



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**CONTROLE DA LIBERAÇÃO DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE
GERADO PELA QUITOSANA EM MEIO ÁCIDO E ALCALINO**

ANDREY MARTINEZ REBELO

FLORIANÓPOLIS

2002

ANDREY MARTINEZ REBELO

**CONTROLE DA LIBERAÇÃO DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE
GERADO PELA QUITOSANA EM MEIO ÁCIDO E ALCALINO**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial à obtenção do grau
de Mestre em Farmácia.**

Orientador: Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho

FLORIANÓPOLIS

2002


**"CONTROLE DA LIBERAÇÃO DA ENZIMA SUPERÓXIDO
DISMUTASE GERADO PELA QUITOSANA EM MEIO
ÁCIDO E ALCALINO"**

POR

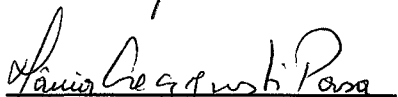
ANDREY MARTINEZ REBELO

**Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo Orientador e
membros da Banca Examinadora,
composta pelos Professores Doutores:**

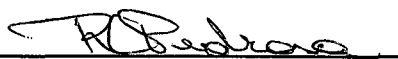
Banca Examinadora:



Danilo Wilhelm Filho (ECZ/CCB/UFSC – Membro Titular)



Tânia Creczynski Pasa (BQA/CCB/UFSC – Membro Titular)



Rozangela Cury Pedrosa (BQA/CCB/UFSC – Membro Titular)


Prof. Dra. Tânia Silvia Fröde

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 31 de agosto de 2002.

Dedico este ao meu pai, José Angelo Rebelo, que com SABEDORIA demonstrou que se pode ser forte e belo; à minha mãe, Janete Damasceno Rebelo que me deu FORÇA para eu ser belo e sábio; e à minha namorada, Aline Câmara da Silva por me proporcionar BELEZA na busca de forças para continuar agindo sabiamente.

(Andrey Martinez Rebelo, 2002.)

AGRADECIMENTOS

À minha Família, porto seguro onde encontro segurança e motivação para prosseguir;

Aos Professores MSc. Roberto Dalla Vecchia e Dr. Clóvis Antônio Rodrigues, estimuladores de meu ingresso na pós-graduação e colaboradores deste trabalho;

Ao Amigo Luiz Otávio Baasch, pelo apoio e estímulo;

Ao Professor Dr. Danilo Wilhelm Filho, pela confiança em mim depositada e pelo respeito às minhas limitações;

A Rubens Luciano Rampelotti, pela amizade e apoio logístico;

À Onélia Souza de Oliveira e família, pelo carinho, incentivo e apoio durante a realização deste curso;

À professora Dr. Tânia C. Pasa, pela cessão de laboratório, equipamentos e reagentes, fundamentais à realização deste trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Biofísica, bem representada pela amiga Vânia Rodrigues de Lima, sempre dispostos a colaborar;

À Fabíola Sell, pela sua paciência e disposição de colaborar na execução dos experimentos;

À Giselle Câmara da Silva, pela condução dos experimentos em laboratório;

Ao José Luiz Ungericht Júnior, pelo incentivo nos momentos de baixo astral, e à sua família, que sempre me estimulou e ajudou na caminhada acadêmica;

Ao Gastão Luck, nesta conquista, pelo arranjo de circunstâncias favorecedoras;

À SPIC PHARMA Ltda, cujo contrato de trabalho me proporcionou recursos e tempo para realização deste curso;

Aos funcionários do Departamento de Pós-graduação em Farmácia, pela disposição em colaborar;

À Aline Câmara da Silva, minha namorada, pelo carinho, apoio e estímulo no final desta jornada;

A todas as pessoas que se alegram comigo por esta vitória.

“Pergunte o que desconheces e passarás por ignorante durante cinco minutos. Não perguntes e serás ignorante por toda a vida.”

(Provérbio da China)

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS	03
1.1.1 Características e Aplicações do Principais Métodos de Encapsulamento de Fármacos para Formação de Formas de Liberação Controlada	04
1.1.1.1 Nanopartículas e micropartículas	05
1.1.1.1.1 <i>Nanosferas e microsferas</i>	05
1.1.1.1.2 <i>Nanocápsulas e microcápsulas</i>	06
1.1.1.2 Lipossomas e niossomas	06
1.1.1.3 Lipoproteínas	08
1.1.1.4 Emulsões	08
1.2 QUITOSANA	09
1.2.1 Principais usos da Quitosana	12
1.3 AGENTES RETICULANTES	13
1.3.1 Alginato de Sódio	14
1.3.2 Glutaraldeído	16
1.4 FORMAÇÃO DA CÁPSULA	19
1.5 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) E NITROGÊNIO (ERN)	21
1.6 DEFESAS ANTIOXIDANTES	25
1.6.1 Enzimas Antioxidantes	26
1.6.1.1 Superóxido dismutase (SOD)	26
2 OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GERAL	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 EQUIPAMENTOS E REAGENTES	31
3.1.1 Equipamentos	31
3.1.2 Reagentes	31
3.1.3 Soluções	32
3.1.3.1 Quitosana (Aiba, 1985)	32
3.1.3.2 Alginato (Aiba, 1985)	32
3.1.3.3 Superóxido dismutase	32
3.1.3.4 Glutaraldeído	32
3.1.3.5 Citocromo c	33
3.1.3.6 Xantina	33
3.1.3.7 Xantina Oxidase	33
3.1.3.8 Outras soluções	33
3.1.3.9 Meios de liberação	33
3.2 MÉTODOS	34
3.2.1 Adição de SOD livre (2500 U/mL) em Meio Ácido e Alcalino, para Avaliação da sua Atividade	34

3.2.2	Preparação da SOD Encapsulada e Inserção em Meio Ácido e Alcalino.....	34
3.2.3	Verificação da Atividade da SOD em Meio Ácido e Alcalino	35
3.3.4	Determinação da Atividade da SOD Livre e Liberada através da verificação da inibição da redução do Citocromo C, após exposição da enzima SOD à Meio Ácido e Alcalino	35
4	RESULTADOS	37
4.1	AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE SOD	37
5	DISCUSSÃO	54
6	CONCLUSÕES	61
7	SUGESTÕES DE ESTUDOS E PERSPECTIVAS	62
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
8.1	BIBLIOGRAFIAS CONSULTADAS	75

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA	1 -	MONÔMERO DA QUITOSANA	10
FIGURA	2 -	MONÔMERO DA QUITINA	10
FIGURA	3 -	COPOLÍMERO DA QUITOSANA	11
FIGURA	4 -	COPOLÍMERO DE ALGINATO	15
FIGURA	5 -	À ESQUERDA, ESQUEMA DA REDE DE ALGINATO E, À DIREITA, DESTAQUE DO DETALHE MOSTRANDO A ESTRUTURA PRIMÁRIA DA REDE DE CÁLCIO	15
FIGURA	6 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO GLUTARALDEÍDO	17
FIGURA	7 -	REPRESENTAÇÃO DA RETICULAÇÃO DA QUITOSANA COM GLUTARALDEÍDO	18
FIGURA	8 -	FOTOGRAFIA DE CÁPSULAS DE QUITOSANA/ALGINATO OBTIDAS POR GOTEJAMENTO DE SOLUÇÃO AQUOSA A 1% DE ALGINATO DE SÓDIO SOBRE SOLUÇÃO A 1% DE QUITOSANA EM HCL 0,01M	20
FIGURA	9 -	FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (100X) DA SECÇÃO TRANSVERSAL DE UMA CÁPSULA QUITOSANA/ ALGINATO/ GLUTARALDEÍDO DESIDRATADA ANTES DE SER SECCIONADA, CUJO NÚCLEO LÍQUIDO ESTÁ INDICADO PELAS SETAS, OBTIDA COM A MESMA TÉCNICA EMPREGADA NESTE ESTUDO	20
FIGURA	10 -	MECANISMO DE DEFESA ENZIMÁTICA PARA PREVENÇÃO DO ACÚMULO DE INTERMEDIÁRIOS REATIVOS DE OXIGÊNIO	22
FIGURA	11 -	A NADPH OXIDASE, UMA ENZIMA DE LIGAÇÃO DE SUPERFÍCIE NOS LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES QUE REDUZ O_2 EM O_2^- USANDO NADPH COMO ELETRODADOR	24
GRÁFICO	1 -	PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD (2500 U/mL) PRESENTE EM AMOSTRAS (20 μ L) DE SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO pH 7,4 (1 mL), AVALIADAS DURANTE 360 MINUTOS: 1) CONTENDO 40 μ L DE SOD LIVRE; 2) CONTENDO 40 μ L DE SOD ENCAPSULADA EM QUITOSANA/ALGINATO	37
GRÁFICO	2 -	PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD PRESENTE EM AMOSTRAS (20 μ L) DE MEIO DE LIBERAÇÃO (1 ML) (SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO PH 7,4), CONTENDO CÁPSULAS DE QUITOSANA/ALGINATO COM 60 μ L DE SOD (2500 U/ML), DURANTE 360 MINUTOS	38
GRÁFICO	3 -	PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD PRESENTE EM AMOSTRAS (20 μ L) DE MEIO DE LIBERAÇÃO (1 ML) (SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO PH 7,4), CONTENDO CÁPSULAS DE QUITOSANA/ALGINATO COM 100 μ L DE SOD (2500 U/ML), DURANTE 360 MINUTOS	39
GRÁFICO	4 -	PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD (2500 U/ML) PRESENTE EM AMOSTRAS (20 μ L) DE SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO PH 2,0 (1 ML), AVALIADAS DURANTE 360 MINUTOS: 1) CONTENDO 40 μ L DE SOD LIVRE; 2) CONTENDO 40 μ L DE SOD ENCAPSULADA EM QUITOSANA/ALGINATO	40

GRÁFICO	5 -	PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD PRESENTE EM AMOSTRAS (20 μ L) DE MEIO DE LIBERAÇÃO (1 mL) (SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO pH 2,0), CONTENDO CÁPSULAS DE QUITOSANA/ALGINATO COM 60 μ L DE SOD (2500 U/mL), DURANTE 360 MINUTOS.	41
GRÁFICO	6 -	PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD (2500 U/mL) PRESENTE EM AMOSTRAS (20 μ L) DE MEIO DE LIBERAÇÃO (1 mL) (SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO): 1) CONTENDO 40 μ L DE SOD LIVRE EM pH 8,0, DURANTE 360 MINUTOS; 2) CONTENDO 40 μ L DE SOD LIVRE EM pH 2,0, DURANTE 360 MINUTOS; 3) CONTENDO 40 μ L DE SOD ENCAPSULADA EM QUITOSANA/ALGINATO COLOCADAS POR 120 MINUTOS EM pH 2,0, E TRANSFERIDAS PORTERIORMENTE PARA pH 8,0 POR MAIS 240 MINUTOS	42
GRÁFICO	7 -	PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD (2500 U/mL) PRESENTE EM AMOSTRAS (20 μ L) DE SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO pH 7,4 (1 mL), AVALIADAS DURANTE 360 MINUTOS: 1) CONTENDO 40 μ L DE SOD LIVRE; 2) CONTENDO 40 μ L DE SOD ENCAPSULADA EM GLUTARALDEÍDO/ QUITOSANA/ALGINATO.....	43
GRÁFICO	8 -	PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD (2500 U/ML) PRESENTE EM AMOSTRAS (20 μ L) DE SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO PH 2,0 (1 ML), AVALIADAS DURANTE 360 MINUTOS: 1) CONTENDO 40 μ L DE SOD LIVRE; 2) CONTENDO 40 μ L DE SOD ENCAPSULADA EM GLUTARALDEÍDO/ QUITOSANA/ALGINATO	44
GRÁFICO	9 -	PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD (2500 U/mL) PRESENTE EM AMOSTRAS (20 μ L) DE MEIO DE LIBERAÇÃO (1 mL) (SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO): 1) CONTENDO 40 μ L DE SOD LIVRE EM pH 8,0, DURANTE 360 MINUTOS; 2) CONTENDO 40 μ L DE SOD LIVRE EM pH 2,0, DURANTE 360 MINUTOS; 3) CONTENDO 40 μ L DE SOD ENCAPSULADA EM GLUTARALDEÍDO/QUITOSANA/ALGINATO COLOCADAS POR 120 MINUTOS EM pH 2,0, E TRANSFERIDAS PORTERIORMENTE PARA pH 8,0 POR MAIS 360 MINUTOS	45
GRÁFICO	10 -	PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD EM AMOSTRAS (20 μ L) RETIRADAS DE MEIOS DE LIBERAÇÃO (1 ML) (TAMPÃO FOSFATO PH 7,4), CONTENDO CÁPSULAS DE QUITOSANA/ALGINATO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA ENZIMA, POR DIFERENTES PERÍODOS...	46
GRÁFICO	11 -	PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD EM AMOSTRAS (20 μ L) RETIRADAS DE MEIOS DE LIBERAÇÃO (1 ML) (TAMPÃO FOSFATO PH 2,0), CONTENDO CÁPSULAS DE QUITOSANA/ ALGINATO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA ENZIMA, POR DIFERENTES PERÍODOS....	47
GRÁFICO	12 -	PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD EM AMOSTRAS (20 μ L) RETIRADAS: 1) DE MEIO DE LIBERAÇÃO (1 ML) SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO PH 7,4; 2) DE MEIO DE LIBERAÇÃO (1 ML) SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO PH 2,0, CONTENDO CÁPSULAS DE QUITOSANA/ ALGINATO COM 40 μ L DA ENZIMA (2500 U/ML), POR DIFERENTES PERÍODOS	48

GRÁFICO	13 -	PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD EM AMOSTRAS (20 μ L) RETIRADAS: 1) DE MEIO DE LIBERAÇÃO (1 mL) SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO pH 7,4 E 2) DE MEIO DE LIBERAÇÃO (1 mL) SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO pH 2,0, CONTENDO CÁPSULAS DE QUITOSANA/ ALGINATO COM 60 μ L DA ENZIMA (2500 U/mL), POR DIFERENTES PERÍODOS	49
GRÁFICO	14 -	PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD EM AMOSTRAS (20 μ L) RETIRADAS: 1) DE MEIO DE LIBERAÇÃO (1 mL) SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO pH 7,4 E 2) DE MEIO DE LIBERAÇÃO (1 mL) SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO pH 2,0, QUE CONTIVERAM CÁPSULAS DE GLUTARALDEÍDO/QUITOSANA/ALGINATO COM 40 μ L DA ENZIMA (2500 U/mL), POR DIFERENTES PERÍODOS	50
GRÁFICO	15 -	PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD EM AMOSTRAS (20 μ L) RETIRADAS DE MEIO DE LIBERAÇÃO (1 mL) SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO pH 7,4, CONTENDO: 1) CÁPSULAS DE QUITOSANA/ALGINATO E 2) CÁPSULAS DE GLUTARALDEÍDO/ QUITOSANA/ALGINATO, TODAS COM 40 μ L DA ENZIMA (2500 U/mL), POR DIFERENTES PERÍODOS	51
GRÁFICO	16 -	PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD EM AMOSTRAS (20 μ L) RETIRADAS DE MEIO DE LIBERAÇÃO (1 mL) SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO pH 2,0, CONTENDO: 1) CÁPSULAS DE QUITOSANA/ALGINATO E 2) CÁPSULAS DE GLUTARALDEÍDO/ QUITOSANA/ALGINATO, TODAS COM 40 μ L DA ENZIMA (2500 U/mL), POR DIFERENTES PERÍODOS	52
GRÁFICO	17 -	PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD EM AMOSTRAS (20 μ L) RETIRADAS DE MEIOS DE LIBERAÇÃO (1 ML) SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO PH 2,0, ONDE AS CÁPSULAS DE QUITOSANA/ALGINATO E DE GLUTARALDEÍDO/QUITOSANA/ALGINATO CONTENDO 40 μ L DA ENZIMA (2500 U/ML), PERMANECERAM POR 120 MINUTOS, E POSTERIORMENTE TRANSFERIDAS PARA SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO PH 8,0, NOS MINUTOS SUBSEQÜENTES	53
FIGURA	12 -	ESQUEMA DA REDE QUE FORMA A MEMBRANA DA CÁPSULA DE QUITOSANA/ALGINATO	55

RESUMO

O aperfeiçoamento das formas farmacêuticas é obtido pelo emprego da farmacotécnica e da tecnologia farmacêutica. O uso de biopolímeros, como a quitosana, no prolongamento e no retardamento da liberação de medicamentos tem sido muito estudado nos últimos anos. Enzimas podem ser imobilizadas pela cápsula de quitosana/alginate e por cápsulas de glutaraldeído/quitosana/alginate. Neste estudo avaliou-se o comportamento de cápsulas de quitosana/alginate, contendo 40, 60 e 100 μL de SOD (concentração de 2500 U/mL), no prolongamento da liberação e do emprego de filme de glutaraldeído sobre cápsulas de quitosana/alginate, contendo 40 μL de SOD, como retardador do início da liberação desta enzima, em meio ácido e básico. As cápsulas de quitosana/alginate e glutaraldeído/quitosana/alginate foram feitas de acordo com a metodologia de Aiba (1985) e a análise da liberação baseada na inibição da redução do citocromo c, conforme Flohé & Ötting (1984). As cápsulas de quitosana/alginate promoveram o prolongamento da liberação da enzima e a duração do tempo foi inversamente proporcional ao conteúdo da mesma, em ambos os pHs. Em pH 2,0, as cápsulas com 40 μL de SOD retardaram o início da liberação e o prolongamento ocorreu em menor tempo, com menor quantidade liberada que os registrados em pH 7,4. O filme de glutaraldeído sobre as cápsulas de quitosana adiou o início da liberação da SOD em cerca de 120 minutos, enquanto que nas cápsulas sem esta proteção a liberação foi imediata, quando em pH 7,4 e o retardamento registrado em pH 2,0 não ultrapassou a 60 minutos. O encapsulamento da SOD em quitosana/alginate e em glutaraldeído/quitosana/alginate modifica a sua disponibilidade, que é dependente da concentração e do pH do meio.

Palavras-chaves: Liberação Prolongada; Quitosana; Alginate, superóxido dismutase.

ABSTRACT

The improvement of pharmacological forms is obtained by employing pharmaceutics and pharmaceutical technology. The use of biopolymers, such as chitosan, in extending and delaying drug release has been evaluated in recent years. Enzymes can be immobilized by chitosan/alginate and also by glutaraldehyde/chitosan/alginate capsules. This study aimed to evaluate the behaviour of chitosan/alginate capsules containing 40, 60 and 100 μl of SOD (2500 U/mL), in extending the drug release, as well as the effect of a glutaraldehyde film on chitosan/alginate capsules containing 40 μl of SOD (2500 U SOD mL⁻¹), in delaying the beginning of enzyme release, both under acid and basic media. The production of chitosan/alginate capsules and of glutaraldehyde/chitosan/alginate capsules was based on Aiba (1985) methodology and the release analysis was based on the inhibition of cytochrome c reduction, according to Flohé & Ötting (1984). The chitosan/alginate capsules extended the drug release, and the time interval was inversely proportional to their content under both pHs. Under pH 2.0, the 40 μl SOD capsules delayed the beginning of release and the extension occurred at a shorter time interval and at a lower released amount than under pH 7.4. The glutaraldehyde film on chitosan capsules delayed the beginning of SOD release in about 120 minutes, while in capsules lacking this protection the release was immediate under pH 7.4 and the delay recorded at pH 2.0 did not exceed 60 minutes. SOD entrapment in chitosan/alginate and in glutaraldehyde/chitosan/alginate affects its availability, which is dependent on its concentration and pH.

Key-words: Extended Drug Release; Chitosan; Alginate, superoxide dismutase.

1 INTRODUÇÃO

O aperfeiçoamento das formas farmacêuticas ocorre à medida que a ciência farmacêutica necessita melhorar o aproveitamento do seu arsenal medicamentoso disponível. Apesar dos avanços das ciências biomédica e química no melhoramento e síntese de centenas de novos agentes com atividade terapêutica potencial, ainda não se evitam que muitos destes fármacos falhem na sua função. Dentre estas falhas, destacam-se, conforme Zanetti (2001), a elevada toxicidade, a estreita faixa terapêutica, a rápida metabolização, ou o emprego em tratamentos de longa duração. Estas falhas podem ser corrigidas através da mudança da via de administração, da diminuição, regularização e manutenção das doses aplicadas, principalmente através de especialidades farmacêuticas de liberação controlada de substâncias ativas. Segundo Ng et al. (1998), uma das formas de melhorar o aproveitamento de uma substância ativa é através do uso de uma forma farmacêutica que promova a sua liberação prolongada. Este mecanismo, além da manutenção regular da dose, facilita a sua administração. A tecnologia farmacêutica ou a farmacotécnica são responsáveis pelo melhoramento e correções de falhas das formas farmacêuticas. Baseado nestas ciências e apoiado na farmacologia, pode-se estudar a possibilidade do uso de quitosana como agente deste melhoramento.

A quitosana é um biopolímero que tem sido empregado como excipiente farmacêutico em formulação oral de fármacos para melhorar a dissolução ou para liberação controlada como suporte de erosão lenta de uma matriz hidratada (Tozaki et al., 1997). Este biopolímero é atóxico ao organismo humano, nas doses empregadas (Thanoo et al., 1991) além de ser de fácil obtenção.

Uma das formas do uso da quitosana consiste na sua propriedade encapsuladora de fármacos. De acordo com Andreo Filho & Oliveira (1999), a encapsulação de fármacos é uma das alternativas viáveis para o desenvolvimento de novas formulações, possibilitando, racional e efetivamente, o

aumento da eficiência terapêutica de substâncias já utilizadas correntemente no tratamento de diversas doenças.

O uso de enzimas tem sido limitado em função da instabilidade deste tipo de biomolécula (Comerlato, 1995, citado por Miguez, 1997). Conforme Muzykantov (2001), os sistemas de liberação também têm por objetivo proteger enzimas contra a inativação e fazê-las atingir especificamente o sítio onde deverão atuar. Servem, ainda, para reduzir doses terapêuticas, visando minimizar reações imunes e outros efeitos adversos.

As espécies reativas de oxigênio (ERO) resultantes do metabolismo dos seres aeróbicos são tóxicas. A redução completa do oxigênio (O_2), resulta na formação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\bullet OH$). Estes, por sua vez, são extremamente mesmo em concentrações relativamente baixas, os tecidos tentam constantemente controlar e remover estas ERO. A interação de ERO tem sido relacionada a um grande número de estados patológicos, envolvendo processos de isquemia-reperfusão, doenças degenerativas do sistema nervoso, do aparelho cardiovascular, aparelho respiratório, órgãos de visão, processos inflamatórios, lesão radioativa, câncer e o próprio envelhecimento (Del Maestro, 1980).

As superóxido dismutases (SODs) compõe uma família de metaloenzimas antioxidantes presentes nas células dos mamíferos, demais vertebrados, invertebrados e bactérias aeróbicas (Halliwell & Gutteridge, 1999). Estas enzimas convertem o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, que, subseqüentemente, é degradado pela catalase, originando água e oxigênio molecular (Mc Cord & Fridovich, 1969; Halliwell & Gutteridge, 1999; Muzykantov, 2001).

O conhecimento do comportamento de cápsulas de quitosana na liberação da enzima SOD em pHs relacionados aos fluídos fisiológicos humanos, pode vir a constituir-se numa forma farmacêutica de grande eficiência contra os efeitos deletérios das ERO, se perfeitamente ajustados à via de administração.

1.1 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

A administração convencional de fármacos tem como objetivo principal tornar possível a ação a que ele se destina (Aguilar et al. 1968). As formas convencionais de administração de fármacos mais conhecidas são sólidas (via oral, retal e intradérmica), líquidas (ocular, oral, nasal e injetável) e semi-sólidas (tópico e ocular) (Langer, 1990).

Em formas farmacêuticas convencionais, a concentração do fármaco na corrente sanguínea apresenta um aumento e atinge um pico máximo que é seguido de um declínio imediato. Cada fármaco possui uma faixa de ação terapêutica acima da qual ela é tóxica, e abaixo, é ineficaz (Bidah & Vergnaud, 1991).

Fármacos diversos são criados e melhorados ao mesmo tempo que métodos de forma de disponibilização destes no organismo são desenvolvidos. Este desenvolvimento, utilizando sistemas de liberação controlada, tem evoluído da necessidade de prolongar e melhorar o controle do fármaco administrado. Os sistemas de liberação controlada buscam uma utilização mais eficiente do fármaco, dando possibilidades à vetorização, diminuindo efeitos sistêmicos; aumentando o intervalo de administração, reduzindo assim, os efeitos colaterais (Andreo Filho & Oliveira, 1999), e promovendo a aceitação do tratamento por pacientes (Langer, 1990). É requerido aos sistemas de liberação controlada o alcance de um perfil de liberação que seja reprodutível, gerando um controle maior que as formas convencionais.

O objetivo dos sistemas de liberação controlada é manter a concentração do fármaco dentro da faixa terapêutica por um tempo prolongado, utilizando um menor número de doses possível (Bidah & Vergnaud, 1991; Vasudev et al., 1997). A manutenção do nível terapêutico do fármaco no plasma de um indivíduo determinará o tempo da rotina de prescrição (Kost & Langer, 1991).

