
| 5,00 | 7,12 | 10,78 | 1,34 | 3,79 | 0,68 | 2,58 |
| 6,00 | 7,57 | 12,29 | 1,38 | 3,82 | 0,66 | 2,58 |
| 24,00 | 8,48 | 12,81 | 1,43 | 4,16 | 1,09 | 3,57 |
| 48,00 | 9,60 | 12,81 | 1,43 | 4,16 | 1,10 | 3,61 |

Tabela 12 - Dados de fração liberada (%) de 5-FU de V₁-2,5-FA e V₁-10-FA em pH 1,2; 7,4 e 10.

| Tempo (h) | Fração liberada (%) | | | | | |
|--------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| | pH 1,2 | | pH 7,4 | | pH 10 | |
| | V ₁ -2,5-FA | V ₁ -10-FA | V ₁ -2,5-FA | V ₁ -10-FA | V ₁ -2,5-FA | V ₁ -10-FA |
| 0,25 | 2,20 | 3,79 | 0,60 | 0,19 | 0,42 | 2,7.10 ⁻³ |
| 0,5 | 4,39 | 6,21 | 0,69 | 0,19 | 0,45 | 0,014 |
| 0,75 | 10,93 | 10,40 | 0,69 | 0,19 | 0,47 | 0,021 |
| 1,00 | 11,89 | 12,82 | 0,68 | 0,20 | 0,48 | 0,028 |
| 2,00 | 13,21 | 16,87 | 0,78 | 0,18 | 0,51 | 0,043 |
| 3,00 | 16,52 | 20,30 | 0,78 | 0,24 | 0,59 | 0,104 |
| 4,00 | 18,14 | 21,31 | 0,80 | 0,25 | 0,60 | 0,115 |
| 5,00 | 22,26 | 22,99 | 0,82 | 0,26 | 0,63 | 0,126 |
| 6,00 | 23,59 | 24,01 | 0,85 | 0,28 | 0,66 | 0,146 |
| 24,00 | 24,21 | 25,43 | 0,89 | 0,46 | 0,73 | 0,213 |
| 48,00 | 23,97 | 26,12 | 0,88 | 0,47 | 0,87 | 0,249 |
| 72,00 | 23,81 | 26,47 | 1,11 | 1,11 | 1,24 | 1,008 |

As curvas de liberação *in vitro* das microesferas em meio PBS pH 7,4 e pH 10 estão representadas na Figura 45 e Figura 46, respectivamente. Os dados de fração liberada de 5-FU das microesferas V₁-2,5-F e V₁-10-F estão representados na Tabela 11 e das microesferas V₁-2,5-FA e V₁-10-FA na Tabela 12. Os perfis de liberação em pH 7,4 e 10 foram diferentes do perfil de liberação em pH 1,2 para

todas as microesferas estudadas. Observa-se que ocorreu uma liberação mais lenta (menor inclinação da curva de liberação) nas primeiras horas em relação a liberação brusca que ocorreu em pH 1,2. Após 48 horas, a quantidade 5-FU liberada em pH 7,4 foi de 296 µg, 679 µg, 511 µg, 329 µg e em pH 10 foi de 228 µg, 589 µg, 488 µg e 284 µg para as microesferas V_{1-2,5-F}, V_{1-10-F}, V_{1-2,5-FA} e V_{1-10-FA}, respectivamente. Esses dados evidenciam que o teor de MMT nas microesferas reduz a velocidade de liberação do 5-FU e estão de acordo com estudos anteriores (Kevadiya *et al.*, 2012; Azhar e Olad, 2014). O aumento do pH ocasiona aumento na carga negativa da argila, enquanto o 5-FU permanece carregado positivamente (pKa = 8), isso indica que o fármaco deve estar ligado mais intensamente à MMT, por isso é liberado com menor velocidade com o aumento do pH do meio (Kevadiya *et al.*, 2012).

Outro aspecto que deve ter influenciado a massa liberada de 5-FU foi o aumento da área superficial. No sistema V_{1-2,5-F/V1-10-F} houve um aumento da área superficial de 1428,0 para 2138,9 mm².g⁻¹ e no sistema V_{1-2,5-FA/V1-10-FA} de 2172,9 para 2475,9 mm².g⁻¹, a magnitude no aumento da área no sistema sem argila justifica o aumento da massa liberada, pois o aumento da área das microesferas deve aumentar a massa liberada de 5-FU, isso ocorre por que o fluxo (*J*) é uma relação entre a quantidade de massa (*m*) que passa através de uma área (*A*) por unidade de tempo (*t*), conforme Equação 42 (Livi, 2000). Entretanto o aumento de área nos sistemas com MMT não foi determinante para aumentar a massa liberada de 5-FU, a menor liberação deve estar relacionada com a menor EE das microesferas V_{1-10-FA}, pois a menor EE gerou menor gradiente de concentração ($\frac{\partial \rho_{5-FU}}{\partial y}$) e conseqüentemente menor fluxo, conforme Equação 7.

$$J = \frac{m}{A \cdot t} \quad (42)$$

Os resultados revelaram que em pH 7,4 e pH 10 o 5-FU é liberado lentamente pelas microesferas contendo MMT, quando comparado com o perfil de liberação das microesferas sem MMT. Provavelmente a diferença de liberação deve estar relacionada com a intercalação de 5-FU nas camadas do silicato, resultando numa menor difusão dentro da matriz, retardando e suprimindo a liberação do 5-FU

(Azhar e Olad, 2014). O retardo na liberação demonstra que as microesferas V₁-2,5-FA e V₁-10-FA apresentaram propriedades de liberação controlada do 5-FU em pH 7,4 e 10.

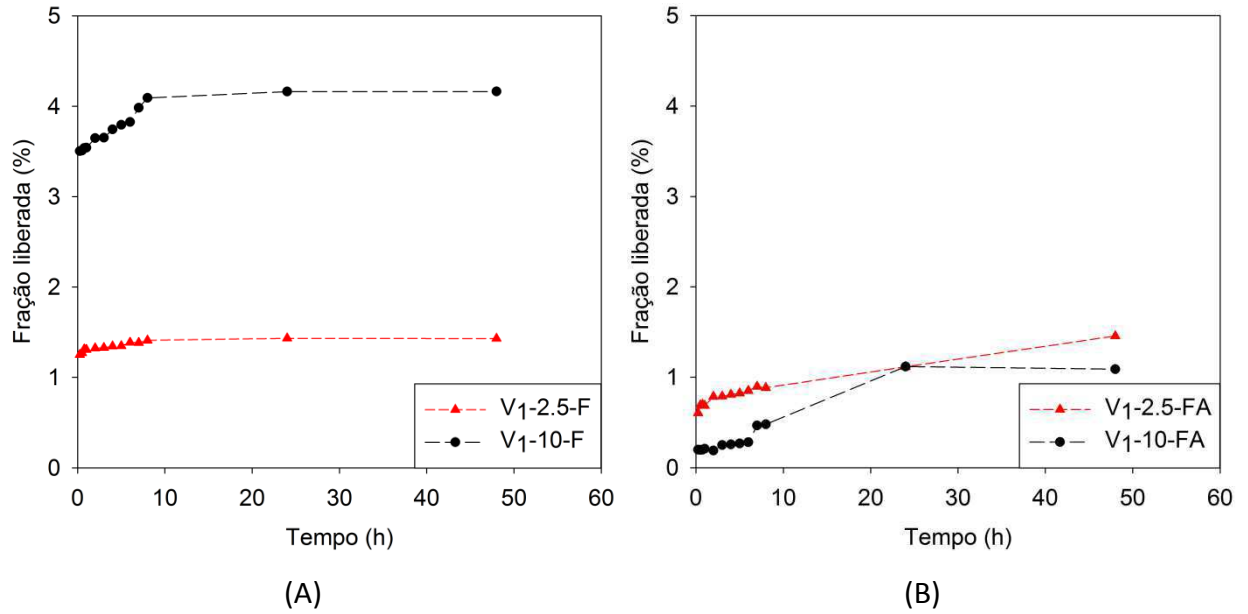


Figura 45 - Perfil de liberação do 5-FU das microesferas em PBS pH 7,4 sem MMT (A) e com MMT (B).

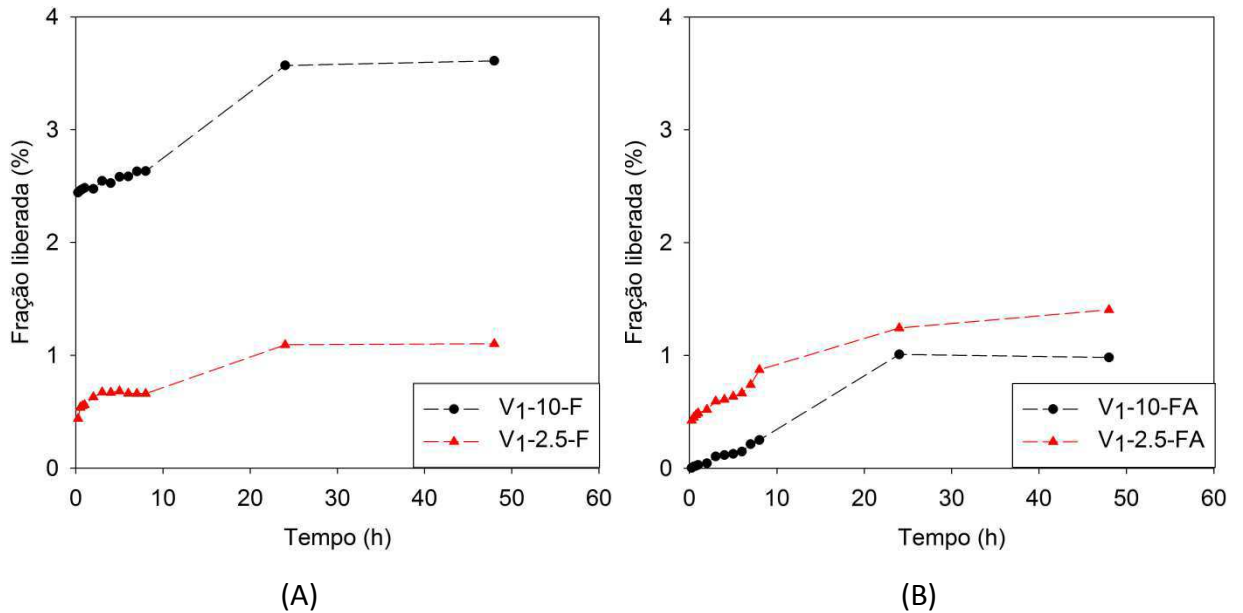


Figura 46 - Perfil de liberação do 5-FU das microesferas em PBS pH 10 sem MMT (A) e com MMT (B).

Os dados demonstram que o pH do meio influenciou o perfil de liberação do 5-FU, esse evento deve estar relacionado com a redução da solubilidade da quitosana com o aumento do pH. Comportamento similar foi observado para a quitosana em modelos de dinâmica molecular, onde foi observado um pequeno tempo de vida para a ligação O3–HO3···O5 devido à orientação das moléculas de água ao redor do grupo amino protonado, causando a desestabilização da ligação intramolecular (Figura 47). Entretanto, em pH elevado a ligação O3–HO3···O5 é estabilizada pela presença de grupos aminos desprotonados (NH₂) como observado na Figura 47. Dados de energia livre de solvatação, obtidos a partir da resolução numérica da equação não-linear de Poisson-Boltzmann, demonstram que ocorre um aumento da energia livre de solvatação com o aumento do pH, justificando a redução da solubilidade da quitosana. As simulações por dinâmica molecular concordam com as observações experimentais e sugerem que a variação de pH afeta significativamente a conformação e solubilidade da quitosana (Silva *et al.*, 2011).

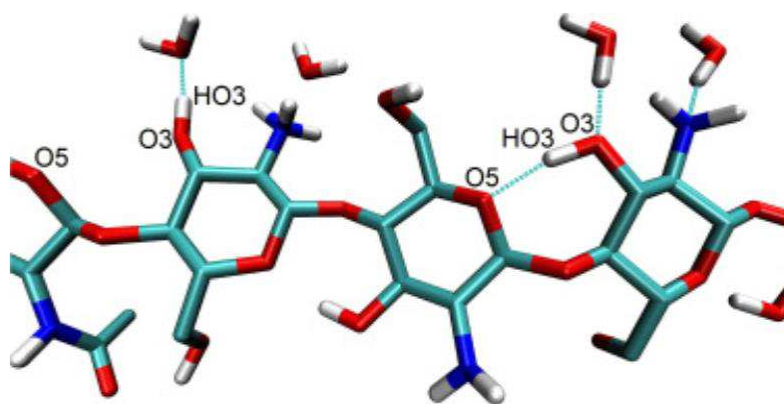


Figura 47 - Desestabilização e estabilização da ligação de hidrogênio intramolecular O3–HO3O5 (Silva *et al.*, 2011)

4.6.1 Simulação Liberação Gastrointestinal

A Figura 48 mostra duas etapas de liberação em todos os sistemas, a primeira com liberação rápida nas duas horas iniciais de liberação e outra fase longa até o final do teste. Normalmente a liberação rápida ocorre em um período curto de tempo em comparação com todo o processo de liberação (Yang *et al.*, 2016). A alta liberação inicial do 5-FU deve ter ocorrido principalmente por dissolução do 5-FU presente na superfície dos sistemas e a segunda fase liberação deve ter envolvido

difusão, conforme dados do modelo cinético de liberação. Em pH 1,2, ocorreu a liberação do 5-FU durante o intervalo de tempo de 0 até 2 horas, com liberação de 6,35%, 9,40%, 13,21% e 16,87% das microesferas V₁-2,5-F, V₁-10-F, V₁-2,5-FA e V₁-10-FA, respectivamente. Em pH 7,4 foi observado que houve liberação de 7,74%, 13,23%, 14,06% e 17,15 % de 5-FU de 2 até 6 horas. Finalmente no pH 10 e no intervalo de tempo de 6 até 24 horas, a liberação de 5-FU foi de 8,83%, 16,80%, 15,30% e 18,16%.

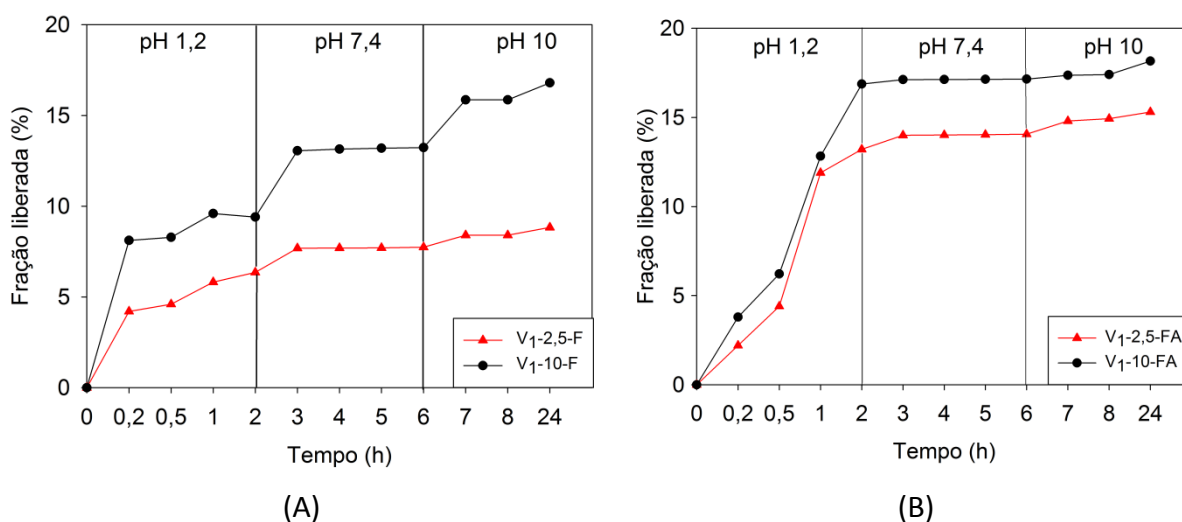


Figura 48 - Simulação *in vitro* de liberação gastrointestinal do 5-FU das microesferas sem MMT (A) e com MMT (B).

