

ANDRÉ LUIZ DA CUNHA

**APLICAÇÃO DE FACE (*FLUOROPHORE ASSISTED CARBOHYDRATE
ELECTROPHORESIS*) NA ANÁLISE DE CONDRITIM SULFATO DE USO
FARMACÊUTICO**

Juiz de Fora

2012

André Luiz da Cunha

**APLICAÇÃO DE FACE (*FLUOROPHORE ASSISTED CARBOHYDRATE
ELECTROPHORESIS*) NA ANÁLISE DE CONDROITIM SULFATO DE USO
FARMACÊUTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Dra. Elita Scio Fontes

Co-orientadores: Dr. Jair Adriano Kopke de Aguiar
Dra. Yara Maria Michelacci

Juiz de Fora

2012

Cunha, André Luiz da.

Aplicação de FACE (Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis) na Análise de Condroitim Sulfato de Uso Farmacêutico / André Luiz da Cunha. – 2012.

141 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-
Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

1. Condroitim sulfato. 2. FACE. 3. condroitinase. I. Título.

Aplicação de FACE (*Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis*) na Análise de Condroitim Sulfato de Uso Farmacêutico

André Luiz da Cunha

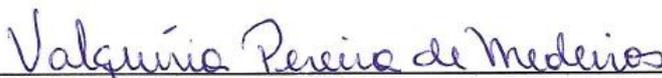
DRa. ELITA SCIO FONTES

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 31/07/2012



Prof. Dr. Ivarne Luis dos Santos Tersariol
Universidade de Mogi das Cruzes



Prof. Dra. Valquíria Pereira de Medeiros
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dra. Elita Scio Fontes
Universidade Federal de Juiz de Fora

Aos meus pais, Piteco e Francisca, pelo amor, carinho, dedicação e exemplo de vida, e por sempre me apoiarem em minhas decisões e tornarem possível o sonho da carreira acadêmica, dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao meu orientador e grande amigo Jair, pela oportunidade de trilhar os caminhos da ciência e por todos os ensinamentos, pela confiança e pela grande amizade que desenvolvemos ao longo desses anos;

À Dra. Yara Michelacci, exemplo de pesquisadora, pela co-orientação deste trabalho e pelas oportunidades de estágio no laboratório da disciplina de biologia molecular da UNIFESP, deixando este sempre disponível para nossas necessidades;

Aos professores membros da banca da dissertação, Ivarne e Valquíria, pela disposição em analisar o trabalho, e pelas críticas e sugestões que muito contribuíram para melhorá-lo;

À Sarah, que esteve sempre ao meu lado, pela compreensão nos momentos de ausência;

Ao grande amigo Gustavo, pela amizade sincera e pelos bons momentos de trabalho no laboratório;

Aos amigos do laboratório, por tornarem os momentos de trabalho mais prazerosos;

Ao Giovani, pela ajuda com os experimentos em São Paulo;

À Isabelle, Gabriela, Lara e Rafael, pela ajuda no preparo dos oligossacarídeos e dissacarídeos;

Aos professores Orlando e Silvana, pela dedicação ao programa de pós-graduação e pela disposição em ajudar, e aos demais professores do programa, pelos ensinamentos passados;

Aos professores do departamento de bioquímica, em especial à Elita.

Às professoras de minha banca de qualificação, Priscila e Cilene, que muito contribuíram com propostas e idéias;

Ao professor Marcelo, do laboratório de genética, por nos permitir utilizar o sistema de aquisição de imagens, sem o qual este trabalho certamente estaria mais atrasado. Agradeço também aos alunos que me ajudaram na utilização do aparelho;

À professora Marta, da Embrapa de Juiz de Fora, que no início do estabelecimento da FACE nos permitiu utilizar o sistema de aquisição de imagens, e à Isabella, que efetivamente nos recebia e digitalizava as imagens;

Ao professor Vítor Pomim, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, por me receber e orientar em estágio realizado na UFRJ;

Ao professor Mauro Pavão, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, que nos forneceu os padrões de dissacarídeos, que muito agilizaram a padronização da FACE, e à sua aluna Eliene, pela ajuda com os experimentos. Agradeço também ao professor Paulo Mourão, pelo apoio financeiro durante meu estágio na UFRJ e pelos padrões de monossacarídeos doados, e também aos demais professores do laboratório de tecido conjuntivo;

Ao aluno Gustavo, da UFRJ, pela ajuda com os experimentos no Rio e aos demais alunos que muito bem me receberam;

Aos farmacêuticos que doaram os insumos analisados.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

Dwarfs standing on the shoulders of giants

BERNARD OF CHARTRES

RESUMO

Condroitim sulfato é um glicosaminoglicano sulfatado composto por unidades dissacarídicas formadas por ácido D-glucurônico e *N*-acetil-galactosamina. Este polissacarídeo é utilizado no Brasil em combinação com outros fármacos para tratamento de osteoartrite. Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade do insumo farmacêutico condroitim sulfato de sódio utilizado em farmácias de manipulação. Para isso foi necessário estabelecer uma técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida para análise de açúcares (FACE), bem como produzir enzimas específicas para a digestão de condroitim sulfato. Diferentes dissacarídeos insaturados, monossacarídeos sulfatados e açúcares neutros derivatizados com 2-aminoacridona foram separados por FACE, usando dois sistemas tampão distintos. Fracionamos por cromatografia de interação hidrofóbica três condroitinases de *F. heparinum* – condroitinase AC, C e B. Por FACE caracterizamos a atividade dessas enzimas e identificamos contaminação de condroitinase AC por sulfatase específica para hexosamina sulfatada na posição 4, que foi inibida por fluoreto de sódio (10 mM). Glucuronidase com atividade específica para dissacarídeo não sulfatado e 6-sulfatado foi detectada em condroitinase C, e sacarolactona (10 mM) foi capaz de impedir somente a degradação de Δ DiOS. Dosagem de condroitim sulfato em amostras farmacêuticas foi realizada por eletroforese em gel de agarose e por titulação fotométrica. Teor superior a 80% foi encontrado em apenas cinco matérias-primas. O peso molecular médio do condroitim sulfato nessas amostras variou entre 16 e 26 kDa, e análise dissacarídica por FACE revelou proporções próximas entre dissacarídeo 4-sulfatado e 6-sulfatado. Onze amostras apresentaram teor inferior a 20%, e análise por FACE demonstrou presença de contaminação por lactose ou polímeros de glicose com diferentes pesos moleculares. Concluímos neste estudo que há grande distorção entre os resultados reportados no certificado de análise de onze insumos analisados e os resultados obtidos nesse trabalho. Torna-se necessário, portanto, maior fiscalização e regulação do comércio deste produto.

Palavras chave: condroitim sulfato, FACE, condroitinase

ABSTRACT

Chondroitin sulfate is a sulfated glycosaminoglycan composed of alternate sequences of D-glucuronic acid and *N*-acetyl-D-galactosamine. This polysaccharide is widely recommended for treatment of osteoarthritis in Brazil, in association with other drugs. The objective of the present study was to evaluate the quality of chondroitin sulfate raw material used for pharmaceutical recipes. A polyacrylamide gel electrophoresis method for carbohydrate analysis (FACE) was established, so as the production of specific enzymes able to digest chondroitin sulfate. Different unsaturated disaccharides, sulfated monosaccharides and neutral sugars derivatized with 2-aminoacridone were resolved by FACE, using two distinct buffer systems. *F. heparinum* chondroitinase AC, C and B were fractionated by hydrophobic interaction chromatography, and the activity of these enzymes was characterized by FACE. Chondroitinase AC demonstrated contamination by a sulfatase specific for sulfation at position 4 of hexosamine, which was inhibited by 10 mM sodium fluoride. Glucuronidase contamination with specific activity against non sulfated and 6-sulfated disaccharide was detected in chondroitinase C, and 10 mM D-saccharic acid-1,4-lactone inhibited the degradation of only non sulfated disaccharide. Chondroitin sulfate content in pharmaceutical raw materials was determined by agarose gel electrophoresis and by photometric titration. Only five samples showed content greater than 80%. Chondroitin sulfate average molecular weight in these samples varied from 16 to 26 kDa, and disaccharide analysis by FACE revealed similar proportions between 4-sulfated and 6-sulfated disaccharide. Eleven samples showed less than 20% of chondroitin sulfate, and contaminant analysis by FACE detected the presence of lactose or different polymers of glucose. We concluded that there is a large distortion between the data reported at the certificate of analysis of eleven products and the results obtained in this work. Stricter regulation of this raw material should be enforced.