Os sistemas de encapsulamento de substâncias vêm sendo estudados por muitos pesquisadores nas últimas décadas. Estes sistemas possibilitam o isolamento, o retardamento da liberação e a manutenção dos níveis plasmáticos de substâncias ativas contidas pelas estruturas, que podem ter dimensões desde nanômetro a milímetros de diâmetro (Andreo Filho & Oliveira, 1999)

Outras vantagens do encapsulamento consistem na obtenção de formas sólidas de óleos, mascaramento de sabor e odor desagradáveis, proteção contra degradação do fármaco, prevenção de incompatibilidades com outras substâncias ativas presentes na formulação, possibilidade de manipular materiais tóxicos, entre outras (Andreo Filho & Oliveira, 1999).

Os sistemas poliméricos de liberação são estudados para serem capazes de ajustar a velocidade de liberação do fármaco em resposta à necessidade fisiológica (Kost & Langer, 1991), podendo ser influenciados pelo modelo do sistema utilizado, assim como condições do meio, como o pH. Estes sistemas podem promover a liberação do fármaco por longos períodos (Li et al., 1991). De forma geral, estes materiais liberam os fármacos por sistemas de difusão, reação química e ativação de solventes (Langer, 1990).

1.1.1 Características e Aplicações dos Principais Métodos de Encapsulamento de Fármacos para Formação de Formas de Liberação Controlada.

O encapsulamento é uma forma de imobilização, no qual substâncias são dispersas em pequenas partículas morfologicamente esféricas, constituídas de membranas, geralmente poliméricas semipermeáveis, com poros de tamanho variado, podendo ser de origem natural ou sintética. As razões primordiais para a utilização destes sistemas estão na necessidade de proteção do material encapsulado contra agentes externos ou processos biológicos. Da mesma forma a proteção de alguns tecidos como a parede gástrica, que pode sofrer irritação proveniente do contato direto de alguns fármacos (Rodríguez et al., 1998).

1.1.1.1 Nanopartículas e micropartículas

A denominação micro e nano é genérica, diferenciando entre eles o tamanho da partícula a que se está referindo. Partículas iguais ou menores que 1 μ m são nanopartículas, enquanto as de maior tamanho são chamadas de micropartículas. O termo partícula, que é amplo, é dado a estruturas como esferas e cápsulas (Andreo Filho & Oliveira, 1999).

1.1.1.1.1 Nanosferas e microsferas

São denominados assim os sistemas em que o fármaco encontra-se homogeneamente disperso no interior da matriz polimérica ou cerosa. Obtém-se, desta forma, um sistema monolítico, em que é impossível identificar a presença de núcleo diferenciado (Andreo Filho & Oliveira, 1999).

Microsferas e nanosferas podem ser utilizadas para controle da liberação de medicamentos *in vitro* e *in vivo*, utilizando estruturas porosas (Ehtezazi & Washington, 2000), como o ácido hialurônico e a quitosana (Lim et al., 2000), entre outros (Choi & Park, 2000; Kortesus, 2000).

Ford et al. (1999), testou nanosferas de ciclosporinas A, comparando com formas farmacêuticas do tipo microemulsão, onde, demonstrou-se que as nanosferas promovem maior absorção da ciclosporina A por via oral em cães que a microemulsão.

Estudos feitos com microsferas de quitosana com a citarabina, demonstraram que o sistema possui uma incorporação de cerca de 70%, além de formar uma adequada geometria esférica. Também foi observado maior concentração de citarabina em 48 horas, sendo o fármaco detectado no plasma durante 13 dias e a matriz permaneceu intacta por seis meses (Blanco et al., 2000).

1.1.1.1.2 Nanocápsulas e microcápsulas

Estes são sistemas denominados reservatórios, em que é possível identificar núcleos diferenciados, sólidos ou líquidos. A substância ativa encontra-se envolvida por uma membrana, geralmente polimérica, isolando o núcleo do meio externo (Andreo Filho & Oliveira, 1999). Estes sistemas possuem a liberação controlada por pressão osmótica. A membrana de recobrimento é rígida e capaz de manter a integridade estrutural durante a liberação da droga. Estas membranas de recobrimento, quando sofrem intumescimento, forçam a saída gradativa da substância ativa encapsulada pela pressão formada internamente. A espessura desta membrana afeta a taxa e a duração da liberação do fármaco do sistema (Chien, 1983).

As microcápsulas constituem uma das formas estudadas na liberação prolongada de medicamentos via oral. Um exemplo desta utilização bem sucedida foi o uso do antiinflamatório diclofenaco de sódio (Ichikawa et al., 1997) e do cloridrato de tereftaloil contra ERO (Ery et al., 1998).

As nanosferas têm sido empregadas, via oral, como por exemplo, na administração de ciclosporina A, contra a rejeição de órgãos transplantados em cães, com grande vantagem sobre as micro-emulsões (Ford et al., 1999). Nanocápsulas de quitosana têm sido empregadas na liberação controlada de doxirrubicina contra tumores, visando proteger o coração dos efeitos tóxicos do fármaco (Mitra et al. 2001).

1.1.1.2 Lipossomas e niossomas

Lipossomas são micropartículas ou carreadores coloidais com diâmetro médio em torno de 0,05 a 5,0 μm , que se formam espontaneamente quando lipídeos, como fosfolipídios e colesterol, são hidratados em meio aquoso. Podem ser constituídos de membranas simples ou múltiplas (Bangham & Horne, apud

Sharma, & Sharma, 1997). Estes carreadores vêm sendo estudados utilizando-se vários agentes ativos, como antineoplásicos, antimicrobianos, esteróides vacinas, etc. (Sharma & Sharma, 1997).

Os lipossomas aumentam a liberação de fármacos como *N*-fosfoacetil-L-aspartato (PALA), quando são pobremente absorvidos pela célula. Fármacos como doxirrubicina, anfotericina B, citrato de daunarubicina já foram aprovados para uso em vários países, principalmente da Europa. No entanto, os lipossomas apresentam limitações relacionadas à manufatura, estabilidade, reprodutibilidade, esterilização, baixa incorporação, controle do tamanho e meia-vida curta das vesículas circulantes (Sharma & Sharma, 1997). Os lipossomas têm sido utilizados, com grande sucesso, para encapsulamento de SOD na prevenção da apoptose, visando a proteção dos neurônios motores do cordão espinhal de embriões de ratos (Estévez, 2000).

Os niossomas são vesículas unilamelares ou multilamelares com paredes de bicamadas formados em solução aquosa, com ou sem colesterol, na presença de surfactantes não iônicos (tweens e/ou spans), exibindo um perfil similar aos dos lipossomas. Estes podem ser empregados para promover absorção dérmica, possuem alta afinidade por tecidos com processo inflamatório instalado, e são reconhecidos por sua eficácia na liberação de fármacos antiinflamatórios (Junginger et al., 1993).

Segundo Sahiwala & Misra (2002), os niossomas, associados ao nimisulide (antiinflamatório), promovem uma consistente e prolongada ação antiinflamatória, podendo ser usado para este fim com promissora vantagem sobre as formulações convencionais, pela sua afinidade ao sítio de ação, diminuindo os efeitos colaterais sistêmicos.

1.1.1.3 Lipoproteínas

As lipoproteínas são macromoléculas de tamanho e densidade variados, formadas por interações não covalentes e de baixa energia entre lipídeos e proteínas (Souza et al., 1993). Possuem classificação segundo a densidade, em quilomicrons, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Souza et al., 1993; Souza & Campa, 1999). Estudos esclarecem que quilomicrons e LDL artificiais comportam-se tão bem como os naturais, mesmo após adição da anfotericina B (AB). Demonstram, igualmente, que a associação anfotericina-LDL (AB-LDL) teve resultados menos tóxicos que AB (Maranhão et al., 1998). As desvantagens deste sistema são a DL_{50} do AB-LDL, que aumentou três vezes, demonstrando que doses maiores neste sistema podem ser deletérias (Souza et al., 1993; Keer et al., 1998; Souza & Campa, 1999; Quintão & Nakeakare, 1999).

1.1.1.4 Emulsões

São preparações farmacêuticas que dispersam fases não miscíveis ou parcialmente miscíveis entre si. Estas preparações são constituídas por fases que podem ser classificadas como dispersa (interna) e dispersante (contínua ou externa), as quais, com a ajuda de um emulsionante, formam um sistema homogêneo. Estes sistemas podem ser classificados pelo tamanho da partícula dispersa em macroemulsões (>400 nm), miniemulsões (100 a 400 nm), microemulsões (transparentes; <100 nm). Outra classificação pode ser dada pelas características hidrofílicas da fase dispersa e dispersante, podendo ser chamadas de normal (óleo em água [O/A]), inversa (água em óleo [A/O]) ou múltipla (água/óleo/água [A/O/A] ou óleo/água/óleo [O/A/O]), onde esta última apresenta partículas dispersas, consideradas emulsões simples (Becker, 1988).

Estudos de liberação prolongada demonstraram a efetividade das emulsões simples, tanto quanto das emulsões múltiplas O/A/O, com aplicação tópica de hidrocortisona, diferindo entre elas quanto ao menor efeito sistêmico nas O/A/O (Laugel et al., 1997). As emulsões também têm sido empregadas, com grande efetividade, como condutoras poliméricas na liberação de fármacos lipofílicos, como esteróides e vitaminas (Yuk et al., 1995).

1.2 QUITOSANA

A quitosana (Figura 1) é um biopolímero hidrofílico de alto peso molecular ($\sim 1,5 \times 10^5$ daltons), costumeiramente preparada pela desacetilação da quitina (poli- β -D-N-acetil-glicosamina) (Figura 2), através de uma reação de hidrólise básica (Suryanarayana et al., 1987). É predominantemente constituída de uma unidade β -(1,4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose (Muzzarelli, 1977 apud Miguez, 1997). A quitosana difere da quitina pela maior quantidade de grupos N-acetil desta (Peter, 1995).

A quitina e a quitosana são os polissacarídeos mais abundantes encontrados na natureza (Chandy & Sharma, 1993). São derivados da celulose, embora não sejam produzidos em organismos produtores de celulose. A quitina é o principal constituinte de organismos como fungos e crustáceos (Yao et al., 1994). A quitosana pode formar complexos polieletrólitos com polímeros aniônicos (Fukuda & Kikuchi, 1978 apud Huguet & Dellacherie, 1996).

Embora a estrutura da quitosana seja representada como um homopolímero, o processo de desacetilação é raramente completo, sendo a maioria dos produtos comerciais copolímeros compostos de unidades repetidas de quitosana e quitina (Figura 3) (Chandy & Sharma, 1993).

A presença de grupos amino confere solubilidade à quitosana em pH cerca de 6,0 em determinados solventes, como ácidos orgânicos diluídos (ácido acético e ácido fórmico), além de ácidos inorgânicos, formando soluções de

caráter viscoso com propriedades polieletrônicas, quelante e com capacidade de formação de filmes, fibras e membranas (Muzzarelli, 1988; Carlogh et al., 1991; Gonçalves & Laranjeiras, 2000).

Em pH baixo, o grupo amino da quitosana é muito mais facilmente cationizado e pode adsorver muito fortemente ânions por atração eletrostática. No entanto, nesta condição de pH, a quitosana forma gel, o que prejudica sua avaliação e limitando seu uso em soluções ácidas. Para solucionar este problema, pode-se empregar agentes reticulantes que a estabiliza. A quitosana, quando reticulada, é insolúvel em pH entre 1,0 e 7,0 e tem suas propriedades mecânicas melhoradas (Chiou & Li, 2002).

A molécula de quitosana também possui grupos funcionais como OH e NHCOCH_3 , sendo, o grupo NH_2 é o mais ativo (Nascimento, 2000) (Figura 3).

FIGURA 1. MONÔMERO DA QUITOSANA

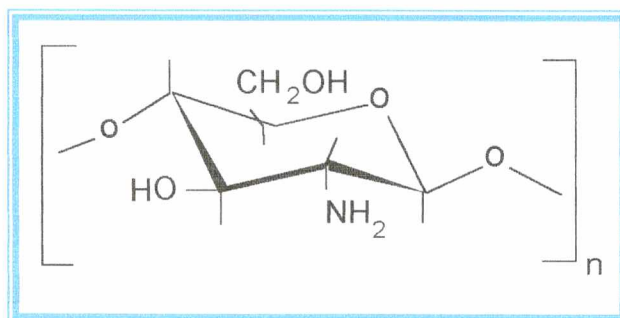


FIGURA 2. MONÔMERO DA QUITINA

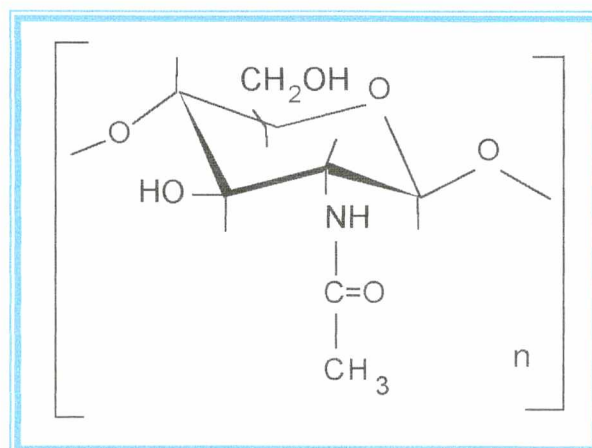
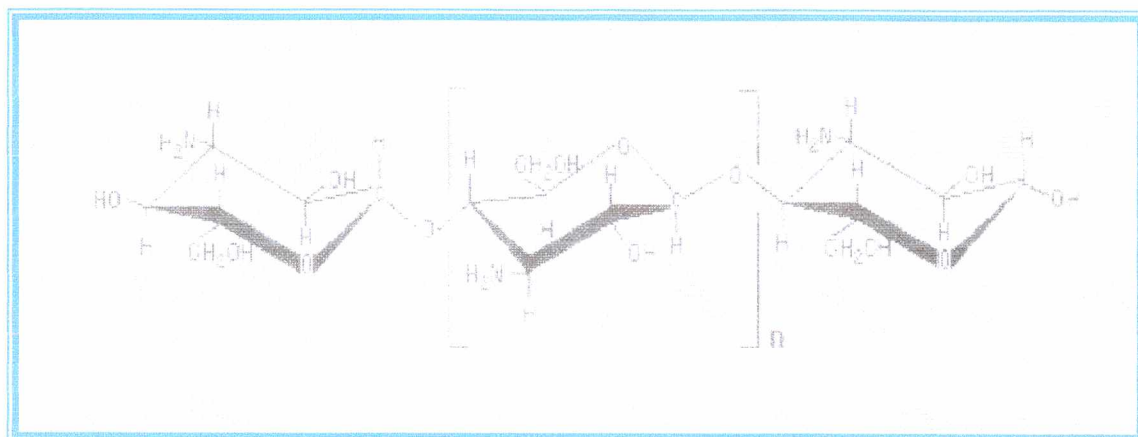


FIGURA 3. COPOLÍMERO DA QUITOSANA



A quitosana pode apresentar um grau de desacetilação que varia de 50% a 100%, dependendo do modo como é conduzido o processo. Quando acima de 60%, apresenta considerável solubilidade em ácidos orgânicos e em alguns ácidos minerais diluídos (Crispim, 1996). A determinação do grau de desacetilação da quitosana pode ser realizada por métodos de espectroscopia infravermelho (Kurit et al., 1991), espectroscopia ultravioleta (Aiba, 1986), titulação condutimétrica (Domard, 1987), ressonância magnética (RMN), cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Nascimento, 2000).

A quitosana é obtida pela desacetilação por hidrólise básica da quitina e pela bioconversão por fungos, como *Mucor rouxii* (Tsigos, 1999) e *Phycomyces blakesleeanus* (Chung, 1994).

A quitosana apresenta propriedades favoráveis de biocompatibilidade por ser atóxica (DL_{50} igual a 16g/kg via oral em ratos, segundo Illum, 1998 apud Bernkop-Schnürch & Kast, 2001), biodegradável e de origem natural, e de bioatividade (Muzzarelli, 1988; Chandy & Sharma, 1993; Peter, 1995; Gonçalves & Laranjeiras, 2000), possuindo propriedades antibacterianas (Chiou & Li, 2002). É biodegradada pela quitinase produzida pelos microorganismos do intestino (Tozaki et al., 1997; Tozaki et al., 1999 apud Tozaki et al., 2002), sendo o subproduto desta degradação atóxica (Thanno et al., 1991).

A quitosana também pode ser degradada pela lisosima e por outras proteases, ainda mais eficientes (Yalpani & Pantaleone, 1994 apud Muzzarelli et al., 1995). A lipase presente em diversos alimentos como o germe de trigo, leite e seus derivados, têm alta atividade na despolimerização da quitosana e da quitosana modificada dissolvida em solução aquosa levemente ácida (Muzzarelli et al., 1995).

1.2.1 Principais Usos da Quitosana

A quitosana, assim como a quitina, são recursos naturais muito comercializados pelas suas diversas utilidades. Estes polímeros, existentes em crustáceos, insetos, paredes de fungos, microfauna e plâncton, são encontrados em abundância em rejeitos das indústrias de caranguejo e de camarão. De acordo com Peter (1995), são utilizados, principalmente, na indústria alimentícia e de cosméticos pela sua capacidade de formar gel.

A sua solubilidade em meio ácido possibilita a utilização na produção de filmes, permitindo a imobilização de enzimas na preparação de biosensores, modificação de eletrodos sólidos, formação de membranas e cápsulas, utilizados em produtos farmacêuticos e cosmetológicos (Chen et al., 1996).

A quitosana, por suas características e propriedades, pode ser empregada: 1) na remoção de metais em águas residuais (Aiba, 1985); 2) na utilização como material de implante odontológico; 3) na indústria de papel e celulose, como importante componente para resistência à água (Rodrigues, 1996); 4) na área médica e bioquímica, como membrana para hemodiálise e anticoagulante do sangue e, ainda, pela sua propriedade mucoadesiva (Wang et al., 2001); 5) no setor agrícola, para tratamento de sementes; 6) na indústria alimentícia, para processamento de alimentos (Chen et al., 1996); 7) na construção de sensores e biosensores eletroquímicos (Rodrigues et al., 2000); 8) como adsorvente de corantes; 9) na redução do colesterol (Muzzarelli et al., 1988); e 10) na formação de cápsulas que protejam proteínas biologicamente

ativas. Formam-se, assim, biorreatores compostos, de um lado, por proteínas biologicamente ativas e, de outro, de seu carreador bioinerte (Itoyama et al., 1994; Rebelo, 1998). Este polímero, associado à polivinil pirrolidona, tem sido utilizado em preparações de sistemas de liberação prolongada de antibióticos em meio ácido (Risbud et al., 2000), de insulina dirigida ao intestino grosso, protegendo-a da ação da alta concentração de protease existente no intestino delgado (Miyazaki et al., 1988; Tozaki et al., 1997 apud Tozaki 2002) e outros fármacos (Thanno et al., 1991; Shantha & Harding, 2000). Segundo Muzzarelli (1977), a produção de fibras através da interação entre quitosana e álcool polivinílico demonstrou que, em relação aos componentes individuais, apresentou várias propriedades, como aumento do teor de umidade, da resistência mecânica, elasticidade e, principalmente, das propriedades dielétricas. Tais características conferem melhores propriedades, não somente na formação de fibras, como também na formação de filmes e microcápsulas. A quitosana tem sido, ainda, usada em sistemas de liberação de insulina via oral, na forma de cápsula de quitosana-alginato-cálcio (Maffezzolli et al., 2000).

Por outro lado, tem sido relatado na literatura que a quitosana, assim como a quitina, possui propriedade de concentração seletiva em células tumorais (Thanno et al., 1991).

1.3 AGENTES RETICULANTES

De acordo com Pinto (2001), estruturalmente os polímeros podem ser classificados como termoplásticos e termofixos (termorrígidos). No primeiro caso, as cadeias macromoleculares têm um tamanho microscopicamente finito. São caracterizadas como seqüências em série de unidades monoméricas, tendo início e fim definidos. Em sua grande maioria podem ser dissolvidos. Os termofixos, também denominados de polímeros reticulados, têm tamanho microscopicamente infinito. Não se pode identificar uma cadeia única e isolada. São caracterizados por uma rede tridimensional formada pela união de vários segmentos de cadeia

polimérica. Estes materiais não fundem, e a elevação da temperatura leva à decomposição térmica. Também não sofrem processo de dissolução como os polímeros termoplásticos, porém, sofrem um processo de intumescimento, produzindo géis de polímero-solvente. O grau de intumescimento depende da interação polímero-solvente e do grau de reticulação do polímero.

A reticulação é a reação predominante na irradiação de poliestireno, polietileno, borrachas, entre outros. Apresenta efeitos benéficos nas propriedades mecânicas de alguns polímeros e é executada comercialmente para produzir polietileno com estabilidade aumentada e resistência ao escoamento em altas temperaturas (Artel, 2002).

A quitosana, que é um polieletrólito catiônico, reticula-se, formando gel através de ligações inter e intramoleculares, por interação iônica, com substâncias aniônicas (Shiraishi et al., 1993 apud El-Gibaly, 2002). O complexo insolúvel quitosana/substância aniônica pode ser formado pela combinação eletrostática do grupo amino da molécula de quitosana e o grupo carboxílico do anion da molécula da substância (El-Gibaly, 2002).

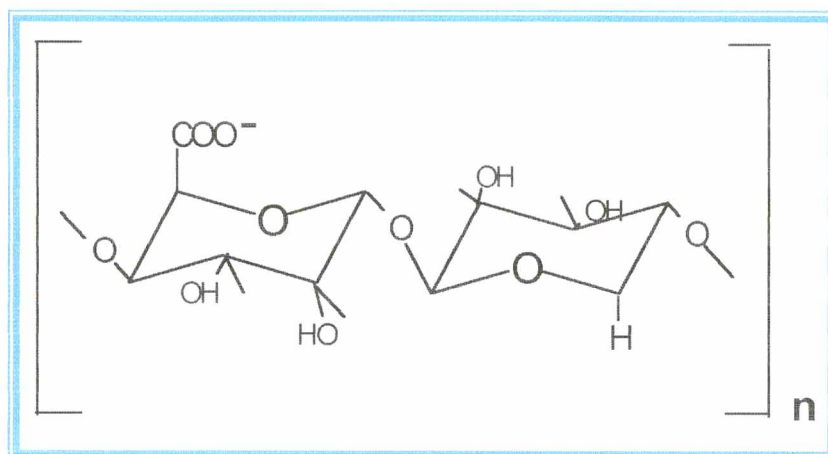
1.3.1 Alginato de Sódio

O alginato (Figura 4), considerado atóxico por Dunmire et al. (1999), tem sido usado extensivamente como material base para conduzir fármacos de alto peso molecular (Kikuchi et al., 1999; Gaserod et al., 1999 apud Iskakov et al. 2002).

Conhecido apenas por alginato, o alginato de sódio é um copolímero natural com características aniônicas. É de origem marinha, sendo encontrado em algas marrons, como a *Laminaria hyperborica*, *L. japonica*, *Ascophyllum nodosum*, *Macrocystis pyrifera*, *Clonia maxima*, *Lesonia negrescens* e espécies de *Sargassum* (Garret & Grisham, 1995; Lee et al., 1996; Smidsrod & Skjak-Braek, apud Gombotz & Wee, 1998). Em todas estas algas, o alginato é o

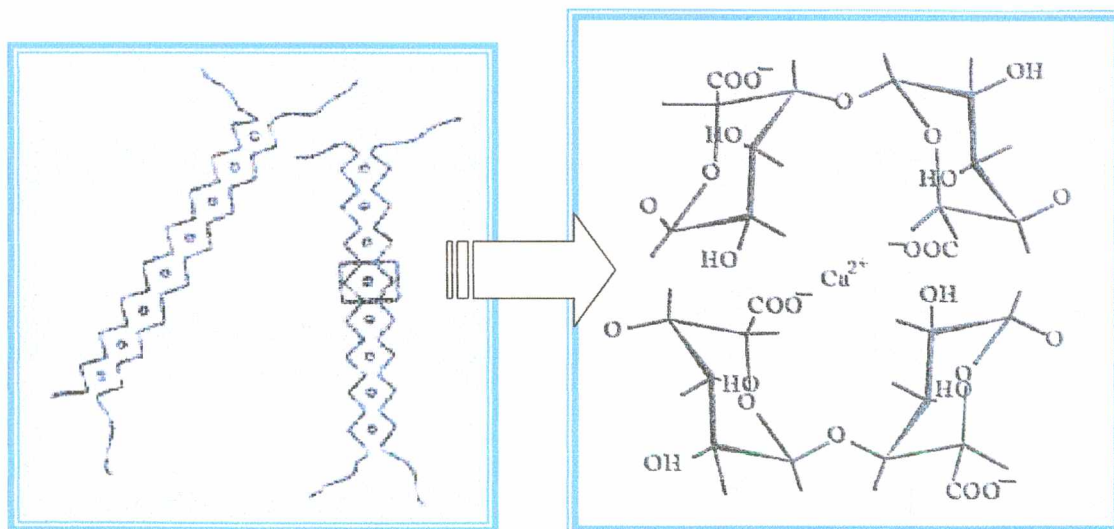
principal polissacarídeo nelas presente, participando com mais de 40% de seu peso seco (Gombotz & Wee, 1998).

FIGURA 4. COPOLÍMERO DE ALGINATO.



O alginato, com cátions bivalentes (Figura 5), forma uma gelatina viscosa fracamente solúvel em água (Garret & Grisham, 1995; Lee et al., 1996; Reynolds, 1996).

FIGURA 5. À ESQUERDA, ESQUEMA DA REDE DE ALGINATO E, À DIREITA, DESTAQUE DO DETALHE MOSTRANDO A ESTRUTURA PRIMÁRIA DA REDE DE CÁLCIO.