A maior liberação de 5-FU em meio ácido também deve estar relacionada com a facilidade de protonação dos grupos amino ($-\text{NH}_3^+$) nesse meio. Esse evento resulta na repulsão eletrostática e enfraquecimento da resistência mecânica e química da estrutura, o que deve ter favorecido consideravelmente o grau de inchamento da quitosana. Com a elevação do pH, a protonação da quitosana decresce, o que reduziu o grau de inchamento. Em pH próximo da neutralidade, há equilíbrio entre as cargas o que promove máxima interação entre os grupos ionizáveis, proporcionando maior estabilidade à matriz (Mendes *et al.*, 2011). Essa estabilidade reduz o número de grupos amino da quitosana protonados, afetando as propriedades de intumescimento e liberação do 5-FU pelas microesferas. Em pH 10 a maioria grupos amino estavam desprotonados, indicando que a liberação de 5-FU neste meio, deve ter dependido das características de intumescimento da argila e da solubilidade do 5-FU no meio alcalino.

Comparativamente as microesferas com argila apresentaram maior liberação, esse fato pode estar associado às lamelas de MMT que foram expostas à água; as moléculas de água são adsorvidas na superfície das camadas, que são então separadas umas das outras. Este comportamento é chamado de inchamento interlamelar e pode progredir até um espaçamento de 40,0 Å (Brindley, 1952; Lummus e Azar, 1986). Esse inchamento pode ter favorecido a difusão do 5-FU, pois é acompanhando do aumento da frente de erosão e da frente de difusão, conforme esquema representado da Figura 49 (Lopes *et al.*, 2005). Entretanto as diferenças entre EE e área superficial das microesferas são aspectos que limitam a comparação direta entre as microesferas com e sem argila.

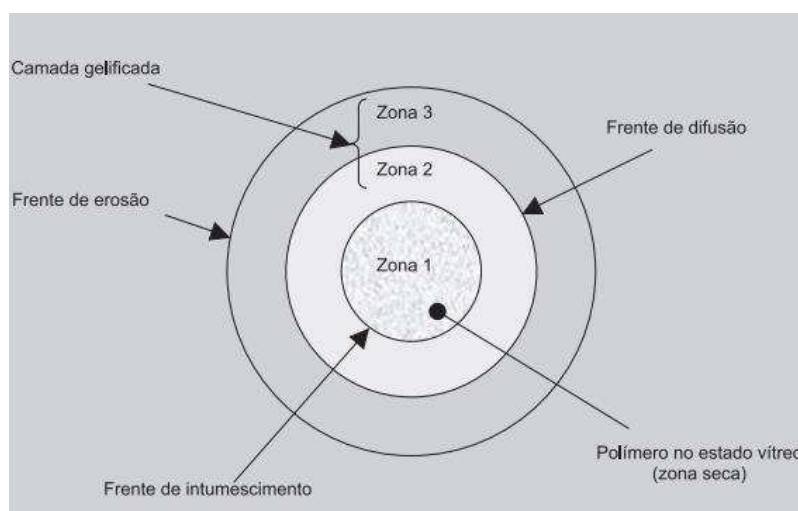


Figura 49 - Esquema ilustrativo das frentes de movimento (intumescimento, difusão e erosão) durante a liberação de fármacos a partir de sistemas matriciais intumescíveis (Lopes *et al.*, 2005).

A fração liberada de 5-FU foram maiores nos sistemas $V_1-2,5-FA$ e $V_1-10-FA$, esta característica deve estar relacionada com o aumento da área superficial e o tamanho das microesferas, pois a liberação é influenciada diretamente pelo tamanho da partícula e área superficial (Fangueiro *et al.*, 2012). O aumento na liberação nas formulações $V_1-2,5-FA$ e $V_1-10-FA$ devem apresentar melhoras significativas nas propriedades de absorção e biodisponibilidade do 5-FU *in vivo* (Shegokar e Muller, 2010; Moschwitz, 2013).

As diferenças entre as frações liberadas de 5-FU ao término do ensaio ($V_1-2,5$ e $V_1-10 = 7,97\%$; $V_1-2,5-FA$ e $V_1-10-FA = 2,86\%$) provavelmente está

relacionada com o aumento da área superficial. No sistema $V_{1-2,5}/V_{1-10}$ ocorreu um aumento da área superficial de 1428,0 para 2138,9 $\text{mm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ e no sistema $V_{1-2,5-FA}/V_{1-10-FA}$ de 2172,9 para 2475,9 $\text{mm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, a magnitude no aumento da área dos sistemas justifica o aumento da massa liberada, pois o aumento da área superficial das microesferas facilita o aumento da massa liberada de 5-FU, conforme Equação 42 (Livi, 2000; Lee e Yeo, 2015).

4.6.2 Cinética de Liberação

A cinética de liberação do 5-FU das microesferas foi avaliada com aplicação do modelo de Korsmeyer *et al.* (1983). A Figura 50 e Figura 51 apresentam as taxas de liberação e as regressões do modelo de Korsmeyer em PBS pH 7,4 e 10, respectivamente.

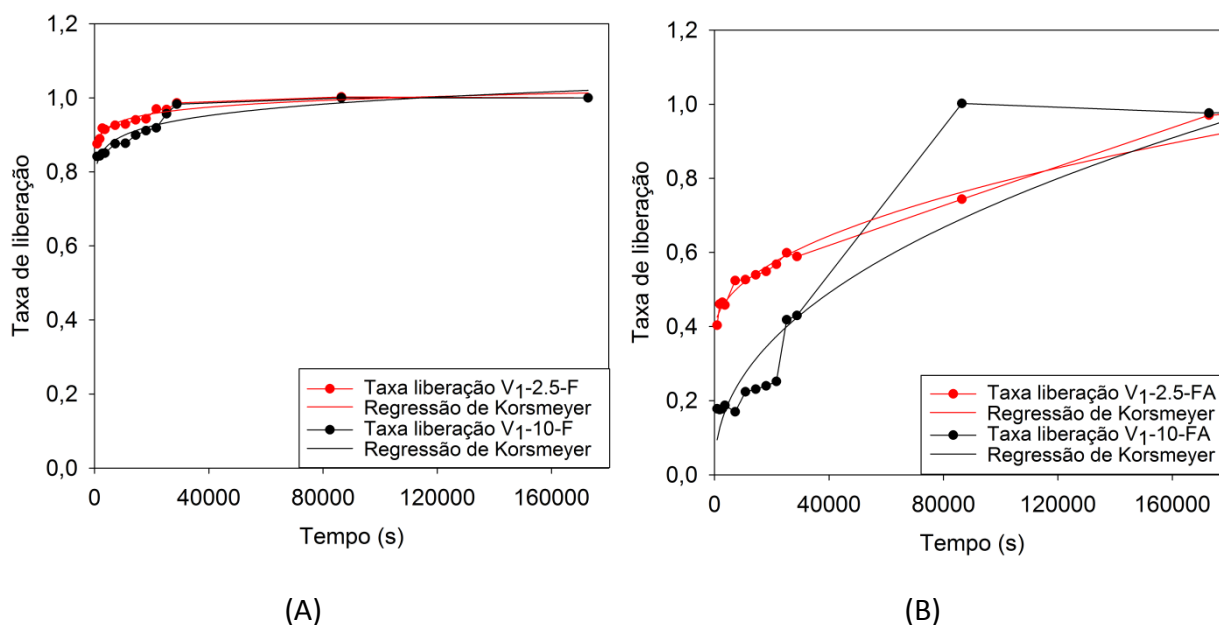


Figura 50 - Taxa de liberação $V_{1-2,5-F}$ e V_{1-10-F} (A) e $V_{1-2,5-FA}$ e $V_{1-10-FA}$ (B) em PBS pH 7,4.

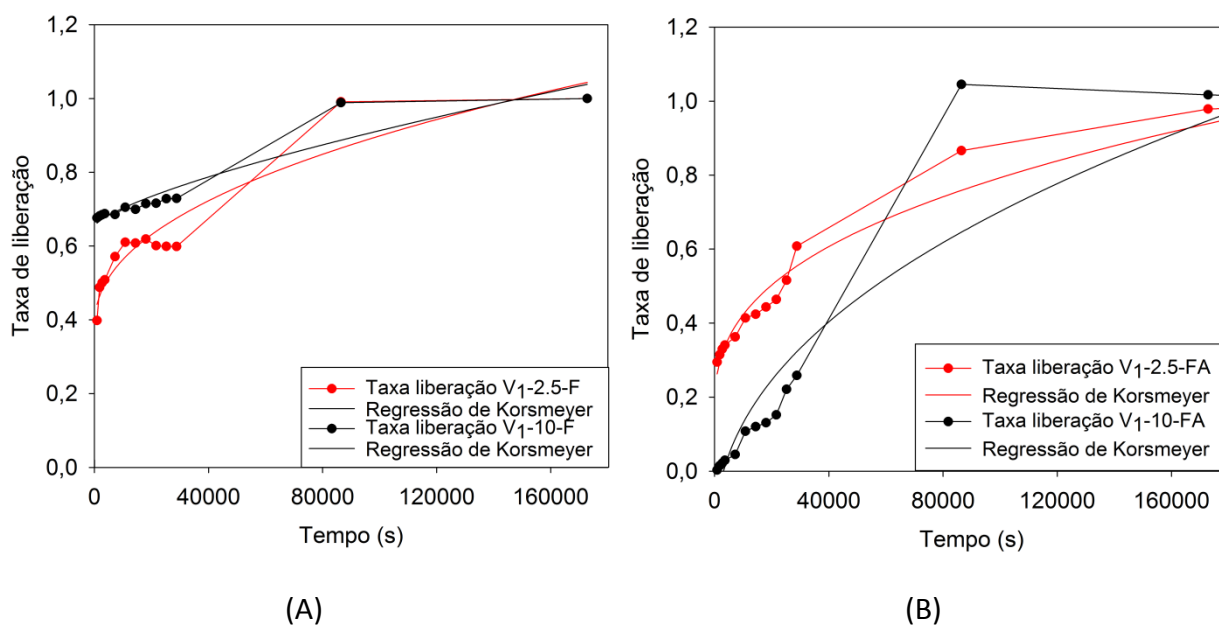


Figura 51 - Taxa de liberação V₁-2,5-F e V₁-10-F (A) e V₁-2,5-FA e V₁-10-FA(B) em PBS pH 10.

Os valores do expoente n encontrados para os perfis de liberação do 5-FU em em pH 7,4 e 10 estão representados nas Tabela 13 e

Tabela 14. Os valores de n indicam que em PBS pH 10 a liberação do 5-FU a partir das V₁-2,5-F e V₁-10-F ocorreu por um mecanismo do tipo anômalo e em PBS pH 7,4 o mecanismo é de difusão de Fick. No mecanismo anômalo provavelmente ocorreu uma ação conjunta dos processos de difusão controlada (difusão de Fick), difusão parcial e erosão da matriz polimérica. Estudos anteriores mostram que a liberação do 5-FU em compostos de biopolímero/argila podem seguir um mecanismo de difusão controlada, difusão parcial através da matriz polimérica inchada ou poros cheios de água nas formulações, e que o tipo de mecanismo varia com o tempo de liberação (Kevadiya *et al.*, 2012; Nivethaa *et al.*, 2015).

Tabela 13 - Parâmetros de regressão da equação de Korsmeyer na liberação 5-FU V₁-2,5-F e V₁-10-F em PBS pH 7,4 e 10.

| pH | V ₁ -2,5-F | | | | V ₁ -10-F | | | |
|-----|-----------------------|------|-------|----------------|----------------------|------|------|----------------|
| | K | n | b | R ² | K | n | b | R ² |
| 7,4 | 2,19 | 0,01 | -1,48 | 0,9315 | 0,09 | 0,12 | 0,60 | 0,8915 |
| 10 | 0,005 | 0,45 | 0,38 | 0,9092 | 0,005 | 0,72 | 0,65 | 0,8999 |

Tabela 14 - Parâmetros de regressão da equação de Korsmeyer na liberação 5-FU V₁-2,5-FA e V₁-10-FA em PBS pH 7,4 e 10.

| pH | V ₁ -2,5-FA | | | | V ₁ -10-FA | | | |
|-----|------------------------|--------|--------|----------------|-----------------------|--------|---------|----------------|
| | K | n | b | R ² | K | n | b | R ² |
| 7,4 | 0,0015 | 0,4867 | 0,3849 | 0,9845 | 0,0041 | 0,4492 | 0,0062 | 0,8836 |
| 10 | 0,0084 | 0,3762 | 0,1541 | 0,9621 | 0,0053 | 0,4446 | -0,1190 | 0,8828 |

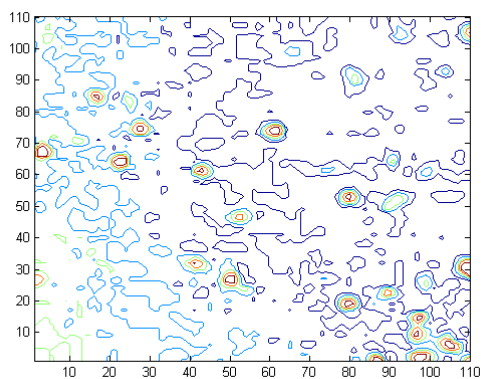
Os valores de *n* apresentados na

Tabela 14 indicam que a liberação do 5-FU em pH 10 a partir das V₁-2,5-FA e V₁-10-FA ocorreu por um mecanismo de difusão de Fick (Siepmann e Peppas, 2001). Em pH 7,4 a V₁-10-FA, apresentou mecanismo de liberação por difusão de Fick e a V₁-2,5-FA apresentou mecanismo anômalo. Entretanto a proximidade do expoente *n* com a faixa de transporte anômalo (0,45-0,89) indica que pode estar havendo difusão e intumescimento na matriz polimérica (Siepmann e Peppas, 2001; Lopes *et al.*, 2005). As imagens de MEV renderizadas sugerem que pode estar ocorrendo erosão superficial da matriz polimérica (

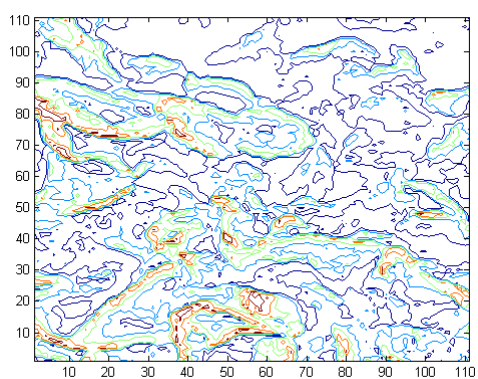
Escala em tons de cinza



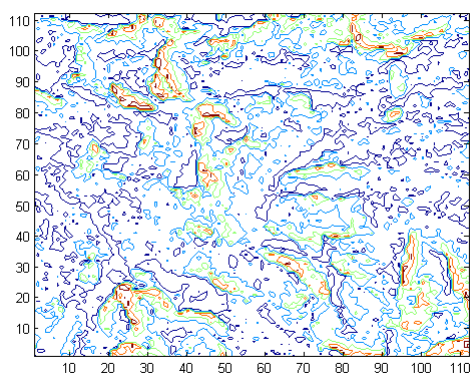
Figura 52), pois a textura superficial apresenta um maior número de irregularidades, com mais vales e picos em tons de cinza nas microesferas pós liberação, essas informações concordam com um mecanismo anômalo de dissolução, pois nesse mecanismo ocorre difusão e erosão durante a liberação do fármaco. Na análise dos dados, foi utilizado o conceito de textura do Engineers (1990); apud Khalifa *et al.* (2006), onde textura é um atributo representando o arranjo espacial dos níveis de cinza dos pixels em uma região. Portanto, as informações indicam que um processo de erosão pode estar ocorrendo durante o processo de liberação do fármaco nos meios estudados.