Key-words: chondroitin sulfate, FACE, chondroitinase

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema da Composição Típica de Diferentes Famílias de Glicosaminoglicanos.	25
Figura 2 – Estrutura Química dos Dissacarídeos que Constituem Diversos Tipos de Condroitim Sulfato e Dermatom Sulfato.	27
Figura 3 – Estrutura dos principais corantes empregados na análise de CS.	29
Figura 4 – Estrutura de Dissacarídeos Insaturados de Ácido Hialurônico e Condroitim Sulfato.	31
Figura 5 – Derivatização de dissacarídeo insaturado não sulfatado de condroitim sulfato/dermatam sulfato com AMAC na presença de cianoborohidreto de sódio (NaCNBH ₃).	34
Figura 6 - Espectro de Absorção do Reagente Azul de 1,9-dimetilmetileno (DMB) na Ausência (azul) ou Presença (vermelho) de 10 µg de Condroitim 4-sulfato (A), Condroitim 6-sulfato (B) e Dermatom Sulfato (C).	45
Figura 7 – Eletrofluorogramas em Sistema Tris-glicina (A) e Tris-borato (B) de Dissacarídeos Insaturados de CS/DS Derivatizados com AMAC.	54
Figura 8 – Eletrofluorogramas em Sistema Tris-glicina (A) e Tris-borato (B) de Diferentes Resíduos de GalNAc e ΔDiHA.	56
Figura 9 – (A) Eletrofluorograma em Sistema Tris-borato de Diferentes Sacarídeos Derivatizados com AMAC. (B e C) Esquema Representativo da Migração de Diversos Sacarídeos em Sistema Tris-glicina e Tris-borato.	57
Figura 10 – (A) Eletrofluorograma em Sistema Tris-borato de Glicose Derivatizada com Diferentes Quantidades de AMAC. (B) Análise Densitométrica de Bandas Detectadas em Relação à Concentração de AMAC usada na derivatização.	58
Figura 11 – (A) Eletrofluorograma em Sistema Tris-glicina de Produtos de Digestão de Condroitim 4-Sulfato por Condroitinase AC Derivatizados com Diferentes Quantidades de AMAC. (B) Análise Densitométrica do Total de Produtos Formados.	59
Figura 12 – (A) Análise Densitométrica de Dissacarídeos Insaturados Formados por Digestão de Condroitim 4-Sulfato por Condroitinase AC e Derivatizados com Diferentes Quantidades de AMAC. (B) Porcentagem Relativa de Dissacarídeos Insaturados Detectados.	60
Figura 13 – Lateral Direita de Cromatograma Preparativo Revelado com Reagente de Prata Alcalino.	61
Figura 14 – Dosagem de Ácido Urônico por Método de Carbazol em Soluções Obtidas por Cromatografia Preparativa em Papel.	62
Figura 15 – (A) Eletrofluorograma em Sistema Tris-glicina de Produtos de Digestão Enzimática de Condroitim 4-Sulfato Separados por Cromatografia Preparativa em Papel. (B) Análise Densitométrica do Total de Fluorescência das Bandas de Cada Região.	62
Figura 16 – Razão Entre Fluorescência das Bandas Detectadas no Eletroferograma (UAD) e Dosagem de Ácido Urônico por Método de Carbazol em Soluções Obtidas por Cromatografia Preparativa em	63

Papel.

Figura 17 – Eletrofluorogramas em Sistema Tris-glicina (A) e Tris-borato (B) de Produtos Presentes em Regiões Redutoras 1, 2 e Região Intermediária, Submetidos a Tratamento com Mercúrio.	64
Figura 18 – Eletrofluorogramas em Sistema Tris-glicina (A) e Tris-borato (B) de Produtos Presentes em Regiões Redutoras 3, 4 e 5 Submetidos a Tratamento com Mercúrio.	65
Figura 19 – Curva de Velocidade das Condroitinases Presentes em Extrato Bruto de <i>F. heparinum</i> .	67
Figura 20 – Fracionamento de Condroitinases de <i>Flavobacterium heparinum</i> por Cromatografia de Interação Hidrofóbica em <i>Phenyl Sepharose</i> HP.	69
Figura 21 - Atividade (U/mL) de Frações Eluídas por HIC em <i>Phenyl Sepharose</i> HP.	70
Figura 22 – Atividade de Condroitinases Presentes em Frações Eluídas por HIC em <i>Phenyl Sepharose</i> HP.	71
Figura 23 – Eletrofluorogramas nos Sistemas Tris-glicina (A) e Tris-borato (B) de Produtos de Digestão de C4S de Traquéia Bovina por Condroitinase AC.	73
Figura 24 – Porcentagem Relativa de Produtos de Digestão de C4S por Condroitinase AC.	74
Figura 25 – Eletrofluorogramas nos Sistemas Tris-glicina (A) e Tris-borato (B) de Produtos de Digestão de C4S de Traquéia Bovina por Condroitinase AC na Presença de Fluoreto de Sódio. (C) Porcentagem Relativa de Produtos de Digestão de C4S por Condroitinase AC na Presença de Fluoreto de Sódio.	75
Figura 26 – (A) Eletrofluorograma em Sistema Tris-glicina de Produtos de Digestão de C6S de Cartilagem de Tubarão por Condroitinase AC. (B) Porcentagem Relativa de Produtos de Digestão de C6S por Condroitinase AC.	76
Figura 27 – Eletrofluorograma em Sistema Tris-glicina de Produtos de Digestão de DS de Mucosa Intestinal Suína por Condroitinase AC.	77
Figura 28 – Eletrofluorogramas nos Sistemas Tris-glicina (A e C) e Tris-borato (B) de Produtos de Digestão de C6S de Cartilagem de Tubarão (A e B) e C4S de Traquéia Bovina (C) por Condroitinase C.	78
Figura 29 – (A) Eletrofluorograma em Sistema Tris-glicina de Produtos de Digestão de DS de Mucosa Intestinal Suína por Condroitinase B. (B) Porcentagem Relativa de Produtos de Digestão de DS por Condroitinase B.	79
Figura 30 – Eletrofluorogramas nos Sistemas Tris-glicina (A) e Tris-borato (B) de Produtos de Digestão de Glicosaminoglicanos por Incubação com Condroitinasas de <i>F. heparinum</i> Fracionadas por HIC em <i>Phenyl Sepharose</i> HP.	80
Figura 31 – Eletrofluorogramas nos Sistemas Tris-glicina (A e B) e Tris-borato (C, D e E) de Diferentes Dissacarídeos Insaturados Após Incubação com Condroitinasas de <i>F. heparinum</i> Fracionadas por HIC em <i>Phenyl Sepharose</i> HP.	81
Figura 32 – Eletrofluorogramas nos Sistemas Tris-glicina (A) e Tris-borato (B) de	83

Δ Di0S e Δ Di6S Após Incubação com Fração 12 (condroitinase C) de HIC em *Phenyl Sepharose* HP.

Figura 33 – Eletrofluorogramas nos Sistemas Tris-glicina (A e B) e Tris-borato (C) de Produtos de Digestão de Condroitim Sulfato por Incubação com Condroitinases de <i>F. heparinum</i> Fracionadas por HIC em <i>Phenyl Sepharose</i> HP na Presença de Fluoreto de Sódio.	84
Figura 34 – Eletrofluorogramas nos Sistemas Tris-glicina (A) e Tris-borato (C) de Produtos de Digestão de Glicosaminoglicanos por Incubação com Fração 12 (condroitinase C) de HIC em <i>Phenyl Sepharose</i> HP, na Presença de Sacarolactona.	85
Figura 35 – Eletrofluorogramas nos Sistemas Tris-glicina (A) e Tris-borato (B) de Produtos de Digestão de Condroitim Sulfato de Diferentes origens por Condroitinase AC de <i>F. heparinum</i> Fracionada por HIC.	86
Figura 36 – Eletrofluorogramas nos Sistemas Tris-glicina (A) e Tris-borato (B) de Produtos de Digestão de Condroitim Sulfato de Amostras Farmacêuticas por Condroitinase AC de <i>F. heparinum</i> Fracionada por HIC.	87
Figura 37 – (A e B) Eletrofluorogramas em Sistema Tris-borato de Diversos Açúcares Submetidos ou não à Hidrólise Ácida e Derivatizados com AMAC.	89
Figura 38 – Eletrofluorograma em Sistema Tris-borato de Condroitim Sulfato Submetido ou não à Hidrólise Ácida.	90
Figura 39 – Eletrofluorogramas em Sistema Tris-borato de Amostras Farmacêuticas de Condroitim Sulfato Contaminadas por Outros Açúcares.	91

APÊNCIE 1 – RESULTADOS PRELIMINARES

Figura A1 – Eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3 diaminopropano acetato (PDA) de diferentes glicosaminoglicanos e ácidos nucleicos.	113
Figura A2 – Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA de condroitim sulfato.	114
Figura A3 – Variação inter-lâmina e intra-lâmina do método de eletroforese em gel de agarose.	115
Figura A4 – Curva de calibração da análise inter-lâmina.	116
Figura A5 – Titulação de condroitim sulfato com brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON)	117
Figura A6 – Curvas de titulação de diferentes polímeros aniônicos com brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON) 0,1%.	117
Figura A7 – Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA de amostras de condroitim sulfato coletadas em farmácias de manipulação de Juiz de Fora.	118
Figura A8 – Teor de condroitim sulfato em Amostras Farmacêuticas analisadas por eletroforese em gel de agarose e titulação fotométrica com	119

CETAVLON.

Figura A9 – Espectro de absorção em ultravioleta de condroitim sulfato padrão Sigma.	120
Figura A10 – Espectro de absorção em ultravioleta de soluções padrão de ácido glucurônico e N-acetil-glucosamina.	120
Figura A11 – Espectro de absorção em ultravioleta de amostras 3, 4, 6, 12 e 16.	121
Figura A12 – Espectro de absorção em ultravioleta de amostras 13 e 15.	122
Figura A13 – Espectro de absorção em ultravioleta de amostras 1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 14 e de todas as 16 amostras mais o padrão.	123
Figura A14 – Dosagem de açúcares redutores por método do DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) em amostras de condroitim sulfato coletadas em farmácias de manipulação de Juiz de Fora.	124
Figura A15 – Cromatografia em papel das amostras de insumo farmacêutico condroitim sulfato coletadas em farmácias de manipulação.	126
Figura A16 – Dosagem de proteínas totais por método de Lowry em amostras de condroitim sulfato coletadas em farmácias de manipulação de Juiz de Fora.	127
Figura A17 – Dosagem de ácido urônico por método de carbazol em amostras de condroitim sulfato coletadas em farmácias de manipulação de Juiz de Fora.	128
Figura A18 – Eletroforese em gel de agarose de amostras submetidas à degradação com condroitinase AC. Incubação de volumes variados de cada amostra para atingir 100 µg de condroitim sulfato.	131
Figura A19 – Cromatografia em papel de amostras submetidas à degradação com condroitinase AC. Incubação de 100 µg de amostra.	132
Figura A20 – Cromatografia em papel de amostras submetidas à degradação com condroitinase AC. Incubação de volumes variados de cada amostra para atingir 100 µg de condroitim sulfato.	132
Figura A21 – PAGE de condroitim sulfato de amostras farmacêuticas.	134
Figura A22 – Análise densitométrica das bandas de condroitim sulfato de amostras farmacêuticas em gel de PAGE.	135
Figura A23 – <i>Imunoblotting</i> contra queratam sulfato de amostras farmacêuticas de condroitim sulfato.	136
Figura A24 – Organograma com a classificação das amostras de condroitim sulfato quanto à distribuidora e procedência (país de origem da matéria-prima)	137
Figura A25 – (A) Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA de dois medicamentos industrializados contendo condroitim sulfato. B: Concentração de CS (em mg) determinada por densitometria das bandas do gel de agarose.	140