FONTE: Adaptado de Gombotz & Wee (1998)

Para que gotas de alginato sejam administradas no corpo humano, é necessário que tenham pequeno diâmetro e sejam revestidas por uma membrana que resista à difusão do fármaco e que, ao se intumescer, pressione internamente a membrana (Iskakov et al., 2002). Neste caso a quitosana desempenha este papel, ligando-se ao alginato por interação química, o que é feito pela cápsula de quitosana, que a ele se liga por interação química. De acordo com Smidsrod (1973), citado por Gombotz & Wee, (1988), o alginato forma fortes complexos com policátions, como a quitosana, polipeptídios, como as polilisinas, além de polímeros sintéticos, como as polietilenoaminas. Estes complexos não se dissolvem na presença de Ca^{2+} e podem ser usados para estabilizar géis e reduzir a porosidade.

O alginato possui alta mucobioadesividade devido à penetração da cadeia polimérica na interfase polímero-mucosa, que o torna vantajoso no emprego em sistemas de liberação de fármacos em mucosa (Peppas & Buri, 1985, apud Gombotz & Wee, 1998).

As características mucoadesivas de polímeros, como as do alginato, são úteis na condução de fármacos para a mucosa de tecidos, como a do trato gastrointestinal e nasofaríngeo. A aderência destes veículos condutores mantém os fármacos localizados na mucosa e retardam o tempo de trânsito, potencializando a efetividade e biodisponibilidade de proteínas e de outros fármacos (Gombotz & Wee, 1998).

1.3.2 Glutaraldeído

O glutaraldeído tem sido extensivamente usado para imobilizar enzimas. Os grupos aldeídicos do glutaraldeído têm alta reatividade com grupos amino terminais. A reação entre glutaraldeído e um suporte com terminal amino que esteja ligado a enzimas, introduz os grupos aldeídicos no referido suporte. Esta reação tem sido chamada de ativação. Embora seja aceito que a ligação de glutaraldeído com o suporte e a enzima ocorra pela formação de bases de Schiff,

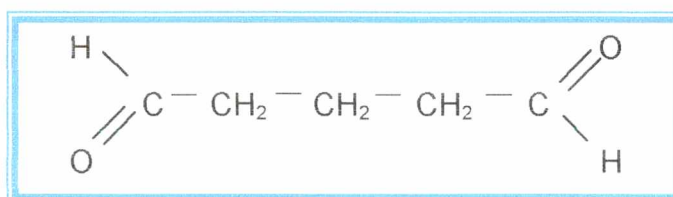
há evidências que a reação de glutaraldeído com amina não é tão simples. Um exemplo disso é a formação de 1,3,4,5-tetrasubstituído anel de piridina com consumo de oxigênio durante a reação. Assim, estes detalhes da reação ainda precisam ser elucidados (Ukeda et al., 1995).

O glutaraldeído é um aldeído preparado a partir do tratamento do 2-etoxi-3,4-diidro-2-H-pirano com $\text{HCl}_{(\text{aq})}$. É solúvel em água e apresenta fórmula molecular $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ e peso molecular igual a 100,11 (Figura 6). Possui DL_{50} , via oral em ratos de 2,38 mL/kg e, por penetração dérmica em coelhos, de 2,56 mL/kg (Liu et al., 1995).

Segundo o Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra (2002), o glutaraldeído no estado puro apresenta-se na forma de líquido oleoso ou de cristais incolores, de cheiro característico. É solúvel em todas as proporções na água e no etanol. Na prática, o produto é encontrado na forma de soluções aquosas contendo geralmente 25 ou 50% em peso de glutaraldeído. É incolor, pouco volátil e ligeiramente ácido. O glutaraldeído é muito reativo, podendo polimerizar-se na presença da água. A reação de condensação é mais rápida em meio alcalino e pode se tornar violenta em contato com bases fortes.

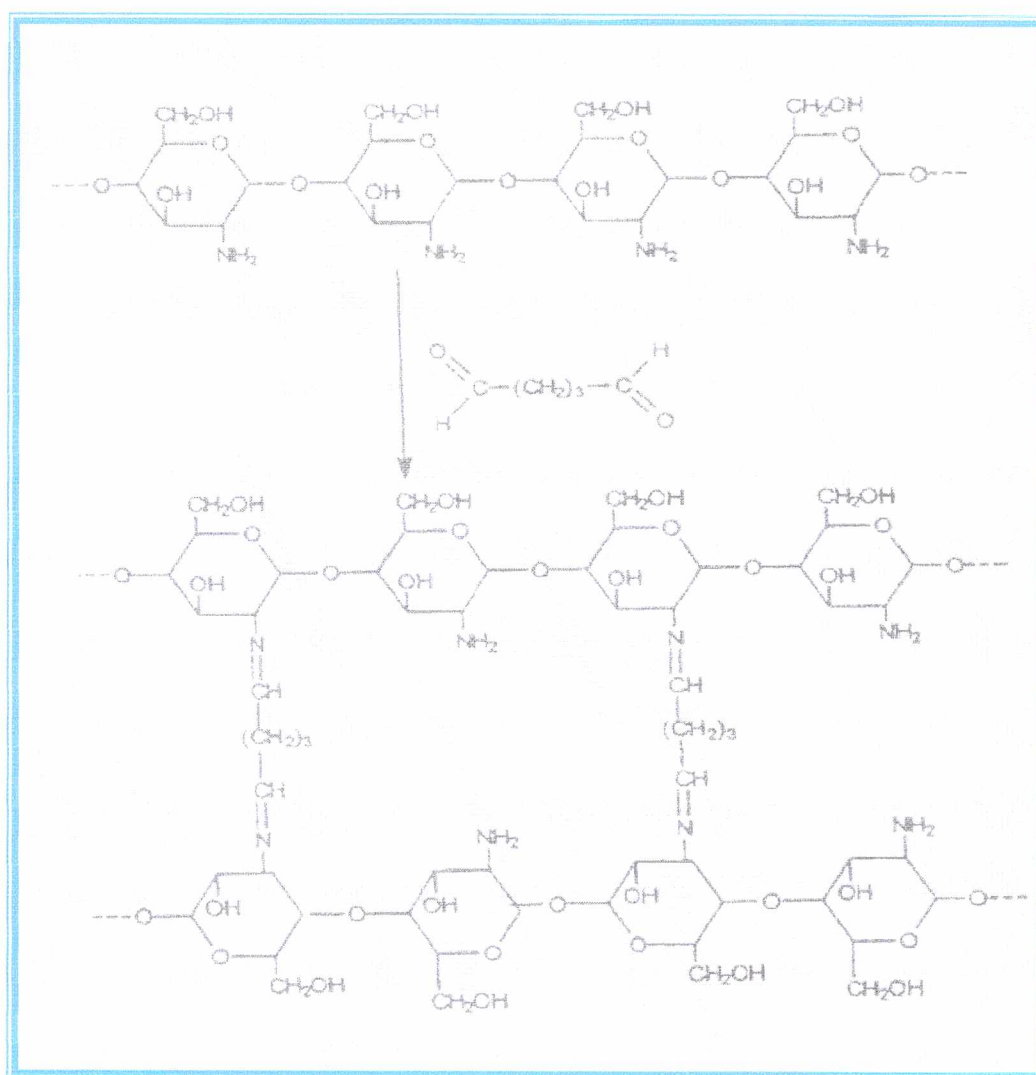
De acordo com Rasmussen & Albrechtsen (1974), apud Ukeda et al. (1995), a polimerização do glutaraldeído em uma solução alcalina dá-se por condensação aldol, e a extensão desta polimerização aumenta com o aumento da alcalinidade e da concentração do produto.

FIGURA 6. ESTRUTURA QUÍMICA DO GLUTARALDEÍDO



Por ser a quitosana solúvel em meio ácido, ela precisa ser reticulada para que as micropartículas formadas possuam resistência química e mecânica (Gonçalves, 1999). O glutaraldeído pode inibir a solubilidade da quitosana através de reticulação pela formação de base de Schiff (Figura 7) com seus grupamentos aldeídicos e os grupos amino livres da unidade glucosamina do polímero quitosana (Fávere, 1994).

FIGURA 7. REPRESENTAÇÃO DA RETICULAÇÃO DA QUITOSANA COM GLUTARALDEÍDO



Latha et al. (1994) demonstraram que microsferas de caseína reticuladas com glutaraldeído poderiam ser utilizadas como veículo de administração oral de

fármacos como teofilina, fármacos citotóxicos e enzimas proteolíticas, que poderiam ser degradadas durante o trânsito gastrointestinal.

1.4 FORMAÇÃO DE CÁPSULAS

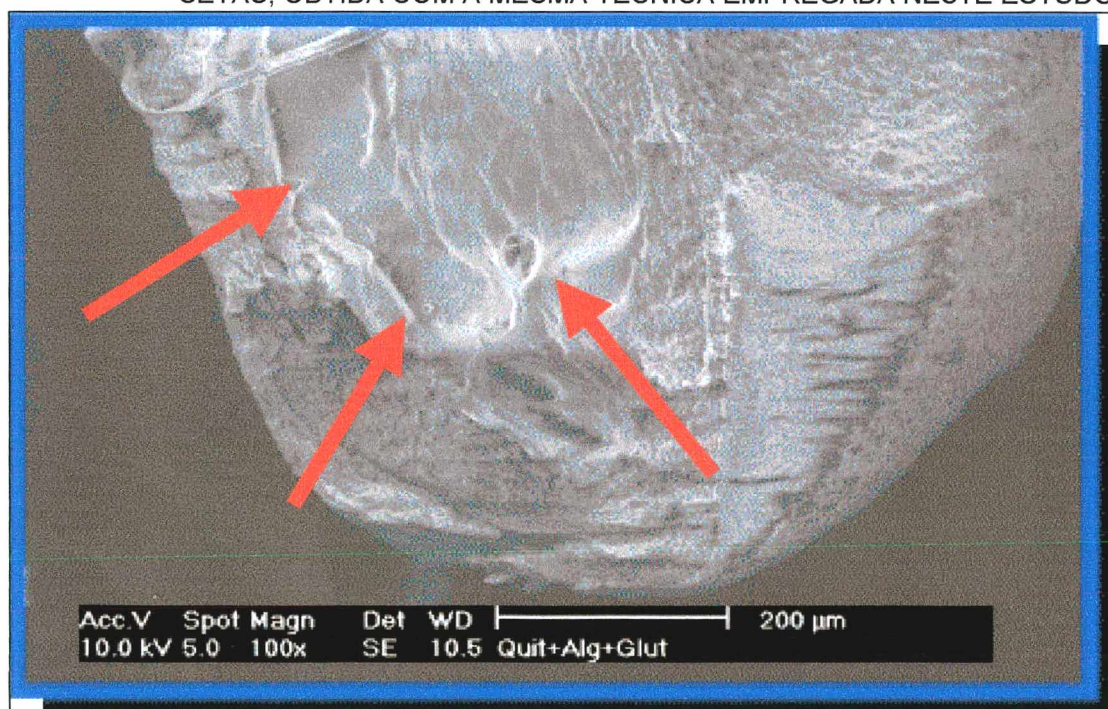
De acordo com Daly & Knorr (1988), tem sido estudada a formação de cápsulas com núcleo líquido, com capacidade de modificação da permeabilidade, mas não da resistência da membrana. A união de polímeros, em especial polissacarídeos como o alginato e, de outro lado, a quitosana, tem sido o procedimento mais comum nestes estudos para encapsulamento de produtos farmacêuticos, entre outros. Segundo Lee et al. (1996), a modificação da permeabilidade é que tem permitido o amplo uso desta membrana em diálise, ultra-filtragem, e outros processos de separação de soluções. Ainda, segundo Lee et al. (1996), para que o material encapsulado não se perca, o alginato pode ser revestido por polímeros que formem uma membrana na sua superfície. Quando gotas de alginato caem em uma solução de quitosana, uma membrana interfásica é formada pela complexação de dois polieletrólitos de cargas contrárias, por interação eletrostática. O núcleo de gel que se forma origina-se pela difusão do cloreto de cálcio na solução de quitosana. Ocorre, então, a formação de uma cápsula (Figura 8) com núcleo líquido (Figura 9) encapado de alginato e uma membrana interfásica de alginato/quitosana.

FIGURA 8 - FOTOGRAFIA DE CÁPSULAS DE QUITOSANA/ALGINATO OBTIDAS POR GOTEJAMENTO DE SOLUÇÃO AQUOSA A 1% DE ALGINATO DE SÓDIO SOBRE SOLUÇÃO A 1% DE QUITOSANA EM HCL 0,01M.



FONTE: Rebelo, 1998.

FIGURA 9 - FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (100X) DA SECÇÃO TRANSVERSAL DE UMA CÁPSULA QUITOSANA / ALGINATO / GLUTARALDEÍDO DESIDRATADA ANTES DE SER SECCIONADA, CUJO NÚCLEO LÍQUIDO ESTÁ INDICADO PELAS SETAS, OBTIDA COM A MESMA TÉCNICA EMPREGADA NESTE ESTUDO.



FONTE: Rebelo, 1998.

O uso de cloreto de cálcio na composição da cápsula tem por objetivo provocar uma reação de reticulação (fortalecimento) com o alginato, antes que este interaja com a quitosana na formação da membrana (Figura 5) (Daly & Knorr, 1988; Lee et al., 1996).

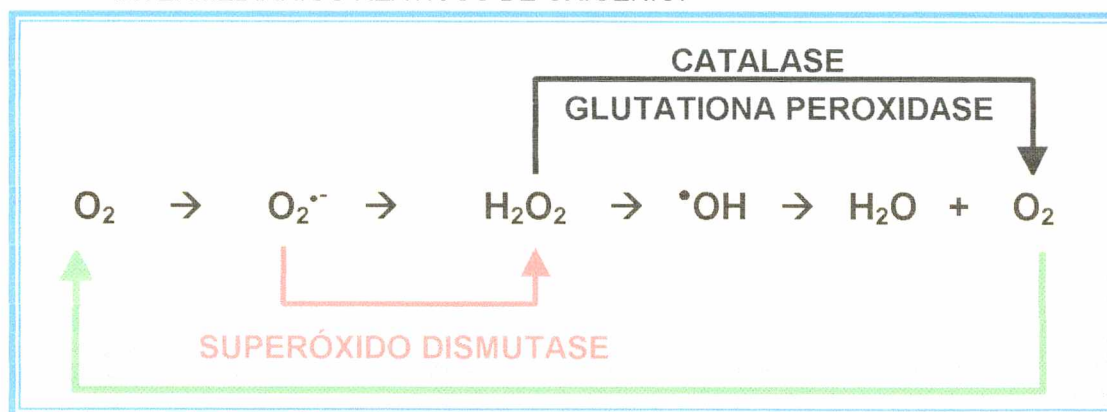
A imobilização de enzimas também pode ser feita pela ligação química da quitosana com o glutaraldeído (Figura 7). Este é um reagente de ligação cruzada que se liga com a quitosana e a proteína (Braun et al., 1985), endurecendo a cápsula (Hwang et al., 1985). O glutaraldeído reage com os grupos $-NH_2$ da quitosana por meio de seus dois grupos aldeídicos, um em cada extremo da molécula, formando as bases de Schiff (Fávere, 1994). A reação do glutaraldeído com o polímero quitosana resulta na reticulação da mesma, o que a torna mais resistente (Kawase et al., 1997) e menos solúvel em meio ácido.

1.5 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) E NITROGÊNIO (ERN)

De acordo com Del Maestro (1979), um radical livre é definido como qualquer átomo, grupo de átomos ou molécula com um elétron não pareado, ocupando uma órbita externa. Moléculas como o óxido nítrico (NO) e dióxido de nitrogênio (NO_2) são considerados, por definição, radicais livres. Um radical íon pode ser chamado positivo (H_3N^+ radical amino protonado) ou negativo ($O_2^{\bullet-}$ radical ânion superóxido). O elétron solitário presente na órbita externa de um radical livre lhe confere características físicas e reatividade química muito incomuns. A reatividade resulta na tendência do elétron não pareado interagir com outros elétrons, formando uma ligação química. Uma molécula de oxigênio (O_2) é um exemplo de birradical, pois contém dois elétrons não pareados. Possui um arranjo de rotação paralela de elétrons que previne a adição direta de um par de elétrons, necessitando uma inversão na rotação do elétron antes que uma ligação pudesse se formar, tornando-se um oxidante relativamente fraco, pela lentidão do processo de inversão. Porém, se houver a redução do O_2 por via univalente, que não envolva nenhuma inversão da rotação de elétron, esta

predominaria sobre a redução bivalente. A redução completa de O_2 , via univalente, resulta na formação do radical $O_2^{\bullet -}$, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil ($\bullet OH$). Este último, por sua vez, é extremamente reativo, e tóxico mesmo em concentrações relativamente baixas, os tecidos, procuram constantemente controlar e remover estes intermediários reativos, através de um complexo sistema de defesas antioxidantes no sentido de evitar a geração de $\bullet OH$ (Figura 10). As principais vias de formação do radical hidroxil, a ERO mais reativa e deletéria, são a reação de Fenton (através da catálise de metais de transição como o ferro e o cobre sobre o peróxido de hidrogênio), e a reação de Haber-Weiss, pela combinação entre o peróxido de hidrogênio e ânion superóxido (Halliwell & Gutteridge, 1999).

FIGURA 10. MECANISMO DE DEFESA ENZIMÁTICA PARA PREVENÇÃO DO ACÚMULO DE INTERMEDIÁRIOS REATIVOS DE OXIGÊNIO.



FONTE: Adaptado de MUZYKANTOV, 2001.

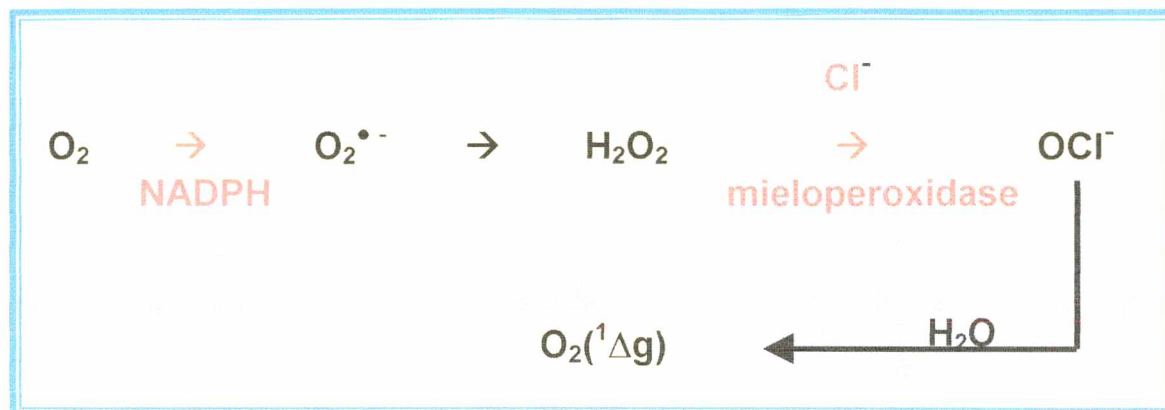
As principais origens biológicas do $O_2^{\bullet -}$ já são conhecidas. Sabe-se que enzimas como xantina oxidase (XO) (Fridovich, 1970 apud Del Maestro, 1980), aldeído oxidase, diidro-orótico desidrogenase, flavina desidrogenase (Fridovich, 1978a) e peroxidases (Halliwell, 1977 apud Del Maestro, 1980), são conhecidas catalisadoras de reação de oxidação para redução de O_2 em $O_2^{\bullet -}$. A auto-oxidação de compostos como catecolaminas (Cohen & Heikkila, 1974), assim como ferredoxina (Misra & Fridovich, 1971 apud Del Maestro, 1980), resultam,

também, em $O_2^{\bullet-}$. As mitocôndrias e os cloroplastos formam fluxos contínuos de $O_2^{\bullet-}$ (Asada et al., 1977), constituindo a principal fonte biológica destas ERO (Halliwell & Gutteridge, 1999).

O radical ânion superóxido pode reagir como agente redutor e como oxidante, sendo reduzido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Pode oxidar, também, o ácido ascórbico e a adrenalina (Fridovich, 1975). No entanto, a reação de dismutação parece ser a mais importante, formando H_2O_2 e O_2 . Esta reação, conhecidamente rápida, quando na presença de SOD intracelular, pode ser aumentada a um fator de 10^9 (Fridovich, 1978a).

Células antiinflamatórias, como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e monócitos, reduzem o O_2 em $O_2^{\bullet-}$, após receberem estímulo resultante da presença de agentes como fungos, bactérias, etc. Esta redução é promovida pela enzima NADPH oxidase presente na superfície destas células (Dewald et al., 1979). Esta habilidade é capaz de promover a morte destes agentes que estimularam a redução. Este processo de redução é muito importante, pois indivíduos incapazes de reduzir O_2 , como os portadores de granulomatose crônica, sofrem infecções bacterianas de repetição, podendo vir a morrer (Babior, 1978). De acordo com Del Maestro (1980), os mecanismos através dos quais a liberação de $O_2^{\bullet-}$ resulta em efeitos bactericidas, são ainda pouco conhecidos. Provavelmente estão relacionados à nova geração de espécies de ERO mais reativas, tais como $\bullet OH$, $O_2 (^1 \Delta g, \text{oxigênio singlete})$ e hipoclorito (OCl^-). A proporção de $O_2^{\bullet-}$ produzida é liberada no espaço extracelular, e a formação de H_2O_2 resulta de dismutação espontânea. O $\bullet OH$ extracelular e, possivelmente a formação de $O_2 (^1 \Delta g)$, pode resultar de uma interação de H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$. A mieloperoxidase, usando H_2O_2 e Cl^- como substrato, pode produzir OCl^- e, subseqüentemente, $O_2 (^1 \Delta g)$ (Figura 11) (Del Maestro, 1980).

FIGURA 11. A NADPH OXIDASE, UMA ENZIMA DE LIGAÇÃO DE SUPERFÍCIE NOS LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES QUE REDUZ O_2 EM $O_2^{\bullet-}$ USANDO NADPH COMO ELETRODOADOR



FONTE: Adaptado de Del Maestro, 1980.

As ERO, dependendo do local onde ocorrem, podem originar diferentes tipos de lesão. No espaço extracelular, elas podem promover a degradação do ácido hialurônico (Del Maestro et al., 1979) e do colágeno (Greenward & Moy, 1979), interferindo, de forma notável, na permeabilidade e nas características estruturais do tecido. Experiências *in vitro* têm demonstrado que membranas lisossômicas podem ser rompidas por um fluxo de ERO (Fong et al., 1973). O DNA também pode ser degradado por um fluxo de radicais podendo levar à carcinogênese (Morgan et al., 1976). Agentes quimioterápicos e antineoplásicos (Fridovich, 1978a) bem como compostos como paraquat e tetracloreto de carbono (Recknagel et al., 1977), têm sido ligados à habilidade de alterar o fluxo de ERO intracelular e/ou na formação dos mesmos. Além disso, a interação de ERO com as biomembranas e outros compostos do meio intracelular, pode determinar o tipo e grau da lesão sofrido por uma célula em processos patológicos específicos. Até o presente, mais de duas centenas de patologias já foram descritas envolvendo, direta ou indiretamente a geração de ERO (Halliwell & Gutteridge, 1999).

1.6 DEFESAS ANTIOXIDANTES

As células possuem substâncias antioxidantes, que segundo Halliwell & Gutteridge (1999), são utilizadas como defesas através do retardamento ou da inibição da oxidação de um substrato, mesmo quando em baixa concentração em relação ao substrato oxidável. Estas substâncias são capazes de inativar ERO, podendo estas defesas serem enzimáticas ou não (Sies, 1993).

O sangue humano é o meio de transporte de LDL e contém, assim como outros tecidos, um vasto grupo de defesas antioxidantes. São constituídas principalmente pelas enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase. Estes antioxidantes estão presentes em quantidades relativamente grandes, quando comparados aos outros componentes enzimáticos, tanto no sangue quanto em outros tecidos. Entre os antioxidantes não-enzimáticos, o mais importante e abundante o α -tocoferol, que é a forma mais ativa (química e biologicamente) de vitamina E, exógena, além da glutatona reduzida (GSH), que é endógena (Halliwell & Gutteridge, 1999). Outros antioxidantes não-enzimáticos exógenos importantes são o ácido ascórbico, o β -caroteno, e diversos tipos de flavonóides. O ácido ascórbico é particularmente importante na inibição da peroxidação lipídica induzida por diferentes tipos de estresse oxidativo e na regeneração do radical tocoferoxil oriundo da reação da vitamina E com as ERO (Frei, 1999).

Baixos níveis de antioxidantes como vitamina E, C e selênio estão associados às doenças coronárias. Os dados em humanos quanto à correlação da vitamina E ou C e as doenças do coração são escassos, entre tanto, em primatas, a deficiência de vitamina E conduz a cardiomiopatias e, em mamíferos, a lesões fibroarteriais, com morte súbita, que podem ser prevenidas com o uso da combinação vitamina E e selênio. A função do selênio é a de ajudar a enzima glutatona peroxidase na remoção de peroxilipídeos (Riemersma et al., 1990).

1.6.1 Enzimas Antioxidantes

Conforme já mencionado, entre as formas enzimáticas de defesa antioxidante existentes, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathiona peroxidase, que constituem a defesa primária endógena para neutralização das ERO, sendo estas as mantenedoras do baixo nível de radicais superóxido e de peróxido de hidrogênio formadores do radical hidroxil (Boveris & Cadenas, 1997).