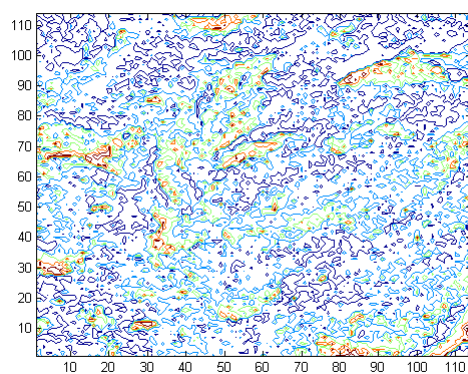
(A)



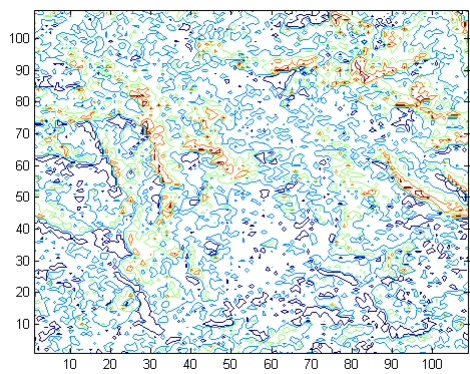
(D)



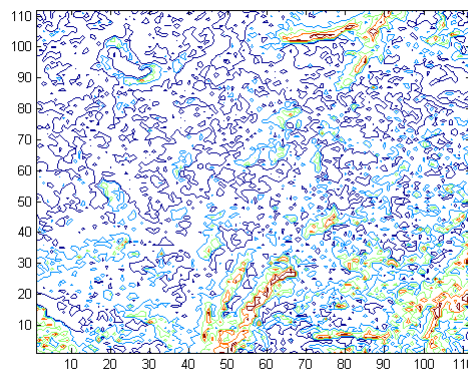
(B)



(E)



(C)



(F)

Escala em tons de cinza



Figura 52 - MEV renderizada V₁-2,5-FA antes da liberação (A); V₁-2,5-FA pós liberação em pH 7,4 (B) e pH 10 (C); V₁-10-FA antes da liberação (D); V₁-10-FA pós liberação pH 7,4 (E) e pH 10 (F).

4.6.3 Coeficiente de Difusão

Os valores das constantes de difusão e dos coeficientes de difusão estão representados na Tabela 15 e Tabela 16. Os cálculos para obtenção dos coeficientes q_n e α estão representados no Apêndice 3. As microesferas não tiveram o coeficiente de difusão (D) calculado em PBS pH 1,2, pois durante a liberação *in vitro* ocorreu dissolução gradativa das microesferas, essa dissolução dificulta o cálculo de difusão no modelo escolhido.

Tabela 15 - Número de microesferas (N), coeficientes q_n e α da liberação *in vitro*.

| Amostra | N | q_n | α mL.cm ⁻³ |
|------------------------|------|--------|---------------------------------|
| V ₁ -2,5-F | 1250 | 3,1979 | 16,3521 |
| V ₁ -10-F | 1512 | 3,1526 | 86,1034 |
| V ₁ -2,5-FA | 2857 | 3,1807 | 23,8028 |
| V ₁ -10-FA | 3245 | 3,1597 | 52,2440 |

Tabela 16 - Coeficientes de difusão (D) das microesferas em PBS pH 7,4 e 10.

| Amostra | pH 7,4 D (cm ² .s ⁻¹) | pH 10 D (cm ² .s ⁻¹) |
|------------------------|---|--|
| V ₁ -2,5-F | 5,24.10 ⁻⁵ | 9,22.10 ⁻⁷ |
| V ₁ -10-F | 9,96.10 ⁻⁶ | 6,20.10 ⁻⁷ |
| V ₁ -2,5-FA | 2,61.10 ⁻⁷ | 2,09.10 ⁻⁷ |
| V ₁ -10-FA | 8,20.10 ⁻⁸ | 6,63.10 ⁻⁸ |

As microesferas V₁-2,5-F e V₁-10-F apresentaram coeficientes de difusão que estão de acordo com estudos anteriores que mostram valores de coeficientes de difusão na faixa de 5.10⁻⁵-10⁻⁷ (Fang *et al.*, 1998; Rokhade *et al.*, 2007). Os coeficientes de difusão foram maiores para as microesferas V₁-2,5-F/V₁-10-F em comparação com as microesferas V₁-2,5-FA e V₁-10-FA, evidenciando que a presença da MMT deve ter aumentado à tortuosidade do percurso do 5-FU dentro das microesferas (Ray, 2013; Gurses, 2015). Observa-se uma tendência semelhante nas taxas de liberação do 5-FU (Figura 50 e Figura 51), isto é, as microesferas sem MMT mostraram uma taxa de liberação maior do que as formulações com MMT PBS

pH 7.4 e 10. Os resultados do presente estudo foram semelhantes a estudos anteriores encontrados na literatura (Kevadiya *et al.*, 2012; Azhar e Olad, 2014).

Os valores do coeficiente de difusão das microesferas sem MMT foram mais elevados em pH 7.4. Esse evento deve estar relacionado com a maior facilidade de protonação dos grupos amino em PBS pH 7.4 quando comparado com o meio PBS pH 10. Essa maior protonação favorece uma repulsão eletrostática e o intumescimento das microesferas, reduzindo provavelmente o livre caminho médio percorrido para as moléculas de 5-FU e facilitando sua difusão. Esses dados estão de acordo com os dados de perfil de liberação e taxa de liberação. Entretanto o mesmo comportamento não foi observado nas microesferas contendo MMT, pois os coeficientes de difusão não apresentaram diferenças significativas entre os meios PBS pH 7.4 e pH 10. Nesse caso a menor dependência entre difusão e o pH do meio, pode estar relacionado com a prevalência das interações eletrostáticas das monocamadas longitudinais de MMT e 5-FU (Kevadiya *et al.*, 2012), quando comparado com o aumento da difusão causado pelo intumescimento das microesferas.

4.6.4 Dosagem e Individualização

Para pacientes oncológicos, com função hematopoiética adequada, o esquema posológico semanal emprega 500-600 mg.m⁻² de 5-FU, durante 6-8 semanas (Brunton *et al.*, 2012). Admitindo uma quimioterapia sistêmica e mantendo o mesmo esquema posológico, seria necessário utilizar 12,8 g das microesferas sem argila (EE \cong 35%) e 7,3 g das microesferas com argila (EE \cong 75%), entretanto a massa total das microesferas pode ser reduzida com otimização da etapa de coagulação e lavagem das microesferas, reduzindo a perda do fármaco nessa etapa.

Apesar dos avanços na quimioterapia sistêmica e do grande número de estudos clínicos controlados e não controlados realizados com paciente portadores de câncer hepatocelular, nenhum agente isolado, ou combinação de agentes, leva, de modo reprodutível a uma taxa de resposta de 25%, ou efeito na sobrevida (Braunwald *et al.*, 2013). Entretanto, o uso de quimioterapia regional com microesferas por meio da artéria hepática apresenta vantagem na sobrevida dos pacientes, mas só foi demonstrada com doxorubicina e cisplatina (Lo *et al.*, 2002; Llovet e Bruix, 2003). As microesferas obtidas nesse estudo estão dentro da faixa de diâmetro (40-1000 μ m) dos produtos comerciais disponíveis (Contour SE e

Embosphere) para quimioembolização, e podem ser utilizadas para testes de liberação controlada de 5-FU localmente, pois estudos anteriores já demonstraram que a citotoxicidade do 5-FU é menor na presença de MMT e quitosana (Kevadiya *et al.*, 2012; Ganguly *et al.*, 2015; Nivethaa *et al.*, 2015). Essa terapia é pouco invasiva e deve reduzir o número de procedimentos para administração do fármaco, além disso, pode reduzir os efeitos colaterais, pois a exposição será localizada no sítio de interesse.

5 CONCLUSÃO

O sistema de baixo custo que foi aperfeiçoado para obtenção das microesferas encapsuladas com 5-FU de quitosana e quitosana/montmorilonita, apresentou resultados reprodutíveis e obtenção de microesferas regulares. Os parâmetros fluxo de injeção e fluxo de ar podem ser ajustados para obtenção de microesferas com diâmetros variados. Durante a obtenção das microesferas ocorreu perda do 5-FU nas etapas de coagulação e lavagem, essa perda interferiu na eficiência de encapsulação do 5-FU. De acordo com os resultados de difratometria de raios X ficou evidenciado que a incorporação da montmorilonita a quitosana levou a formação de bionanocompósitos intercalados. A formação de bionanocompósitos favoreceu o aprisionamento do 5-FU, reduzindo o coeficiente de difusão nos sistemas estudados. O modelo matemático de Crack, obtido a partir das leis de difusão de Fick, para liberação a partir de microesferas, tem boa representatividade em meio PBS pH 7,4 e 10, com típico comportamento Fickiano. No entanto, para meio PBS pH 1,2, o comportamento de liberação é não Fickiano e ocorre por dissolução. As microesferas com bionanocompósitos apresentaram perfil de liberação controlada e têm potencial para ultrapassar a barreira gástrica e liberar o fármaco no ambiente intestinal, também apresentaram dimensões compatíveis com microesferas utilizadas em quimioembolização, que são utilizadas como agentes antitumorais em locais específicos. A metodologia utilizada foi adequada para a síntese de microesferas de bionanocompósitos quitosana/montmorilonita com alta eficiência de encapsulamento e com características controladas de liberação do fármaco, indicando que os bionanocompósitos podem ser sistemas promissores de administração do 5-FU por uma terapia menos invasiva do que a via venosa.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar avaliação das microesferas com células tumorais *in vitro* e tumores induzidos *in vivo*;
- Avaliar o perfil de liberação das microesferas em situações de redução e elevação de temperatura;
- Avaliar a possibilidade do uso transdérmico das microesferas, uma vez que constitui uma alternativa para ultrapassar as limitações de outras vias, como a oral e parenteral.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKBUGA, J.; BERGISADI, N. 5-Fluorouracil-loaded chitosan microspheres: preparation and release characteristics. **Journal of microencapsulation**, v. 13, n. 2, p. 161-168, 1996. ISSN 0265-2048.

AL-HAIJA, Q. A. et al. A Tiny RSA Cryptosystem based on Arduino Microcontroller Useful for Small Scale Networks. **Procedia Computer Science**, v. 34, n. 0, p. 639-646, // 2014. ISSN 1877-0509. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877050914009466> >.

ALLÉMANN, E. et al. In vitro extended-release properties of drug-loaded poly (DL-lactic acid) nanoparticles produced by a salting-out procedure. **Pharmaceutical research**, v. 10, n. 12, p. 1732-1737, 1993. ISSN 0724-8741.

ALLEN JR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9 ed. São Paulo: Premier: Artmed Editora, 2013.

ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. **Computer simulation in chemical physics**. Springer Science & Business Media, 2012. ISBN 9401116792.

ALNAIM, L. Individualization of 5-Fluorouracil in the Treatment of Colorectal Cancer. **SRX Pharmacology**, v. 2010, 2010.

ANDERSON, J. M.; SHIVE, M. S. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 72-82, 2012. ISSN 0169-409X.

ANDREW, R. L. **Molecular modelling: principles and applications**: Prentice Hall 2001.

ANITHA, A. et al. 5-flourouracil loaded N, O-carboxymethyl chitosan nanoparticles as an anticancer nanomedicine for breast cancer. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 8, n. 1, p. 29-42, 2012. ISSN 1550-7033.

ANITHA, A. et al. In vitro combinatorial anticancer effects of 5-fluorouracil and curcumin loaded N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles toward colon cancer and in vivo pharmacokinetic studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 1, p. 238-251, 9// 2014. ISSN 0939-6411. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641114001349> >.

ARAÚJO, E. L. D. **Preparação e caracterização de bases de Schiff e complexos metálicos a partir de quitosana e derivados de salicilaldeído**. 2015. Tese - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo

ARDUINO. 2015. Disponível em: < www.arduino.cc >.

ARIAS, J. L. Novel Strategies to Improve the Anticancer Action of 5-Fluorouracil by Using Drug Delivery Systems. **Molecules**, v. 13, n. 10, p. 2340-2369, 2008. ISSN 1420-3049.

ARICA, B. et al. 5-Fluorouracil encapsulated alginate beads for the treatment of breast cancer. **International journal of pharmaceutics**, v. 242, n. 1, p. 267-269, 2002. ISSN 0378-5173.

AULTON, M. E. Delineamento de Formas Farmacêuticas. 2ª Edição. **Porto Alegre, Artmed**, 2005.

AULTON, M. E.; ORTEGA, G. G. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Artmed, 2008. ISBN 853630152X.

AVELLA, M.; MARTUSCELLI, E.; RAIMO, M. Review properties of blends and composites based on poly (3-hydroxy) butyrate (PHB) and poly (3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate)(PHBV) copolymers. **Journal of Materials Science**, v. 35, n. 3, p. 523-545, 2000. ISSN 0022-2461.

AYDIN, R.; PULAT, M. 5-Fluorouracil encapsulated chitosan nanoparticles for pH-stimulated drug delivery: evaluation of controlled release kinetics. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, p. 42, 2012. ISSN 1687-4110. Disponível em: < <http://downloads.hindawi.com/journals/jnm/2012/313961.pdf> >.

AZEVEDO, M. M. M. Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos. WORKSHOP DO CURSO: TÓPICOS ESPECIAIS EM QUÍMICA INORGÂNICA IV- INTRODUÇÃO À NANOTECNOLOGIA: UM ENFOQUE QUÍMICO, 2002, São Paulo-SP.

AZHAR, F. F.; OLAD, A. A study on sustained release formulations for oral delivery of 5-fluorouracil based on alginate–chitosan/montmorillonite nanocomposite systems. **Applied Clay Science**, v. 101, p. 288-296, 2014. ISSN 0169-1317.

BANSODE, S. et al. Microencapsulation: a review. **International journal of pharmaceutical sciences review and research**, v. 1, n. 2, p. 38-43, 2010.

BANZI, M.; SHILOH, M. **Primeiros Passos com o Arduino–2ª Edição**. Novatec Editora, 2015. ISBN 8575224352.

BAPAT, N.; BOROUJERDI, M. Uptake capacity and adsorption isotherms of doxorubicin on polymeric nanoparticles: effect of methods of preparation. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 18, n. 1, p. 65-77, 1992. ISSN 0363-9045.

BARBOSA, R. et al. Caracterizações de argilas bentoníticas e síntese de argilas organofílicas para uso em nanocompósitos poliméricos: parte II. **Cerâmica**, v. 58, n. 347, p. 363-367, 2012.

BARREIRO, E. J. et al. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química nova**, v. 20, n. 3, p. 300-310, 1997.

BAYOMI, S. M.; AL-BADR, A. A. Analytical profile of 5-fluorouracil. **Analytical profiles of drug substances**, v. 18, p. 599-639, 1990. ISSN 0099-5428.

BELLON, M. L. **Complexos formados por montmorilonita sódica/fármacos aminados: estudo do arranjo molecular de fármacos intercalados em material carreador lamelado aplicando modelagem e dinâmica molecular**. 2014. Tese - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

BERENDSEN, H. J. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of chemical physics**, v. 81, n. 8, p. 3684-3690, 1984. ISSN 0021-9606.