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagem Relativa de Dissacarídeos de Condroitim Sulfato Extraído de Diferentes Origens.	32
Tabela 2 – Especificações Geralmente Reportadas em Laudos de Certificado de Análise de Condroitim Sulfato de Sódio.	35
Tabela 3 – Atividade de Condroitinases Presentes em Extrato Bruto de <i>F. heparinum</i> .	68
Tabela 4 – Atividade de Frações Dialisadas Eluídas por HIC em <i>Phenyl Sepharose</i> HP.	71
Tabela 5 – Porcentagem Relativa de Produtos de Digestão de CS de Diferentes Origens por Condroitinase AC de <i>F. heparinum</i> Fracionada por HIC, Determinada por FACE em Sistema Tris-Glicina.	86
Tabela 6 – Porcentagem Relativa de Produtos de Digestão de CS de Amostras Farmacêuticas e Padrões Sigma-Aldrich por Condroitinase AC de <i>F. heparinum</i> Fracionada por HIC, Determinada por FACE em Sistema Tris-Glicina.	88

APÊNCIE 1 – RESULTADOS PRELIMINARES

Tabela A1 – Comparação dos Resultados de Teor de Condroitim Sulfato e de Proteínas Obtidos Neste Trabalho com as Informações Reportadas no Certificado de Análise do Controle de Qualidade do Produto.	139
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

As seguintes abreviaturas foram utilizadas no presente trabalho:

Δ	presença de insaturação
$\Delta\text{Di}0\text{S}$	2-acetamido-2-deoxi-3-O-(ácido β -D-gluco-4-enepiranosil urônico)-D-galactose, ou dissacarídeo insaturado não sulfatado
$\Delta\text{Di}2,4,6\text{S}$	2-acetamido-2-deoxi-3-O-(ácido 2-O-sulfo- β -D-gluco-4-enepiranosil urônico)-4,6-di-O-sulfo-D-galactose, ou dissacarídeo insaturado 2,4,6-trissulfatado
$\Delta\text{Di}2,4\text{S}$	2-acetamido-2-deoxi-3-O-(ácido 2-O-sulfo- β -D-gluco-4-enepiranosil urônico)-4-O-sulfo-D-galactose, ou dissacarídeo insaturado 2,4-dissulfatado
$\Delta\text{Di}2,6\text{S}$	2-acetamido-2-deoxi-3-O-(ácido 2-O-sulfo- β -D-gluco-4-enepiranosil urônico)-6-O-sulfo-D-galactose, ou dissacarídeo insaturado 2,6-dissulfatado
$\Delta\text{Di}2\text{S}$	2-acetamido-2-deoxi-3-O-(ácido 2-O-sulfo- β -D-gluco-4-enepiranosil urônico)-D-galactose, ou dissacarídeo insaturado 2-sulfatado
$\Delta\text{Di}4,6\text{S}$	2-acetamido-2-deoxi-3-O-(ácido β -D-gluco-4-enepiranosil urônico)-4,6-di-O-sulfo-D-galactose, ou dissacarídeo insaturado 4,6-dissulfatado
$\Delta\text{Di}4\text{S}$	2-acetamido-2-deoxi-3-O-(ácido β -D-gluco-4-enepiranosil urônico)-4-O-sulfo-D-galactose, ou dissacarídeo insaturado 4-sulfatado
$\Delta\text{Di}6\text{S}$	2-acetamido-2-deoxi-3-O-(ácido β -D-gluco-4-enepiranosil urônico)-6-O-sulfo-D-galactose, ou dissacarídeo insaturado 6-sulfatado
ΔDiHA	2-acetamido-2-deoxi-3-O-(ácido β -D-gluco-4-enepiranosil urônico)-D-glicose, ou dissacarídeo insaturado de ácido hialurônico
μ	micro
Abs	absorbância
Ac	acetato ou acetil
AINE	anti-inflamatório não esteroide
AMAC	2-aminoacridona
ANTS	ácido 8-aminonaftaleno-1,3,6-trissulfônico

C4S	condroitim 4-sulfato
C6S	condroitim 6-sulfato
CCD	charged coupled device
CE	<i>capillary electrophoresis</i>
CETAVLON	brometo de <i>N</i> -cetil- <i>N,N,N</i> -trimetilamônio
CS	condroitim sulfato
DMB	azul de 1,9-dimetilmetileno (dimethylmethylen blue)
DMSO	dimetil sulfóxido
DNS	ácido 3,5-dinitrosalicílico
DS	dermatam sulfato
EP	<i>The European Pharmacopeia</i>
EULAR	<i>european league against rheumatism</i>
FACE	<i>fluorophore assisted carbohydrate electrophoresis</i>
FDA	<i>food and drug administration</i>
Fru	frutose
GAG	glicosaminoglicano
Gal	galactose
GalNAc	<i>N</i> -acetil-D-galactosamina
GalNAc-4,6S	<i>N</i> -acetil-D-galactosamina-4,6-di-sulfato
GalNAc-4S	<i>N</i> -acetil-D-galactosamina-4-sulfato
GalNAc-6S	<i>N</i> -acetil-D-galactosamina-6-sulfato
GC	<i>gas chromatography</i>
Glc	glicose
GlcA	ácido β -D-glucurônico
GlcN	glucosamina
GlcNAc	<i>N</i> -acetil-D-glucosamina
Hep	heparina
HIC	<i>hydrophobic interaction chromatography</i>

HP	<i>high performance</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HS	heparam sulfato
IdoA	ácido α -L-idurônico
kDa	quiloDaltons
Lac	lactose
M	molar
Mal	maltose
NaCNBH ₃	cianoborohidreto de sódio
OARSI	<i>osteoarthritis research society international</i>
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAGE-FS	<i>polyacrylamide gel electrophoresis of fluorophore-labeled saccharides</i>
QS	queratam sulfato
Rf	fator de retenção
RMN	ressonância magnética nuclear
SaL	sacarolactona
SYSADOA	<i>symptomatic slow acting drug in osteoarthritis</i>
TCA	ácido tri-cloro acético
TLC	<i>thin layer chromatography</i>
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	unidades
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
USP	<i>The United States Pharmacopeia</i>
UV	ultra violeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	OSTEOARTRITE	19
1.1.1	ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS PARA TRATAMENTO DE OSTEOARTRITE	20
1.1.2	CONDROITIM SULFATO UTILIZADO NO TRATAMENTO DE OSTEOARTRITE ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	
1.2	GLICOSAMINOGLICANOS E PROTEOGLICANOS	24
1.3	CONDROITIM SULFATO	26
1.3.1	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE CONDROITIM SULFATO	27
1.3.2	MÉTODOS APLICADOS À ANÁLISE DE CONDROITIM SULFATO	28
1.3.3	FACE (<i>FLUOROPHORE ASSISTED CARBOHIDRATE ELECTROPHORESIS</i>)	33
1.3.4	ANÁLISE FARMACOPEICA DE CONDROITIM SULFATO	34
2	OBJETIVOS	37
2.1	OBJETIVOS GERAIS	37
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	MATERIAIS	38
3.2	MÉTODOS	41
3.2.1	FACE (<i>FLUOROPHORE ASSISTED CARBOHYDRATE ELECTROPHORESIS</i>)	41
3.2.1.1	Derivatização de Amostras e Padrões	41
3.2.1.2	Preparo de Géis de Poliacrilamida e Eletroforese	42
3.2.2	PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE CONDROITINASES DE <i>Flavobacterium heparinum</i>	43
3.2.2.1	Preparo de Extrato Bruto	43
3.2.2.2	Fracionamento e Caracterização das Enzimas Presentes no Extrato Bruto	44
3.2.2.2.1	Método 1 - Determinação de Atividade Enzimática por Absorção em UV	46
3.2.2.2.2	Método 2 - FACE de Produtos de Degradação de Glicosaminoglicanos por Condroitinases	46
3.2.3	PREPARO DE DISSACARÍDEOS E OLIGOSSACARÍDEOS INSATURADOS E CONDROITIM SULFATO	47
3.2.3.1	Preparo de dissacarídeos e oligossacarídeos insaturados por Cromatografia Preparativa em Papel	47
3.2.3.2	Extração de Condroitim Sulfato de Tecidos Animais	47
3.2.4	ANÁLISE DE CONDROITIM SULFATO EM AMOSTRAS FARMACÊUTICAS	48
3.2.4.1	Eletroforese	48
3.2.4.1.1	Eletroforese em Gel de Agarose em Tampão PDA	48
3.2.4.1.2	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	48
3.2.4.2	Imunoblotting para Queratam Sulfato	49
3.2.4.3	Titulação Fotométrica	49
3.2.4.4	Espectro de Absorção em Ultravioleta	50
3.2.4.5	Degradações Enzimáticas	50
3.2.4.6	Cromatografia em Papel	51
3.2.4.7	Análises Químicas	51
3.2.4.7.1	Determinação de Açúcares Redutores	51
3.2.4.7.2	Quantificação de Proteínas	52
3.2.4.7.3	Dosagem de Ácido Urônico	52
4	RESULTADOS	53
4.1	ANÁLISE DE AMOSTRAS FARMACÊUTICAS DE CONDROITIM SULFATO	53
4.2	FACE (<i>FLUOROPHORE ASSISTED CARBOHYDRATE ELECTROPHORESIS</i>)	53
4.2.1	ANÁLISE DE MIGRAÇÃO DE DISSACARÍDEOS INSATURADOS DE CONDROITIM SULFATO/DERMATAM SULFATO	53