Estes mecanismos enzimáticos podem efetuar a redução bivalente e tetravalente de O_2 para H_2O . A maior parte (~98 %) do O_2 reduzido por células aeróbicas é feita por tetravalência pela enzima citocromo-oxidase (Antonini et al., 1979), prevenindo o excesso de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e $\bullet OH$, disponível em meio celular (Figura 10).

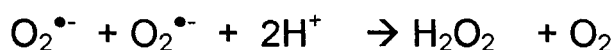
1.6.1.1 Superóxido Dismutase (SOD)

O chamado estresse oxidativo, que consiste num excesso de geração de ERO e/ou na diminuição das defesas antioxidantes (Halliwell & Gutteridge, 1999), está implicado em muitos processos bioquímicos patológicos, como doenças degenerativas do sistema nervoso, cardiovasculares, inflamação, câncer, etc. No entanto, a degradação do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio parece representar um importante sucesso na terapêutica. Tratamentos usando a enzima SOD parecem ser uma promissora alternativa à terapia convencional e muitas tentativas têm sido feitas para o tratamento de doenças ligadas ao estresse oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 1999; Muzykantov, 2001).

A administração de SOD pode ter ação primordial na neutralização das ERO, já que ela faz parte importante do sistema de proteção enzimático contra ERO, dismutando o ânion superóxido (Del Maestro, 1980) e, desta forma, prevenindo e atenuando a ação deletéria do radical hidroxil ($\bullet OH$) formado via

reação de Fenton e de Haber-Weiss (Baker et al., 1997; Halliwell & Gutteridge, 1999).

As SODs compõe uma família de metaloenzimas antioxidantes presentes nas células dos mamíferos. Estas enzimas convertem o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio que subseqüentemente é degradado pela catalase, originando água e oxigênio molecular (O₂) (Mc Cord & Fridovich, 1969; Muzykantov, 2001). Este processo envolve duas moléculas de ânion superóxido onde há redução de uma e oxidação de outra (Fridovich, 1979), como mostra o esquema da reação, abaixo:



O ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio são apenas moderadamente reativos com outras moléculas biológicas, mas sua alta produção e conversão a potentes oxidantes, tais como o radical hidroxil, ácido hipocloroso e peroxinitrito (ONOO⁻), podem iniciar e manter uma condição de estresse oxidativo (Muzykantov, 2001; Rengel et al., 2002).

Mecanismos univalentes de redução de O₂ em células aeróbicas também são importantes (Britton et al., 1978; Fridovich, 1978a, 1978b). Este sistema, com sua variedade de SODs, parece resultar da evolução no combate do fluxo constante de O₂^{•-}.

A SOD pode ser encontrada ainda, em três isoformas metaloprotêicas: 1) exclusivamente em bactérias, com átomo de ferro no seu grupo prostético; 2) em bactérias e mitocôndrias, com átomo de manganês; e 3) na forma citosólica dos eucariontes, na qual possuem átomos de zinco e cobre junto a seus grupos prostéticos (Fridovich, 1979).

Proteínas são promissoras no campo da terapêutica e normalmente administradas na forma injetável. A via oral, apesar de ser um método de fácil administração e liberação de variadas quantidades de proteínas, tem a desvantagem de desnaturar e degradá-las devido à passagem no trato digestivo.

Para aproveitamento das facilidades desta via de administração, as proteínas podem ser protegidas por encapsulamento em membrana semi-permeável que as difunda paulatinamente (Polk et al., 1994).

As propriedades farmacológicas e o mecanismo de ação da SOD podem ser entendidos como função de suas características farmacocinéticas, exceto pela sua pobre biodisponibilidade após sua administração oral (Giri & Misra, 1984 apud Regnault et al., 1995), atribuída à sua curta meia-vida (Conforti et al., 1986 apud Regnault et al., 1995) e à sua baixa afinidade com a membrana celular (Igarashi et al., 1992 apud Regnault et al., 1995), bem como Para solucionar tais desvantagens, o encapsulamento da SOD tem sido estudado com o objetivo de protegê-la da ação do suco gástrico e para melhorar a sua penetração na célula. A SOD, quando encapsulada, incrementa sua biodisponibilidade tanto no sangue quanto em exsudatos celulares (Regnault et al., 1995). De acordo com este autor, o uso destas preparações pode incrementar a afinidade da SOD com tecidos ou ativar receptores ligados ao metabolismo celular, o que o torna uma importante opção nas terapias baseadas nesta enzima antioxidante.

A SOD tem sido estudada por diversas vias de administração como instilação, liberação sistêmica parenteral controlada, sub-cutânea e através de vias conjugadas (Greenwald, 1990 apud Regnault et al., 1995) e por via oral (Regnault et al., 1995; Regnault et al., 1996). Regnault et al. (1995), observaram que pequenas doses de SOD, via oral, podem ser pró-inflamatórias, mas a repetição da administração oral contrapõe-se a este efeito. A repetição da administração deste fármaco também pode ser benéfica no tratamento dos prejuízos induzidos por estados patológicos crônicos que envolvem EROs.

A SOD tem sido ministrada via intra-articular contra artrose e osteoartrites; via intracavernosa, contra diversas doenças; intramural, contra cistites; intramuscular, contra cistite, fibrose e prostatites; via intratecal, contra escleroses; intravenosa, por ocasião de transplante de órgãos; tópica, contra fibrose, utilizando-se Orgotein® (Thomson Micromedex, 2002), e via sub-lingual

como suplemento antioxidante, com o uso de SOD ® (MedQuest Pharmacy, 2002), e no tratamento de periodontite e via oral contra inflamações musculares, para uso veterinário com o emprego de DISMUTASE ® (BioVet Int., 2002).

Para que a SOD atue eficientemente contra EROs ela deve estar em concentração adequada no local e no momento em que os radicais livres estão sendo gerados (Swart et al., 1999). Efeitos terapêuticos da SOD têm sido registrados *in vitro* e *ex vivo* durante experimentos de perfusão cardíaca (Dumoulin et al., 1996). *In vivo*, os efeitos de SOD exógena somente foram encontrados nos rins (Adachi et al., 1986) e após sua administração local no pulmão (Davis et al., 1994). *In vivo*, o acúmulo de SOD nos rins (Baret et al., 1984) dá-se após a filtração glomerular e reabsorção pelas células do túbulo proximal (Baret et al., 1984). Devido à rápida eliminação da SOD do plasma pelas células renais, a sua meia-vida plasmática é de apenas 6 minutos (em ratos). Outros órgãos acumulam pobremente esta proteína (Zidenberg-Cherr et al., 1983) e, conseqüentemente, os níveis terapêuticos não são mantidos no plasma ou nos tecidos renais (Swart et al., 1999). De acordo com Corvo et al. (1997), a duração da SOD no plasma humano é de cerca de 30 minutos.

Sistemas específicos de liberação de SOD são promissores e podem preencher os requisitos básicos para que ela atue com precisão nos sítios-alvos (Bayati et al., 1988). A conjugação da SOD a macromoléculas de polietilenoglicol (PEG) a protege da sua eliminação plasmática (Morpurgo et al., 1996), mas não incrementa a sua absorção pelas células-alvo. No entanto, a associação de SOD ao copolímero divinil éter e anidro malêico (DIVEMA), e a manose-SOD facilita a absorção pelas células de Kupffer e endoteliais do fígado. Em animais que receberam SOD não conjugada, nenhum efeito sobre os níveis de EROs nas células fibróticas do fígado foi observado. Em contraste, a produção de EROs intra-hepático foi largamente inibida 1 hora após a administração de manose-SOD ou DIVEMA-SOD. A aplicação de SOD conjugada a polímeros no tratamento de fibrose do fígado pode ser uma atraente forma de terapia contra fibrose hepática (Swart et al., 1999). Estes resultados demonstram claramente a importância de liberadores específicos desta enzima.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o comportamento de cápsulas de quitosana como sistema de liberação da enzima superóxido dismutase (SOD) em meio ácido e alcalino.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Encapsular SOD em gel de quitosana;
- 2) Avaliar a liberação da SOD *in vitro* por cápsulas quitosana/alginato, contendo diferentes volumes (40, 60 e 100 μ L) da enzima SOD (2500 U/mL);
- 3) Avaliar a liberação da SOD *in vitro* por cápsulas de quitosana/alginato, submetidas a diferentes pHs;
- 4) Avaliar a liberação da SOD *in vitro* por cápsulas de glutaraldeído/ quitosana/alginato, submetidas a diferentes pHs;
- 5) Comparar a liberação da SOD *in vitro* por cápsulas de quitosana/ alginato e de glutaraldeído/ quitosana/alginato, submetidas a diferentes pHs.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Ecofisiologia Respiratória do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em Florianópolis, Santa Catarina, no ano de 2002.

3.1 EQUIPAMENTOS E REAGENTES

3.1.1 Equipamentos

As pesagens foram realizadas em balança analítica marca Ohaus modelo AR2140.

Os pHs foram medidos com pH-metro marca Digimed, modelo DM 20.

A avaliação da liberação da enzima SOD por cápsulas de quitosana foi feita com o auxílio de espectrofotômetro marca/modelo GBC 916 UV-visível.

3.1.2 Reagentes

A quitosana foi sintetizada no Laboratório da Faculdade de Farmácia da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), pelo professor Dr. Clóvis Antônio Rodrigues, de quem foi obtida. Seu grau de desacetilação era de 85 %.

O alginato de sódio e o glutaraldeído foram adquiridos do laboratório Vetec Química Final Ltda.

A enzima Superóxido Dismutase (3.896 U/mg), o citocromo c (95%), a xantina (99-100%) e a xantina oxidase (12,4 U/mL) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (Ohio, USA)

3.1.3 Soluções

3.1.3.1 Quitosana (Aiba, 1985)

Para preparação da solução de quitosana 0,1%, dissolveu-se 2 g de quitosana em 200 mL de HCl 0,01M, sob agitação, para melhor dissolução. Após, adicionou-se NaCl até concentrar-se em 117 mM e CaCl_2 até 5 mM. Por fim, com auxílio de NaOH, ajustou-se o pH para 5,9, para se obter uma completa dissolução da quitosana e conseqüente formação do gel.

3.1.3.2 Alginato (Aiba, 1985).

Para preparação da solução de alginato de sódio 1,2 %, dissolveu-se completamente, por meio de agitação, 2,4 g de alginato de sódio em 200 mL de água deionizada. Após, adicionou-se NaCl até concentrar-se em 150 mM.

3.1.3.3 Superóxido dismutase

Para preparação da solução de SOD com 2500 U/mL (utilizado durante todo experimento), dissolveu-se 1,3mg de SOD em 2 mL de solução tampão fosfato pH 7,8, 50mM.

3.1.3.4 Glutaraldeído

A solução de glutaraldeído a 2 % foi fornecida pelo Laboratório da Faculdade de Farmácia da Universidade do Vale do Itajaí, através do Professor Msc. Roberto Dalla Vecchia.

3.1.3.5 Citocromo c

Para preparação da solução de citocromo c 20 mM, dissolveu-se 0,0198 g de citocromo c em 8 mL de solução tampão fosfato de sódio 50 mM com pH, 7,8. Esta solução foi feita no ato e mantida em gelo durante o ensaio.

3.1.3.6 Xantina

Preparou-se uma solução xantina 1 mM, dissolvendo-se 0,012 g de xantina em 8 mL de solução de NaOH 0,001 N.

3.1.3.7 Xantina oxidase

Preparou-se uma solução xantina oxidase 0,2 U/mL, diluindo-se 16,1 μ L de xantina oxidase em 8 mL de solução de NaOH 0,001 N em 1 mL de solução tampão fosfato de sódio 50 mM com pH, 7,8. Esta solução foi feita no ato e mantida em gelo durante o ensaio.

3.1.3.8 Outras soluções

A solução de tampão fosfato 7,8 (50 mM, 0,1 mM DPTA) e a solução de NaOH 0,001 N foram fornecidas pelo Laboratório de Ecofisiologia Respiratória do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.1.3.9 Meios de Liberação

Os meios de liberação utilizados neste trabalho, ou seja as soluções tampão fosfato de sódio, pH 2,0; 7,4 e 8,0, foram fornecidos pelo Laboratório de

Ecofisiologia Respiratória do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Adição de SOD livre (2500 U/mL) em Meio Ácido e Alcalino, para Avaliação da sua Atividade

Da solução de SOD (2500 U/mL) tomou-se alíquotas de 40, 60 e 100 μ L que foram individualmente adicionadas em 1 mL de meio similar ao de liberação da SOD encapsulada, para verificação da atividade da SOD em pH ácido e alcalino, sendo estes meios: 1) Tampão fosfato de sódio pH 2,0; 2) Tampão fosfato de sódio pH 7,4 e 3) Tampão fosfato de sódio pH 8,0.

3.2.2 Preparação da SOD Encapsulada e Inserção em Meio Ácido e Alcalino

Prepararam-se cápsulas com um e dois filmes de revestimento.

Da solução de SOD tomou-se alíquotas de 40, 60 e 100 μ L que foram individualmente misturadas com solução de alginato, de forma a se obter 100, 150 e 250 U de SOD em um volume final de 200 μ L da mistura (alginato+SOD), respectivamente. Cada uma destas misturas foi gotejada com uma seringa em 10 mL da solução de quitosana contida em Becker de 50 mL. Tomou-se o cuidado de não sobrepor as gotas, evitando o aglomeramento das cápsulas. Cerca de 10 minutos após o final do gotejamento, separaram-se da solução restante, por filtração, as cápsulas formadas, as quais foram colocadas em 1 mL de meio de liberação, constituindo por: 1) Tampão fosfato de sódio pH 2,0; 2) Tampão fosfato de sódio pH 7,4 e 3) Tampão fosfato de sódio pH 8,0.

Para formação do segundo filme de revestimento, as cápsulas foram colocadas em 10 mL de solução de glutaraldeído por cerca de 10 minutos e, após, incluídas em cada meio de liberação.

3.2.3 Verificação da Atividade da SOD em Meio Ácido e Alcalino

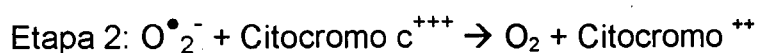
A avaliação da atividade da enzima SOD livre e liberada foi feita com o auxílio de espectrofotômetro a intervalos de 30 minutos, nas três primeiras horas e a cada 60 minutos nas três horas seguintes (180 minutos). Em cada um destes intervalos, utilizou-se de uma nova amostra (alíquota de 20 µL) do meio de liberação onde as cápsulas estavam imersas. O volume de cada alíquota retirada era repostado pela mesma solução tampão fosfato utilizada como meio de liberação.

Avaliou-se a atividade da SOD na amostra (20 µL do meio de liberação) pela inibição da redução do citocromo c em A_{550} , de acordo com Flohé & Ötting (1984).

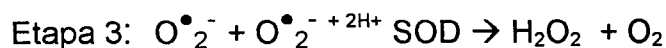
3.2.4 Determinação da Atividade da SOD Livre e Liberada através da Verificação da Inibição da Redução do Citocromo C, após Exposição da Enzima (SOD) à Meio Ácido e Alcalino

Após o preparo das soluções, transferiram-se para uma cubeta 1,66 mL da solução de tampão fosfato pH 7,8, 200 µL da solução citocromo c e 100 µL da solução xantina. Após homogenização, a cubeta contendo a mistura foi levada ao espectrofotômetro para que o instrumento fosse zerado. Uma vez zerado o aparelho, a cubeta recebeu mais 20 µL da solução xantina oxidase. Após constatação de que a leitura variou, no mínimo em intervalos de 0,004 em 0,004, durante 10 segundos, deu-se início ao registro da formação do ânion superóxido, assim realizado: a 1 minuto e 20 segundos do início da leitura, acrescentaram-se

20 µL da amostra (meio onde a enzima SOD (2500 U/mL) livre ou na forma encapsulada foram inseridas) à cubeta no aparelho. Durante mais 1 minuto a amostra foi avaliada, verificando-se a presença de atividade SOD por inibição da redução do citocromo c. A atividade da SOD ou a presença da mesma após liberação foi avaliada pela diferença do coeficiente angular entre as retas, antes e depois da adição de SOD no meio, onde a redução do citocromo c ocorria pela formação do ânion superóxido. A reação que explica melhor a redução do citocromo c está demonstrada a seguir:



Quando se adiciona amostras com SOD na solução contida pela cubeta, a enzima deve reagir com o $\text{O}_2^{\bullet -}$, retardando a redução do citocromo c e promovendo reação de dismutação (Fridovich, 1979):



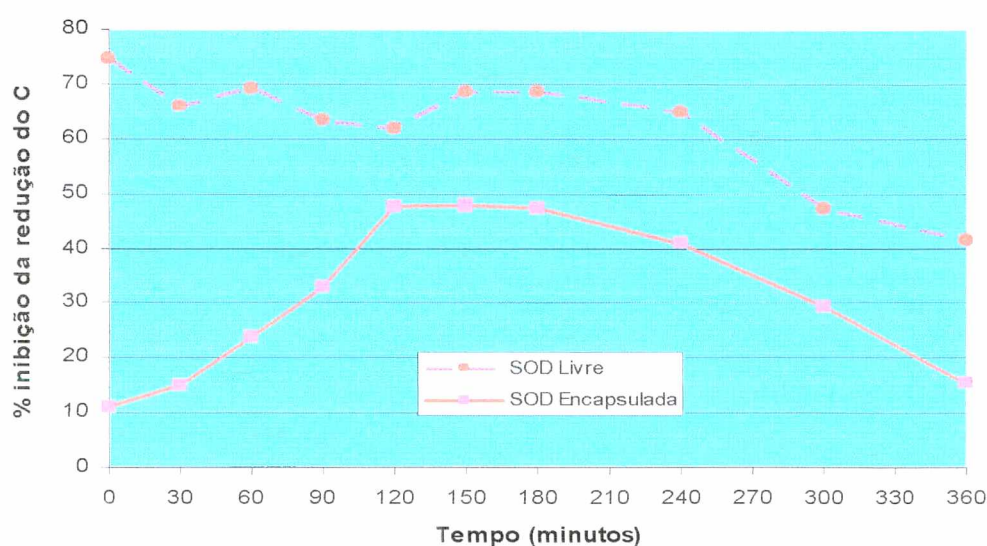
O resultado obtido consistiu na média de tríplexes análises.

4. RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE SOD

A maior inibição da redução do citocromo c foi obtida pela maior quantidade de SOD na amostra. Pela análise da inibição da redução do citocromo c em amostras do meio de liberação (tampão fosfato pH 7,4), onde as cápsulas de quitosana/alginato, contendo 40 μ L de SOD estavam imersas, observou-se que a liberação de SOD, foi crescente desde o tempo 0 até 120 minutos, estabilizando-se entre 120 e 180 minutos, e, a partir daí foi decrescendo até os 360 minutos, onde atingiu valor próximo ao obtido no início da reação. A reação de inibição da redução do citocromo c pela SOD livre ocorreu do início ao fim da análise, com percentuais de até mais de sete vezes aos dos observados pela SOD encapsulada (Gráfico 1).

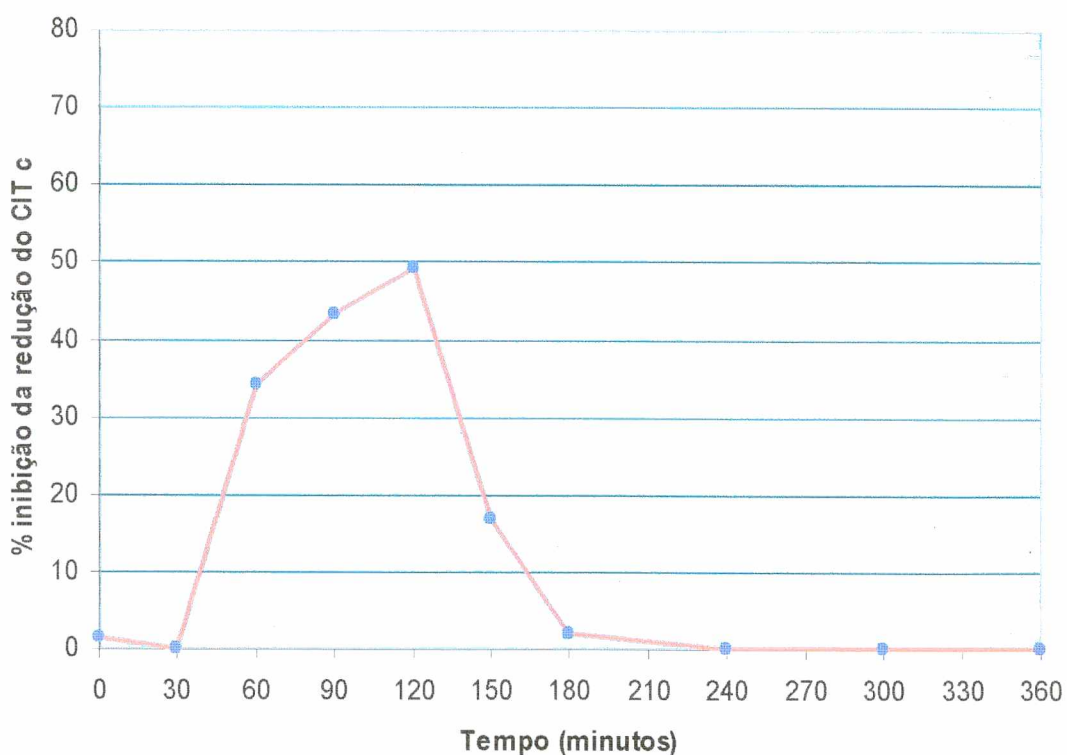
GRÁFICO 1 - PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD (2500 U/mL) PRESENTE EM AMOSTRAS (20 μ L) DE SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO pH 7,4 (1 mL), AVALIADAS DURANTE 360 MINUTOS: 1) CONTENDO 40 μ L DE SOD LIVRE; 2) CONTENDO 40 μ L DE SOD ENCAPSULADA EM QUITOSANA/ALGINATO.



FONTE: Dados primários, 2002.

Pela análise da inibição da redução do citocromo c em amostras do meio de liberação (tampão fosfato pH 7,4), onde as cápsulas de quitosana/alginate, contendo 60 μL de SOD (2500 U/mL) estavam imersas, observou-se que a liberação de SOD, de acordo com o gráfico 2, foi nula nos primeiros 30 minutos e a partir de então crescente, atingindo o máximo aos 120 minutos, para decrescer a zero aos 180 minutos.

GRÁFICO 2 - PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD PRESENTE EM AMOSTRAS (20 μL) DE MEIO DE LIBERAÇÃO (1 mL) (SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO PH 7,4), CONTENDO CÁPSULAS DE QUITOSANA/ALGINATO COM 60 μL DE SOD (2500 U/mL), DURANTE 360 MINUTOS.

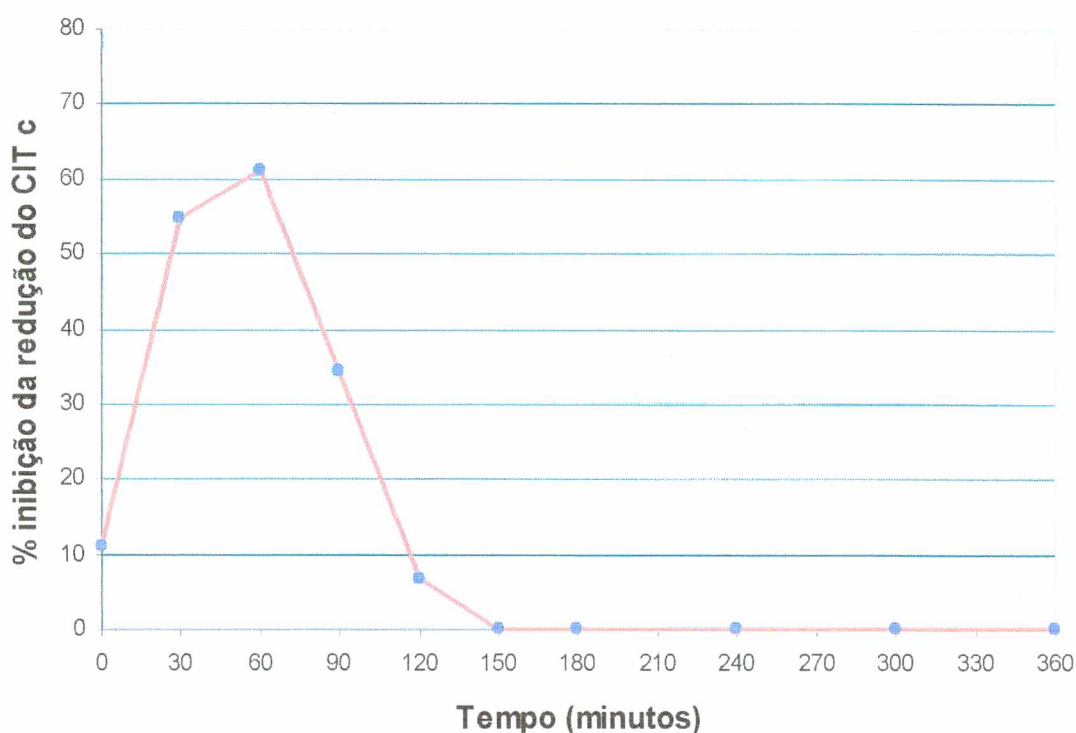


FONTE: Dados primários, 2002.

Pela análise da inibição da redução do citocromo c em amostras do meio de liberação (tampão fosfato pH 7,4), onde as cápsulas de quitosana/alginate, contendo 100 μL de SOD (2500 U/mL) estavam imersas, observou-se que a liberação de SOD, de acordo com o gráfico 3, foi crescente de 0 até 60 minutos,

quando atingiu o máximo, decrescendo até à metade do valor inicial aos 120 minutos, e prosseguindo no decréscimo, e atingindo o valor zero aos 180 minutos.