BEZERRA, D. C. **Controlador de temperatura utilizando um pi digital aplicado a um nobreak de 1KVA**. 2010. TCC Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará

BIZERRA, A.; SILVA, V. Sistemas de liberação controlada: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 3, n. 2, p. 1-12, 2016. ISSN 2447-8822.

BLASCHKE, M. et al. Measurement of 5-FU plasma levels in patients with advanced cancer: correct approach to practical procedures is essential. **International journal of clinical pharmacology and therapeutics**, v. 49, n. 1, p. 83, 2011. ISSN 0946-1965.

BRAUNWALD, E. et al. **Medicina Interna de Harrison (Vol. I)**. Porto Alegre: Artmed, 2013.

BRINDLEY, G. W. Structural mineralogy of clays. **Clays and clay minerals**, v. 1, p. 33-43, 1952.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-12**. AMGH Editora, 2012. ISBN 858055117X.

BURKERT, U.; ALLINGER, N. L. **Molecular mechanics**. American Chemical Society Washington, DC, 1982.

CAMPOS, M. G. N. **Desenvolvimento e caracterização de membranas de quitosana para recobrimento de feridas e liberação controlada de fármacos**. 2007.

CASARIN, S. **Desenvolvimento e caracterização de blendas e compostos empregando polímeros biodegradáveis**. 2004. 112 p. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências), UFSCar, São Carlos, 2004. Disponível em: < <http://libdigi.unicamp.br/document>

CASARIN, S. A. Desenvolvimento e caracterização de blendas e de compostos empregando polímeros biodegradáveis. 2010.

CHANDY, T.; DAS, G.; RAO, G. 5-Fluorouracil-loaded chitosan coated polylactic acid microspheres as biodegradable drug carriers for cerebral tumours. **Journal of microencapsulation**, v. 17, n. 5, p. 625-638, 2000. ISSN 0265-2048.

CHENG, M. et al. Synthesis of galactosylated chitosan/5-fluorouracil nanoparticles and its characteristics, in vitro and in vivo release studies. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 100, n. 8, p. 2035-43, Nov 2012. ISSN 1552-4981 (Electronic) 1552-4973 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22865703> >.

CHORNY, M. et al. Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. **Journal of Controlled Release**, v. 83, n. 3, p. 389-400, 2002. ISSN 0168-3659.

CHOUDHARY, S.; DEVI, V. K. Potential of nanotechnology as a delivery platform against tuberculosis: Current research review. **Journal of Controlled Release**, v. 202, p. 65-75, 2015.

COELHO, A. C. V.; DE SSANTOS, P.; DE SSANTOS, H. Argilas especiais: argilas quimicamente modificadas-uma revisão. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1282, 2007. ISSN 0100-4042.

COHEN, N. C. et al. Molecular modeling software and methods for medicinal chemistry. **Journal of medicinal chemistry**, v. 33, n. 3, p. 883-894, 1990. ISSN 0022-2623.

COSTA JR, E. D. S.; MANSUR, H. S. **Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA, quimicamente reticulado para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial**. 2008. Tese (Doutorado). Belo Horizonte: Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123-133, 5// 2001. ISSN 0928-0987. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098701000951> >.

CRANK, J. **The mathematics of diffusion**. Oxford university press, 1979. ISBN 0198534116.

CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 4, p. 780-792, 4// 2013. ISSN 0014-3057. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305712004181> >.

CRUZ, M. C. P. Influencia do poli (etileno glicol)(PEG) no processo de microencapsulação da oxitetraciclina no sistema alginato/quitosana: modelamento" in vitro da liberação oral. 2004.

DARDER, M.; COLILLA, M.; RUIZ-HITZKY, E. Biopolymer-clay nanocomposites based on chitosan intercalated in montmorillonite. **Chemistry of Materials**, v. 15, n. 20, p. 3774-3780, 2003. ISSN 0897-4756.

_____. Chitosan–clay nanocomposites: application as electrochemical sensors. **Applied Clay Science**, v. 28, n. 1, p. 199-208, 2005. ISSN 0169-1317.

DASH, M. et al. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 8, p. 981-1014, 8// 2011. ISSN 0079-6700. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S007967001100027X> >.

DE CARVALHO CANELLA, K. M. N.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel—influência do método de preparação e do solvente. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 13-17, 2001.

DE VILLIERS, M. M.; ARAMWIT, P.; KWON, G. S. **Nanotechnology in drug delivery**. Springer Science & Business Media, 2008. ISBN 0387776680.

DEL NOBILE, M. et al. Active packaging by extrusion processing of recyclable and biodegradable polymers. **Journal of Food Engineering**, v. 93, n. 1, p. 1-6, 2009. ISSN 0260-8774.

DENKBAŞ, E.; SEYYAL, M.; PIŞKIN, E. Implantable 5-fluorouracil loaded chitosan scaffolds prepared by wet spinning. **Journal of membrane Science**, v. 172, n. 1, p. 33-38, 2000. ISSN 0376-7388.

DIAS, F. S. et al. Um sistema simples para preparação de microesferas de quitosana. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 160, 2008. Disponível em: <
http://www.quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol31No1_160_27-NT06369.pdf >.

DIAS, M. L.; SILVA, A. P. Extensão de Cadeia em Poli (Naftalato de Etileno) pelo Fosfito de Trifenila. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 3, p. 102-108, 2001. ISSN 0104-1428.

DICKSON, J. L.; CUNNINGHAM, D. Systemic treatment of gastric cancer. **European journal of gastroenterology & hepatology**, v. 16, n. 3, p. 255-263, 2004. ISSN 0954-691X.

DODOV, M. G. et al. Wheat germ agglutinin-conjugated chitosan–Ca–alginate microparticles for local colon delivery of 5-FU: Development and in vitro characterization. **International journal of pharmaceutics**, v. 381, n. 2, p. 166-175, 2009. ISSN 0378-5173.

DOUGLASS, H.; MITTELMAN, A. Metabolic studies of 5-fluorouracil—II. Influences of the route of administration on the dynamics of distribution in man. **Cancer**, v. 34, n. 6, p. 1878-1881, 1974. ISSN 1097-0142.

ENGINEERS, I. E. E. Standard Glossary of Image Processing and Pattern Recognition Terminology. **IEEE Standards**, v. 610.4-1990 1990.

ENSCORE, D.; HOPFENBERG, H.; STANNETT, V. Effect of particle size on the mechanism controlling n-hexane sorption in glassy polystyrene microspheres. **Polymer**, v. 18, n. 8, p. 793-800, 1977. ISSN 0032-3861.

FANG, Y. E.; CHENG, Q.; LU, X. B. Kinetics of in vitro drug release from chitosan/gelatin hybrid membranes. **Journal of applied polymer science**, v. 68, n. 11, p. 1751-1758, 1998. ISSN 1097-4628.

FANGUEIRO, J. F. et al. Desenvolvimento, produção e caracterização de nanocristais de fármacos pouco solúveis. **Química Nova**, v. 35, p. 1848-1853, 2012. ISSN 0100-4042. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000900025&nrm=iso>.

FOYE, W. O. **Cancer chemotherapeutic agents**. American Chemical Society, 1995. ISBN 0006-2960.

FRANCA, E. D. F. Caracterização molecular de biopolímeros em solução utilizando simulação computacional. 2009.

FRANCO, N. B. **Cálculo numérico**. Pearson, 2006. ISBN 8576050870.

FU, D.-J. et al. Preparation and characterization of mPEG grafted chitosan micelles as 5-fluorouracil carriers for effective anti-tumor activity. **Chinese Chemical Letters**, v. 25, n. 11, p. 1435-1440, 11// 2014. ISSN 1001-8417. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1001841714003040>>.

GAMELIN, E. et al. Individual fluorouracil dose adjustment based on pharmacokinetic follow-up compared with conventional dosage: results of a multicenter randomized trial of patients with metastatic colorectal cancer. **Journal of clinical oncology**, v. 26, n. 13, p. 2099-2105, 2008. ISSN 0732-183X.

GANGULY, K.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R. Colon Targeting of 5-Fluorouracil Using Polyethylene Glycol Cross-linked Chitosan Microspheres Enteric Coated with Cellulose Acetate Phthalate. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 50, n. 21, p. 11797-11807, 2011. ISSN 0888-5885 1520-5045.

GANGULY, K.; KULKARNI, A. R.; AMINABHAVI, T. M. In vitro cytotoxicity and in vivo efficacy of 5-fluorouracil-loaded enteric-coated PEG-crosslinked chitosan microspheres in colorectal cancer therapy in rats. **Drug delivery**, p. 1-14, 2015. ISSN 1071-7544.

GENNARO, A. R. **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 20 ed. 2004.

GOMES, A. D. M. **Desenvolvimento e estudos biológicos de dispositivos de liberação controlada de antitumorais utilizando polímeros biodegradáveis e materiais magnéticos**. 2015. 138 Tese – Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GONSALVES, A. D. A. et al. Different strategies for crosslinking of chitosan. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215-1223, 2011. ISSN 0100-4042.

GUPTA, P.; VERMANI, K.; GARG, S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. **Drug discovery today**, v. 7, n. 10, p. 569-579, 2002. ISSN 1359-6446.

GURSES, A. **Introduction to polymer–clay nanocomposites**. CRC Press, 2015. ISBN 9814613037.

HAHN, R. G. et al. A double-blind comparison of intensive course 5-fluorouracil by oral vs. intravenous route in the treatment of colorectal carcinoma. **Cancer**, v. 35, n. 4, p. 1031-1035, 1975. ISSN 1097-0142.

HASAN, T. et al. Cancer medicine. **Holland–Frei Cancer Medicine**, p. 605-622, 2006.

HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 50, n. 10, p. 874-875, 1961. ISSN 1520-6017.

HINCHLIFFE, A. **Molecular modelling for beginners**. John Wiley & Sons, 2005. ISBN 0470030054.

HIXSON, A.; CROWELL, J. Dependence of reaction velocity upon surface and agitation. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 23, n. 10, p. 1160-1168, 1931. ISSN 0019-7866.

HOCKNEY, R. W. **Potential calculation and some applications**. Langley Research Center, Hampton, Va. 1970

HUANG, L. et al. Preparation of chitosan/chondroitin sulfate complex microcapsules and application in controlled release of 5-fluorouracil. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 1, p. 168-173, 2010. ISSN 0144-8617.

ICH, I. C. O. H. Validation of analytical procedures: text and methodology. **CPMP/ICH/381/95**, v. 1, 1995.

ILLUM, L. et al. Evaluation of carrier capacity and release characteristics for poly (butyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 30, n. 1, p. 17-28, 1986. ISSN 0378-5173.

JEFFERY, G. et al. **Vogels textbook of quantitative chemical analysis**. Pearson Education India, 2006. ISBN 8177581805.

JIANG, L. et al. Study of the poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/cellulose nanowhisker composites prepared by solution casting and melt processing. **Journal of Composite Materials**, v. 42, n. 24, p. 2629-2645, 2008. ISSN 0021-9983.

JOSHI, G. V. et al. Montmorillonite as a drug delivery system: intercalation and in vitro release of timolol maleate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 374, n. 1, p. 53-57, 2009. ISSN 0378-5173.

JOSUÉ, A. et al. Liberação controlada da eosina impregnada em microesferas de copolímero de quitosana e poli (ácido acrílico). **Polímeros: Ciência e tecnologia**, v. 10, n. 3, p. 116-121, 2000. ISSN 1678-5169.

KAH, M.; HOFMANN, T. Nanopesticide research: Current trends and future priorities. **Environment International**, v. 63, n. 0, p. 224-235, 2// 2014. ISSN 0160-4120. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412013002754> >.

KALOSAKAS, G.; MARTINI, D. Drug release from slabs and the effects of surface roughness. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, n. 2, p. 291-298, 2015/12/30/ 2015. ISSN 0378-5173. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517315302866> >.

KATZHENDLER, I. et al. Modeling of Drug Release from Erodible Tablets. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 1, p. 110-115, 1997. ISSN 0022-3549. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/js9600538> >. Acesso em: 2018/01/03.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 3-11, 2010. ISSN 0169-409X.

KEVADIYA et al. Layered inorganic nanocomposites: a promising carrier for 5-fluorouracil (5-FU). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 1, p. 91-101, 2012. ISSN 0939-6411.

KEVADIYA, B. D. et al. Layered inorganic nanocomposites: a promising carrier for 5-fluorouracil (5-FU). **Eur J Pharm Biopharm**, v. 81, n. 1, p. 91-101, May 2012. ISSN 1873-3441 (Electronic) 0939-6411 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22269936> >.

KHALIFA, O. O.; DENSIBALI, A.; FARIS, W. Image processing for chatter identification in machining processes. **The International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, v. 31, n. 5, p. 443-449, 2006. ISSN 0268-3768.

KORSMEYER, R. W. et al. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International journal of Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 25-35, 1983. ISSN 0378-5173.

KREUTER, J. Nanoparticles—a historical perspective. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 331, n. 1, p. 1-10, 2007. ISSN 0378-5173.

KUMAR, M. N. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and functional polymers**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000. ISSN 1381-5148.

LAM, P. L. et al. Development of hydrocortisone succinic acid/and 5-fluorouracil/chitosan microcapsules for oral and topical drug deliveries. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 22, n. 9, p. 3213-8, May 1 2012. ISSN 1464-3405 (Electronic) 0960-894X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22460032> >.

LARANJEIRA, M.; FÁVERE, V. T. D. Chitosan: functional biopolymer with biomedical industrial potential. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009. ISSN 0100-4042.

LECAROZ, C. et al. Biodegradable micro-and nanoparticles as long-term delivery vehicles for gentamicin. **Journal of microencapsulation**, v. 23, n. 7, p. 782-792, 2006. ISSN 0265-2048.

LEE, A. et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency: impact of pharmacogenetics on 5-fluorouracil therapy. **Clinical advances in hematology & oncology: H&O**, v. 2, n. 8, p. 527-532, 2004. ISSN 1543-0790.

LEE, H.-S. et al. Chitosan adsorption on hydroxyapatite and its role in preventing acid erosion. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 385, n. 1, p. 235-243, 2012/11/01/ 2012. ISSN 0021-9797. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979712007205> >.

LEE, J. H.; YEO, Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. **Chemical Engineering Science**, v. 125, n. Supplement C, p. 75-84, 2015/03/24/ 2015. ISSN 0009-2509. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250914004710> >.

LESNIAK, M. S.; BREM, H. Targeted therapy for brain tumours. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 6, p. 499-508, 2004. ISSN 1474-1776.

LI, G. et al. Thermo- and pH-sensitive ionic-crosslinked hollow spheres from chitosan-based graft copolymer for 5-fluorouracil release. **Int J Biol Macromol**, v. 55, p. 69-74, Apr 2013. ISSN 1879-0003 (Electronic) 0141-8130 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23313823> >.

LI, H.-P.; WANG, Z.-D.; YU, T. Microwave irradiation synthesis of novel ramose chitosan-based-5-fluorouracil and research on its in vitro release. **Medicinal Chemistry Research**, v. 20, n. 1, p. 67-73, 2009. ISSN 1054-2523 1554-8120.

LI, P. et al. Development of chitosan nanoparticles as drug delivery systems for 5-fluorouracil and leucovorin blends. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 698-704, 2011. ISSN 01448617.

LIN, C. C.; FU, C. H. Controlled release study of 5-fluorouracil-loaded chitosan/polyethylene glycol microparticles. **Drug Deliv**, v. 16, n. 5, p. 274-9, Jul 2009. ISSN 1521-0464 (Electronic) 1071-7544 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19538009> >.

LINS, R. D.; HÜNENBERGER, P. H. A new GROMOS force field for hexopyranose-based carbohydrates. **Journal of computational chemistry**, v. 26, n. 13, p. 1400-1412, 2005. ISSN 1096-987X.