4.2.2	ANÁLISE DE MIGRAÇÃO DE DIFERENTES TIPOS DE N-ACETIL-GALACTOSAMINA E DISSACARÍDEO INSATURADO DE ÁCIDO HIALURÔNICO.....	55
4.2.3	ANÁLISE DA DERIVATIZAÇÃO DE SACARÍDEOS COM AMAC	57
4.2.3.1	Derivatização de Glicose.....	57
4.2.3.2	Derivatização de Produtos de Digestão de Condroitim Sulfato	58
4.3	PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS DE DIGESTÃO ENZIMÁTICA DE CONDROITIM SULFATO.....	60
4.4	PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE CONDROITINASES DE FLAVOBACTERIUM HEPARINUM.....	66
4.4.1	PREPARO E ANÁLISE DE EXTRATO BRUTO DE <i>FLAVOBACTERIUM HEPARINUM</i>	66
4.4.2	FRACIONAMENTO DE CONDROITINASES PRESENTES NO EXTRATO BRUTO	68
4.4.3	CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DAS FRAÇÕES ELUÍDAS POR HIC EM PHENYL SEPHAROSE HP.....	69
4.4.3.1	Determinação de Atividade Enzimática por Absorção em UV (Método 1).	69
4.4.3.2	FACE de Produtos de Degradação de Glicosaminoglicanos por Condroitinases (Método 2).....	72
4.4.3.2.1	<i>Condroitinase AC (Frações 5 e 6).....</i>	<i>72</i>
4.4.3.2.2	<i>Condroitinase C (Fração 12).....</i>	<i>77</i>
4.4.3.2.3	<i>Condroitinase B (Frações 17 e 18).....</i>	<i>79</i>
4.4.4	ANÁLISE DAS ENZIMAS CONTAMINANTES NAS PREPARAÇÕES DE CONDROITINASES POR FACE.....	79
4.5	APLICAÇÃO DE FACE NA ANÁLISE DE CONDROITIM SULFATO EXTRAÍDO DE DIVERSAS FONTES.....	85
4.6	APLICAÇÃO DE FACE NA ANÁLISE DE AMOSTRAS FARMACÊUTICAS DE CONDROITIM SULFATO.....	87
4.6.1	ANÁLISE DISSACARÍDICA DE CONDROITIM SULFATO.....	87
4.6.2	ANÁLISE DE AÇÚCARES CONTAMINANTES.....	88
5	DISCUSSÃO.....	92
6	CONCLUSÃO.....	104
	REFERÊNCIAS	105
	APENDICE A – RESULTADOS PRELIMINARES	112
	APENDICE B – PRODUÇÃO INTELECTUAL.....	141

1 INTRODUÇÃO

1.1 OSTEOARTRITE

Osteoartrite ou artrose é uma doença progressiva caracterizada pela destruição e perda da cartilagem articular, promovendo alterações nos tecidos adjacentes e desenvolvimento de processos inflamatórios. Sua origem, ainda que não completamente elucidada, parece ser o resultado do somatório de diversos fatores, como por exemplo, fatores mecânicos, bioquímicos e genéticos, entre outros. Com a progressão da doença, o processo de degradação da cartilagem supera o anabólico, o que leva a uma progressiva perda da cartilagem. Durante o estágio clínico da osteoartrite ocorre frequentemente uma reação inflamatória envolvendo a membrana sinovial, o que favorece a síntese de mediadores inflamatórios que alteraram o metabolismo dos condrócitos. A via final comum de destruição da cartilagem resulta da incapacidade dos condrócitos em manter o balanço homeostático entre síntese e degradação da matriz cartilaginosa, favorecendo o catabolismo. (MARTEL-PELLETIER et al., 2008).

A osteoartrite é a forma mais comum de doença articular e a maior responsável por prejuízo funcional e redução da independência em idosos, devido principalmente à perda de movimentos. Essa doença é responsável ainda por grande impacto sócio-econômico, pois é uma das maiores causas de problemas relacionados à mobilidade e incapacidade. Nos Estados Unidos cerca de 20 milhões de pessoas são afetadas, número que deverá ser duplicado em duas décadas (CLEGG et al., 2006).

No Brasil, com o aumento na proporção da população de idosos provocado pelo declínio da fecundidade e aumento da expectativa de vida, observa-se um aumento das doenças crônico-degenerativas, incluindo osteoartrite. Essa doença atinge cerca de 16% da população brasileira, sendo responsável por 30 a 40% de todas as consultas em ambulatórios de reumatologia. Com o aumento da idade a prevalência da osteoartrite é ainda maior, sendo que 85% das pessoas com idade superior a 79 anos apresenta diagnóstico radiológico de osteoartrite. Esse quadro ainda sobrecarrega o serviço de saúde pública nacional (TAMEGUSHI et al., 2008).

A osteoartrite afeta principalmente as articulações do quadril e do joelho, e estima-se que mais de 40% de idosos acima de 65 anos tenha osteoartrite

sintomática em um dos dois locais, sendo a osteoartrite de joelho mais prevalente (ZHANG et al., 2007).

1.1.1 ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS PARA TRATAMENTO DE OSTEOARTRITE

As estratégias atuais de tratamento da osteoartrite incluem tanto terapias farmacológicas quanto não farmacológicas com objetivo de redução da dor no local afetado e da deficiência física e dificuldade de locomoção melhorando a mobilidade, e algumas delas ainda visam diminuir a deterioração estrutural da articulação afetada, promovendo melhoria da qualidade de vida do paciente. Intervenção cirúrgica também pode ser uma opção para pacientes que não respondem ao tratamento convencional (CLEGG et al., 2006; ZHANG et al., 2008)

As terapias medicamentosas atualmente disponíveis têm como objetivo principal a redução da dor articular nos pacientes com a doença. Para este fim são utilizados tanto analgésicos como anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), que além de possuírem efeito de caráter apenas secundário, têm efeitos adversos preocupantes relacionados ao trato gastrointestinal superior e atualmente ao sistema cardiovascular (CLEGG et al., 2006).

Atualmente são encontradas diversas recomendações e diretrizes para o tratamento da osteoartrite. Porém, a maioria delas é criticada pela falta de rigor metodológico, aplicabilidade e ainda por existirem conflitos de interesse. Dessa forma, a Sociedade Internacional de Pesquisa em Osteoartrite - OARSI (*Osteoarthritis Research Society International*) definiu em setembro de 2005 um comitê internacional multidisciplinar com o objetivo de elaborar um consenso atualizado e com base científica apontando uma estratégia global para o tratamento da osteoartrite de joelho e quadril (ZHANG et al., 2007; ZHANG et al., 2008).

De forma geral, a conduta mais eficaz no tratamento da osteoartrite envolve combinação de terapias não farmacológicas e farmacológicas. Dentre as modalidades não farmacológicas de tratamento, podem ser utilizados: informação e educação do paciente quanto ao objetivo do tratamento e mudanças no estilo de vida; exercícios aeróbicos e para fortalecimento muscular, como fisioterapia e hidroginástica; diminuição de peso; utilização de joelheiras e calçados adequados e

terapias alternativas, como acupuntura, termoterapia e terapia eletromagnética (ZHANG et al., 2008; ZHANG et al., 2010).

Quanto às modalidades de tratamento farmacológicas, acetaminofeno (paracetamol) em dose máxima de 4 g por dia é utilizado como analgésico oral de primeira escolha no alívio de dores moderadas. Porém, diversos estudos têm questionado sua eficácia e toxicidade envolvendo principalmente sistema hepático, renal e gastrointestinal. Atualmente, o órgão norte-americano FDA (*Food and Drug Administration*) recomenda doses diárias inferiores a 4 gramas por dia para adultos, sendo que cada dose não deve ultrapassar 650 mg (ZHANG et al., 2008; ZHANG et al., 2010).

AINEs também são comumente utilizados no tratamento de osteoartrite de joelho e quadril. Porém, o uso de longa duração desses medicamentos é desaconselhado. Em pacientes com história prévia de distúrbios gastrointestinais, deve-se optar pelo uso de inibidores seletivos da COX-2 ou inibidores não seletivos associados a inibidores da bomba de próton, como omeprazol. Os AINEs também devem ser utilizados com cautela em pacientes com risco cardíaco. A aplicação de AINEs de uso tópico e capsaicina também é eficiente no tratamento associado ou alternativo a analgésicos e anti-inflamatórios de uso oral (ZHANG et al., 2008; ZHANG et al., 2010).

Injeções intra-articulares de corticosteroides também são consideradas, especialmente em pacientes com osteoartrite de joelho ou quadril com dor severa que não responde ao tratamento com analgésicos ou anti-inflamatórios orais ou ainda em pacientes com efusão ou sinal de inflamação local. Injeção intra-articular de ácido hialurônico é outra forma de tratamento, caracterizada por ação demorada, porém de duração prolongada quando comparada com injeção intra-articular de corticosteroides. Entretanto essas duas estratégias são procedimentos invasivos e geralmente não são bem aceitas pelos pacientes por gerarem desconforto e dor no momento da aplicação. Além disso, há o risco de injeção da medicação fora do local indicado. (ZHANG et al., 2008; ZHANG et al., 2010).