GRÁFICO 3 - PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD PRESENTE EM AMOSTRAS (20 μ L) DE MEIO DE LIBERAÇÃO (1 mL) (SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO PH 7,4), CONTENDO CÁPSULAS DE QUITOSANA/ALGINATO COM 100 μ L DE SOD (2500 U/mL), DURANTE 360 MINUTOS.

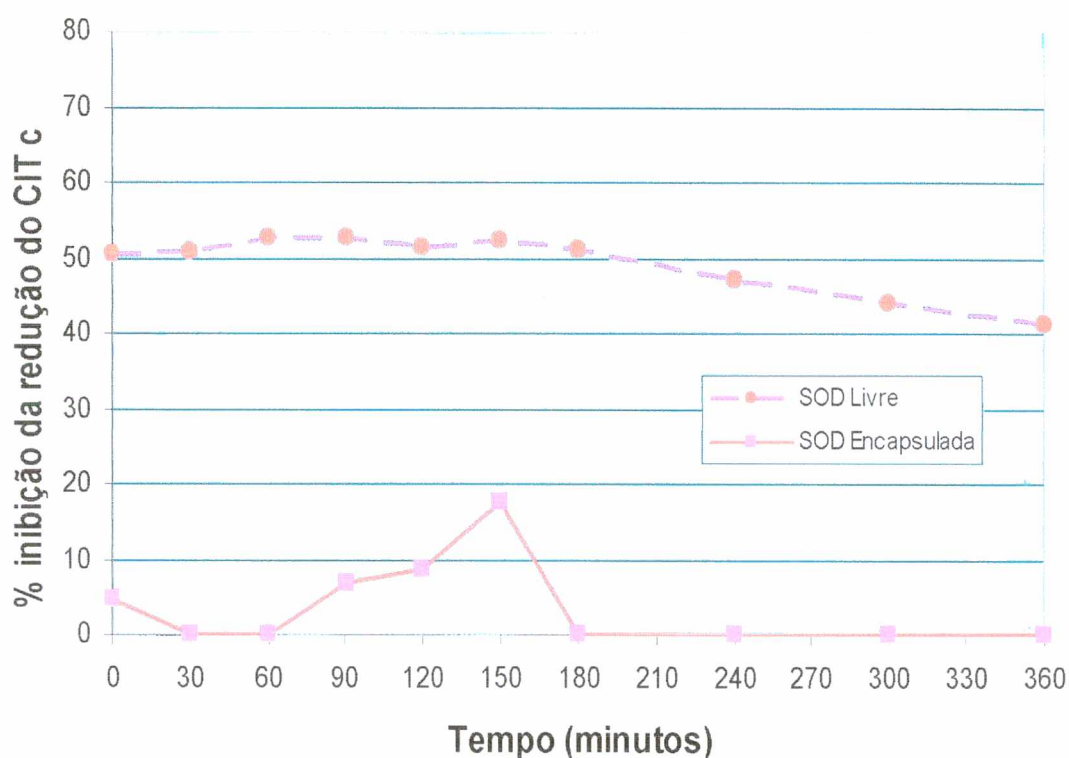


FONTE: Dados primários, 2002.

Pela análise da inibição da redução do citocromo c em amostras do meio de liberação (tampão fosfato pH 2,0), onde as cápsulas de quitosana/alginato, contendo 40 μ L de SOD estavam imersas, observou-se que a liberação de SOD manteve-se nula até os 60 primeiros minutos, e daí foi crescente até atingir o máximo aos 150 minutos, para decrescer até atingir valor zero aos 180 minutos. A reação de inibição da redução do citocromo c pela SOD livre ocorreu do início

ao fim da análise, com percentuais de até 10 vezes aos dos observados pela SOD encapsulada (Gráfico 4).

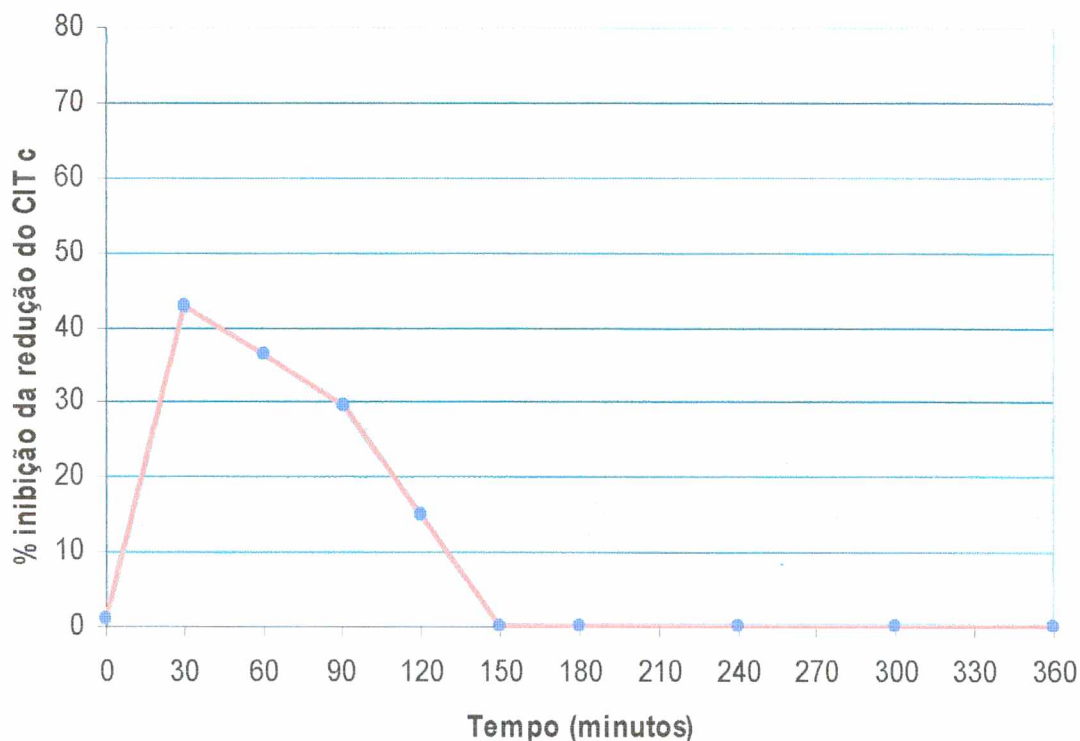
GRÁFICO 4 - PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD (2500 U/mL) PRESENTE EM AMOSTRAS (20 μ L) DE SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO pH 2,0 (1 mL), AVALIADAS DURANTE 360 MINUTOS: 1) CONTENDO 40 μ L DE SOD LIVRE; 2) CONTENDO 40 μ L DE SOD (2500 U/mL) ENCAPSULADA EM QUITOSANA/ALGINATO.



FONTE: Dados primários, 2002.

Pela análise da inibição da redução do citocromo c em amostras do meio de liberação (tampão fosfato pH 2,0), onde as cápsulas de quitosana/alginate, contendo 60 μ L de SOD estavam imersas, observou-se que a liberação de SOD, de acordo com a gráfico 5, foi crescente até atingir o máximo aos 30 minutos, decrescendo até atingir valor zero aos 150 minutos.

GRÁFICO 5 - PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD PRESENTE EM AMOSTRAS (20 μ L) DE MEIO DE LIBERAÇÃO (1 mL) (SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO pH 2,0), CONTENDO CÁPSULAS DE QUITOSANA/ALGINATO COM 60 μ L DE SOD (2500 U/mL), DURANTE 360 MINUTOS.

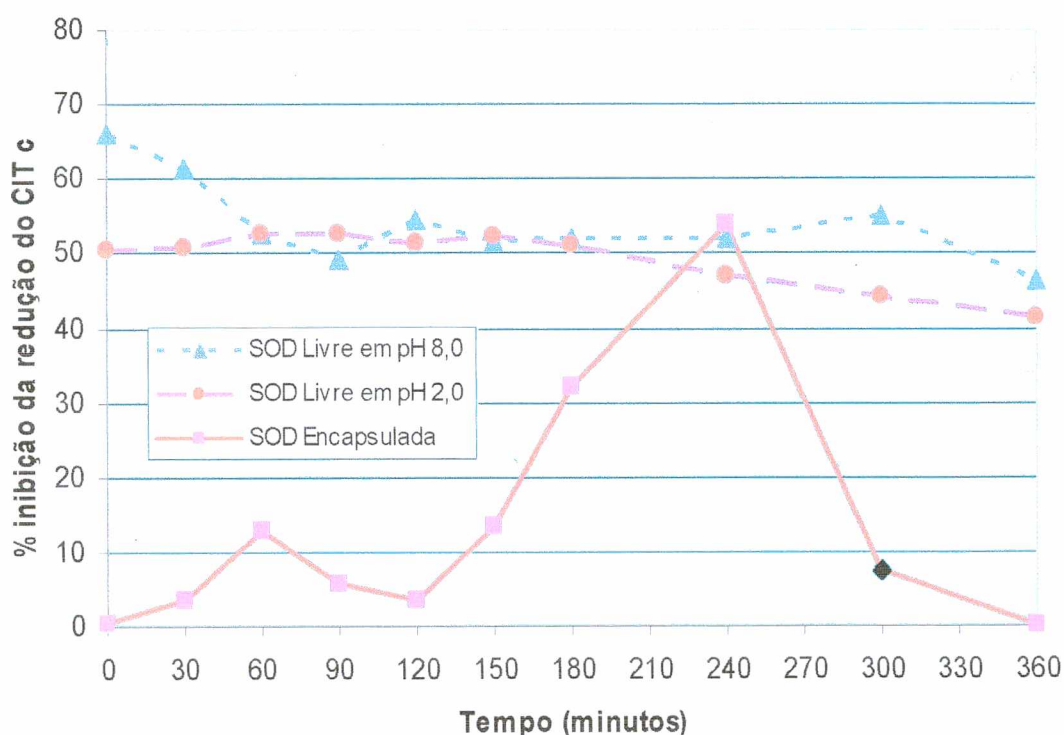


FONTE: Dados primários, 2002.

Pela análise da inibição da redução do citocromo c em amostras do meio de liberação constituídas por tampão fosfato pH 2,0 nos primeiros 120 minutos, e em amostras de meio de liberação constituídas por tampão fosfato pH 8,0, nos minutos subseqüentes até 360 minutos, onde as cápsulas de quitosana/alginate contendo 40 μ L de SOD foram imersas, observou-se que a liberação de SOD, de acordo com o gráfico 6, foi baixa, porém crescente, entre 0 e 60 minutos, atingindo seu máximo em pH 2,0. A partir daí decresceu até aproximar-se de zero aos 120 minutos. Neste momento, ocasião da transferência das cápsulas para solução tampão fosfato pH 8,0, ocorreu rápida e crescente liberação, atingindo o máximo aos 240 minutos, quando decresceu rapidamente para atingir valor zero

aos 360 minutos. Aos 240 minutos observou-se que as cápsulas começaram a se desintegrar, e, aos 300 minutos já não mais existiam. A SOD livre foi ativa desde o início ao fim da observação, sendo mais reativa em pH alcalino que em pH ácido. Quando em pH ácido, a inibição da redução do citocromo c pela SOD livre foi de até 50 vezes maior que a sofrida pela SOD encapsulada.

GRÁFICO 6 - PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD (2500 U/mL) PRESENTE EM AMOSTRAS (20 μ L) DE MEIO DE LIBERAÇÃO (1 mL) (SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO): 1) CONTENDO 40 μ L DE SOD LIVRE EM pH 8,0, DURANTE 360 MINUTOS; 2) CONTENDO 40 μ L DE SOD LIVRE EM pH 2,0, DURANTE 360 MINUTOS; 3) CONTENDO 40 μ L DE SOD ENCAPSULADA EM QUITOSANA/ALGINATO COLOCADAS POR 120 MINUTOS EM pH 2,0, E TRANSFERIDAS PORTERIORMENTE PARA pH 8,0 POR MAIS 240 MINUTOS.

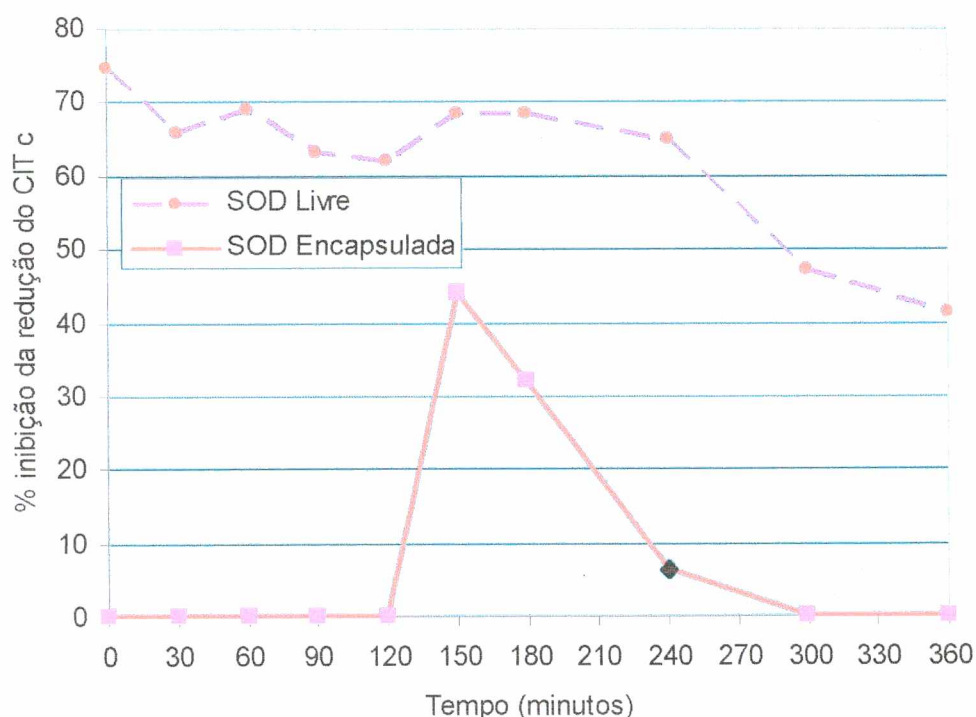


FONTE: Dados primários, 2002.

Pela análise da inibição da redução do citocromo c em amostras do meio de liberação (tampão fosfato pH 7,4), onde as cápsulas de glutaraldeído/quitosana/alginate, contendo 40 μ L de SOD estavam imersas, observou-se que a

liberação de SOD foi nula até 120 minutos, cresceu rapidamente para atingir seu máximo aos 150 minutos e, em decréscimo, atingiu seu mínimo aos 300 minutos. Aos 240 minutos já não foi possível observar as cápsulas, que se desintegraram. A SOD livre foi ativa do início ao fim da observação. Durante o tempo que a SOD encapsulada não foi liberada, o percentual de inibição da redução do citocromo c pela enzima livre foi de 74 a 62 % (Gráfico 7).

GRÁFICO 7 - PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD (2500 U/mL) PRESENTE EM AMOSTRAS (20 μ L) DE SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO pH 7,4 (1 mL), AVALIADAS DURANTE 360 MINUTOS: 1) CONTENDO 40 μ L DE SOD LIVRE; 2) CONTENDO 40 μ L DE SOD ENCAPSULADA EM GLUTARALDEÍDO/ QUITOSANA/ALGINATO.

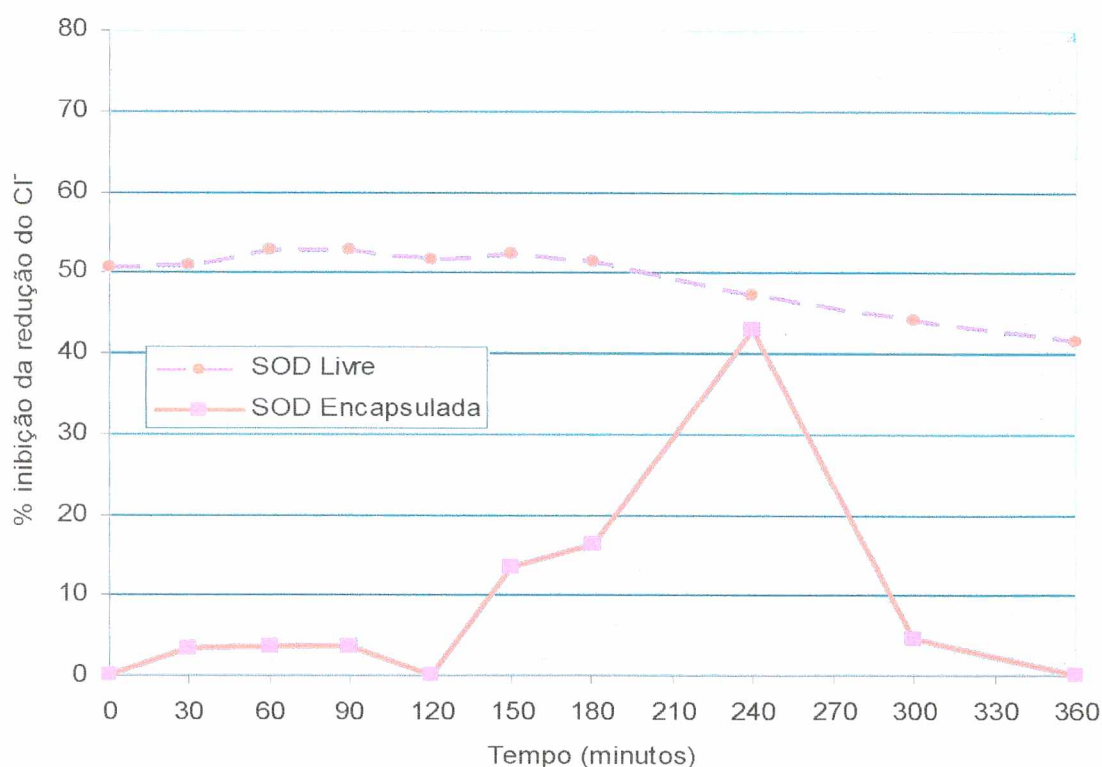


FONTE: Dados primários, 2002.

Pela análise da inibição da redução do citocromo c em amostras do meio de liberação (tampão fosfato pH 2,0), onde as cápsulas de glutaraldeído/ quitosana/alginate, contendo 40 μ L de SOD estavam imersas, observou-se que a

liberação de SOD foi nula até 120 minutos, cresceu até 240 minutos, quando atingiu seu máximo, e decresceu até o valor zero aos 360 minutos. A reação de inibição da redução do citocromo c pela SOD livre ocorreu do início ao fim da análise. Durante o tempo que a SOD encapsulada não foi liberada, o percentual de inibição da redução do citocromo c pela enzima livre atingiu a 50 % (Gráfico 8).

GRÁFICO 8 - PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD (2500 U/mL) PRESENTE EM AMOSTRAS (20 μ L) DE SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO pH 2,0 (1 mL), AVALIADAS DURANTE 360 MINUTOS: 1) CONTENDO 40 μ L DE SOD LIVRE; 2) CONTENDO 40 μ L DE SOD ENCAPSULADA EM GLUTARALDEÍDO/ QUITOSANA/ALGINATO.

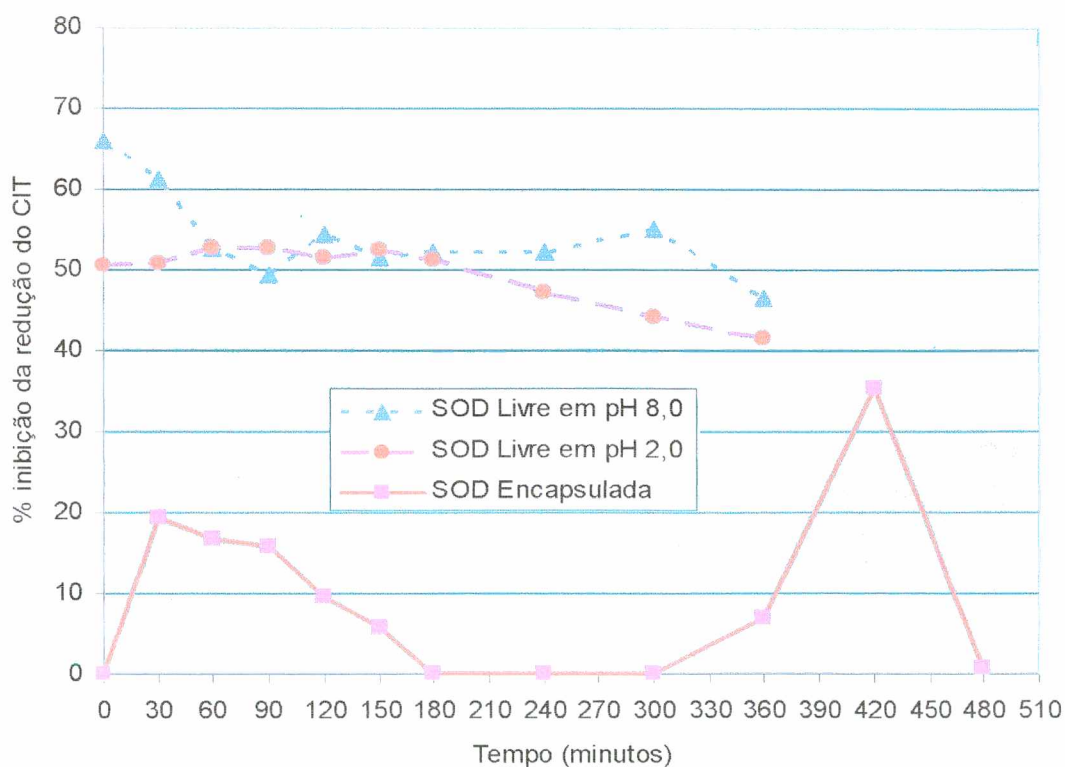


FONTE: Dados primários, 2002.

Pela análise da inibição da redução do citocromo c em amostras do meio de liberação constituídas por tampão fosfato pH 2,0 nos primeiros 120 minutos, e em amostras de meio de liberação constituídas por tampão fosfato pH 8,0, nos

minutos subsequentes até 360 minutos, onde as cápsulas de quitosana/ alginato contendo 40 μL de SOD foram imersas, observou-se que a liberação de SOD foi imediata, porém baixa, durante os 30 primeiros minutos. Decresceu, até atingir valor zero aos 180 minutos, e, assim permaneceu até 300 minutos. Aos 360 minutos constatou-se que a liberação foi reiniciada. Análises seguintes mostraram uma acentuada liberação que culminou aos 420 minutos e decresceu a zero aos 480 minutos. A SOD livre foi ativa durante os 360 minutos observados, sendo mais reativa em pH alcalino que em pH ácido, com atividade sempre superior à observada pela enzima encapsulada (Gráfico 9).

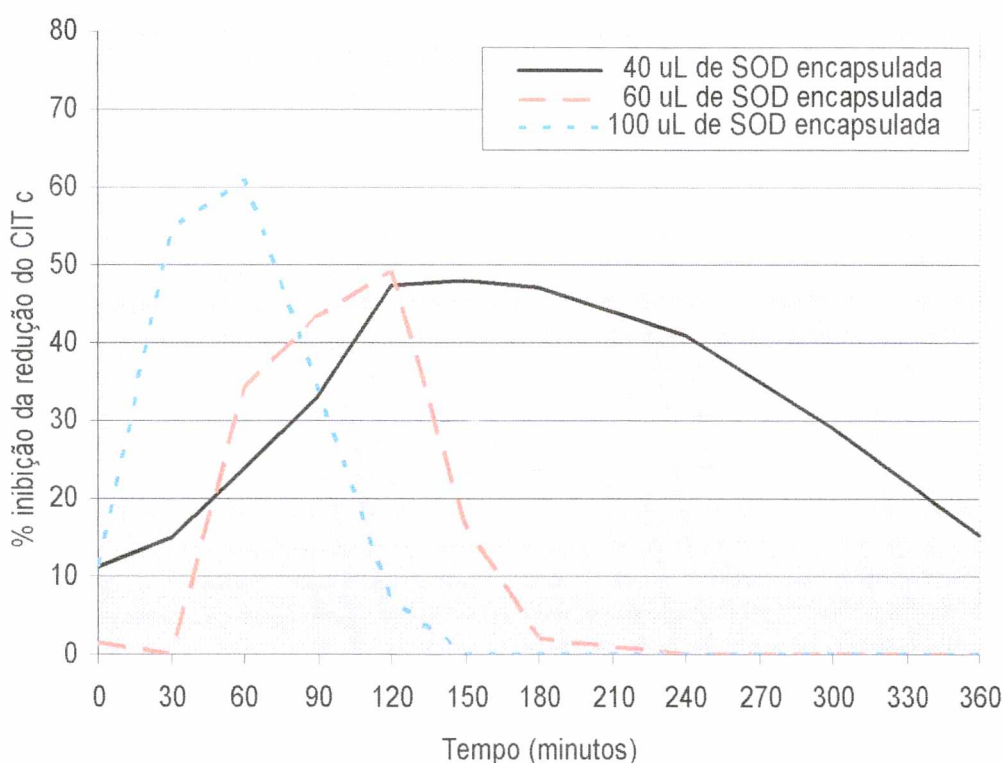
GRÁFICO 9 - PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD (2500 U/mL) PRESENTE EM AMOSTRAS (20 μL) DE MEIO DE LIBERAÇÃO (1 mL) (SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO): 1) CONTENDO 40 μL DE SOD LIVRE EM pH 8,0, DURANTE 360 MINUTOS; 2) CONTENDO 40 μL DE SOD LIVRE EM pH 2,0, DURANTE 360 MINUTOS; 3) CONTENDO 40 μL DE SOD ENCAPSULADA EM GLUTARALDEÍDO/QUITOSANA/ALGINATO COLOCADAS POR 120 MINUTOS EM pH 2,0, E TRANSFERIDAS PORTERIORMENTE PARA pH 8,0 POR MAIS 360 MINUTOS.