LIU, D. et al. Determination of the degree of acetylation of chitosan by UV spectrophotometry using dual standards. **Carbohydrate research**, v. 341, n. 6, p. 782-785, 2006. ISSN 0008-6215.

LIVI, C. P. **Fundamentos de Fenômenos de Transporte: Um Texto Para Cursos Básicos**. Grupo Gen-LTC, 2000. ISBN 8521620586.

LIZARDI-MENDOZA, J.; ARGÜELLES MONAL, W. M.; GOYCOOLEA VALENCIA, F. M. Chapter 1 - Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitosan A2 - Bautista-Baños, Silvia. In: ROMANAZZI, G. e JIMÉNEZ-APARICIO, A. (Ed.). **Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities**. San Diego: Academic Press, 2016. p.3-31. ISBN 978-0-12-802735-6.

LLOVET, J. M.; BRUIX, J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: chemoembolization improves survival. **Hepatology**, v. 37, n. 2, p. 429-442, 2003. ISSN 1527-3350.

LO, C. M. et al. Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 35, n. 5, p. 1164-71, May 2002. ISSN 0270-9139 (Print) 0270-9139 (Linking).

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330-338, 2003. ISSN 1474-175X.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 143-154, 2005. ISSN 1516-9332. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322005000200003&nrm=iso >.

LOPES, E. et al. Polymeric colloidal systems containing ethionamide: preparation and physico-chemical characterization. **Die Pharmazie**, v. 55, n. 7, p. 527-530, 2000. ISSN 0031-7144.

LUMMUS, J. L.; AZAR, J. J. Drilling fluids optimization: a practical field approach. 1986.

LUZ, P. P.; PIRES, A. M.; SERRA, O. A. A low-cost ultrasonic spray dryer to produce spherical microparticles from polymeric matrices. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1744-1746, 2007. ISSN 0100-4042.

MAHAN, B.; MYERS, R. Química, Um curso universitário, tradução da 4ª edição americana. 582 p. **Editora Edgard Blücher Ltda**, 1995.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 375-399, 2002. ISSN 1516-9332. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322002000400002&nrm=iso >.

MARK, P.; NILSSON, L. Structure and dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E water models at 298 K. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 105, n. 43, p. 9954-9960, 2001. ISSN 1089-5639.

MARTINI, L. G.; COLLETT, J. H.; ATTWOOD, D. The release of 5-fluorouracil from a swellable matrix of a triblock copolymer of ϵ -caprolactone and ethylene oxide. **Pharmaceutical research**, v. 12, n. 11, p. 1786-1790, 1995. ISSN 0724-8741.

MARTINS, C. G.; WAGNER, S. C.; LINDEN, R. Individualização farmacocinética das doses de 5-Fluoruracil no câncer colorretal. **Rev. bras. cancerol**, v. 59, n. 2, p. 271-280, 2013. ISSN 0034-7116.

MASARO, L.; ZHU, X. Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids. **Progress in polymer science**, v. 24, n. 5, p. 731-775, 1999. ISSN 0079-6700.

MAYER, R. J. Oral versus intravenous fluoropyrimidines for advanced colorectal cancer: by either route, it's all the same. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n. 21, p. 4093-4096, 2001. ISSN 0732-183X.

MCROBERTS, M. Arduino básico. **Editora Novatec**, v. 344755160, 2011.

MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MISHRA, B.; PATEL, B. B.; TIWARI, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, biology and medicine**, v. 6, n. 1, p. 9-24, 2010. ISSN 1549-9634.

MOSCHWITZER, J. P. Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process. **Int J Pharm**, v. 453, n. 1, p. 142-56, Aug 30 2013. ISSN 1873-3476 (Electronic) 0378-5173 (Linking).

NAGARWAL, R. C.; KUMAR, R.; PANDIT, J. K. Chitosan coated sodium alginate-chitosan nanoparticles loaded with 5-FU for ocular delivery: in vitro characterization and in vivo study in rabbit eye. **Eur J Pharm Sci**, v. 47, n. 4, p. 678-85, Nov 20 2012. ISSN 1879-0720 (Electronic) 0928-0987 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22922098> >.

NAIR, L. et al. Biological evaluation of 5-fluorouracil nanoparticles for cancer chemotherapy and its dependence on the carrier, PLGA. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 1685, 2011.

NARAYANI, R.; RAO, K. P. Gelatin microsphere cocktails of different sizes for the controlled release of anticancer drugs. **International journal of pharmaceuticals**, v. 143, n. 2, p. 255-258, 1996. ISSN 0378-5173.

NGUYEN, H. M. et al. Photoprotection for deltamethrin using chitosan-coated beeswax solid lipid nanoparticles. **Pest management science**, v. 68, n. 7, p. 1062-1068, 2012. ISSN 1526-4998.

NIVETHAA, E. et al. An in vitro cytotoxicity study of 5-fluorouracil encapsulated chitosan/gold nanocomposites towards MCF-7 cells. **RSC Advances**, v. 5, n. 2, p. 1024-1032, 2015.

NOMURA, L. M. et al. Processo cicatricial de sutura em ceco com os fios polipropilene, poliglicaprone 25 e glicomer 60 em ratos. **ABCD Arq Bras Cir Dig**, v. 22, n. 2, p. 82-8, 2009.

OGATA, K.; MAYA, P. Á.; LEONARDI, F. **Engenharia de controle moderno**. Prentice Hall, 2003. ISBN 8587918230.

OLIVEIRA, J. D.; SILVA, A. D. M.; ALBUQUERQUE, R. D. A. Produção e caracterização de microesferas de quitosana. **Anais da 32ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química**, 2009.

OPANASOPIT, P. et al. Incorporation of camptothecin into N-phthaloyl chitosan-g-mPEG self-assembly micellar system. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals**, v. 64, n. 3, p. 269-276, 2006. ISSN 0939-6411.

OUCHI, T. et al. Antitumor activity of chitosan and chitin immobilized 5-fluorouracils through hexamethylene spacers via carbamoyl bonds. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 4, n. 4, p. 362-371, 1989. ISSN 0883-9115.

PAEK, S. et al. Poloxamer 188 and propylene glycol-based rectal suppository enhances anticancer effect of 5-fluorouracil in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 5, p. 1060, 2006. ISSN 0918-6158.

PAPADIMITRIOU, S. et al. Chitosan nanoparticles loaded with dorzolamide and pramipexole. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 1, p. 44-54, 7/4/ 2008. ISSN 0144-

8617. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861707005528>>.

PASETTO, L. M. et al. Old and new drugs in systemic therapy of pancreatic cancer. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 49, n. 2, p. 135-151, 2004. ISSN 1040-8428.

PEPPAS, N. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 60, n. 4, p. 110, 1985. ISSN 0031-6865.

PETERS, G. et al. Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1587, n. 2, p. 194-205, 2002. ISSN 0925-4439.

PETERS, G. et al. Prolonged retention of high concentrations of 5-fluorouracil in human and murine tumors as compared with plasma. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 31, n. 4, p. 269-276, 1993. ISSN 0344-5704.

POHLMANN, A. R. et al. Alkaline hydrolysis as a tool to determine the association form of indomethacin in nanocapsules prepared with poly (ϵ -caprolactone). **Current drug delivery**, v. 1, n. 2, p. 103-110, 2004. ISSN 1567-2018.

PORTE, L. H. M.; LEÃO, M.; PORTE, A. Avaliação da porosidade de microcápsulas contendo proteína bioativa por porosimetria de mercúrio e adsorção de nitrogênio. **Química Nova**, v. 34, p. 1582-1587, 2011.

PRADO, A. G. S. et al. Sistema de baixo custo para a produção de microesferas de quitosana. **Anais da 32ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química**, 2009.

PRADO, A. G. S. et al. Sistema de baixo custo para produção de microesferas de quitosana. **Analytica**, v. 44, p. 5, 2010. Disponível em: <
<http://sec.s bq.org.br/cdrom/32ra/resumos/T2146-1.pdf>>.

PUGA, A. M. et al. Pectin-coated chitosan microgels crosslinked on superhydrophobic surfaces for 5-fluorouracil encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 331-340, 10/15/ 2013. ISSN 0144-8617. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861713005912>>.

RAY, S. S. **Clay-containing polymer nanocomposites: from fundamentals to real applications**. Newnes, 2013. ISBN 0444594604.

REJINOLD et al. Biodegradable and thermo-sensitive chitosan-g-poly (N-vinylcaprolactam) nanoparticles as a 5-fluorouracil carrier. **Carbohydrate polymers**, v. 83, n. 2, p. 776-786, 2011. ISSN 0144-8617.

REJINOLD, N. S. et al. Biodegradable and thermo-sensitive chitosan-g-poly(N-vinylcaprolactam) nanoparticles as a 5-fluorouracil carrier. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 776-786, 2011. ISSN 01448617.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, 2004. ISSN 0100-4042.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of controlled release**, v. 5, n. 1, p. 37-42, 1987. ISSN 0168-3659.

ROKHADE, A. P. et al. Novel hydrogel microspheres of chitosan and pluronic F-127 for controlled release of 5-fluorouracil. **Journal of microencapsulation**, v. 24, n. 3, p. 274-288, 2007. ISSN 0265-2048.

RORRER, G. L.; HSIEN, T. Y.; WAY, J. D. Synthesis of porous-magnetic chitosan beads for removal of cadmium ions from wastewater. **Industrial & engineering chemistry research**, v. 32, n. 9, p. 2170-2178, 1993. ISSN 0888-5885.

SANT, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 49-57, 2009. ISSN 1984-6835.

SANTOS, E. et al. Optimization of 100µm alginate-poly-L-lysine-alginate capsules for intravitreal administration. **Journal of controlled release**, v. 158, n. 3, p. 443-450, 2012. ISSN 0168-3659.

SANTOS, P. **Ciência e Tecnologia de Argilas, Vol. 1, 2ª edição, Edgard Blücher Ltda, S:** Paulo 1989.

SCHATZ, C. et al. Static light scattering studies on chitosan solutions: from macromolecular chains to colloidal dispersions. **Langmuir**, v. 19, n. 23, p. 9896-9903, 2003. ISSN 0743-7463.

SEYYAL, E. D.-M.; PISĖKIN, E. 5-Fluorouracil loaded chitosan microspheres for chemoembolization. **J. MICROENCAPSULATION**, v. 16, n. 6, p. 741-749, 1999.

SHAH, A. et al. Photochemistry and electrochemistry of anticancer uracils. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 117, p. 269-277, 2012. ISSN 1011-1344.

SHEGOKAR, R.; MULLER, R. H. Nanocrystals: industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. **Int J Pharm**, v. 399, n. 1-2, p. 129-39, Oct 31 2010. ISSN 1873-3476 (Electronic) 0378-5173 (Linking).

SHEN, S. I.; JASTI, B. R.; LI, X. Design of controlled release drug delivery systems. **Standard Handbook of biomedical Engineering & Design. McGraw-Hill, New York**, p. 161-179, 2003.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced drug delivery reviews**, v. 48, n. 2, p. 139-157, 2001. ISSN 0169-409X.

SILVA, H.; DOS SANTOS, K.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776, 2006. ISSN 0100-4042.

SILVA, K. C. C. Simulação computacional da interação de nanopartículas de quitosana com íons metálicos. 2013.

SILVA, K. C. C. et al. Estudo do efeito do pH e da força iônica em filamentos de quitosana via simulação por dinâmica molecular. **Sociedade Brasileira de Química**, 2011.

SILVA, S. M. et al. Application of infrared spectroscopy to analysis of chitosan/clay nanocomposites. **Infrared spectroscopy-materials science, engineering and technology. Croatia: InTech**, p. 43-62, 2012.

SILVEIRA, J. A. D. **Experimentos com o Arduino**. João Alexandre da Silveira, 2011. ISBN 8599823205.

SINHA, V. R. et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 274, n. 1-2, p. 1-33, 4/15/ 2004. ISSN 0378-5173. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517304000225> >.

SKOOG, D. et al. Fundamentos de Química Analítica, Editora Thomson, tradução da 8ª edição. **Skoog, DA**, p. 0-50, 2006.

SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of controlled release**, v. 70, n. 1, p. 1-20, 2001. ISSN 0168-3659.

SUAVE, J. et al. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente/Health and Environment Journal**, v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006.

SUN, L. et al. Preparation of 5-fluorouracil-loaded chitosan nanoparticles and study the sustained release in vitro and in vivo. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2017. ISSN 1818-0876.

TAHARA, K.; YAMAMOTO, K.; NISHIHATA, T. Application of model-independent and model analysis for the investigation of effect of drug solubility on its release rate from hydroxypropyl methylcellulose sustained release tablets. **International journal of pharmaceutics**, v. 133, n. 1, p. 17-27, 1996. ISSN 0378-5173.

TALUKDAR, M. M. et al. Comparative study on xanthan gum and hydroxypropylmethyl cellulose as matrices for controlled-release drug delivery I. Compaction and in vitro drug release behaviour. **International journal of pharmaceutics**, v. 129, n. 1, p. 233-241, 1996. ISSN 0378-5173.

TAN, W. et al. A novel method to prepare chitosan/montmorillonite nanocomposites in the presence of hydroxy-aluminum oligomeric cations. **Composites Science and Technology**, v. 68, n. 14, p. 2917-2921, 2008/11/01/ 2008. ISSN 0266-3538.

Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0266353807004058> >.

TAVARIA, F. K. et al. Chitosan as a dental biomaterial: state of the art. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 29, n. 1, p. 110-120, 2013. ISSN 1517-3151.

TERENCE, M. C. **Obtenção de um sistema de liberação controlada de drogas a partir do PVAL irradiado com radiação gama**. 2002. Tese – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.

THOMAS, M. Effect of route of administration of 5-fluorouracil on its concentration in blood and lymph. **British journal of cancer**, v. 37, n. 1, p. 105, 1978.

TİĞLİ AYDIN, R. S.; PULAT, M. 5-Fluorouracil Encapsulated Chitosan Nanoparticles for pH-Stimulated Drug Delivery: Evaluation of Controlled Release Kinetics. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, p. 1-10, 2012. ISSN 1687-4110 1687-4129.

UTRACKI, L. A. **Clay-containing polymeric nanocomposites**. iSmithers Rapra Publishing, 2004. ISBN 1859574378.

VAN DER SPOEL, D. et al. GROMACS: fast, flexible, and free. **Journal of computational chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1701-1718, 2005. ISSN 1096-987X.

VARELAS, C. G.; DIXON, D. G.; STEINER, C. A. Zero-order release from biphasic polymer hydrogels. **Journal of controlled release**, v. 34, n. 3, p. 185-192, 1995. ISSN 0168-3659.

VERLET, L. Computer" experiments" on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. **Physical review**, v. 159, n. 1, p. 98, 1967.

WASHINGTON, C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 58, n. 1, p. 1-12, 1/15/ 1990. ISSN 0378-5173. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037851739090280H> >.

XU, Y. et al. Oxidation and pH responsive nanoparticles based on ferrocene-modified chitosan oligosaccharide for 5-fluorouracil delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, n. 0, p. 27-35, 12/19/ 2014. ISSN 0144-8617. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861714007541> >.

YAN, C. et al. Nanoparticles of 5-fluorouracil (5-FU) loaded N-succinyl-chitosan (Suc-Chi) for cancer chemotherapy: preparation, characterization--in-vitro drug release and anti-tumour activity. **J Pharm Pharmacol**, v. 58, n. 9, p. 1177-81, Sep 2006. ISSN 0022-3573 (Print) 0022-3573 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16945175> >.

YAN, S. et al. Layer-by-layer assembly of poly(L-glutamic acid)/chitosan microcapsules for high loading and sustained release of 5-fluorouracil. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 78, n. 3, p. 336-45, Aug 2011. ISSN 1873-3441 (Electronic) 0939-6411 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21195174> >.