O uso de opióides mais leves e analgésicos narcóticos também pode ser considerado para o tratamento de dor refratária em pacientes que não obtiveram resposta efetiva com o uso de outros agentes farmacológicos, ou que têm contraindicação de uso. Opióides mais fortes devem apenas ser utilizados em casos excepcionais de dor severa. Nestes casos, o tratamento não farmacológico deve ser

reforçado e intervenção cirúrgica também deve ser avaliada. De forma geral, em pacientes com osteoartrite de joelho ou quadril que não respondem de forma adequada ao tratamento não farmacológico e farmacológico, a intervenção cirúrgica pode ser considerada (ZHANG et al., 2008; ZHANG et al., 2010).

Atualmente uma nova classe de fármacos tem sido introduzida no tratamento da osteoartrite com objetivo de redução dos sintomas da doença. Essa classe, chamada SYSADOA (*Symptomatic Slow Acting Drug in Osteoarthritis*), inclui compostos que, em países europeus, são prescritos como medicamentos há muitos anos, enquanto nos Estados Unidos são vendidos como suplementos alimentares. Nessa classe está presente o condroitim sulfato de uso oral (UEBELHART, 2008).

O condroitim sulfato é atualmente recomendado pela EULAR (*European League Against Rheumatism*) para o tratamento de osteoartrite de joelho e de mão, com base em metanálises de diversos estudos clínicos. Na Europa, as recomendações da EULAR para tratamento de osteoartrite de joelho classificaram o condroitim sulfato como evidência 1A, onde A representa o nível mais elevado para uma estratégia terapêutica (JORDAN et al., 2003). Além do mais, estudos clínicos recentes demonstram que o condroitim sulfato pode apresentar efeitos que provocam a modificação do curso da doença, sendo capaz de parar sua progressão, e não apenas agir positivamente nos sintomas (UEBELHART et al., 2006; UEBELHART, 2008; KAHAN et al., 2009).

O tratamento de osteoartrite com condroitim sulfato associado a glucosamina é indicado como terapia medicamentosa e melhora o quadro sintomático em pacientes com osteoartrite de joelho. Estes sacarídeos são constituintes naturais dos proteoglicanos da cartilagem e vêm sendo muito utilizados como suplementos nutricionais principalmente nos Estados Unidos, enquanto em países da Europa, Ásia e América Latina, seu uso como medicamento tem ganhado importância (ZHANG et al., 2008; ZHANG et al., 2010).

No Brasil, o condroitim sulfato é registrado pela ANVISA como medicamento. Quanto à denominação dada a esse princípio ativo no país, pode-se encontrar sulfato de condroitina ou condroitina sulfato de sódio. Neste trabalho, este insumo farmacêutico será denominado condroitim sulfato, que é a tradução mais adequada do termo *chondroitin sulfate*. Os principais produtos industrializados para tratamento de osteoartrite contendo condroitim sulfato são o Condroflex® e o Artrolive®, comercializados em associação com glucosamina (denominada sulfato de

glucosamina no Brasil) na forma de sachês ou cápsulas. O condroitim sulfato ainda é amplamente manipulado e comercializado no país por farmácias magistrais.

A utilização de condroitim sulfato no regime terapêutico da osteoartrite melhora a função das articulações, pois reduz a dor e o edema articular e impede o estreitamento do espaço articular. Além disso, a segurança e tolerância do fármaco mostram-se favoráveis ao uso (UEBELHART, 2008).

A resposta clínica apresentada pelo uso de condroitim sulfato pode ser explicada pelos diversos efeitos produzidos por essa molécula no organismo. A diminuição da dor e do edema podem ser explicados pelo efeito anti-inflamatório do condroitim sulfato, devido a mecanismos como diminuição da expressão de fosfolipase A2 e ciclo-oxigenase 2 e diminuição da concentração de prostaglandina E2. Nas articulações o condroitim sulfato reduz a concentração de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 1B (IL-1 β), e provoca ainda diminuição da concentração sistêmica e articular de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio. Além disso, a proteção da estrutura articular pode ser explicada pelo fato de que, em condrócitos, o condroitim sulfato reduz o aumento de proteases de matriz mediado por IL-1 β , como as metaloproteases de matriz (MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 e MMP-14) e agrecanase-1 e -2 (IMADA et al., 2010; IOVU et al., 2008).

O condroitim sulfato tem um modo de ação mais demorado que os AINEs, sendo que os primeiros efeitos sobre dor e mobilidade somente são alcançados após 2 a 3 semanas de terapia. Em contrapartida, o uso de analgésicos e AINES apresenta resposta terapêutica no prazo de 1 a 3 dias. Porém, é importante notar que, em caso de interrupção da administração após uso contínuo diário de 3 meses, o condroitim sulfato na maioria dos casos possui um efeito remanescente que pode durar até 2 meses. Este resultado nunca é alcançado com o uso de AINEs, os quais necessitam ser continuamente administrados para promover alívio da dor e aumento da mobilidade nos pacientes com osteoartrite. Uma importante abordagem no uso do condroitim sulfato é a redução do uso de AINEs no regime terapêutico da osteoartrite, conseqüentemente limitando a ocorrência dos efeitos adversos relacionados ao trato gastrointestinal superior (UEBELHART, 2008).

1.2 GLICOSAMINOGLICANOS E PROTEOGLICANOS

Glicosaminoglicanos (GAGs) são heteropolissacarídeos lineares que apresentam como estrutura básica unidades dissacarídicas repetitivas, constituídas por uma hexosamina e por um açúcar não nitrogenado (ácido D-glucurônico, ácido L-idurônico ou D-galactose), unidos entre si por ligações glicosídicas. As unidades dissacarídicas podem estar esterificadas por grupos sulfato, que juntamente com os grupamentos carboxílicos dos ácidos urônicos (açúcar não nitrogenado), conferem alta densidade de cargas negativas a esses polímeros (JACKSON et al., 1991).

De acordo com o tipo de hexosamina, os GAGs podem ser divididos em galactosaminoglicanos, que incluem condroitim sulfato e dermatam sulfato, e em glucosaminoglicanos, a exemplo de heparim sulfato, heparina, queratim sulfato e ácido hialurônico. A hexosamina é sempre *N*-acetilada em condroitim sulfato, dermatam sulfato, ácido hialurônico e queratim sulfato, enquanto na heparina a glucosamina é geralmente *N*-sulfatada, e em heparim sulfato as duas substituições podem ocorrer. Além da classificação de acordo com o tipo de hexosamina, os GAGs ainda podem ser distinguidos de acordo com o açúcar não nitrogenado. Ácido D-glucurônico é o único encontrado em condroitim sulfato e ácido hialurônico, enquanto queratim sulfato apresenta galactose. Já em dermatam sulfato, heparim sulfato e heparina, ácido D-glucurônico e ácido L-idurônico coexistem em proporções variadas. A presença de grupamentos sulfato em diferentes posições, bem como o tipo de ligação glicosídica intradissacarídica e interdissacarídica aumentam ainda mais a complexidade destas moléculas (SAMPAIO & NADER, 2006).

Com exceção do ácido hialurônico, o único não sulfatado, os GAGs são formados por dois ou mais tipos de unidades dissacarídicas. Diferentes proporções entre esses dissacarídeos são encontradas nos GAGs de diferentes origens e, por isso, cada um deles se constitui numa família. A Figura 1 mostra as unidades mais freqüentes de cada uma dessas famílias (ESKO, KIMATA & LINDAHL, 2009).

Os glicosaminoglicanos são bastante heterogêneos em termos de peso molecular, que varia entre 5 e 100 kDa. O número de grupamentos sulfato por unidade dissacarídica também é característico, sendo que heparim sulfato e heparina tendem a ser mais sulfatados que condroitim e dermatam sulfato.

Com exceção do ácido hialurônico, que ocorre nos tecidos como cadeia polissacarídica livre, os GAGs encontram-se covalentemente ligados a um esqueleto

protéico, formando os proteoglicanos (PGs), os quais ainda podem conter oligossacarídeos *N*- e/ou *O*-ligados (EVERED & WHELAN, 1986; LOHMANDER et al., 1980; THONAR & SWEET, 1997).