FONTE: Dados primários, 2002.

Cápsulas de quitosana/alginate (quit/alg) com menores concentrações de SOD, quando em tampão fosfato pH 7,4, apresentara uma liberação mais prolongada do que aquelas com maiores concentrações da enzima. A maior concentração de enzima promoveu uma instantaneidade na sua liberação (Gráfico 10).

GRÁFICO 10 - PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD EM AMOSTRAS (20 μ L) RETIRADAS DE MEIOS DE LIBERAÇÃO (1 mL) (TAMPÃO FOSFATO PH 7,4), CONTENDO CÁPSULAS DE QUITOSANA/ ALGINATO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA ENZIMA, POR DIFERENTES PERÍODOS.

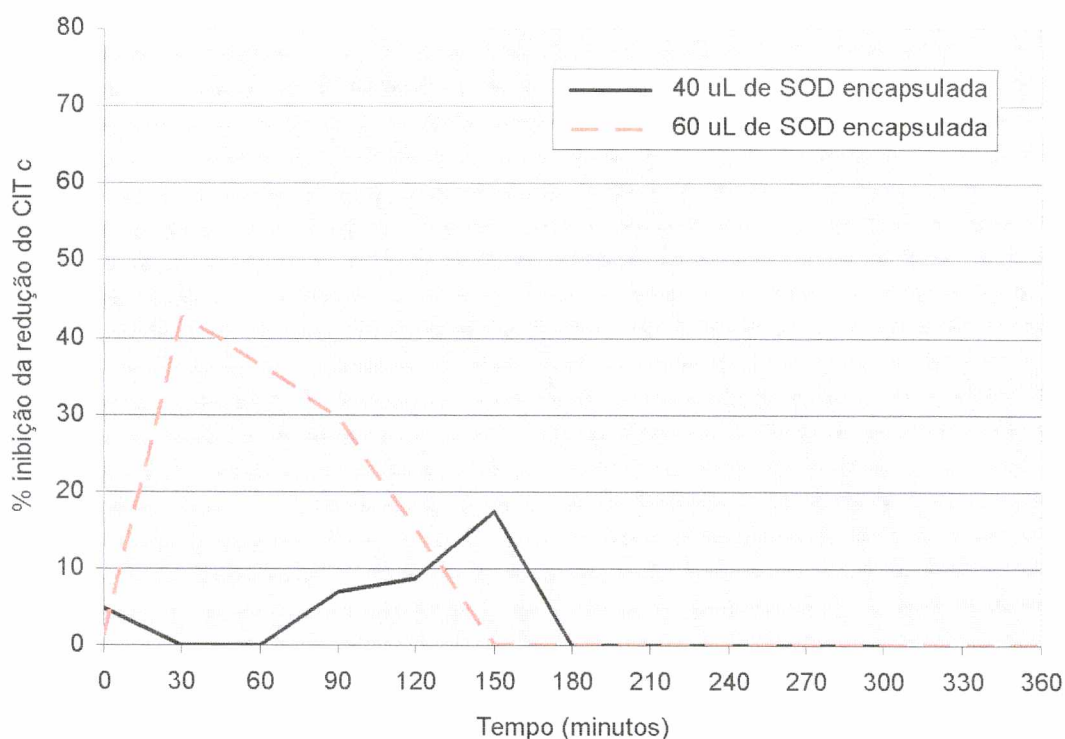


FONTE: Dados primários, 2002.

Cápsulas de quitosana/alginate (quit/alg) com concentrações de 40 e 60 μ L de SOD, quando em tampão fosfato pH 2,0, praticamente não diferiram no prolongamento da liberação. No entanto, cápsulas com a maior quantidade de SOD liberaram instantaneamente grande quantidade de enzima, ao passo que as

de menor quantidade só iniciaram sua liberação a partir dos 60 minutos (Gráfico 11).

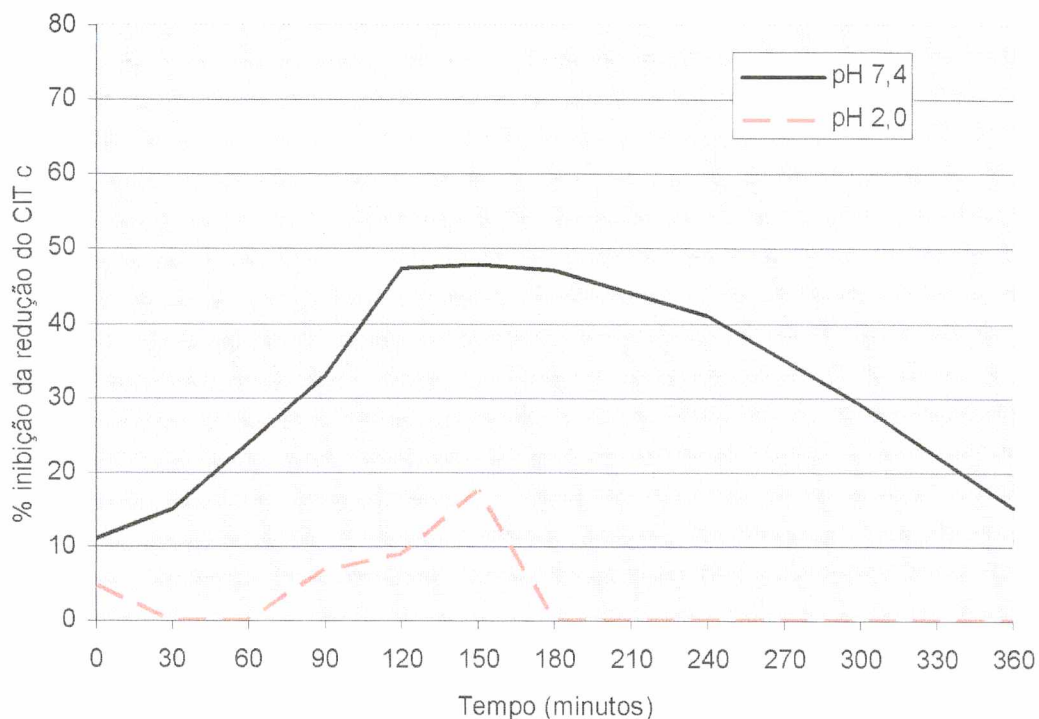
GRÁFICO 11 - PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD EM AMOSTRAS (20 μ L) RETIRADAS DE MEIOS DE LIBERAÇÃO (1 mL) (TAMPÃO FOSFATO PH 2,0), CONTENDO CÁPSULAS DE QUITOSANA/ ALGINATO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA ENZIMA, POR DIFERENTES PERÍODOS.



FONTE: Dados primários, 2002.

Cápsulas de quitosana/alginate (quit/alg), contendo 40 μ L de SOD (2500 U/mL), quando em meio de liberação tampão fosfato pH 7,4 permaneceram liberando por mais tempo a enzima que quando em meio de liberação tampão fosfato pH 2,0. Além disso, naquele meio, a liberação foi maior e se iniciou imediatamente, ao passo que, neste último, a liberação, além de menor, só teve início a partir dos 60 minutos (Gráfico 12).

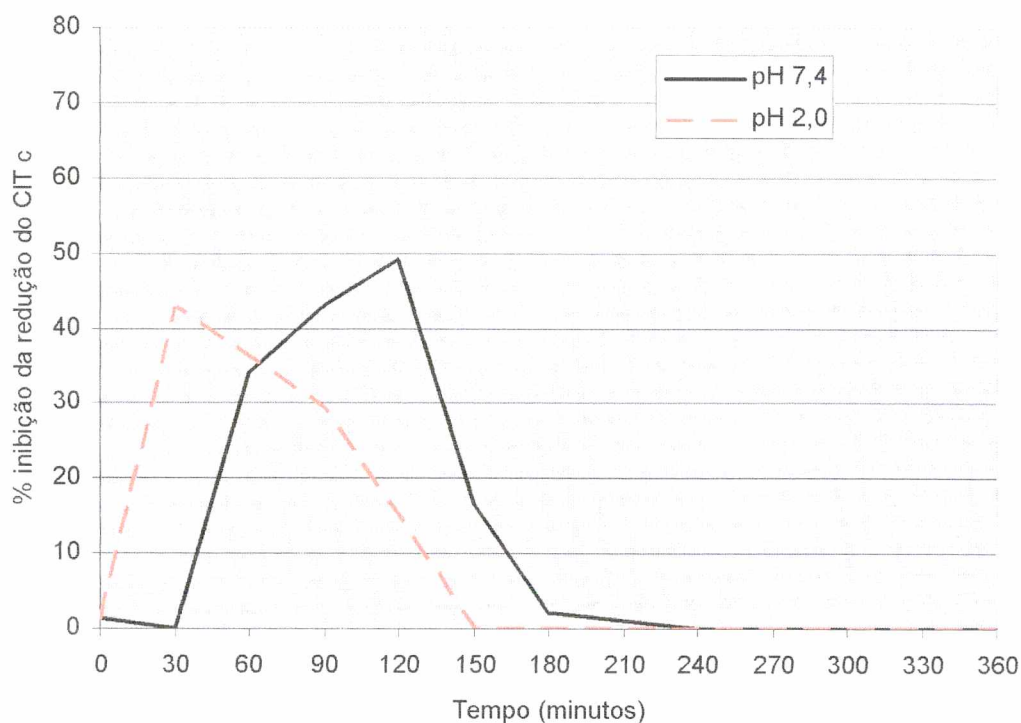
GRÁFICO 12 - PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD EM AMOSTRAS (20 μ L) RETIRADAS: 1) DE MEIO DE LIBERAÇÃO (1 mL) SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO pH 7,4; 2) DE MEIO DE LIBERAÇÃO (1 mL) SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO pH 2,0, CONTENDO CÁPSULAS DE QUITOSANA/ ALGINATO COM 40 μ L DA ENZIMA (2500 U/mL), POR DIFERENTES PERÍODOS.



FONTE: Dados primários, 2002.

Cápsulas de quitosana/alginate (quit/alg), contendo 60 μ L de SOD (2500 U/mL), quando em meio de liberação tampão fosfato pH 7,4 e em meio de liberação tampão fosfato de sódio pH 2,0, não diferiram entre si no tempo de liberação, e, tampouco, na quantidade liberada da enzima SOD. No entanto, em meio de liberação tampão fosfato pH 2,0, o início da liberação foi imediato, ao passo que em meio de liberação tampão fosfato pH 7,4 a liberação iniciou a partir dos 30 minutos (Gráfico 13).

GRÁFICO 13 - PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD EM AMOSTRAS (20 μ L) RETIRADAS: 1) DE MEIO DE LIBERAÇÃO (1 mL) SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO pH 7,4 E 2) DE MEIO DE LIBERAÇÃO (1 mL) SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO pH 2,0, CONTENDO CÁPSULAS DE QUITOSANA/ ALGINATO COM 60 μ L DA ENZIMA (2500 U/mL), POR DIFERENTES PERÍODOS.

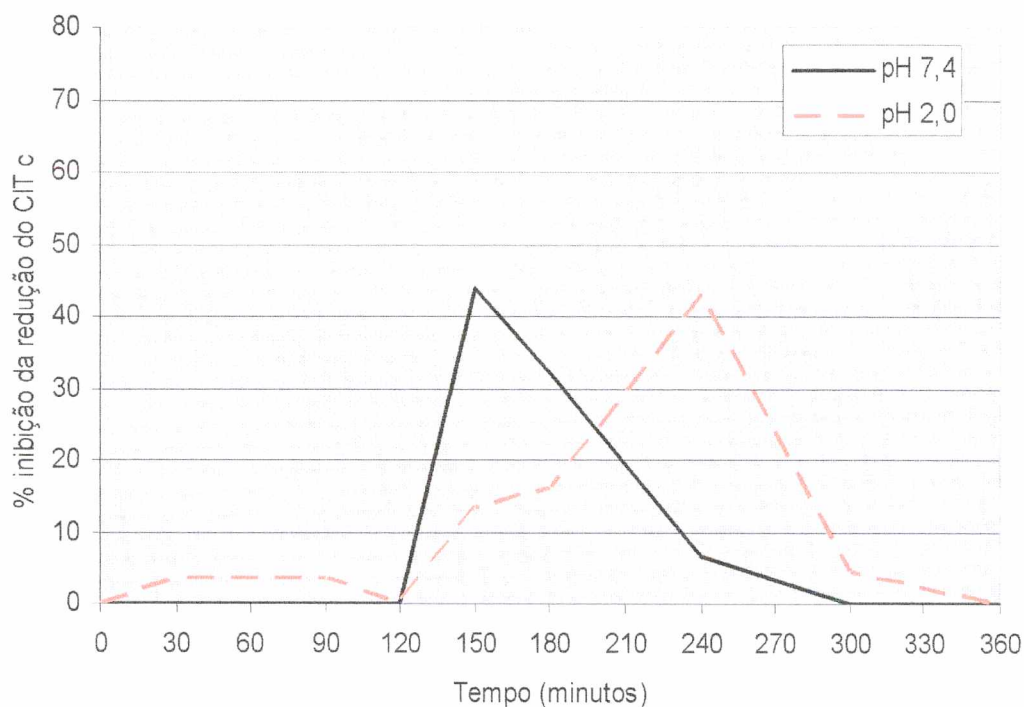


FONTE: Dados primários, 2002.

Cápsulas de glutaraldeído/quitosana/alginate (glut/quit/alg), contendo 40 μ L de SOD, em meio de liberação tampão fosfato pH 7,4 e em meio de liberação tampão fosfato pH 2,0 iniciaram a liberação de SOD ao mesmo tempo, aos 120 minutos e apresentaram semelhante pico de liberação. No entanto, o pico, no primeiro caso ocorreu aos 150 minutos e, no segundo, aos 240 minutos. Em tampão fosfato pH 2,0 a liberação prolongou-se até 360 minutos e em tampão fosfato pH 7,4, encerrou-se aos 240 minutos (Gráfico 14).

Em meio de liberação tampão fosfato pH 7,4 as cápsulas não foram mais vistas aos 240 minutos, ao passo que em tampão fosfato pH 2,0 duraram até o final da liberação.

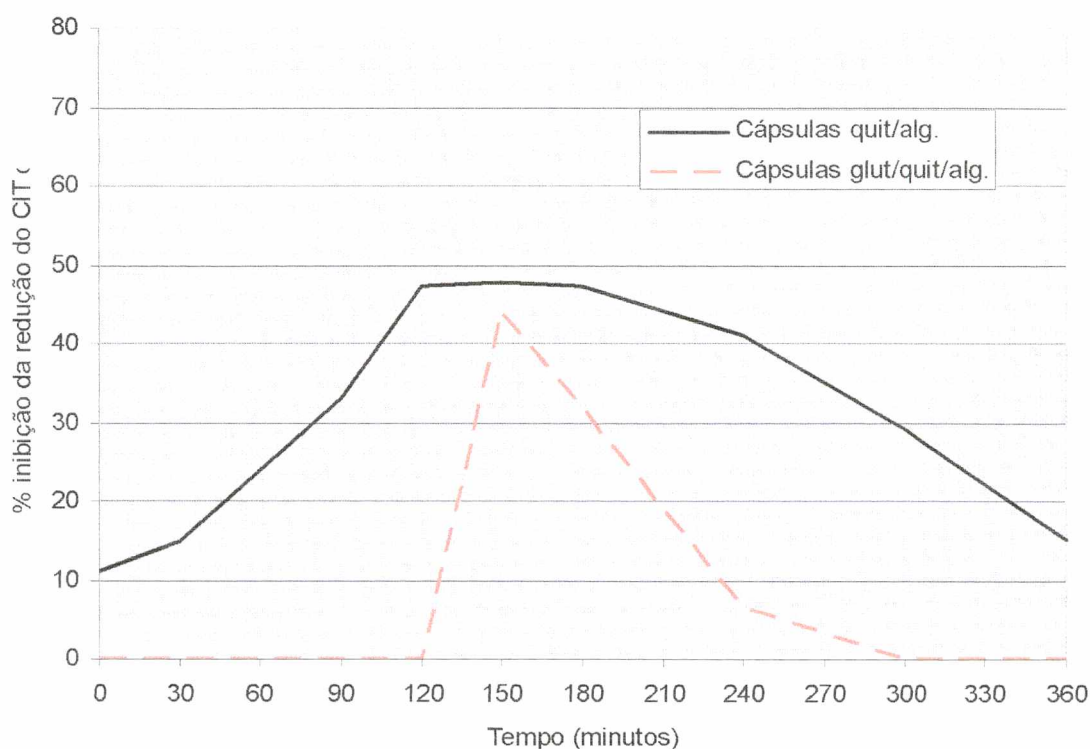
GRÁFICO 14 - PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD EM AMOSTRAS (20 μ L) RETIRADAS: 1) DE MEIO DE LIBERAÇÃO (1 mL) SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO pH 7,4 E 2) DE MEIO DE LIBERAÇÃO (1 mL) SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO pH 2,0, QUE CONTIVERAM CÁPSULAS DE GLUTARALDEÍDO/QUITOSANA/ALGINATO COM 40 μ L DA ENZIMA (2500 U/mL), POR DIFERENTES PERÍODOS.



FONTE: Dados primários, 2002.

Cápsulas de quitosana/alginate (quit/alg) contendo 40 μ L de SOD (2500 U/mL) em meio de liberação tampão fosfato pH 7,4 liberaram a enzima durante todo o tempo de observação, com pico aos 120 minutos. Nas mesmas condições, as cápsulas de glutaraldeído/quitosana/alginate (glut/quit/alg), iniciaram a liberação aos 120 minutos de forma instantânea, com pico máximo em 150 minutos e aos 240 minutos as cápsulas não foram mais encontradas (Gráfico 15).

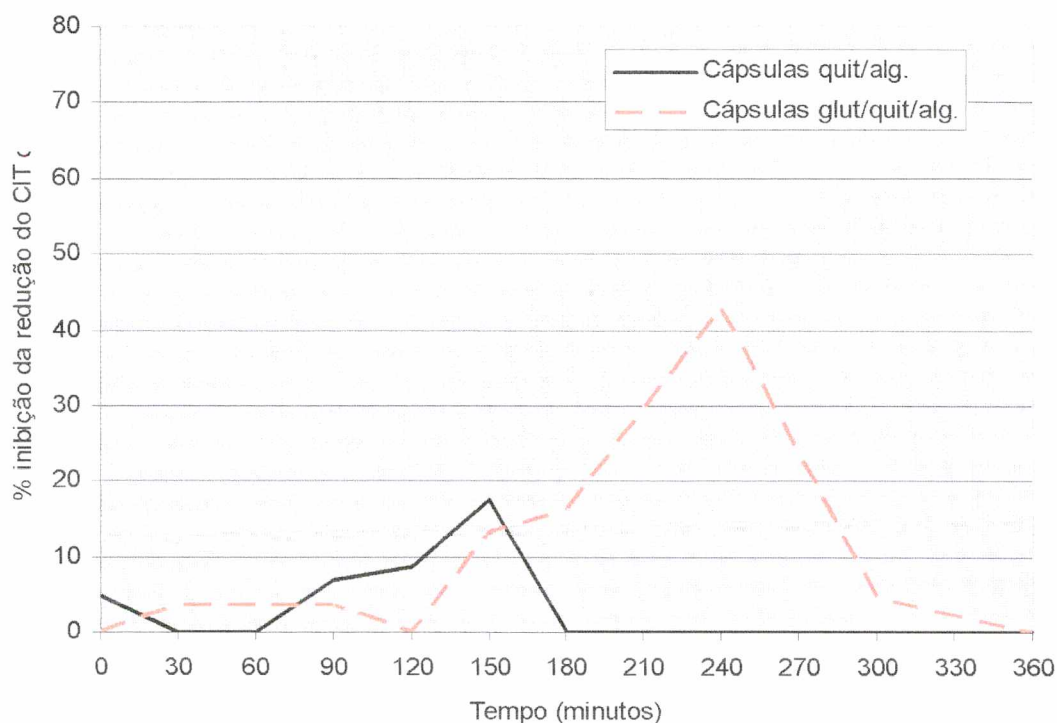
GRÁFICO 15 - PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD EM AMOSTRAS (20 μ L) RETIRADAS DE MEIO DE LIBERAÇÃO (1 mL) SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO pH 7,4, CONTENDO: 1) CÁPSULAS DE QUITOSANA/ALGINATO E 2) CÁPSULAS DE GLUTARALDEÍDO/QUITOSANA/ALGINATO, TODAS COM 40 μ L DA ENZIMA (2500 U/mL), POR DIFERENTES PERÍODOS.



FONTE: Dados primários, 2002.

Cápsulas de quitosana/alginate (quit/alg) contendo 40 μ L de SOD (2500 U/mL) em meio de liberação tampão fosfato pH 2,0 iniciaram a liberação da enzima aos 60 minutos com pico em 150 minutos, não sendo mais detectada a liberação da mesma aos 180 minutos. Nas mesmas condições, as cápsulas de glutaraldeído/quitosana/alginate (glut/quit/alg), iniciaram a liberação aos 120 minutos, de forma lenta e contínua, com o pico em 240 minutos, decresceu até os 360 minutos, quando não mais se detectou a presença de SOD (Gráfico 16).

GRÁFICO 16 - PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD EM AMOSTRAS (20 μ L) RETIRADAS DE MEIO DE LIBERAÇÃO (1 mL) SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO pH 2,0, CONTENDO: 1) CÁPSULAS DE QUITOSANA/ALGINATO E 2) CÁPSULAS DE GLUTARALDEÍDO/QUITOSANA/ALGINATO, TODAS COM 40 μ L DA ENZIMA (2500 U/mL), POR DIFERENTES PERÍODOS.

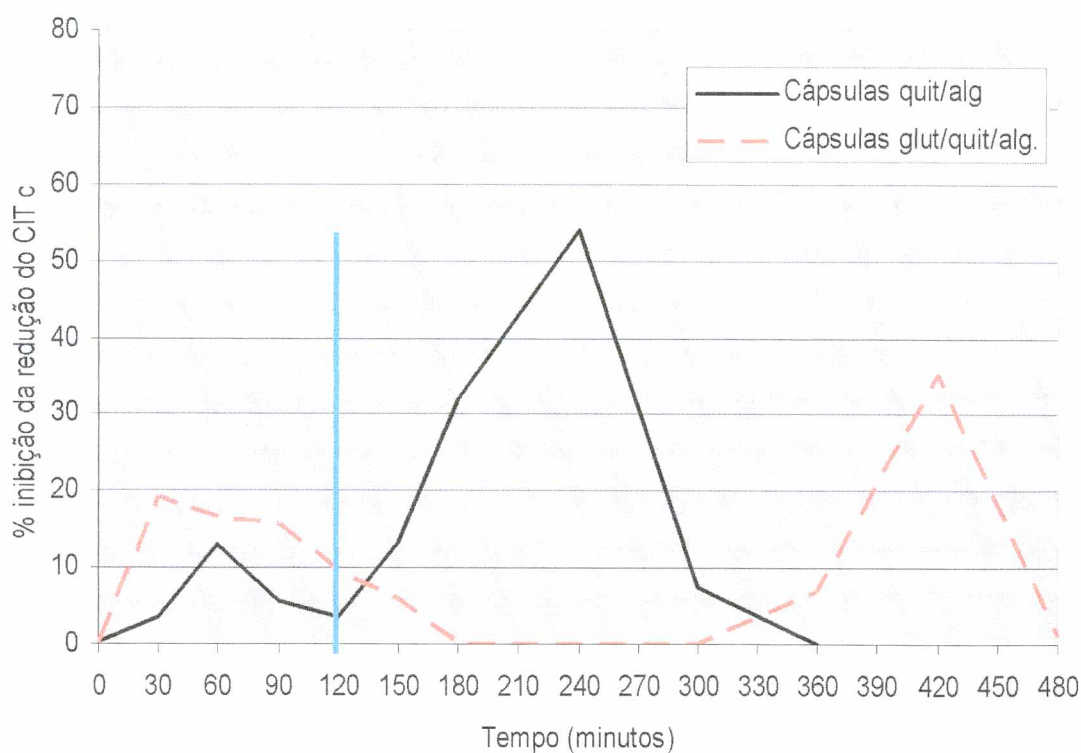


FONTE: Dados primários, 2002.

Cápsulas de quitosana/alginate (quit/alg) contendo 40 μ L de SOD em meio de liberação constituído por tampão fosfato pH 2,0, nos primeiros 120 minutos e em meio de liberação constituído por tampão fosfato pH 8,0 nos minutos subseqüentes, tiveram sua efetiva liberação iniciada aos 120 minutos de forma gradual até 240 minutos, onde atingiu o pico, vindo a decrescer até 300 minutos, quando não mais se detectou a presença das cápsulas. Nas mesmas condições, cápsulas de glutaraldeído/quitosana/alginate (glut/quit/alg), apresentaram uma liberação repentina aos 30 primeiros minutos, seguida de um decréscimo até 180 minutos, quando atingiu valor zero para reiniciar a liberação

crecente da enzima aos 300 minutos, atingindo o pico aos 420 minutos para subsequente queda, zerando em 480 minutos (Gráfico 17).