YANG, H. C.; HON, M. H. The effect of the molecular weight of chitosan nanoparticles and its application on drug delivery. **Microchemical Journal**, v. 92, n. 1, p. 87-91, 2009. ISSN 0026-265X.

YANG, J.-H. et al. Drug-clay nanohybrids as sustained delivery systems. **Applied Clay Science**, v. 130, n. Supplement C, p. 20-32, 2016/09/01/ 2016. ISSN 0169-1317. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169131716300229> >.

YU, C.-Y. et al. Sustained release of antineoplastic drugs from chitosan-reinforced alginate microparticle drug delivery systems. **International journal of pharmaceuticals**, v. 357, n. 1, p. 15-21, 2008. ISSN 0378-5173.

YUAN, Q. et al. Controlled and extended drug release behavior of chitosan-based nanoparticle carrier. **Acta biomaterialia**, v. 6, n. 3, p. 1140-1148, 2010. ISSN 1742-7061.

ZHANG, D.-Y. Preparation of chitosan-polyaspartic acid-5-fluorouracil nanoparticles and its anti-carcinoma effect on tumor growth in nude mice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 22, p. 3554, 2008. ISSN 1007-9327.

ZHAO, X.-L. et al. Study on colon-specific 5-Fu pH-enzyme Di-dependent chitosan microspheres. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 7, p. 963-968, 2008. ISSN 0009-2363.

ZHENG, Y. et al. Nanoparticles based on the complex of chitosan and polyaspartic acid sodium salt: preparation, characterization and the use for 5-fluorouracil delivery. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 67, n. 3, p. 621-31, Nov 2007. ISSN 0939-6411 (Print) 0939-6411 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17533123> >.

ZHU, K. et al. Preparation and in vitro release behaviour of 5-fluorouracil-loaded microspheres based on poly (L-lactide) and its carbonate copolymers. **Journal of microencapsulation**, v. 20, n. 6, p. 731-743, 2003. ISSN 0265-2048.

ZHU, L. et al. Chitosan-coated magnetic nanoparticles as carriers of 5-fluorouracil: preparation, characterization and cytotoxicity studies. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 68, n. 1, p. 1-6, Jan 1 2009. ISSN 1873-4367 (Electronic) 0927-7765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19013060> >.

8 APÊNDICE 1

Cálculo de eficiência de encapsulação (EE) das microesferas V₁-2.5-F

Massa das microesferas lavadas com 2200 mL de água destilada = 625,0 mg

Massa do fármaco presente antes da lavagem (W_t):

$$W_t = \frac{625 \text{ mg}}{9} = 69,44 \text{ mg}$$

Concentração de 5-FU presente na água de lavagem = 19,79 µg/mL

Fármaco perdido na lavagem (W_f):

$$W_f = V_{lavagem} * C = 2200 \text{ ml} * 19,79 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} = 43538 \mu\text{g} = 43,538 \text{ mg}$$

Logo:

$$EE = \frac{W_t - W_f}{W_t} = \frac{69,44 \text{ mg} - 43,54 \text{ mg}}{69,44 \text{ mg}} \cong 0,373$$

Cálculo de eficiência de encapsulação (EE) das microesferas V₁-10-F

Massa das microesferas lavadas com 2200 ml de água destilada = 593,0 mg

Massa do fármaco presente antes da lavagem (W_t):

$$W_t = \frac{593 \text{ mg}}{9} = 65,88 \text{ mg}$$

Concentração de 5-FU presente na água de lavagem = 21,15 µg/ml

Fármaco perdido na lavagem (W_f):

$$W_f = V_{lavagem} * C = 2200 \text{ ml} * 21,15 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} = 46530 \mu\text{g} = 46,53 \text{ mg}$$

Logo:

$$EE = \frac{W_t - W_f}{W_t} = \frac{65,88 \text{ mg} - 46,53 \text{ mg}}{65,88 \text{ mg}} \cong 0,293$$

Cálculo de eficiência de encapsulação (EE) das microesferas V₁-2.5-FA

Massa das microesferas lavadas com 2200 ml de água destilada = 684,0 mg

Massa do fármaco presente antes da lavagem (W_t):

$$W_t = \frac{684 \text{ mg}}{11} = 62,18 \text{ mg}$$

Concentração de 5-FU presente na água de lavagem = 7,07 µg/ml

Fármaco perdido na lavagem (W_f):

$$W_f = V_{lavagem} * C = 2200 \text{ ml} * 7,07 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} = 15554 \mu\text{g} = 15,55 \text{ mg}$$

Logo:

$$EE = \frac{W_t - W_f}{W_t} = \frac{62,18 \text{ mg} - 15,55 \text{ mg}}{62,18 \text{ mg}} \cong 0,7499$$

Cálculo de eficiência de encapsulação (EE) das microesferas V₁-10-FA

Massa das microesferas lavadas com 2200 mL de água destilada = 620,0 mg

Massa do fármaco presente antes da lavagem (W_t):

$$W_t = \frac{620 \text{ mg}}{11} = 56,36 \text{ mg}$$

Concentração de 5-FU presente na água de lavagem = 8,98 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

Fármaco perdido na lavagem (W_f):

$$W_f = V_{lavagem} * C = 2200 \text{ ml} * 8,98 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} = \mu\text{g} = 19,75 \text{ mg}$$

Logo:

$$EE = \frac{W_t - W_f}{W_t} = \frac{56,36 \text{ mg} - 19,75 \text{ mg}}{56,36 \text{ mg}} \cong 0,6496$$

9 APÊNDICE 2

Memorial cálculo da Massa de 5-FU liberada e Fração Liberada pelas microesferas V₁-2.5-F em PBS pH 1.2, nos tempo 0,25 (t=1) e 0,5 h (t=2).

$$A_{(1)} = \left(\sum_{i=1}^{t-1} A_i \right) + 5 \cdot C_1 = 2mL \cdot 17,4139\mu g \cdot mL^{-1} = 34,82\mu g$$

$$\text{Massa liberada}_{(1)} = A_{(t-1)} + 50 \cdot C_{(1)} = 0 + 50mL \cdot 17,4139\mu g \cdot mL^{-1} = 870,695\mu g$$

$$\text{Massa do fármaco} = \frac{5 \cdot 10^5 (\mu g) * EE}{\text{Relação mássica}_{(5-FU)}} = \frac{5 \cdot 10^5 (\mu g) * 0,3729}{9} = 20716,7\mu g$$

$$\text{Fração liberada}_{(1)} = \frac{\text{Massa liberada}_{(1)}}{\text{Massa do fármaco}} \cdot 100 = \frac{870,695\mu g}{20716,7\mu g} \cdot 100 = 4,20\%$$

$$A_{(2)} = \left(\sum_{i=1}^{t-1} A_i \right) + 5 \cdot C_2 = 34,82\mu g + 2mL \cdot 18,35\mu g \cdot mL^{-1} = 71,52\mu g$$

$$\begin{aligned} \text{Massa liberada}_{(2)} &= A_{(t-1)} + 50 \cdot C_{(2)} = 34,82\mu g + 50mL \cdot 18,35\mu g \cdot mL^{-1} \\ &= 952,5\mu g \end{aligned}$$

$$\text{Fração liberada}_{(2)} = \frac{\text{Massa liberada}_{(2)}}{\text{Massa do fármaco}} \cdot 100 = \frac{952,25\mu g}{20716,7\mu g} \cdot 100 = 4,59\%$$

Todas as Massas Liberadas e Frações Liberadas do 5-FU foram obtidas dessa forma e estão representadas nas tabelas seguintes.

Tabela 17 - Massa de 5-FU liberada pelas microesferas V₁-2.5-F em PBS pH 1.2.

| Tempo (h) | Absorbância 1 | Absorbância 2 | Absorbância média | Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | Massa liberada (μg) | Fração liberada (%) |
|--------------|------------------|------------------|----------------------|---|--|---------------------------|
| 0,25 | 0,4632 | 0,4831 | 0,4732 | 17,4139 | 870,6944 | 4,2011 |
| 0,50 | 0,4780 | 0,4886 | 0,4833 | 18,3537 | 952,5130 | 4,5959 |
| 0,75 | 0,5105 | 0,5116 | 0,5111 | 20,9222 | 1117,6463 | 5,3927 |
| 1,00 | 0,5123 | 0,5300 | 0,5211 | 21,8532 | 1206,0417 | 5,8192 |
| 1,50 | 0,5235 | 0,5235 | 0,5235 | 22,0750 | 1260,8361 | 6,0836 |
| 2,00 | 0,5240 | 0,5282 | 0,5261 | 22,3162 | 1317,0463 | 6,3548 |
| 2,50 | 0,5079 | 0,5276 | 0,5177 | 21,5412 | 1322,9287 | 6,3832 |
| 3,00 | 0,5149 | 0,5306 | 0,5227 | 22,0019 | 1389,0435 | 6,7022 |
| 3,50 | 0,5151 | 0,5172 | 0,5161 | 21,3917 | 1402,5380 | 6,7673 |
| 4,00 | 0,5025 | 0,5126 | 0,5075 | 20,5968 | 1405,5759 | 6,7820 |
| 4,50 | 0,5010 | 0,5225 | 0,5117 | 20,9833 | 1466,0981 | 7,0740 |
| 5,00 | 0,5041 | 0,5061 | 0,5051 | 20,3708 | 1477,4398 | 7,1287 |
| 5,50 | 0,4995 | 0,5126 | 0,5061 | 20,4602 | 1522,6491 | 7,3469 |
| 6,00 | 0,4949 | 0,5203 | 0,5076 | 20,6051 | 1570,8148 | 7,5793 |
| 6,50 | 0,5236 | 0,5505 | 0,5370 | 23,3278 | 1748,1593 | 8,4350 |
| 24,00 | 0,5246 | 0,5341 | 0,5294 | 22,6181 | 1759,3287 | 8,4889 |
| 48,00 | 0,5576 | 0,5815 | 0,5695 | 26,3370 | 1990,5139 | 9,6043 |

Tabela 18 - Massa de 5-FU liberada pelas microesferas V₁-10-F em PBS - pH 1,2.

| Tempo (h) | Absorbância 1 | Absorbância 2 | Absorbância média | Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | Massa liberada (μg) | Fração liberada (%) |
|--------------|------------------|------------------|----------------------|---|--|---------------------------|
| 0,25 | 0,5642 | 0,5782 | 0,5712 | 26,4903 | 1324,5139 | 8,1145 |
| 0,50 | 0,5628 | 0,5687 | 0,5657 | 25,9856 | 1352,2630 | 8,2845 |
| 0,75 | 0,5924 | 0,6104 | 0,6014 | 29,2875 | 1569,3269 | 9,6143 |
| 1,00 | 0,5775 | 0,5988 | 0,5881 | 28,0588 | 1566,4667 | 9,5968 |
| 1,50 | 0,5727 | 0,5871 | 0,5799 | 27,2958 | 1584,4361 | 9,7069 |
| 2,00 | 0,5515 | 0,5635 | 0,5575 | 25,2241 | 1535,4398 | 9,4067 |
| 2,50 | 0,5463 | 0,5690 | 0,5577 | 25,2366 | 1586,5130 | 9,7196 |
| 3,00 | 0,5509 | 0,5621 | 0,5565 | 25,1319 | 1631,7546 | 9,9968 |
| 3,50 | 0,5380 | 0,5586 | 0,5483 | 24,3690 | 1643,8704 | 10,0710 |
| 4,00 | 0,5372 | 0,5629 | 0,5500 | 24,5319 | 1700,7565 | 10,4195 |
| 4,50 | 0,5356 | 0,5407 | 0,5382 | 23,4310 | 1694,7741 | 10,3828 |
| 5,00 | 0,5360 | 0,5485 | 0,5422 | 23,8097 | 1760,5713 | 10,7859 |
| 5,50 | 0,5428 | 0,5628 | 0,5528 | 24,7870 | 1928,4856 | 11,8146 |
| 6,00 | 0,5383 | 0,5800 | 0,5592 | 25,3773 | 2007,5736 | 12,2992 |
| 6,50 | 0,5529 | 0,5671 | 0,5600 | 25,4532 | 2062,1245 | 12,6334 |
| 24,00 | 0,5502 | 0,5604 | 0,5553 | 25,0199 | 2091,3644 | 12,8125 |
| 48,00 | 0,5385 | 0,5510 | 0,5448 | 24,0421 | 2092,5153 | 12,8196 |

Tabela 19 - Massa de 5-FU liberada pelas microesferas V₁-2.5-F em PBS pH 7,4.

| Tempo | Absorbância 1 | Absorbância 2 | Absorbância média | Concentração | Massa liberada | Fração liberada |
|-------|------------------|------------------|----------------------|---------------------------|-------------------|--------------------|
| (h) | | | | ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | (μg) | (%) |
| 0,25 | 0,2344 | 0,2347 | 0,2346 | 5,1914 | 259,5709 | 1,2524 |
| 0,50 | 0,2376 | 0,2396 | 0,2386 | 5,2716 | 263,5778 | 1,2718 |
| 0,75 | 0,2460 | 0,2483 | 0,2471 | 5,4418 | 272,0908 | 1,3129 |
| 1,00 | 0,2452 | 0,2470 | 0,2461 | 5,4208 | 271,0379 | 1,3078 |
| 2,00 | 0,2488 | 0,2501 | 0,2494 | 5,4875 | 274,3762 | 1,3239 |
| 3,00 | 0,2499 | 0,2508 | 0,2504 | 5,5067 | 275,3343 | 1,3285 |
| 4,00 | 0,2535 | 0,2540 | 0,2538 | 5,5739 | 278,6926 | 1,3447 |
| 5,00 | 0,2543 | 0,2548 | 0,2546 | 5,5902 | 279,5110 | 1,3487 |
| 6,00 | 0,2623 | 0,2626 | 0,2625 | 5,7482 | 287,4102 | 1,3868 |
| 7,00 | 0,2619 | 0,2623 | 0,2621 | 5,7403 | 287,0160 | 1,3849 |
| 8,00 | 0,2671 | 0,2676 | 0,2673 | 5,8452 | 292,2605 | 1,4102 |
| 24,00 | 0,2717 | 0,2727 | 0,2722 | 5,9414 | 297,0709 | 1,4334 |
| 48,00 | 0,2712 | 0,2717 | 0,2715 | 5,9277 | 296,3872 | 1,4301 |

Tabela 20 - Massa de 5-FU liberada pelas microesferas V₁-10-F em PBS pH 7,4.

| Tempo | Absorbância 1 | Absorbância 2 | Absorbância média | Concentração | Massa liberada | Fração liberada |
|-------|------------------|------------------|----------------------|---------------------------|-------------------|--------------------|
| (h) | | | | ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | (μg) | (%) |
| 0,25 | 0,5470 | 0,5483 | 0,5477 | 11,4401 | 572,0060 | 3,5043 |
| 0,50 | 0,5478 | 0,5496 | 0,5487 | 11,4608 | 573,0389 | 3,5107 |
| 0,75 | 0,5529 | 0,5533 | 0,5531 | 11,5493 | 577,4651 | 3,5378 |
| 1,00 | 0,5532 | 0,5544 | 0,5538 | 11,5628 | 578,1387 | 3,5419 |
| 2,00 | 0,5702 | 0,5722 | 0,5712 | 11,9096 | 595,4790 | 3,6481 |
| 3,00 | 0,5715 | 0,5722 | 0,5718 | 11,9231 | 596,1527 | 3,6523 |
| 4,00 | 0,5862 | 0,5875 | 0,5869 | 12,2227 | 611,1327 | 3,7440 |
| 5,00 | 0,5942 | 0,5960 | 0,5951 | 12,3870 | 619,3513 | 3,7944 |
| 6,00 | 0,5986 | 0,6020 | 0,6003 | 12,4908 | 624,5409 | 3,8262 |
| 7,00 | 0,6234 | 0,6288 | 0,6261 | 13,0055 | 650,2745 | 3,9838 |
| 8,00 | 0,6416 | 0,6461 | 0,6439 | 13,3603 | 668,0140 | 4,0925 |
| 24,00 | 0,6546 | 0,6559 | 0,6553 | 13,5882 | 679,4112 | 4,1623 |
| 48,00 | 0,6545 | 0,6566 | 0,6555 | 13,5937 | 679,6856 | 4,1640 |