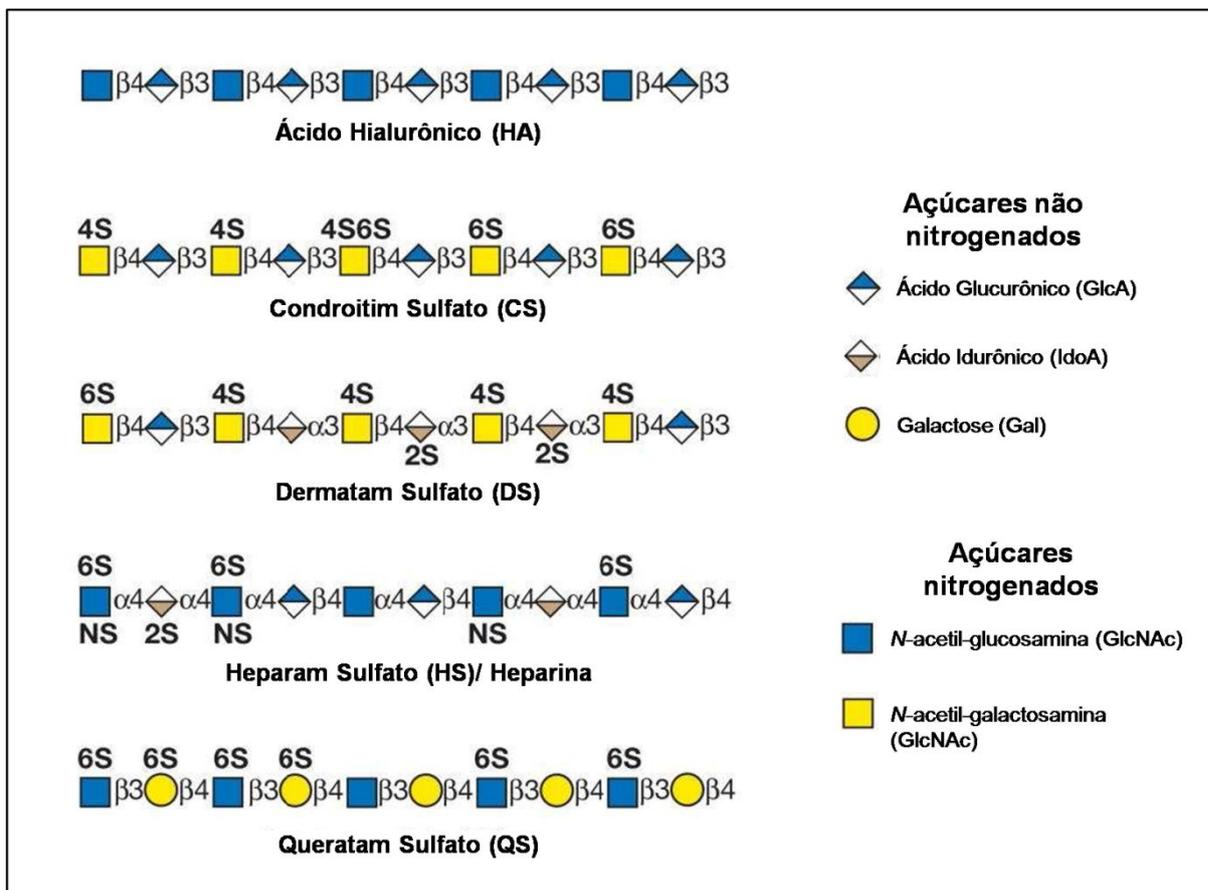


Figura 1 – Esquema da Composição Típica de Diferentes Famílias de Glicosaminoglicanos.
Fonte: Adaptado de ESKO, KIMATA, LINDAHL, 2009.

Os proteoglicanos encontram-se largamente distribuídos nos tecidos animais e podem ser classificados de acordo com o esqueleto protéico. Os PGs localizados na superfície celular compreendem as famílias do sindecam e glicam, enquanto serglicim é encontrado em grânulos. Na matriz extracelular são encontrados vários tipos de PGs, como agregam, versicam, decorim, biglicam, perlecam e agrim (IOZZO, 1998).

A ligação dos GAGs sulfatados ao esqueleto protéico, com exceção do queratan sulfato, se faz por meio do tetrassacarídeo ácido glucurônico-galactosil-galactosil-xilose (GlcA-Gal-Gal-Xil), onde a extremidade redutora se une à proteína por uma ligação do tipo *O*-glicosídica entre a xilose do tetrassacarídeo e a hidroxila de um resíduo de serina. A extremidade não redutora se liga à cadeia de GAG (SAMPAIO & NADER, 2006).

1.3 CONDROITIM SULFATO

Condroitim sulfato é um glicosaminoglicano formado por unidades alternadas de ácido D-glucurônico e *N*-acetil-galactosamina, unidos por ligação glicosídica $\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow4)$, respectivamente [$\rightarrow4\text{GlcA}\beta1\rightarrow3\text{GalNAc}\beta1\rightarrow$]. De acordo com a sulfatação dos dissacarídeos, diferentes tipos de condroitim sulfato são conhecidos. Os mais comuns são formados por diferentes porcentagens de dissacarídeos monossulfatados: condroitim 4-sulfato, ou condroitim sulfato A, é constituído por dissacarídeos sulfatados na posição 4 ou 6 da *N*-acetil-galactosamina, podendo apresentar regiões não-sulfatadas. Já condroitim 6-sulfato, ou condroitim sulfato C, é formado principalmente por unidades dissacarídicas sulfatadas na posição 6 da *N*-acetil-galactosamina, podendo também estar presentes outros tipos de dissacarídeos monossulfatados, dissulfatados e não-sulfatados (LAMARI, KARAMANOS, 2006; VOLPI, 2007).

A proporção relativa dos dissacarídeos na cadeia de condroitim sulfato varia de acordo com o tecido e espécie. Por exemplo, condroitim sulfato extraído de plaquetas e tecidos cerebrais apresenta mais de 90% de unidades dissacarídicas 4-sulfatadas (DIETRICH et al., 1978; NADER, 1991). Já cartilagem humana normal de indivíduos adultos e cartilagem de tubarão apresentam maior proporção (cerca de 85%) do dissacarídeo 6-sulfatado (MICHELACCI et al., 1979; MICHELACCI, HORTON, 1989).

Em animais de origem marinha são também encontrados outros tipos de unidades dissacarídicas. O dissacarídeo E extraído de lula apresenta dois grupos sulfato nas posições 4 e 6 da *N*-acetil-galactosamina (SUZUKI et al., 1968). A unidade dissacarídica D, encontrada em cartilagem de tubarão e arraias, apresenta dissacarídeos dissulfatados na posição 2 do ácido glucurônico e 6 da *N*-acetil-galactosamina (VOLPI, 2007).

O dermatam sulfato apresenta uma estrutura com quantidades variáveis de ácido L-idurônico e ácido D-glucurônico, de acordo com o tecido e a espécie. Este glicosaminoglicano é formado a partir da epimerização do carbono 5 do ácido D-glucurônico do condroitim sulfato para L-idurônico, podendo ocorrer também modificações na sulfatação dos dois monossacarídeos constituintes. A Figura 2 mostra exemplos de dissacarídeos que formam os diferentes tipos de condroitim sulfato e dermatam sulfato (antigamente denominado condroitim sulfato B).

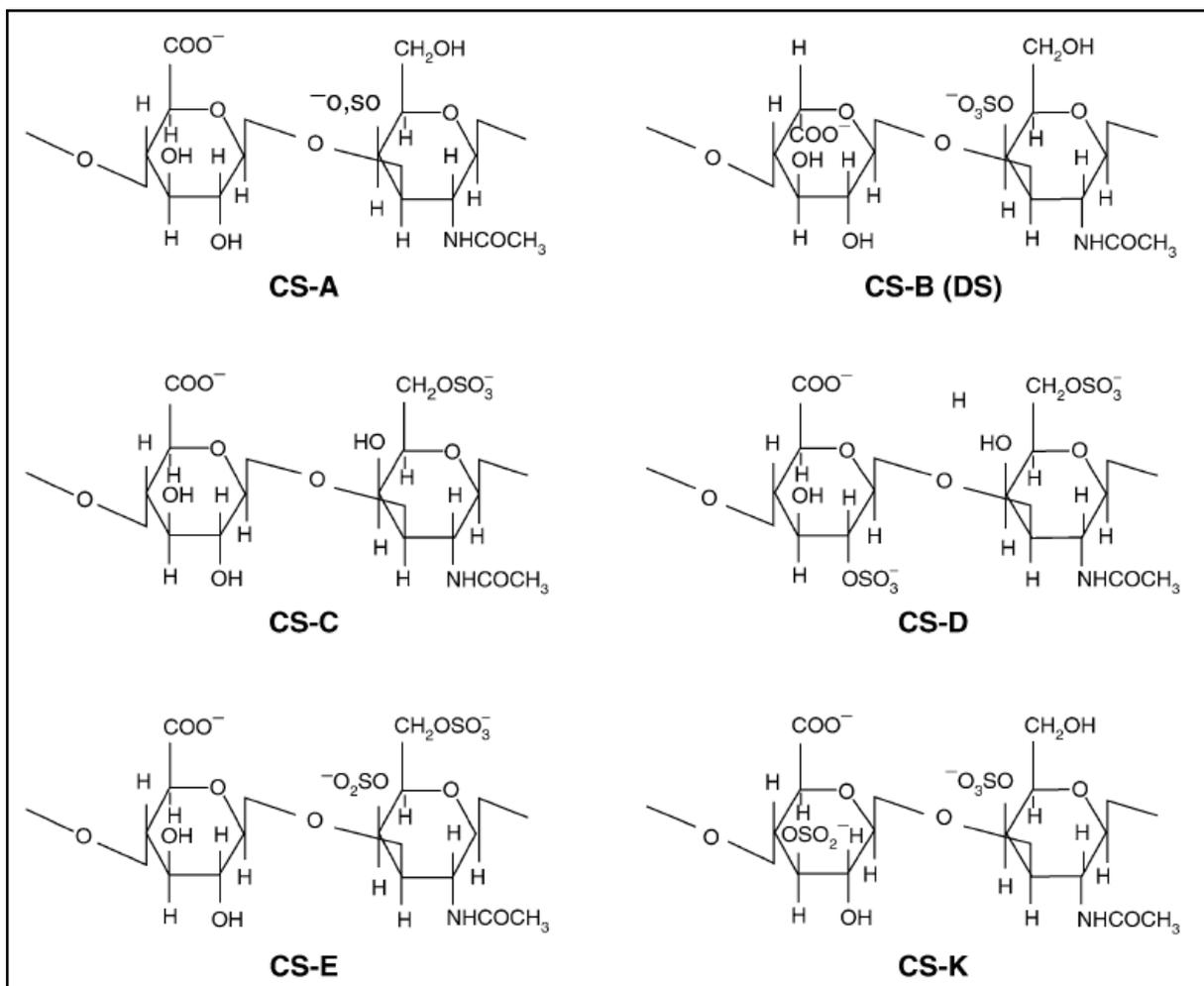


Figura 2 – Estrutura Química dos Dissacarídeos que Constituem Diversos Tipos de Condroitim Sulfato e Dermatam Sulfato. Fonte: STYLIANOU et al., 2006

A heterogeneidade de estruturas do condroitim sulfato é responsável pelas diversas e mais especializadas funções deste polissacarídeo. Na cartilagem articular, tecido conjuntivo que reveste os ossos, proteoglicanos de condroitim sulfato são os maiores responsáveis por retenção de água no tecido, o que pode ser atribuído às cargas negativas distribuídas na molécula. Esta função está associada ao grau de sulfatação dos dissacarídeos, sendo que condroitim sulfato com menor grau de sulfatação tem menor capacidade de retenção de água (STYLIANOU et al., 2006; MARTEL-PELLETIER et al., 2008).