GRÁFICO 17 - PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO CITOCROMO C PELA SOD EM AMOSTRAS (20 μ L) RETIRADAS DE MEIOS DE LIBERAÇÃO (1 mL) SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO pH 2,0, ONDE AS CÁPSULAS DE QUITOSANA/ALGINATO E DE GLUTARALDEÍDO/QUITOSANA/ALGINATO CONTENDO 40 μ L DA ENZIMA (2500 U/mL), PERMANECERAM POR 120 MINUTOS, E POSTERIORMENTE TRANSFERIDAS PARA SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO Ph 8,0, NOS MINUTOS SUBSEQÜENTES.



FONTE: Dados primários, 2002.

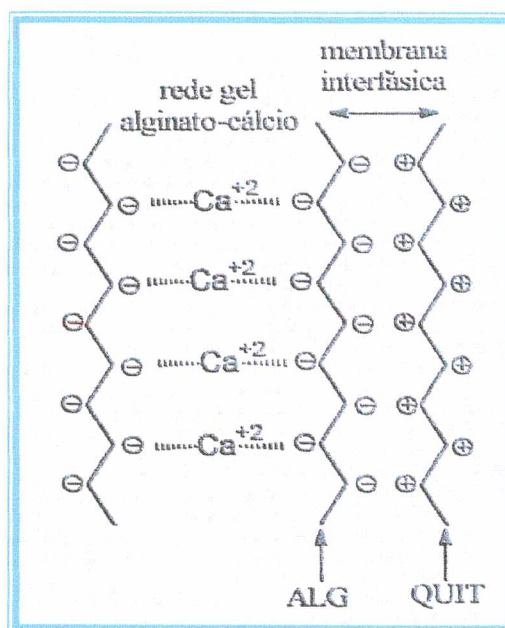
5 DISCUSSÃO

O comportamento da SOD quanto à inibição da redução do citocromo c quando exposta a pH ácido e alcalino revela que o meio não foi capaz de desativá-la (Gráficos 1, 4, 6, 7, 8 e 9). Sugere, ainda, que os resultados da inibição do citocromo c pela SOD encapsulada é fruto do controle de sua liberação gerado pelas cápsulas que a continham.

O menor percentual de redução do citocromo c ocorrido quando a enzima não encapsulada foi exposta ao meio ácido que quando em meio alcalino, pode ser devido à sua parcial desnaturação por aquele meio. No entanto, o baixo pH (2,0) do meio não foi capaz de desativá-la de forma a interferir na sua atividade enzimática. Tal comprovação demonstra que a atuação da enzima encapsulada resultou da liberação controlada pelas cápsulas e não por reativação da enzima.

Considerando-se que a liberação da enzima pelas cápsulas com maiores concentrações de SOD em solução tampão pH 7,4 foi menos prolongada que a realizada pelas cápsulas com menores concentrações da enzima (Gráfico 10), pode-se concluir que o prolongamento da liberação é dependente da quantidade de alginato presente nas cápsulas. Nas cápsulas com maiores concentrações da solução de SOD, a quantidade da solução de alginato foi menor que nas cápsulas com menor concentração da enzima. De acordo com Daly & Knorr (1988) e Lee et al. (1996), ocorre uma interação entre o alginato e a quitosana para formação da membrana encapsuladora (Figura 12). Assim, é provável que se obtenha um prolongamento da liberação pelas cápsulas contendo maiores quantidades de enzima pela adequada concentração de alginato.

FIGURA 12 - ESQUEMA DA REDE QUE FORMA A MEMBRANA DA CÁPSULA DE QUITOSANA/ALGINATO.



FONTE: TAY et al., 1993.

As implicações quanto ao prolongamento da liberação da enzima pelas cápsulas estudadas, em relação à quantidade de enzima encapsulada, observadas em solução tampão pH 7,4 (Gráfico 10), repetiram-se na solução tampão fosfato pH 2,0, conforme gráfico 11. Não se observou dificuldade em encapsular 40, 60 e 100 μL de SOD em cápsulas de quitosana/alginato. De acordo com Rengel et al. (2002), o percentual de eficiência no encapsulamento de SOD está ligado à sua concentração. Estes autores observaram que o maior incremento da eficiência de encapsulamento ocorreu nas concentrações de 0,50 a 0,75 mg de SOD por mL, utilizando uma concentração de SOD 3920 U/mg, sendo que concentrações maiores provocaram um decréscimo na eficiência do encapsulamento causado pelo saturamento. Neste presente estudo, trabalhou-se com concentração de 0,64 mg/mL de SOD 3896 U/mg para obter uma solução contendo 2500 U/mL de SOD confirmando os resultados obtidos por Rengel et al. (2002). Isto explicaria o adequado encapsulamento dos diferentes volumes de SOD aqui estudados. De acordo com Rengel et al. (2002), o adequado efeito

terapêutico requer uma alta eficiência de encapsulamento e uma quantidade suficiente da enzima.

As cápsulas que continham 40 μL de SOD comportaram-se, quanto à liberação da enzima, de modo similar, tanto em pH 2,0 quanto em pH 7,4. O menor tempo de liberação naquela solução (pH 2,0) estaria associado à menor quantidade de SOD liberada. Esta associação pode estar relacionada ao grau de permeabilidade da quitosana. Coerentemente, e de acordo com Lee et al. (1996), a quitosana diminui a sua permeabilidade em pH abaixo de 5,0. A maior permeabilidade da cápsula pode ser notada pelo maior tempo de liberação e quantidade liberada da enzima pelas cápsulas em solução tampão pH 7,4, do que quando em solução tampão pH 2,0, o que pode ser verificado no gráfico 12. Em pH abaixo de 5,0 ocorre protonação dos grupos $-\text{NH}_2$, promovendo o aumento do número de grupos $-\text{NH}_3^+$ (Risbud, 2000), fortalecendo a interação química alginato/quitosana (Figura 12), o que explicaria a menor liberação da enzima SOD em pH 2,0. A protonação da quitosana em meio pH 2,0 foi confirmada por Yao et al. (1994) citado por Risbud (2000), através do espectro infra-vermelho (picos entre 1625 e 1512 cm^{-1}), confirmando o aumento do número de grupos $-\text{NH}_3^+$. Outro aspecto que poderia interferir na baixa atividade da SOD em pH 2,0 poderia residir em sua inibição em pH baixo, pois seu pH ótimo de atividade gira em torno de 8,0 (Fridovich, 1978b). Entretanto conforme discutido logo adiante, poderia estar relacionado com o comportamento do alginato (Gráfico 13).

A diminuição da permeabilidade da cápsula em meio ácido permite que se administre adequadamente doses de fármacos por via oral, evitando o inconveniente da aplicação de doses tóxicas, ineficazes ou instáveis de determinados fármacos quando em formas farmacêuticas convencionais. De acordo com Risbud (2000), as doses de amoxicilina e metronidazol permitidas por via oral constituem-se como sub-doses no tratamento de *Helicobacter pylori*. O encapsulamento destes produtos em quitosana permite levar a droga ao sítio gástrico colonizado pela bactéria.

O comportamento similar das cápsulas com quantidade intermediária de SOD (60 μ L) na liberação da enzima quando em meios ácido e básico (Gráfico 13), parece contrariar o já discutido aumento da impermeabilidade da quitosana em pH ácido. O comportamento da liberação de SOD em tampão fosfato pH 7,4 deu-se conforme esperado, de acordo com o já discutido anteriormente. A similaridade do comportamento da liberação em pH 2,0 seria explicado pela menor quantidade de alginato nestas cápsulas em relação às aquelas contendo 40 μ L de SOD ou, de acordo com Lee et al. (1996), pela protonação dos grupos carboxilatos do alginato quando em meio ácido. O alginato de sódio em meio ácido é convertido em ácido algínico (Ostberg, apud Remuñán-Lopez & Bodmeier, 1997), o que diminui a sua interação química com a quitosana, mesmo protonada, o que a tornaria menos porosa se quantidade suficiente de alginato existisse para uma adequada interação química entre estes dois polímeros. A natureza policatiónica da quitosana e a natureza polianiónica do alginato permitem que, por ocasião da associação destes dois polímeros, possam formar cápsulas melhor estruturadas (Daly & Knorr, 1988).

De acordo com Braun et al. (1985), a imobilização de enzimas também pode ser feita pela ligação química da quitosana com o glutaraldeído. Este aldeído reage com os grupos $-NH_2$ da quitosana, através de seus grupamentos aldeídicos, formando as bases de Schiff (Fávere, 1994). O reforço da cápsula pelo glutaraldeído é percebido pelo retardamento do início da liberação da enzima, tanto em solução-tampão fosfato pH 7,4, quanto em pH 2,0, aspecto observado nos gráficos 14, 15 e 16. Este reforço, no entanto, não se fez notar nas cápsulas em solução-tampão fosfato pH 7,4, que não apresentaram o desejado perfil comportamental de liberação das enzimas pelas cápsulas em solução-tampão fosfato pH 2,0, além da inesperada desintegração capsular naquele meio.

Além do retardamento do início na liberação da enzima, proporcionado pelo glutaraldeído, obteve-se, ainda, em meio de solução-tampão fosfato pH 7,4, o prolongamento da liberação da enzima, não conseguido quando as cápsulas não dispunham desta película (Gráfico 17). Por outro lado, a película de glutaraldeído não impediu que as cápsulas em solução-tampão fosfato pH básico

se desintegrassem (Gráfico 7), tal qual ocorreu com as cápsulas de quitosana, (Gráfico 6). De acordo com Iskakov et al. (2002), a liberação por gotas de alginato de cálcio de substâncias de alto peso molecular foi fortemente influenciada pela desintegração daquelas, independentemente do peso molecular da substância nelas contida. A liberação maciça e imediata da droga contida por gotas de gel em solução tampão-fosfato pH 7,4, coincidiu com a desintegração das cápsulas de gel de alginato encapsuladas. A desintegração das ocorre pelo aumento da pressão interna sobre a capa, decorrente da dissociação dos íons de cálcio da cadeia de alginato. O tempo para desintegração do alginato depende do polímero que o encapa, e a expulsão da droga por explosão da cápsula depende da pressão osmótica da solução-tampão. A pressão osmótica desta solução tampão pode ser alterada por acréscimo de glicose. Com o incremento da concentração de glicose na solução-tampão, a pressão osmótica criada pelo alginato no interior da cápsula é diminuída ou suprimida pelo incremento da osmolaridade externa. A solução hipertônica com alta concentração de glicose reduz a solubilidade do alginato, impedindo a desintegração da cápsula e, por conseguinte, a expulsão imediata da substância por ela contida.

A desintegração do gel de alginato em solução-tampão fosfato, poderia ser comprovada pela presença de íons cálcio livres, após algum tempo nesta solução. O tempo para desintegração dependeria do peso molecular do alginato, da concentração de gel, e do diâmetro das gotas (Kikuchi et al., 1999 apud Iskakov et al., 2002).

A possibilidade de se encapsular SOD em cápsulas de quitosana para promoção de sua liberação prolongada, tanto em pH ácido quanto em pH básico, demonstrada neste trabalho, permite que a SOD se constitua numa alternativa terapêutica aos tratamentos convencionais de estresses oxidativos.

Sistemas específicos de liberação de SOD são promissores e podem preencher os requisitos básicos para que ela atue com precisão nos sítios-alvos (Bayati et al., 1988). De acordo com Jadot et al. (1995 apud Rengel et al., 2002), a penetração celular da SOD é pobre, o que afeta fortemente e limita o seu

potencial terapêutico, limitando-se à sua atuação sérica. Assim, seria desejável descobrir um sistema adequado de liberação que protegesse esta enzima da inativação e que prolongaria o seu tempo de circulação e manutenção dos níveis terapêuticos, e que, além disso a conduzisse aos diferentes locais intracelulares de ação. As SODs de peso molecular entre 33 e 80 kD são rapidamente filtradas pelos rins, resultando em baixa meia-vida no plasma ($t_{1/2} < 6$ minutos em ratos). De acordo com Corvo et al. (1997), a duração da SOD no plasma humano é de cerca de 30 minutos.

A baixa biodisponibilidade da SOD após sua administração oral (Giri & Misra, 1984 apud Regnault et al., 1995), é atribuída à sua curta meia-vida (Conforti et al., 1986 apud Regnault et al., 1995), bem como à sua baixa afinidade com a membrana celular (Igarashi et al., 1992 apud Regnault et al., 1995).

Para superar tais desvantagens, o encapsulamento da SOD em lipossomas tem sido estudado com o objetivo de protegê-la da ação do suco gástrico e para melhorar a sua penetração na célula. A SOD, quando encapsulada, em lipossoma, incrementa sua biodisponibilidade tanto no sangue quanto em exsudatos celulares (Regnault et al., 1995). De acordo com este autor, o uso destas preparações pode incrementar a afinidade da SOD com tecidos ou ativar receptores ligados ao metabolismo celular, o que as tornaria importante alternativa nas terapias baseadas na SOD.

A SOD tem sido estudada por diversas vias de administração como instilação, liberação sistêmica parenteral controlada, subcutânea e através de vias conjugadas (Greenwald, 1990 apud Regnault et al., 1995) e também por via oral (Regnault et al., 1995; Regnault et al., 1996). Tem sido igualmente ministrada via intra-articular contra artrose e osteoartrites; via intracavernosa, contra diversas doenças; intramural, contra cistites; intramuscular, contra cistite, fibrose e prostatites; via intratecal, contra escleroses; intravenosa, por ocasião de transplante de órgãos; tópica, contra fibrose, utilizando-se Orgotein® (Thomson Micromedex, 2002) e via sublingual como suplemento antioxidante, com o uso de S.O.D® (MedQuest Pharmacy, 2002), também e no tratamento de periondontite

e via oral contra inflamações musculares para uso veterinário com o emprego de DISMUTASE® (BioVet Int'l., 2002).

Regnault et al. (1995), observaram que pequenas doses de SOD, via oral, podem ser pró-inflamatórias, mas a repetição da administração oral contrapõe-se a este efeito. A repetição da administração deste fármaco também pode ser benéfica no tratamento dos prejuízos induzidos por estados patológicos crônicos que envolvem ERO.

A conjugação da SOD a macromoléculas de polietilenoglicol (PEG) a protege de sua eliminação plasmática (Morpurgo et al., 1996), mas não incrementa a sua absorção pelas células-alvo. No entanto, a associação de SOD ao copolímero divinil éter e anidro malêico (DIVEMA) e a manose-SOD, facilita a absorção pelas células de Kupffer e endoteliais do fígado. Em animais que receberam SOD não conjugada, nenhum efeito sobre os níveis de ERO nas células fibróticas do fígado foi observado. Em contraste, a produção de ERO intra-hepática foi largamente inibida 1 hora após a administração de manose-SOD ou DIVEMA-SOD. Estes resultados demonstram claramente a importância de liberadores específicos desta enzima. A aplicação de SOD conjugada a polímeros no tratamento de fibrose do fígado pode ser uma atraente forma de terapia contra a fibrose hepática (Swart et al., 1999), e provavelmente contra outras patologias.

6 CONCLUSÕES

1) A enzima superóxido dismutase pode ser encapsulada em quitosana/ alginato e glutaraldeído/quitosana/alginato;

2) O encapsulamento da enzima superóxido dismutase em quitosana/ alginato e glutaraldeído/quitosana/alginato modifica a sua disponibilidade;

3) O grau de permeabilidade da quitosana e protonação do alginato sofrem alterações quando se modifica o pH do meio, alterando as características da cápsula, com efeito sobre a disponibilidade da enzima encapsulada;

4) A quantidade de enzima liberada e o tempo de liberação dependem do pH do meio e da quantidade de alginato em relação à quantidade de enzima;

5) O reforço das cápsulas obtido pelo glutaraldeído permite a modulação do retardamento do início da liberação da enzima pelas cápsulas;

6) Considerando os resultados da liberação da SOD em diferentes pHs empregados no presente trabalho, a enzima superóxido dismutase pode, eventualmente, ser disponibilizada através do encapsulamento por quitosana, adequando-o para eventuais estudos *in vivo*.

7 SUGESTÕES DE ESTUDOS E PERSPECTIVAS

1) Estudar a alteração da quantidade de alginato empregado no encapsulamento de diferentes quantidades de enzima, visando adequar melhor a modulação da liberação de SOD;

2) Modificação da concentração da solução de quitosana, quando do emprego do filme de glutaraldeído, visando o reforço da cápsula em meio alcalino;

3) Avaliar o comportamento das cápsulas na liberação da enzima superóxido dismutase em outros meios de liberação, além dos aqui estudados;

4) Caracterizar a reticulação por ressonância magnética nuclear (RMN), infra vermelho (IV), análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria diferencial (DSC);

5) Obter a micrografia eletrônica de varredura (MEV) da cápsula contendo SOD;

6) Mensurar o grau de entumescimento.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, T. et al. Effect of superoxide dismutase on glomerular nephritis. **Biochem. Pharmacol.**, [s.l.], v. 35, p. 341–345, 1986.

AIBA, S. et al. Chitin in nature and technology. **Plenum Press**, New York, p. 389-396, 1985.

AIBA, S. Studies of chitosan: determination of the degree of N-acetylation of chitosan by ultraviolet spectrophotometry and gel permeation chromatography. **Int. J. Biol. Macromol.**, [s.l.], v. 8, p. 173-176, 1986.

ANDREO FILHO, N.; OLIVEIRA, A. G. Sistemas de micro/nano encapsulação de fármacos. **Pharmácia Brasileira**. [s.l.], v. 9, n. 1/5, p. 18-21, maio-junho, 1999.

ANTONINI R. B; GREENWOOD C; MALTRÖM B.G. Catalytic mechanism of cytochrome oxidase. **Nature**, [s.l.], v. 228, p. 936-937, 1970.

ARTEL, B. W. H. Radiação: efeito da radiação em polímeros. **Revista Plástico Moderno**, São Paulo. Ed. 333 jun., 2002. Disponível em: (<http://www.plastico.com.br/revista/pm312/radiacao2.htm>)

ASADA R. et al. Formation of active oxygen and its fate in chloroplasts. In: O. Hayaishi, O; Asada, K. Biochemical and medical aspects of active oxygen., Univer. **Park Press**, New York, p. 45-63, 1977.

BABIOR, B.M.. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. **Part II. Engl J. Med.**, [s.l.], p. 298:721-725, 1978.

BAKER, K. et al. Synthetic combined superoxide dismutase/catalase mimetics are protective as a delayed treatment in a rat stroke model: a key role for reactive oxygen species in ischemic brain injury. **J. Pharmacol. Experim. Therapeut.**, [s.l.], v. 284, p. 215-221, 1998.

BANGHAM, A. D; HORNE, R.W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. In: Sharma, E; Sharma, U.S. Liposomes in Drug Delivery; Progress and Limitations. **Inter. J. Pharmac.**, New York, v.154, p. 123-140, 1997.

BARET, A.; JADOT, G.; MICHELSON, A. M. Pharmacokinetic and anti-inflammatory properties in the rat of superoxide dismutases (Cu SODs and Mn SOD) from various species. **Biochem. Pharmacol.**, [s.l.], v. 33, p. 2755-2760, 1984.

BAYATI, A. et al. Plasma elimination kinetics and renal handling of copper/zinc superoxide dismutase in the rat. **Acta. Physiol. Scand.**, [s.l.], v. 134, p. 65–74. 1988.

BECKER, P. **Encyclopedia of Emulsion Technology**. v. 3, New York: M. Dekker Inc., 1988.

BIDAH, D.; VERGNAUD, J. M. Dosage forms with a polymer matrix and a swelling polymer. **Inter. J. Pharm.**, [s.l.], v. 77, p. 81-87, 1991.

BioVet Int'l. **Dismutase: proven with veterinarians in scientific studies**. 2002. Disponível em: (<http://www.agrigenic.com>).

BLANCO, M.D. et al. Chitosan microspheres in pig films as devices for cytarabine release. **Inter. J. Pharmac.**, Madrid, v. 202, p. 29-39, 2000.

BOVERIS, A; CADENAS, E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: Clerch, L; Massaro D. Oxygen, Gene Expression and Function. **Marcel Dekker**, New York, v. 105, p. 1-25, 1997.

BRAUN, J. et al. Whole cells and enzymes immobilized on chitosan. In: Muzzarelli, R; Charles, J; Gooday, G.W. Chitin in nature and technology, **Plenum Press**, New York, p.389-396, 1985.

BRITTON L.; MALINOWSKI D.P; FRIDOVICH I. Superoxide Dismutase and Oxygen Metabolism in *Streptococcus faecalis* an comparisons with other organisms. **J. Bacter.**, [s.l.], v. 134, p. 229-236, 1978.

CARLOGH, M. et al. Diffusion coefficients of direct dyes in chitosan. **J. Appl. Polym. Sci.**, [s.l.], v. 42, p. 3035-3038, 1991.

CHANDY, T.; SHARMA, C. Chitosan matrix for oral sustained delivery of ampicillin. **Biomaterials**, [s.l.], v. 12, n. 12, p. 939-943, 1993.

CHEN, R. H.; TSAI, M. L.; LIN, W.-C. Effects of chain flexibility of chitosan molecules on the preparation, physical, and release characteristics of the prepared capsules. **Carbohydr. Polym.**, [s.l.], v. 31, p. 141-148, 1996.

CHIEN, Y. W. Potential developments and new approaches in oral controlled-release drug delivery systems. **Drug Develop. Indust. Pharm.**, [s.l.], v. 9, n. 7, p. 1291-1330, 1983.

CHIOU, M.-S.; LI, H.-Y. Equilibrium and kinetic modeling of adsorption of reactive dye on cross-linked chitosan beads. **J. Hazardous Mat.**, v. B23, p. 233-248, 2002.

CHOI, S.H; PARK, T.G. Hydrophobic ion pair formation between leuprolide and sodium oleate for sustained release from biodegradable polymeric microspheres. **Inter. J. Pharmac, Taejon**, v. 203. p. 193-202, 2000.

CHUNG, L. Y. et al. Biocompatibility of potential wound management products: fungal mycelia as a source of chitin/chitosan and their effect on the proliferation of

human F1000 fibroblasts in culture. **J. Biomedic. Mater. Res.**, [s.l.], v. 28, p 463-469, abr, 1994.

COHEN, G; HEIKKILA, R. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical and hydroxyl radical by 6-hydroxy-dopamine dialuric acid and related cytotoxic agents. **J. Biol. Chem.**, [s.l.], v. 249, p. 2447-2452, 1974.

COMERLATO, M. H. Imobilização de enzimas no suporte crisolina. 1995. (Tese de Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade de Campinas, Campinas, SP. In: Miguez, M. J. B. **Sistema de microencapsulação de urease com quitosana-PVA: reatividade e aplicações**. 1997. 127 f. (Tese de Doutorado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

CONFORTI, A. et al. Anti-inflammatory properties of superoxide dismutase derivatives (SOD-PEG-3 and 8) in carrageenan pleurisy. In: Rotilio G. Superoxide and superoxide dismutase in chemistry, biology and medicine. Elsevier Sci. Publ. B. V. (Biomed. Div.) p. 532-534, 1986. In: Regnault, C. et al. Effect of encapsulation on the anti-inflammatory properties of superoxide dismutase after oral administration. **Clin. Chim. Acta.**, v. 240, p. 117-127, 1995.

CORVO, M.L. et al. Liposomal formulations of Cu,Zn-Superoxide Dismutase: Physico-chemical characterization and activity assessment in an inflammation model. **J. Control. Rel.**, [s.l.], v. 43, p. 1-8, 1997.

CRISPIM, E. de O; LUCINDA, R. M; RODRIGUÊS, C. A. **Preparação de Derivados da Quitosana Utilizando Rotas Sintéticas que Envolvem a formação de Sal de Diazônio**. 1996. (Monografia em farmácia). Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí-SC.

DALY, M. M; KNORR, D. Chitosan-Alginato complex coacervate capsules: effects of calcium chloride, plasticizers, and polyelectroles on mechanical stability. **Biotechnol.**, Progress, [s.l.], v.4, n.2, p. 76-81, June, 1988.

DAVIS, J. M. et al. Pharmacologic interactions of exogenous lung surfactant and recombinant human Cu/Zn superoxide dismutase. **Pediatr. Res.**, [s.l.] v. 35, p. 37-40, 1994.

DEL MAESTRO, R. F. Uma abordagem aos radicais livres em medicina e biologia. **Acta Physiol Sc.**, Ontario/London, v. 492, p. 153-168, 1980.

DEL MAESTRO, R. F; ARFORS K. E; LINDBLOM, R. Free Radical Depolymerization of Hyaluronic Acid. **EUROPE CONFERENCE MICROCIRCULATION, CAGLIARI 1978**. Hibanat Red. D. H. Lewis. Kager. Basel. n. 18, p. 132-135, 1979.

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA. **Glutaraldeído**. Coimbra, Portugal, 2002. Disponível em: (www.eq.uc.pt/~mene3/glutaraldeido.html).

DEWALD B. et al. Subcellular localization of the superoxide-forming system in human neutrophils. **J. Clin Invest.**, [s.l.], v. 63, p.21-29, 1979.

DUMOULIN M. J. et al. Comparative antioxidant and cardioprotective effects of ceruloplasmin, superoxide dismutase and albumin. **Arzneimittel-forschung**, [s.l.], v. 46, p. 855–861, 1996.

DUNMIRE, E. N; PLENYS, A. M; CATZ, D. F. Spectrophotometric analyses of molecular transport in gels. **J. Control. Rel.**, v. 57, p. 127-140, June, 1999.