Tabela 21 - Massa de 5-FU liberada pelas microesferas V₁-2.5-F em PBS pH 10.

| Tempo | Absorbância 1 | Absorbância 2 | Absorbância média | Concentração | Massa liberada | Fração liberada |
|-------|------------------|------------------|----------------------|---------------------------|-------------------|--------------------|
| (h) | | | | ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | (μg) | (%) |
| 0,25 | 0,1388 | 0,1396 | 0,1392 | 1,8176 | 90,8781 | 0,4385 |
| 0,50 | 0,1556 | 0,1570 | 0,1563 | 2,2274 | 111,3680 | 0,5374 |
| 0,75 | 0,1585 | 0,1591 | 0,1588 | 2,2860 | 114,3011 | 0,5515 |
| 1,00 | 0,1598 | 0,1607 | 0,1602 | 2,3208 | 116,0394 | 0,5599 |
| 2,00 | 0,1707 | 0,1738 | 0,1723 | 2,6082 | 130,4122 | 0,6292 |
| 3,00 | 0,1794 | 0,1800 | 0,1797 | 2,7864 | 139,3190 | 0,6722 |
| 4,00 | 0,1789 | 0,1796 | 0,1792 | 2,7753 | 138,7634 | 0,6695 |
| 5,00 | 0,1816 | 0,1811 | 0,1814 | 2,8257 | 141,2843 | 0,6817 |
| 6,00 | 0,1785 | 0,1774 | 0,1780 | 2,7444 | 137,2222 | 0,6621 |
| 7,00 | 0,1772 | 0,1779 | 0,1776 | 2,7355 | 136,7742 | 0,6599 |
| 8,00 | 0,1768 | 0,1782 | 0,1775 | 2,7339 | 136,6965 | 0,6596 |
| 24,00 | 0,2537 | 0,2513 | 0,2525 | 4,5253 | 226,2664 | 1,0917 |
| 48,00 | 0,2534 | 0,2550 | 0,2542 | 4,5668 | 228,3393 | 1,1017 |

Tabela 22 - Massa de 5-FU liberada pelas microesferas V₁-10-F em PBS pH 10.

| Tempo | Absorbância 1 | Absorbância 2 | Absorbância média | Concentração | Massa liberada | Fração liberada |
|-------|------------------|------------------|----------------------|---------------------------|-------------------|--------------------|
| (h) | | | | ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | (μg) | (%) |
| 0,25 | 0,3964 | 0,3971 | 0,3968 | 7,9732 | 398,6619 | 2,4424 |
| 0,50 | 0,3965 | 0,4021 | 0,3993 | 8,0342 | 401,7085 | 2,4610 |
| 0,75 | 0,4000 | 0,4021 | 0,4011 | 8,0756 | 403,7814 | 2,4737 |
| 1,00 | 0,4017 | 0,4032 | 0,4024 | 8,1080 | 405,4002 | 2,4836 |
| 2,00 | 0,4008 | 0,4017 | 0,4012 | 8,0798 | 403,9904 | 2,4750 |
| 3,00 | 0,4101 | 0,4118 | 0,4110 | 8,3121 | 415,6033 | 2,5461 |
| 4,00 | 0,4075 | 0,4090 | 0,4082 | 8,2472 | 412,3596 | 2,5263 |
| 5,00 | 0,4133 | 0,4184 | 0,4158 | 8,4283 | 421,4158 | 2,5818 |
| 6,00 | 0,4164 | 0,4162 | 0,4163 | 8,4400 | 422,0012 | 2,5853 |
| 7,00 | 0,4221 | 0,4227 | 0,4224 | 8,5857 | 429,2832 | 2,6300 |
| 8,00 | 0,4221 | 0,4234 | 0,4228 | 8,5941 | 429,7073 | 2,6326 |
| 24,00 | 0,5506 | 0,5511 | 0,5508 | 11,6545 | 582,7240 | 3,5700 |
| 48,00 | 0,5540 | 0,5588 | 0,5564 | 11,7875 | 589,3728 | 3,6107 |

Tabela 23 - Massa de 5-FU liberada pelas microesferas V₁-2.5-FA em PBS pH 1.2.

| Tempo (h) | Absorbância 1 | Absorbância 2 | Absorbância média | Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | Massa liberada (μg) | Fração liberada (%) |
|--------------|------------------|------------------|----------------------|---|--|---------------------------|
| 0,25 | 0,4601 | 0,4704 | 0,4653 | 15,01 | 750,61 | 2,20 |
| 0,50 | 0,6511 | 0,6673 | 0,6592 | 28,48 | 1498,94 | 4,39 |
| 0,75 | 1,2447 | 1,2757 | 1,2602 | 70,21 | 3728,11 | 10,93 |
| 1,00 | 1,2404 | 1,2657 | 1,2531 | 69,72 | 4054,47 | 11,89 |
| 1,50 | 1,2238 | 1,2588 | 1,2413 | 68,9 | 4362,3 | 12,79 |
| 2,00 | 1,1665 | 1,1992 | 1,1828 | 64,84 | 4503,81 | 13,21 |
| 2,50 | 1,1924 | 1,2226 | 1,2075 | 66,56 | 4913,75 | 14,41 |
| 3,00 | 1,303 | 1,3344 | 1,3187 | 74,28 | 5632,52 | 16,52 |
| 3,50 | 1,2808 | 1,3093 | 1,295 | 72,63 | 5921,68 | 17,37 |
| 4,00 | 1,2507 | 1,2818 | 1,2663 | 70,64 | 6184,97 | 18,14 |
| 4,50 | 1,3881 | 1,4187 | 1,4034 | 80,16 | 7014,23 | 20,57 |
| 5,00 | 1,4537 | 1,4541 | 1,4539 | 83,67 | 7590,47 | 22,26 |
| 5,50 | 1,2756 | 1,3841 | 1,3298 | 75,05 | 7578,09 | 22,23 |
| 6,00 | 1,326 | 1,3842 | 1,3551 | 76,81 | 8041,06 | 23,59 |
| 24,00 | 1,1897 | 1,2252 | 1,2074 | 66,55 | 8253,94 | 24,21 |
| 48,00 | 1,0552 | 1,1204 | 1,0878 | 58,24 | 8171,26 | 23,97 |
| 72,00 | 0,9547 | 1,0227 | 0,9887 | 51,36 | 8118,34 | 23,81 |

Tabela 24 - Massa de 5-FU liberada pelas microesferas V₁-10-FA em PBS - pH 1,2.

| Tempo (h) | Absorbância 1 | Absorbância 2 | Absorbância média | Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | Massa liberada (μg) | Fração liberada (%) |
|--------------|------------------|------------------|----------------------|---|--|---------------------------|
| 0,25 | 0,5643 | 0,5799 | 0,57 | 22,43 | 1121,45 | 3,79 |
| 0,50 | 0,7351 | 0,7562 | 0,75 | 34,48 | 1836,29 | 6,21 |
| 0,75 | 1,0378 | 1,0664 | 1,05 | 55,77 | 3072,82 | 10,40 |
| 1,00 | 1,165 | 1,1906 | 1,18 | 64,49 | 3788,05 | 12,82 |
| 1,50 | 1,2351 | 1,262 | 1,25 | 69,41 | 4356,18 | 14,75 |
| 2,00 | 1,309 | 1,3488 | 1,33 | 74,99 | 4982,23 | 16,87 |
| 2,50 | 1,3541 | 1,3925 | 1,37 | 78,07 | 5511,3 | 18,66 |
| 3,00 | 1,3996 | 1,4005 | 1,4 | 79,93 | 5994,57 | 20,30 |
| 3,50 | 1,289 | 1,3248 | 1,31 | 73,46 | 6070,7 | 20,55 |
| 4,00 | 1,2468 | 1,2845 | 1,27 | 70,6 | 6294,87 | 21,31 |
| 4,50 | 1,2239 | 1,2611 | 1,24 | 68,99 | 6567,37 | 22,24 |
| 5,00 | 1,1922 | 1,2226 | 1,21 | 66,55 | 6790,35 | 22,99 |
| 5,50 | 1,1599 | 1,1853 | 1,17 | 64,13 | 7002,36 | 23,71 |
| 6,00 | 1,103 | 1,108 | 1,11 | 59,47 | 7089,97 | 24,01 |
| 24,00 | 1,0483 | 1,0697 | 1,06 | 56,24 | 7509,69 | 25,43 |
| 48,00 | 1,0334 | 1,0401 | 1,04 | 54,7 | 7713,69 | 26,12 |
| 72,00 | 0,9748 | 1,0008 | 0,99 | 51,3 | 7817,32 | 26,47 |

Tabela 25 - Massa de 5-FU liberada pelas microesferas V₁-2.5-FA em PBS - pH 7,4.

| Tempo | Absorbância 1 | Absorbância 2 | Absorbância média | Concentração | Massa liberada | Fração liberada |
|-------|------------------|------------------|----------------------|---------------------------|-------------------|--------------------|
| (h) | | | | ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | (μg) | (%) |
| 0,25 | 0,1812 | 0,1813 | 0,1812 | 4,13 | 206,30 | 0,60 |
| 0,50 | 0,2104 | 0,2105 | 0,2105 | 4,71 | 235,48 | 0,69 |
| 0,75 | 0,2128 | 0,2131 | 0,2129 | 4,76 | 237,93 | 0,69 |
| 1,00 | 0,2015 | 0,2168 | 0,2091 | 4,68 | 234,18 | 0,68 |
| 2,00 | 0,2400 | 0,2461 | 0,2430 | 5,36 | 268,00 | 0,78 |
| 3,00 | 0,2438 | 0,2447 | 0,2443 | 5,38 | 269,21 | 0,78 |
| 4,00 | 0,2495 | 0,2523 | 0,2509 | 5,52 | 275,85 | 0,80 |
| 5,00 | 0,2551 | 0,2560 | 0,2556 | 5,61 | 280,51 | 0,82 |
| 6,00 | 0,2650 | 0,2659 | 0,2655 | 5,81 | 290,37 | 0,85 |
| 7,00 | 0,2803 | 0,2824 | 0,2814 | 6,12 | 306,24 | 0,89 |
| 8,00 | 0,2752 | 0,2774 | 0,2763 | 6,02 | 301,18 | 0,88 |
| 24,00 | 0,3422 | 0,3691 | 0,3556 | 7,61 | 380,35 | 1,11 |
| 48,00 | 0,4689 | 0,4748 | 0,4719 | 9,93 | 496,38 | 1,45 |
| 72,00 | 0,4849 | 0,4890 | 0,4869 | 10,23 | 511,42 | 1,50 |

Tabela 26 - Massa de 5-FU liberada pelas microesferas V₁-10-FA em PBS - pH 7,4.

| Tempo | Absorbância 1 | Absorbância 2 | Absorbância média | Concentração | Massa liberada | Fração liberada |
|-------|------------------|------------------|----------------------|---------------------------|-------------------|--------------------|
| (h) | | | | ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | (μg) | (%) |
| 0,25 | 0,0332 | 0,0333 | 0,0333 | 1,17 | 58,65 | 0,19 |
| 0,50 | 0,0321 | 0,0330 | 0,0325 | 1,16 | 57,91 | 0,19 |
| 0,75 | 0,0332 | 0,0333 | 0,0333 | 1,17 | 58,63 | 0,19 |
| 1,00 | 0,0360 | 0,0365 | 0,0363 | 1,23 | 61,64 | 0,21 |
| 2,00 | 0,0305 | 0,0306 | 0,0306 | 1,12 | 55,94 | 0,18 |
| 3,00 | 0,0483 | 0,0484 | 0,0483 | 1,47 | 73,68 | 0,24 |
| 4,00 | 0,0506 | 0,0508 | 0,0507 | 1,52 | 76,03 | 0,25 |
| 5,00 | 0,0537 | 0,0536 | 0,0537 | 1,58 | 78,99 | 0,26 |
| 6,00 | 0,0577 | 0,0576 | 0,0576 | 1,66 | 82,95 | 0,28 |
| 7,00 | 0,1119 | 0,1132 | 0,1125 | 2,75 | 137,73 | 0,46 |
| 8,00 | 0,1155 | 0,1170 | 0,1163 | 2,83 | 141,48 | 0,47 |
| 24,00 | 0,2767 | 0,3335 | 0,3051 | 6,60 | 329,98 | 1,11 |
| 48,00 | 0,2944 | 0,2988 | 0,2966 | 6,43 | 321,46 | 1,08 |
| 72,00 | 0,3074 | 0,3016 | 0,3045 | 6,59 | 329,30 | 1,11 |

Tabela 27 - Massa de 5-FU liberada pelas microesferas V₁-2.5-FA em PBS - pH 10.

| Tempo | Absorbância 1 | Absorbância 2 | Absorbância média | Concentração | Massa liberada | Fração liberada |
|-------|------------------|------------------|----------------------|---------------------------|-------------------|--------------------|
| (h) | | | | ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | (μg) | (%) |
| 0,25 | 0,1836 | 0,1839 | 0,1837 | 2,88 | 144,12 | 0,42 |
| 0,50 | 0,1914 | 0,1921 | 0,1918 | 3,07 | 153,71 | 0,45 |
| 0,75 | 0,1980 | 0,1982 | 0,1981 | 3,23 | 161,28 | 0,47 |
| 1,00 | 0,2022 | 0,2026 | 0,2024 | 3,33 | 166,45 | 0,48 |
| 2,00 | 0,2110 | 0,2119 | 0,2114 | 3,54 | 177,22 | 0,51 |
| 3,00 | 0,2325 | 0,2323 | 0,2324 | 4,05 | 202,31 | 0,59 |
| 4,00 | 0,2362 | 0,2370 | 0,2366 | 4,15 | 207,25 | 0,60 |
| 5,00 | 0,2440 | 0,2451 | 0,2445 | 4,34 | 216,75 | 0,63 |
| 6,00 | 0,2525 | 0,2534 | 0,2530 | 4,54 | 226,82 | 0,66 |
| 7,00 | 0,2735 | 0,2749 | 0,2742 | 5,04 | 252,22 | 0,73 |
| 8,00 | 0,3111 | 0,3126 | 0,3118 | 5,94 | 297,17 | 0,87 |
| 24,00 | 0,4041 | 0,4312 | 0,4176 | 8,47 | 423,56 | 1,24 |
| 48,00 | 0,4626 | 0,4647 | 0,4636 | 9,57 | 478,55 | 1,40 |
| 72,00 | 0,4703 | 0,4745 | 0,4724 | 9,78 | 488,95 | 1,43 |

Tabela 28 - Massa de 5-FU liberada pelas microesferas V₁-10-FA em PBS - pH 10.