1.3.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE CONDRITIM SULFATO

Em tecidos animais, o condroitim sulfato encontra-se associado a outros componentes da matriz extracelular, e para sua extração é necessário primeiramente realizar digestão proteolítica do tecido usando proteases não

específicas, por exemplo papaína. O material digerido é então tratado para separação do condroitim sulfato e outros GAGs por métodos de precipitação com solventes orgânicos ou íons de amônio quaternário e ainda por cromatografia de troca iônica. Como a maioria dos tecidos possui outros tipos de GAGs, são utilizadas ainda técnicas de fracionamento para obtenção de condroitim sulfato puro. Dentre essas técnicas, destacam-se fracionamento por solventes orgânicos como acetona e etanol, cromatografia de troca iônica, e degradação de outros GAGs por enzimas altamente específicas seguida por cromatografia de exclusão de tamanho (VOLPI, 1994; VOLPI, 1996; SILVA, 2006).

A produção comercial de condroitim sulfato, assim como de outros polissacarídeos naturais, é proveniente essencialmente de processos de extração e purificação de cartilagem de bovinos, suínos, aves e peixes cartilagosos (VOLPI, 2007).

1.3.2 MÉTODOS APLICADOS À ANÁLISE DE CONDRUITIM SULFATO

A dosagem de condroitim sulfato por métodos colorimétricos de detecção e quantificação de seus monômeros é usualmente utilizada. Para dosagem de ácido urônico, os métodos de Dische (1947) e Bitter e Muir (1962), que utilizam carbazol, são os mais usados. Contudo, deve-se destacar que esse método, na presença de açúcares neutros, desenvolve coloração marrom que interfere substancialmente na quantificação de ácido urônico (FILISSETTI-COZZI e CARPITA, 1991). Já a maioria dos métodos de dosagem de hexosaminas é derivada do método de Elson e Morgan (1933), baseado na reação com acetil-acetona.

Outra abordagem interessante na análise de condroitim sulfato está em sua capacidade de produzir metacromasia na presença de corantes catiônicos, propriedade conferida pela alta densidade de cargas negativas. O corante azul de 1,9-dimetilmetileno, de acordo com modificações de Farndale et al. (1986), é muito utilizado na triagem rápida para determinar presença de GAGs em amostras e também na quantificação de GAGs totais. Contudo, esse método deve ser utilizado com cautela na dosagem de condroitim sulfato, pois dosa também outros GAGs e ainda é muito afetado por alguns sais e por outros poliânions (LIMA et al., 2007). Outros corantes catiônicos também são utilizados na detecção de GAGs, por

exemplo azul de alcian, azul de toluidina e *stains-all* (STYLIANOU et al., 2006; VOLPI & MACCARI, 2002).

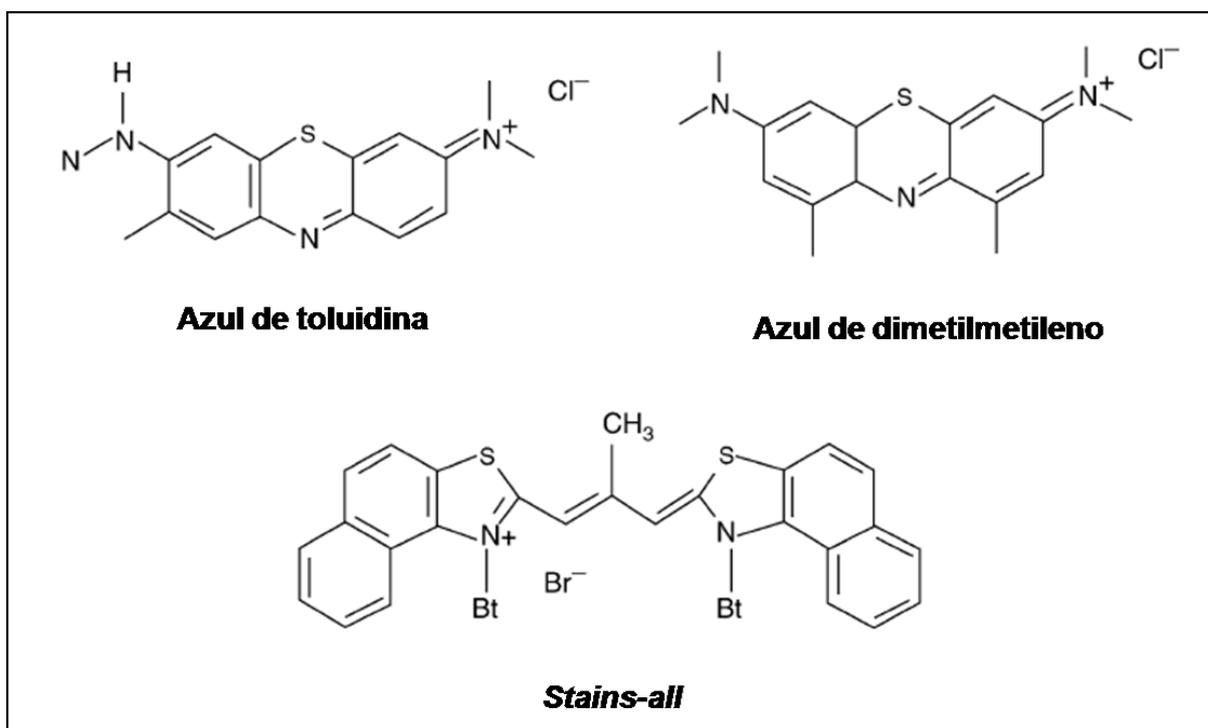


Figura 3 – Estrutura dos principais corantes empregados na análise de CS. Fonte: STYLIANOU et al., 2006

Métodos de eletroforese também são muito empregados na análise de condroitim sulfato. O método de eletroforese em gel de agarose, desenvolvido por Jaques et al. (1968) e modificado por Dietrich e Dietrich (1976) é um dos mais eficazes para análise qualitativa e quantitativa de GAGs. O condroitim sulfato pode ser qualitativamente avaliado quanto à presença de outros GAGs provenientes de impurezas de extração, como heparina, heparam sulfato e dermatam sulfato, pois estes apresentam migração diferente em alguns tampões, por exemplo 1,3-diaminopropano acetato. A análise densitométrica das bandas formadas após coloração por azul de toluidina ou outros corantes permite ainda a quantificação de diferentes polissacarídeos em misturas. A análise de condroitim sulfato também pode ser realizada por eletroforese em membrana de acetato de celulose em tampão acetato de bário, sendo que este método é atualmente recomendado pela Farmacopeia Americana (VOLPI, 2007; USP 32, 2008).

Métodos cromatográficos também são aplicados na separação e análise de condroitim sulfato, conferindo importantes informações quanto à densidade de carga, polidispersia e peso molecular médio das cadeias de GAG. Cromatografia de

troca iônica e cromatografia por exclusão de tamanho são dois exemplos bastante empregados na análise deste polímero (CHOI et al., 2003; STYLIANOU et al., 2006; VOLPI, 2007).

Outras técnicas analíticas eficientes na determinação da estrutura do condroitim sulfato são Ressonância Magnética Nuclear (NMR) e Espectrometria de Massas com Ionização por *Electrospray* (ESI-MS). Porém, alguns aspectos inerentes a esses métodos inviabilizam sua utilização em rotinas de análise, como preço dos equipamentos e procedimentos de análise complexos e demorados (VOLPI, 2007).

Uma ferramenta muito importante na identificação e análise de condroitim sulfato é o uso de condroitinases. Condroitinase AC, por exemplo, é uma enzima que pode ser extraída de *Flavobacterium heparinum*, uma bactéria não patogênica encontrada em solo. Essa enzima é uma endoglicosidase que age em condroitim 4-sulfato, condroitim 6-sulfato e em regiões glucurônicas de dermatam sulfato, liberando dissacarídeos e oligossacarídeos de baixo peso contendo ligação dupla entre carbonos 4 e 5 do resíduo de ácido glucurônico adjacente ao local quebra. A presença da insaturação proveniente da ação das condroitinases bacterianas é de fundamental importância para detecção dos produtos de digestão, dada a capacidade de absorção em ultravioleta (232 nm) (AGUIAR et al., 2003; MICHELACCI & DIETRICH, 1975; MICHELACCI & DIETRICH, 1976). A Figura 4 apresenta a estrutura de diferentes dissacarídeos insaturados de condroitim sulfato e ácido hialurônico, liberados após digestão com liases bacterianas.

A análise dos dissacarídeos que formam o condroitim sulfato após degradação por condroitinases é importante em diversas situações. Condroitins sulfato extraídos de diferentes origens apresentam diferente densidade de carga (número de grupamentos sulfato por unidade dissacarídica) e ainda variações na posição da sulfatação das unidades dissacarídicas (Tabela 1). A densidade de carga de condroitim sulfato de bovinos, suínos e aves varia de 0,88 a 0,96, devido à presença majoritária de dissacarídeos monossulfatados (posição 6 e 4) e baixa porcentagem (6 a 8%) de dissacarídeos não sulfatados. O condroitim sulfato dessas diferentes espécies pode então ser diferenciado pela razão 4S/6S (1,5-2,0 em boi, 3,0-4,0 em frango e 4,5-7,0 em porco). Por outro lado, condroitim sulfato de animais marinhos possui densidade de carga superior a 1,0 (pois apresenta também dissacarídeos dissulfatados e até trissulfatados) e a razão 4S/6S varia de acordo com a espécie (VOLPI, 2004; VOLPI, 2007).