EHTEZAZI, T; WASHINGTON, C. Controlled release of macromolecules from PLA microspheres: using porous structure topology. **J. Control. Rel.**, Nottingham, v. 68, p. 361-372, 2000.

EL-GIBALY, I. Development and in vitro evaluation of novel floating chitosan microcapsules for oral use: comparison with non-floating chitosan microspheres. **Inter. J. Pharmaceut.**, v. 249, p. 7-21, 2002.

ERIANOV, A. K; PAYNE, L. G. Polymeric Carriers for Oral Uptake of Microparticulates. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Cambridge, v. 34 p. 155–170, 1998.

ERY, M.C. et al. Proanthocyanidin microcapsules: preparation, properties and free radical scavenging activity. **Inter. J. Pharmac, Lile**, v. 171. p. 217-226, 1998.

ESTÉVEZ, A. G. et al. Liposome-delivered superoxide dismutase prevents nitric oxide-dependent motor neuron death induced by trophic factor withdrawal. **Free Radic. Biol. & Med.**, Alabama /Clemente Estable, [s.l.], v. 28, n. 3, p. 437–446, 2000.

FÁVERE, V. T. **Adsorção dos ions Cu (II), Cd (II), Ni (II), Pb (II) e Zn (II) pelo biopolímero quitina, quitosana e pelas quitosanas modificadas.** 1994. Tese (Obtenção do grau de Doutor em Química). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis

FLOHÉ, L; ÖTTING, F. Superoxide dismutase assays. **Methods Enzymol.**, [s.l.], v. 105, p. 93-105, 1984.

FONG K. I. et al. Evidence that Peroxidation of Lysosomal Membranes is Inmated by Hydroxyl Free Radicals Produced During Flavin Enzyme Acivity. **J. Biol. Chem.**, [s.l.], v. 248, p. 7792-7797, 1973.

FORD, J.; WOOLFE, J.; FLORENCE, A. T. Nanospheres of cyclosporin A: poor oral absorption in dog. **Inter. J. of Pharmac, London**, v. 183. p. 3-6, 1999.

FREI, B. On the role of vitamin C and other antioxidants in atherogenesis and vascular dysfunction. **Vasc. Effec. Antiox.**, [s.l.], v. 222, p. 196-204, 1999.

FRIDOVICH, I. In: FANH, S. et al. Hypoxia and oxygen toxicity. **Adv. Neurol.**, New York: Raven, p. 225-6, 1979.

FRIDOVICH, I. Quantitative aspects of the productions of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, v. 245, p. 4053-4057, 1970. In: Del Maestro, R. F. Uma abordagem aos Radicais Livres em Medicina e Biologia. **Acta Physiol Scie**, Ontario/London, v. 492, p 153-168, 1980.

FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutases. **Ann. Rev. Biochem.**, North Carolina, v. 44, p. 144-159, 1975.

FRIDOVICH, I. The biology of oxygen. **Radic. Sci.**, [s.l.], v201, p. 875-880, 1978a.

FRIDOVICH, I. Superoxide radicals superoxide dismutases and aerobic life style. **Photochem. Photobiol.**, [s.l.], v. 28, p.733-741, 1978b.

FUKUDA, H; KIKUCHI, Y. Polyelectrolyte complexes of chitosan with sodium carboxymethyl dextran. *Bull. Chem. Soc.* v. 51, p. 1142-1144, 1978. In: Huguet, M. L.; Dellacherie, E. Calcium alginate beads Coated with chitosan: effect of the structure of encapsulated materials on their release. **Proc. Biochemist.**, v. 31, n. 8, p. 745-751, 1996.

GARRET, R. H; GRISHAM, C. M. **Biochemistry**, Orlando: Saunders College Publishing, 1995.

GASEROD, O; SANNES, G; SKJAK-BRAEK, G. Microcapsules of alginate-chitosan. I. A study of capsules stability and permeability. *Biomaterials*, v. 20, p. 773-783, 1999. In: Iskakov, R. M; Kikuchi, A; Okano, T. Time-programmed pulsative release of dextran from calcium-alginate gel beads coated with carboxy-n-propylacrylamide copolymers. **J. Control. Rel.**, [s.l.], v. 80, p. 57-68, 2002.

GIRI, S.N.; MISRA, H. P. Fate of superoxide dismutase in mice following oral route of administration. *Mol. Biol.* v. 62, p. 285-289, 1984. In: Regnault, C. et al. Effect of encapsulation on the anti-inflammatory properties of superoxide dismutase after oral administration. **Clin. Chim. Acta.**, v. 240, p. 117-127, 1995.

GOMBOTZ, W. R; WEE, S. F. Protein release from alginate matrices. **Adv. Drug Deliv.**, Seattle, v. 31, p. 267-285, 1998.

GONÇALVES, V. L. **Sistema de liberação controlada do fármaco diclofenaco de sódio a partir de microsferas de quitosana reticuladas**. 1999. 81 f. (Dissertação de Mestrado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

GONÇALVES, V. L.; LARANJEIRA, M. C. M. Sistema de liberação controlada do diclofenaco de sódio a partir de microsferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído. In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA**, 23, 2000, Poços de Caldas, MG. Disponível em: (<http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/>).

GREENWALD R. A; MOY W. W.. Inhibition of collagen gelation by action of the superoxide radical. **Arthr. Rheum.**, [s.l.], v. 22, p. 251-259, 1979.

GREENWALD R. A. Current approaches to the development of oxygen radical scavengers. *Drugs Today*. v. 26, p. 299-307, 1990. In: REGNAULT, C. et al. Effect of encapsulation on the anti-inflammatory properties of superoxide dismutase after oral administration. **Clin. Chim. Acta.**, v. 240, p. 117-127, 1995.

HALLIWELL, B. Generation of hydrogen peroxide, superoxide and hydroxyl radicals during the oxidation of bihydroxyfumaric acid by peroxidase. *Biochem J*, v. 163, p. 444-448, 1977. In: Del Maestro, R. F. Uma abordagem aos Radicais Livres em Medicina e Biologia. **Acta Physiol. Sc.**, Ontario/London, v. 492, p 153-168, 1980.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M. **Free radical in biology and medicine**. 3 ed. Oxford University Press, 1999.

HWANG, C; RHA, C.K; SINSKEY, A. J. Encapsulation with chitosan: Transmembrane diffusion of proteins in capsules in: Muzzarelli, R.; Charles, J.; Gooday, G. W. Chitin in nature and technology. **Plenum Press**, New York, p. 389-396, 1985.

ICHIKAWA, H; FUKUMORI, Y; ADEYEYE, C.M. Design of prolonged-release microcapsules containing diclofenac sodium for oral suspensions and their preparation by the Wurster process. *Inter. J. Pharmac.*, [s.l.], v. 156. p. 39-48, 1997.

IGARASHI, R. et al. Lecithinization of superoxide dismutase potentiates its protective effect against forssman antiserum-induced elevation in guinea pig airway resistance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* v. 262(3), p. 1214-1219, 1992. In: Regnault, C. et al. Effect of encapsulation on the anti-inflammatory properties of superoxide dismutase after oral administration. **Clin. Chim. Acta.**, v. 240, p. 117-127, 1995.

ILLUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm.Res*, [s.l.], v. 15, p. 1326-1331, 1998. In: Bernkop-Schnürch, A; Kast, C. E. Chemically modified chitosans as enzyme inhibitors. **Adv. Drug Deliv.**, [s.l.], v. 52, p. 127-137, 2001.

ISKAKOV, R. M; KIKUCHI, A; OKANO, T. Time-programmed pulsative release of dextran from calcium-alginate gel beads coated with carboxy-n-propylacrylamide copolymers. **J. Control.**, Rel., [s.l.], v. 80, p. 57-68, 2002.

ITOYAMA, K; TOKURA, S; HAYASHI, T.. Lipoprotein lipase immobilization onto porous chitosan beads. **Biotechnol.**, [s.l.], v.10, p.225-229, 1994.

JADOT, G. et al. Clinical pharmacokinetics and delivery of bovine superoxide dismutase. *Clin. Pharmacokinet.*, v. 28, p. 17-25, 1995. In: Rengel, R.G. et al. High efficiency entrapment of superoxide dismutase into mucoadhesive chitosan-coated liposomes. *Europ. J. Pharmac. Sci.*, [s.l.], v.15, p. 441-448, 2002.

JUNGINGER, H. E.; HOFLAND, H. E. J.; BOUWSTRA, J. A. Liposomes and niosomes interactions with human skin. **Cosmet. Toil.**, v. 106, p. 45-50, 1993.

KAWASE, M. et al. Application of glutaraldehyde-crosslinked chitosan as a scaffold for hepatocyte attachment. **Biol. Pharm. Bull.**, [s.l.], v.20, n.6, p. 708-710, 1997.

KEER, A. et al. Drug targeting using low density lipoprotein (LDL): physicochemical factors affecting drug loading into LDL particles. **J. Control. Rel.**, Newfoundle, v. 55, p. 231-243, 1998.

KIKUCHI A. et al. Pulsed dextran release from calcium-alginate gel beads. **J. Control. Release**, v. 47, p. 21-29, 1999. In: Iskakov, R. M; Kikuchi, A; Okano, T. Time-programmed pulsative release of dextran from calcium-alginate gel beads coated with carboxy-n-propylacrylamide copolymers. **J. Control. Rel.**, [s.l.], v. 80, p. 57-68, 2002.

KIM, I. et al. Core-shell type polymeric nanoparticles composed of poly(L-lactic acid) e poly(N-isopropylacrylamide). **Inter. J. Pharmac.**, [s.l.], v. 211. p. 1-8, 2000.

KORTESUO, P. et al. In vitro evaluation of sol-gel processed spray dried silica gel microspheres as carrier in controlled drug delivery. **Inter. J. Pharmac.**, [s.l.], v. 200, p. 223-229, mar, 2000.

KOST, J.; LANGER, R. Responsive polymeric delivery system. **Adv. Drug Delivery Ver.**, [s.l.], v. 6, p. 19-50, 1991.

KURIT, K. et al. Graft copolymerization of vinyl monomers onto chitin with cerium (IV) ion. **J. Appl. Polym. Sci.**, [s.l.], v. 42, p. 2885-2891, 1991.

LANGER, R. New methods of drug delivery. **Amer. Assoc. Adv. Sci.**, [s.l.], v. 249, p. 1527-1533, 1990.

LATHA, M. S. et al. Casein as a carrier matrix for 5-fluoracil: drug release from microspheres, drug-protein conjugates on *in vivo* degradation of microspheres in rat muscle. **J. Pharmacol.**, [s.l.], v. 46, p. 858-862, 1994.

LAUGEL, C. et al. Oil-water-oil multiple emulsions for prolonged delivery of hydrocortisone after topical application: comparison with simple emulsions. **Inter. J. Pharmac.**, [s.l.], v. 160. p. 109-117, 1998.

LEE, K. Y; PARK, W. H; HÁ, W. S. Polyelectrolyte complexes of sodium alginate with chitosan or its derivatives for microcapsules. **J. Appl. Polym. Sci.**, [s.l.], v.63, p. 425-432, 1996.

LI, Y. P. et al. Preparation of chitosan microspheres containing fluorouracil using the "dry-in-oil" method and its release characteristics. **S. T. P. Pharma Sci.**, [s.l.], v. 1, p. 363-368, 1991.

LIM, S. T. et al. Preparation and evaluation of the in vitro drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and chitosan. **J. Control. Rel.**, London, v. 66, p. 281-292, dec, 2000.

MAFFEZZOLLI, S. et al. Estudo in vitro de cápsulas de quitosana-alginato-cálcio para administração de insulina via oral. In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA**, 23, 2000, Poços de Caldas, MG. Disponível em: (<http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/>).

MARANHÃO, R.C. et al. Plasma kinetics e biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. **Cancer Res.**, São Paulo, v. 54, p. 4660-4666, 1998.

MC CORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzyme function for erythrocyte (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, [s.l.], v. 244, p. 6049-55, 1969.

MEDQUEST PHARMACY. **Superoxide dismutase: antioxidant help for younger, healthier bodies**. 2002. Disponível em: (<http://www.mqrx.com>).

MISRA, H; FRIDOVICH, I. The generation superoxide radical during the autoxidation of ferredoxin. **J. Biol. Chem.**, v. 246, p. 6868-6869, 1971. In: Del Maestro, R. F. Uma abordagem aos Radicais Livres em Medicina e Biologia. **Acta Physiol Sc.**, Ontario/London, v. 492, p 153-168, 1980.

MITRA, S. et al. Tumour targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. **J. Control. Rel.**, Delhi South, v. 74, p. 317-323, 2001.

MIYAZAKI, S. et al. Sustained release and intragastric floating granules of indomethacin using chitosan in rabbit. **Chem Pharm. Bull.**, v. 36, p. 4033-4038, 1988. In: TOZAKI, H. et al. Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: enhanced localization of 5-aminosalicylic acid in the large intestine accelerates healing of TNBS-induced colitis in rats. **J. Control. Rel.**, [s.l.], v. 82, p. 51-61, 2002.

MORGAN A. R; CONE R. L; ELGERT T. M. The mechanism of DNA strand breakage by vitamin c and superoxide and the protective roles of catalase and superoxide dismutase. **Nucleic Acids Res.**, [s.l.], v. 3, p. 1139-1149, 1976.

MORPURGO, E. et al. Protective effect of superoxide dismutase and polyethylene glycol-linked superoxide dismutase against renal warm ischemia/reperfusion injury. **Transplantation**, [s.l.], v. 62, p. 1221-1223, 1996.

MUZYKANTOV, V. R. Targeting of superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium. **J. Control. Rel.**, Philadelphia, v. 71, p. 1-21, Jan, 2001.

MUZZARELLI, R. A. A. Chitin. New York: Pergamon Press, 1977. Cap. 6, p. 207-253. In: Miguez, M. J. B. **Sistema de microencapsulação de urease com**

quitosana-PVA: reatividade e aplicações. 1997. 127 f. (Tese de Doutorado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

MUZZARELLI, R. A. A. et al. Biological activity of chitosan: ultrastructural study. **Biomaterials**, [s.l.], v. 9, p. 247-252, 1988.

MUZZARELLI, R. A. A. et al. Depolymerization of chitosan and substituted chitosans with the aid of a wheat lipase preparation. **Enzyme Microb. Tec.**, New York, v. 17, p. 541-545, 1995.

NASCIMENTO, A. do. **Estudo da liberação controlada de ácido acetil salicílico em matrizes poliméricas quitosana(AA) sensível ao pH.** 2000. 87 f (Dissertação de Mestrado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

NG, K.; et al. Alveolar macrophage cell line is not activated by exposure to polymeric microspheres. **Int. J. Pharmac.**, [s.l.], v. 170, p. 41-49, 1998.

OSTBERG, T; LUND, E. M; GRAFFNER, C. Calcium alginate matrices for oral multiple unit administration. IV. Release characteristics in different media. **Int. J. Pharm.**, v. 112, p. 241-248, 1994. In: Remuñán-Lopez, C.; Bodmeier, R. Mechanical, water uptake and permeability properties of crosslinked chitosan glutamate and alginate film. **J. Control., Rel.**, [s.l.], v. 44, p. 215-225, 1997.

PEPAS, N. A.; BURI, P. A. Surface interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesin on soft tissues. **J. Control. Rel.** v. 2, p. 257-275, 1985. In: Gombotz, W. R; Wee, S. F. Protein release from alginate matrices. **Adv. Drug Deliv.**, Seattle, v. 31, p. 267-285, 1998.

PETER, M. G. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. **JMS. Pure Appl. Chem.**, Bonn, [s.l.], v. 32, n. 4, p. 629-640, 1995.

PINTO, M. R. **Parâmetro de solubilidade de polímeros.** Campinas: Instituto de Química da Unicamp. 2001 Disponível em: (pcserver.iqm.unicamp.br/~wloh/exp/exp7/solubilidade.pdf)

POLK, A. et al. Controlled release of albumin from chitosan-alginate microcapsules. **J. Pharmaceut. Sci.**, [s.l.], v. 83, n. 2, Feb, 1994.

QUINTÃO E; NAKEAKARE, E.R. **Manual de Referência em Dislipidemia.** São Paulo: Faculdade de Medicina de Universidade de São Paulo (FMUSP), 1999.

RASMUSSEN, K.-E.; ALBRECHTSEN, J. Histochem. v. 38, p. 19, 1974. In: Ukeda, H. et al. Dynamic analysis of the binding process of bovine serum albumin on glutaraldehyde-activated controlled pore glass. **Analit. Chim. Acta.**, [s.l.], v. 308, p. 261-268, 1995.

REBELO, A. M. **Síntese de ésteres, em meio orgânico, catalisada por lipase (Palatase M), encapsuladas em gel de quitosana.** 1998. 72 f. (Monografia em Farmácia). Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC.

RECKNAGEL R. O; GLENDE A. Jr; HRUSZKEWYCZ A. M. Chemical Mechanisms in Carbon Retracting Toxicity. In: Free radicals in Biology. (ed. W. Pryor). **Acad. Press**, New York, v. 3, p. 97-132, 1977.

RENGEL, R.G. et al. High efficiency entrapment of superoxide dismutase into mucoadhesive chitosan-coated liposomes. **Europ. J. Pharmac. Sci.**, [s.l.], v.15, p. 441-448, 2002.

REGNAULT, C. et al. Effect of encapsulation on the anti-inflammatory properties of superoxide dismutase after oral administration. **Clin. Chim. Acta.**, v. 240, p. 117-127, 1995.

REGNAULT, C. et al. Preparation of superoxide dismutase entrapped in ceramide-containing liposomes for oral administration. **Inter. J. Pharmaceut.**, v. 132, p. 263-266, 1996.

REYNOLDS, J. E. F. **Martindale: the extra pharmacopeia.** 31 ed. London: Royal Pharmaceutical Society, 1996.

RIEMERSMA, R. A. et al. Plasma antioxidants and coronary heart disease: Vitamins C e E, and selenium. **Eur. J. Clin. Nutr.**, [s.l.], v. 44, p. 143-150, 1990.

RISBUD, M. V. et al. pH-sensitive freeze-dried chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as controlled release system for antibiotic delivery. **J. Control. Rel.**, [s.l.], v. 68, p. 23-30, jan., 2000.

RODRIGUES, C. A. et al. Preparation and characterization of pentacyanoferrate (II) on the surface of N-(4-pyridylmethylidene)chitosan. **Carbohydr. Polymer**, Itajaí, v. 42, p. 311-314, 2000.

RODRIGUES, C. A; SILVA, A. F. S. da. **Obtenção de Quitina a partir de Camarão e Síntese da Quitosana.** 1996. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí-SC.

RODRÍGUEZ, M.; VILA-JATO, J. L.; TORRES, D. Design of a new multiparticulate system for potential site-specific and controlled drug delivery to the colonic region. **J. Control. Rel.**, [s.l.], v. 55, p. 67-77, 1998.

SHAHIWALA, A.; MISRA, A. Studies in topical application of niosomally entrapped nimesulide. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.**, v. 5(3), p. 220-225, 2002.

SHANTHA, K. L.; HARDING, D. R. K. Preparation AND in-vitro evaluation of poly[N-vinyl-2-pyrrolidone-polythilene glycol diacrylate]-chitosan interpolymeric pH-responsive hydrogels for oral drug delivery. **Inter. J. Pharmac.**, Palmerston North, v. 207, p. 65-70, July, 2000.

SHARMA, A; SHARMA, U.S. Liposomes in drug delivery progress and limitations. **Int. J. Pharmac.**, New York, v. 154, p. 123-140, 1997.

SHIRAISHI, S. et al. Controlled release of indomethacin by chitosan-polyelectrolyte complex: optimization and in vivo/in vitro evaluation. **J. Control. Rel.** v. 25, p. 215-225, 1993. In: El-Gibaly, I. Development and in vitro evaluation of novel floating chitosan microcapsules for oral use: comparison with non-floating chitosan microspheres. **Inter. J. Pharmaceut.**, v. 249, p. 7-21, 2002.

SIES, H. Strategies of antioxidant defences. **Eur. J. Biochem.**, [s.l.], v. 215, p. 213-219, 1993.

SMIDSRØD, O; SKJAK-BRAEK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. **Tibtech**, v. 8, p. 71-78, 1990. In: Gombotz, W. R; Wee, S. F. Protein release from alginate matrices. **Adv. Drug Deliv.**, [s.l.], v. 31, p. 267-285, 1998.

SOUZA, L.C. et al. In-vitro e in-vivo studies of the decrease of Amphotericin B toxicity upon association with a triglyceride-rich emulsion. **J. Antimicrob. Chemother.**, São Paulo, v. 32, p. 123-132, 1993.

SOUZA, L.C; CAMPA, A. Pharmacological parameters of intravenously administered Amphotericin B in rats: comparison of the conventional formulation with Amphotericin B associated with a triglyceride-rich emulsion **Cancer Research. J. Antimicrob. Chemother.**, São Paulo, v. 44, p. 77-84, 1999.

SWART, P. J. et al. Targeting of superoxide dismutase to the liver results in anti-inflammatory effects in rats with fibrotic livers. **J. Hepatol.**, [s.l.], v. 31, p. 1034-1043, 1999.

TAY, L. et al. Alginate-chitosan coacervation in production of artificial seeds. **Biotechnol. and Bioengineer**, [s.l.], v. 42, p.449-454, 1993.

THANNO, B. C; SUNNY, M.C; JAYAKRISHNAN, A. Crosslinked chitosan microspheres: preparation and evolution as a matrix for the Control. release of pharmaceuticals. **Pharm. Pharmacol, Trivandrum**, v. 44, p. 283-286, June, 1991.

THOMSON MICROMEDEX. **AltMedDex: superoxide dismutase**. 2002. Disponível em: (<http://www.micromedex.com>).

TOKAZI et al. Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: improvement of insulin absorption from the rat colon. **J. Pharmac. Sci.**, [s.l.], v. 86 n. 9, p. 1016-1021, 1997.

TOZAKI et al. Colon specific delivery of R68070, a new thromboxane synthase inhibitor, using chitosan capsules: therapeutic effects against 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced ulcerative colitis in rats, **Life Sci.**, v. 64, p. 1155-1162, 1999. In: Tozaki, H. et al. Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: enhanced localization of 5-aminosalicylic acid in the large intestine

accelerates healing of TNBS-induced colitis in rats. **J. Control. Rel.**, [s.l.], v. 82, p. 51-61, 2002.

TSIGOS, I. et al. Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on N-acetylchitooligosaccharides. **Europ. J. Biochem.**, Creta, v. 261, p. 698-705, May, 1999.

UENO, H; MORI, T; FUGINAGA, T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. **Adv. Drug Deliv.**, Sapparo, v. 52, p. 105-115, 2001.

UKEDA, H. et al. Dynamic analysis of the binding process of bovine serum albumin on glutaraldehyde-activated controlled pore glass. **Analit. Chim. Acta.**, [s.l.], v. 308, p. 261-268, 1995.

VASUVED, S. C.; CHANDY, T.; SHARMA, C. P. Development of chitosan/polyethylene vinyl acetate co-matrix: controlled release of aspirin-heparin for preventing cardiovascular thrombosis. **Biomaterials**, [s.l.], v. 18, n. 5, p. 375-381, 1997.

WANG, J. et al. Evaluation of gastric mucoadhesive properties of aminated gelatin microspheres. **J. Control. Rel.**, [s.l.], v. 73, p. 223-231, 2001.

YALPANI, M.; PANTALEONE, D. An examination of the unusual susceptibility of aminoglycans to enzymatic hydrolysis. **Carbohydr. Res.** [s.l.], v. 256, p. 159-175, 1994. In: Muzzarelli, R. A. A. et al. Depolymerization of chitosan and substituted chitosans with the aid of a wheat lipase preparation. **Enzyme Microb. Tec.**, New York, v. 17, p. 541-545, 1995.

YAO, K. D. et al. Swelling kinetics and release characteristic of crosslinked chitosan: polyether polymer network (semi-IPN) hydrogels. **J. Polym. Sci, A. Polym Chem**, [s.l.], v. 32, p. 1213-1223, 1994. In: Risbud, M. V. et al. pH-sensitive freeze-dried chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as Control. release system for antibiotic delivery. **J. Control. Rel.**, [s.l.], v. 68, p. 23-30, jan., 2000.

YUK, S. H.; CHO, S. H.; LEE, H. B. pH-sensitive drug delivery system using O/W emulsion. **J. Control. Rel.**, [s.l.], v. 37, p. 69-74, 1995.

ZANETTI, B. G. **Desenvolvimento de microsferas de carbamazepina visando o prolongamento da liberação do f armaco.** 2001. 100 f. (Dissertação de Mestrado em Farmácia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC.

ZIDENBERG-CHERR, S. et al. Dietary superoxide dismutase does not affect tissue levels. **Am. J. Clin. Nutr.**, [s.l.], v. 37, p. 5-7, 1983.

8.1 BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ALVES, M. B. M; ARRUDA, S. M. de. **Como fazer referências:** bibliográficas, eletrônicas e demais formas de documentos. Disponível em: <<http://bu.ufsc.br/framerefer.html>> Acesso em: 15 out. 2002.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. **Normas para apresentação de documentos científicos:** periódicos e artigos de periódicos. v. 4, 2000.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. **Normas para apresentação de documentos científicos:** editoração. v. 8, 2000.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. **Normas para apresentação de documentos científicos:** gráficos. v. 10, 2000.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. **Normas para apresentação de documentos científicos:** teses, dissertações, monografias e trabalhos acadêmicos. v. 2, 2001.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. **Normas para apresentação de documentos científicos:** referências. v. 6, 2001.