| Tempo | Absorbância 1 | Absorbância 2 | Absorbância média | Concentração | Massa liberada | Fração liberada |
|-------|------------------|------------------|----------------------|---------------------------|-------------------|---------------------|
| (h) | | | | ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | (μg) | (%) |
| 0,25 | 0,0637 | 0,0639 | 0,0638 | 0,02 | 0,81 | $2,7 \cdot 10^{-3}$ |
| 0,50 | 0,0664 | 0,0668 | 0,0666 | 0,08 | 4,21 | 0,014 |
| 0,75 | 0,0679 | 0,0684 | 0,0682 | 0,12 | 6,08 | 0,021 |
| 1,00 | 0,0701 | 0,0701 | 0,0701 | 0,17 | 8,32 | 0,028 |
| 2,00 | 0,0738 | 0,0738 | 0,0738 | 0,26 | 12,78 | 0,043 |
| 3,00 | 0,0887 | 0,0890 | 0,0888 | 0,61 | 30,70 | 0,104 |
| 4,00 | 0,0913 | 0,0921 | 0,0917 | 0,68 | 34,18 | 0,115 |
| 5,00 | 0,0973 | 0,0913 | 0,0943 | 0,74 | 37,23 | 0,126 |
| 6,00 | 0,0992 | 0,0995 | 0,0994 | 0,87 | 43,31 | 0,146 |
| 7,00 | 0,1158 | 0,1158 | 0,1158 | 1,26 | 62,96 | 0,213 |
| 8,00 | 0,1254 | 0,1241 | 0,1247 | 1,47 | 73,63 | 0,249 |
| 24,00 | 0,2976 | 0,3268 | 0,3122 | 5,95 | 297,65 | 1,008 |
| 48,00 | 0,2941 | 0,3169 | 0,3055 | 5,79 | 289,61 | 0,981 |
| 72,00 | 0,3118 | 0,2912 | 0,3015 | 5,70 | 284,81 | 0,964 |

10 APÊNDICE 3

Calculando α para as diferentes microesferas

Dados

$$V = 50 \text{ mL}$$

Tabela 29 - Número de microesferas presentes em 500 mg.

| Amostra | N |
|-----------------------|------|
| V _{1-2,5-F} | 1250 |
| V _{1-10-F} | 1512 |
| V _{1-2,5-FA} | 2857 |
| V _{1-10-FA} | 3245 |

Equação

$$\alpha = \frac{(V/N)}{(4\pi a^3/3)}$$

Portanto,

$$\alpha_{V_{1-2,5-F}} = \frac{(V/n)}{(4\pi a^3/3)} = \frac{(0,05 \text{ L}/1250)}{[4\pi(0,0836 \text{ cm})^3/3]} \cong 16,3521 \text{ mL. cm}^{-3}$$

$$\alpha_{V_{1-10-F}} = \frac{(V/n)}{(4\pi a^3/3)} = \frac{(0,05 \text{ L}/1512)}{[4\pi(0,0451 \text{ cm})^3/3]} \cong 86,1034 \text{ mL. cm}^{-3}$$

$$\alpha_{V_{1-2,5-FA}} = \frac{(V/n)}{(4\pi a^3/3)} = \frac{(0,05 \text{ L}/2857)}{[4\pi(0,0560 \text{ cm})^3/3]} \cong 24,8028 \text{ mL. cm}^{-3}$$

$$\alpha_{V_{1-10-FA}} = \frac{(V/n)}{(4\pi a^3/3)} = \frac{(0,05 \text{ L}/3245)}{[4\pi(0,0413 \text{ cm})^3/3]} \cong 52,2440 \text{ mL. cm}^{-3}$$

Método das Secantes

O Método das Secantes é uma aproximação do Método de Newton para determinação das raízes de uma equação. Pelo método de Newton, temos:

$$q_{m+1} = q_m - \frac{f(q_m)}{f'(q_m)}$$

A aproximação consiste em substituir a derivada $f'(q_m)$ pelo quociente das diferenças:

$$f'(q_m) \cong \frac{f(q_m) - f(q_{m-1})}{q_m - q_{m-1}} \quad (43)$$

Logo, temos:

$$q_{m+1} = q_m - \frac{f(q_m)}{\frac{f(q_m) - f(q_{m-1})}{q_m - q_{m-1}}} = q_m - \frac{f(q_m)(q_m - q_{m-1})}{f(q_m) - f(q_{m-1})}$$

Portanto, a expressão mais simples para o método das secantes:

$$q_{m+1} = \frac{q_{m-1} f(q_m) - q_m f(q_{m-1})}{f(q_m) - f(q_{m-1})} \quad (44)$$

Método das secantes para cálculo das raízes de $f(q)$.

Para $\alpha_{V1-2,5-F} = 16,3521$, temos:

$$q_{n+1} = \frac{q_{n-1} f(q_n) - q_n f(q_{n-1})}{f(q_n) - f(q_{n-1})}$$

Aproximação das raízes (Crank, 1979):

$$q_0 = 3,00$$

$$q_1 = 3,50$$

$$f(q_n) = \frac{3q_n}{3 + \alpha q_n^2} - \tan q_n$$

Substituindo, temos:

$$q_2 = \frac{3 * \left(\frac{3 * 3,50}{(3 + 16,3521 * 3,50^2)} - \tan(3,50) \right) - 3,50 * \left(\frac{3 * 3,00}{(3 + 16,3521 * 3,00^2)} - \tan(3,00) \right)}{\left(\frac{3 * 3,50}{(3 + 16,3521 * 3,50^2)} - \tan(3,50) \right) - \left(\frac{3 * 3,00}{(3 + 16,3521 * 3,00^2)} - \tan(3,00) \right)} \cong 3,1927$$

Teste de condição, $E = \left| \frac{q_{n+1} - q_n}{q_{n+1}} \right| < 0,001$

$$E = \left| \frac{3,1927 - 3,500}{3,1927} \right| \cong 0,096$$

Como a condição de parada não foi alcançada ($E < 0,001$), temos:

$$q_3 = \frac{3,50 * \left(\frac{3 * 3,1927}{(3 + 16,3521 * 3,1927^2)} - \tan(3,1927) \right) - 3,1927 * \left(\frac{3 * 3,50}{(3 + 16,3521 * 3,50^2)} - \tan(3,50) \right)}{\left(\frac{3 * 3,1927}{(3 + 16,3521 * 3,1927^2)} - \tan(3,1927) \right) - \left(\frac{3 * 3,50}{(3 + 16,3521 * 3,50^2)} - \tan(3,50) \right)} \cong 3,1977$$

Teste de condição, $E = \left| \frac{q_{n+1} - q_n}{q_{n+1}} \right| < 0,001$

$$E = \left| \frac{3,1977 - 3,1927}{3,1977} \right| \cong 0,0016$$

Como a condição de parada não foi alcançada ($E < 0,001$), temos:

$$q_4 = \frac{3,1927 * \left(\frac{3 * 3,1977}{(3 + 16,3521 * 3,1977^2)} - \tan(3,1977) \right) - 3,1977 * \left(\frac{3 * 3,1927}{(3 + 16,3521 * 3,1927^2)} - \tan(3,1927) \right)}{\left(\frac{3 * 3,1977}{(3 + 16,3521 * 3,1977^2)} - \tan(3,1977) \right) - \left(\frac{3 * 3,1927}{(3 + 16,3521 * 3,1927^2)} - \tan(3,1927) \right)} \cong 3,1979$$

Teste de condição, $E = \left| \frac{q_{n+1} - q_n}{q_{n+1}} \right| < 0,001$.

$$E = \left| \frac{3,1979 - 3,1977}{3,1979} \right| \cong 0,0001$$

Como $E < 0,001$ a raiz de aproximação $q_{V1-2,5-F} \cong 3,1979$.

Para $\alpha_{V1-10-F} = 86,1034$, temos:

Aproximação das raízes (Crank, 1979):

$$q_0 = 3,00$$

$$q_1 = 3,50$$

$$f(q_n) = \frac{3q_n}{3 + \alpha q_n^2} - \tan q_n$$

Substituindo, temos:

$$q_2 = \frac{3 * \left(\frac{3 * 3,50}{(3 + 86,1034 * 3,50^2)} - \tan(3,50) \right) - 3,50 * \left(\frac{3 * 3,00}{(3 + 86,1034 * 3,00^2)} - \tan(3,00) \right)}{\left(\frac{3 * 3,50}{(3 + 86,1034 * 3,50^2)} - \tan(3,50) \right) - \left(\frac{3 * 3,00}{(3 + 86,1034 * 3,00^2)} - \tan(3,00) \right)} \cong 3,1485$$

Teste de condição, $E = \left| \frac{q_{n+1} - q_n}{q_{n+1}} \right| < 0,001$

$$E = \left| \frac{3,1485 - 3,500}{3,1485} \right| \cong 0,1116$$

Como a condição de parada não foi alcançada ($E < 0,001$), temos:

$$q_3 = \frac{3,50 * \left(\frac{3 * 3,1485}{(3 + 86,1034 * 3,1485^2)} - \tan(3,1485) \right) - 3,1485 * \left(\frac{3 * 3,50}{(3 + 86,1034 * 3,50^2)} - \tan(3,50) \right)}{\left(\frac{3 * 3,1485}{(3 + 86,1034 * 3,1485^2)} - \tan(3,1485) \right) - \left(\frac{3 * 3,50}{(3 + 86,1034 * 3,50^2)} - \tan(3,50) \right)} \cong 3,1524$$

Teste de condição, $E = \left| \frac{q_{n+1} - q_n}{q_{n+1}} \right| < 0,001$

$$E = \left| \frac{3,1524 - 3,1485}{3,1524} \right| \cong 0,0012$$

Como a condição de parada não foi alcançada ($E < 0,001$), temos:

$$q_4 = \frac{3,1485 * \left(\frac{3 * 3,1524}{(3 + 86,1034 * 3,1524^2)} - \tan(3,1524) \right) - 3,1524 * \left(\frac{3 * 3,1485}{(3 + 86,1034 * 3,1485^2)} - \tan(3,1485) \right)}{\left(\frac{3 * 3,1524}{(3 + 86,1034 * 3,1524^2)} - \tan(3,1524) \right) - \left(\frac{3 * 3,1485}{(3 + 86,1034 * 3,1485^2)} - \tan(3,1485) \right)} \cong 3,1526$$

Teste de condição, $E = \left| \frac{q_{n+1} - q_n}{q_{n+1}} \right| < 0,001$.

$$E = \left| \frac{3,1526 - 3,1524}{3,1526} \right| \cong 0,0001$$

Como $E < 0,001$ a raiz de aproximação $q_{V1-10-F} \cong 3,1526$.

Para $\alpha_{V1-2,5-FA} = 23,8028$, temos:

Aproximação das raízes (Crank, 1979):

$$q_0 = 3,00$$

$$q_1 = 3,50$$

$$f(q_n) = \frac{3q_n}{3 + \alpha q_n^2} - \tan q_n$$

Substituindo, temos:

$$q_2 = \frac{3 * \left(\frac{3 * 3,50}{(3 + 23,8028 * 3,50^2)} - \tan(3,50) \right) - 3,50 * \left(\frac{3 * 3,00}{(3 + 23,8028 * 3,00^2)} - \tan(3,00) \right)}{\left(\frac{3 * 3,50}{(3 + 23,8028 * 3,50^2)} - \tan(3,50) \right) - \left(\frac{3 * 3,00}{(3 + 23,8028 * 3,00^2)} - \tan(3,00) \right)} \cong 3,1759$$

Teste de condição, $E = \left| \frac{q_{n+1} - q_n}{q_{n+1}} \right| < 0,001$

$$E = \left| \frac{3,1759 - 3,500}{3,1759} \right| \cong 0,1020$$

Como a condição de parada não foi alcançada ($E < 0,001$), temos:

$$q_3 = \frac{3,50 * \left(\frac{3 * 3,1759}{(3 + 23,8028 * 3,1759^2)} - \tan(3,1759) \right) - 3,1759 * \left(\frac{3 * 3,50}{(3 + 23,8028 * 3,50^2)} - \tan(3,50) \right)}{\left(\frac{3 * 3,1759}{(3 + 23,8028 * 3,1759^2)} - \tan(3,1759) \right) - \left(\frac{3 * 3,50}{(3 + 23,8028 * 3,50^2)} - \tan(3,50) \right)} \cong 3,1805$$

Teste de condição, $E = \left| \frac{q_{n+1} - q_n}{q_{n+1}} \right| < 0,001$

$$E = \left| \frac{3,1805 - 3,1759}{3,1805} \right| \cong 0,0014$$

Como a condição de parada não foi alcançada ($E < 0,001$), temos:

$$q_4 = \frac{3,1759 * \left(\frac{3 * 3,1805}{(3 + 23,8028 * 3,1805^2)} - \tan(3,1805) \right) - 3,1805 * \left(\frac{3 * 3,1759}{(3 + 23,8028 * 3,1759^2)} - \tan(3,1759) \right)}{\left(\frac{3 * 3,1805}{(3 + 23,8028 * 3,1805^2)} - \tan(3,1805) \right) - \left(\frac{3 * 3,1759}{(3 + 23,8028 * 3,1759^2)} - \tan(3,1759) \right)} \cong 3,1807$$

Teste de condição, $E = \left| \frac{q_{n+1} - q_n}{q_{n+1}} \right| < 0,001$.

$$E = \left| \frac{3,1807 - 3,1805}{3,1807} \right| \cong 0,0001$$

Como $E < 0,001$ a raiz de aproximação $q_{V1-2,5-FA} \cong 3,1807$.

Para $\alpha_{V1-10-FA} = 52,2440$, temos:

Aproximação das raízes (Crank, 1979):

$$q_0 = 3,00$$

$$q_1 = 3,50$$

$$f(q_n) = \frac{3q_n}{3 + \alpha q_n^2} - \tan q_n$$

Substituindo, temos:

$$q_2 = \frac{3 * \left(\frac{3 * 3,50}{(3 + 52,2440 * 3,50^2)} - \tan(3,50) \right) - 3,50 * \left(\frac{3 * 3,00}{(3 + 52,2440 * 3,00^2)} - \tan(3,00) \right)}{\left(\frac{3 * 3,50}{(3 + 52,2440 * 3,50^2)} - \tan(3,50) \right) - \left(\frac{3 * 3,00}{(3 + 52,2440 * 3,00^2)} - \tan(3,00) \right)} \cong 3,1554$$

Teste de condição, $E = \left| \frac{q_{n+1} - q_n}{q_{n+1}} \right| < 0,001$

$$E = \left| \frac{3,1554 - 3,500}{3,1554} \right| \cong 0,1092$$

Como a condição de parada não foi alcançada ($E < 0,001$), temos:

$$q_3 = \frac{3,50 * \left(\frac{3 * 3,1554}{(3 + 52,2440 * 3,1554^2)} - \tan(3,1554) \right) - 3,1554 * \left(\frac{3 * 3,50}{(3 + 52,2440 * 3,50^2)} - \tan(3,50) \right)}{\left(\frac{3 * 3,1759}{(3 + 52,2440 * 3,1554^2)} - \tan(3,1554) \right) - \left(\frac{3 * 3,50}{(3 + 52,2440 * 3,50^2)} - \tan(3,50) \right)}$$

$$\cong 3,1595$$

Teste de condição, $E = \left| \frac{q_{n+1} - q_n}{q_{n+1}} \right| < 0,001$

$$E = \left| \frac{3,1595 - 3,1554}{3,1595} \right| \cong 0,0013$$

Como a condição de parada não foi alcançada ($E < 0,001$), temos:

$$q_4 = \frac{3,1554 * \left(\frac{3 * 3,1595}{(3 + 52,2440 * 3,1595^2)} - \tan(3,1595) \right) - 3,1595 * \left(\frac{3 * 3,1554}{(3 + 52,2440 * 3,1554^2)} - \tan(3,1554) \right)}{\left(\frac{3 * 3,1595}{(3 + 52,2440 * 3,1595^2)} - \tan(3,1595) \right) - \left(\frac{3 * 3,1554}{(3 + 52,2440 * 3,1554^2)} - \tan(3,1554) \right)}$$

$$\cong 3,1597$$

Teste de condição, $E = \left| \frac{q_{n+1} - q_n}{q_{n+1}} \right| < 0,001$.

$$E = \left| \frac{3,1597 - 3,1595}{3,1597} \right| \cong 0,0001$$

Como $E < 0,001$ a raiz de aproximação $q_{V1-10-FA} \cong 3,1597$