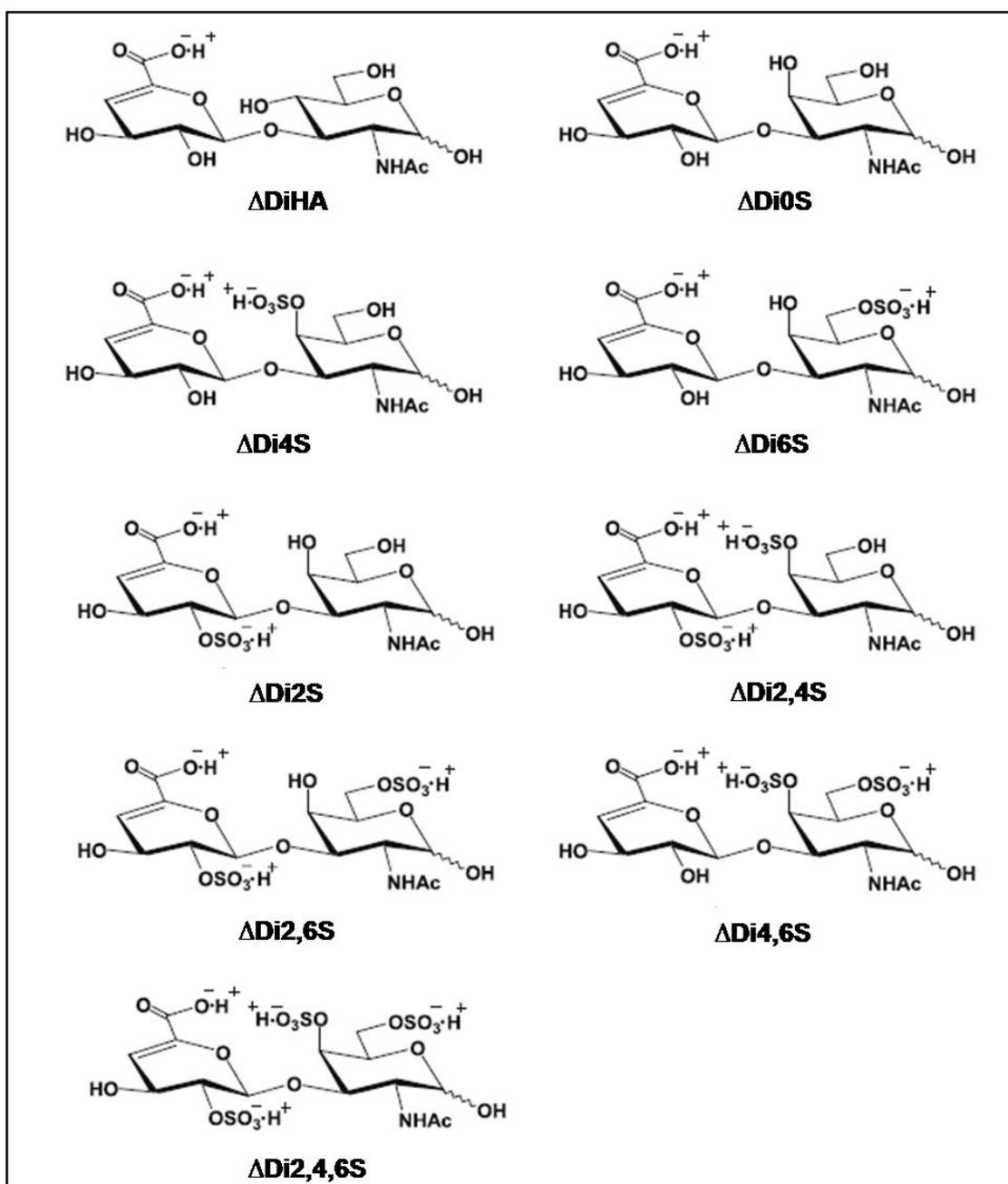


Figura 4 – Estrutura de Dissacarídeos Insaturados de Ácido Hialurônico e Condroitim Sulfato.

Além de apresentar diferenças entre as espécies, variações no condroitim sulfato, geralmente relacionadas ao perfil de sulfatação, também podem ocorrer em uma mesma espécie. Essas variações podem estar relacionadas à diferença na composição do condroitim sulfato em diferentes tecidos, ou ainda ao método de extração desse composto (TAMURA et al., 2009; VOLPI, 2009).

Tabela 1 – Porcentagem Relativa de Dissacarídeos de Condroitim Sulfato Extraído de Diferentes Origens.

Bovino	Suíno	Frango	Tubarão	Baleia	Arraia	Lula
--------	-------	--------	---------	--------	--------	------

ΔDi0S	6-10%	4-6%	8-12%	1-3%	7-11%	2-3%	11-14%
ΔDi6S	33-35%	14-16%	18-20%	40-50%	16-20%	38-40%	15-17%
ΔDi4S	56-60%	78-80%	68-72%	20-30%	63-67%	40-43%	49-51%
ΔDi2,6S	–	–	–	15-22%	2-5%	13-16%	1%
ΔDi4,6S	–	–	–	2-4%	2-4%	1%	18-20%
ΔDi2,4S	–	–	–	1-2%	–	1%	–
SO₃⁻/COO⁻	0,90-0,94	0,92-0,96	0,88-0,92	1,15-1,25	0,95-1,05	1,08-1,16	1,10-1,20
4S/6S	1,5-2,0	4,5-7,0	3,0-4,0	0,45-0,70	3,0-4,0	1,0-1,4	2,5-3,5

SO₃⁻/COO⁻: número de grupamentos sulfato por unidade dissacarídica. 4S/6S: razão entre porcentagem relativa de ΔDi4S e ΔDi6S. Fonte: adaptado de LAMARI, KARAMANOS, 2006; VOLPI, 2004, 2007, 2010.

As propriedades biológicas e farmacológicas do condroitim sulfato variam de acordo com sua origem e estrutura, sendo que propriedades físico-químicas diferentes influenciam na absorção oral da molécula. Dessa forma, a determinação da fonte de extração deste composto é extremamente importante, o que pode ser inferido pela análise dissacarídica (VOLPI, 2002; VOLPI, 2003; VOLPI, 2007).

Dentre os métodos de análise de unidades dissacarídicas de GAGs, cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica forte (SAX-HPLC) é um dos mais usados. Esse método se baseia na interação diferencial dos vários dissacarídeos sulfatados com a resina de troca iônica, com eluição por gradiente crescente de NaCl em tempos diferentes e detecção em 232 nm (STYLIANOU et al., 2006). Alguns autores ainda utilizam derivatização dos dissacarídeos com fluoróforos, por exemplo 2-aminoacridona (AMAC), com o objetivo de aumentar a capacidade de separação e principalmente a sensibilidade do método (VOLPI, 2010).

A análise das unidades dissacarídicas ainda pode ser realizada pelo método de eletroforese capilar. Alguns estudos destacam vários benefícios deste método, como elevada eficiência de separação, operação simples, tempo de análise curto, análise automatizada e com boa reprodutibilidade, e consumo muito baixo de amostra e tampões (VOLPI, 2004; MALAVAKI et. al, 2008).

Entretanto, os métodos citados acima, apesar de muito eficientes, necessitam de aparelhos caros que muitas vezes não são acessíveis a alguns laboratórios de pesquisa e controle de qualidade.

1.3.3 FACE (FLUOROPHORE ASSISTED CARBOHIDRATE ELECTROPHORESIS)

Uma alternativa para a análise de carboidratos é a utilização de um método de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para separação de sacarídeos marcados com fluoróforo. Essa técnica, denominada PAGE-FS (*polyacrylamide gel electrophoresis of fluorophore-labeled saccharides*) ou FACE (*fluorophore assisted carbohydrate electrophoresis*), foi inicialmente investigada por Jackson (1990) utilizando ANTS (ácido 8-aminonaftaleno-1,3,6-trissulfônico) para a derivatização dos carboidratos, e posteriormente o marcador AMAC (2-aminoacridona) foi introduzido (JACKSON 1991).

O método consiste na reação entre sacarídeos com grupo aldeído redutor livre e um grupo amino primário de um composto fluorescente, com produção de uma base de *Schiff*. Essa reação é reversível e necessita ser acompanhada de redução a um derivado de amina secundária usando cianoborohidreto de sódio (aminação redutiva). Os derivados sacarídeo-fluoróforo são então submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em géis de alta densidade (20 a 36%), para obtenção de separações com alta resolução. A presença do marcador fluorescente permite a detecção e quantificação dos derivados com elevada sensibilidade quando os géis (eletrofluorogramas) são iluminados por luz UV e digitalizados por sistema de aquisição de imagens.

A aplicação da FACE para análise de dissacarídeos derivados de glicosaminoglicanos foi efetivamente estabelecida por Calabro et al. (2000, 2001). Para isso, os polissacarídeos são submetidos à digestão por condroitinases para a formação de dissacarídeos insaturados contendo grupamento redutor livre, os quais são derivatizados com (AMAC). Os derivados sacarídeo-AMAC são separados por eletroforese em géis contendo 20 a 30% de poliacrilamida e quantificados por densitometria após a aquisição das imagens (JACKSON, 1994; CALABRO et al., 2000, 2001; OONUKI et al, 2005)

A Figura 5 apresenta a reação de derivatização de um dissacarídeo de condroitim sulfato com AMAC. A estrutura dos fluoróforos mais utilizados em FACE também está representada.

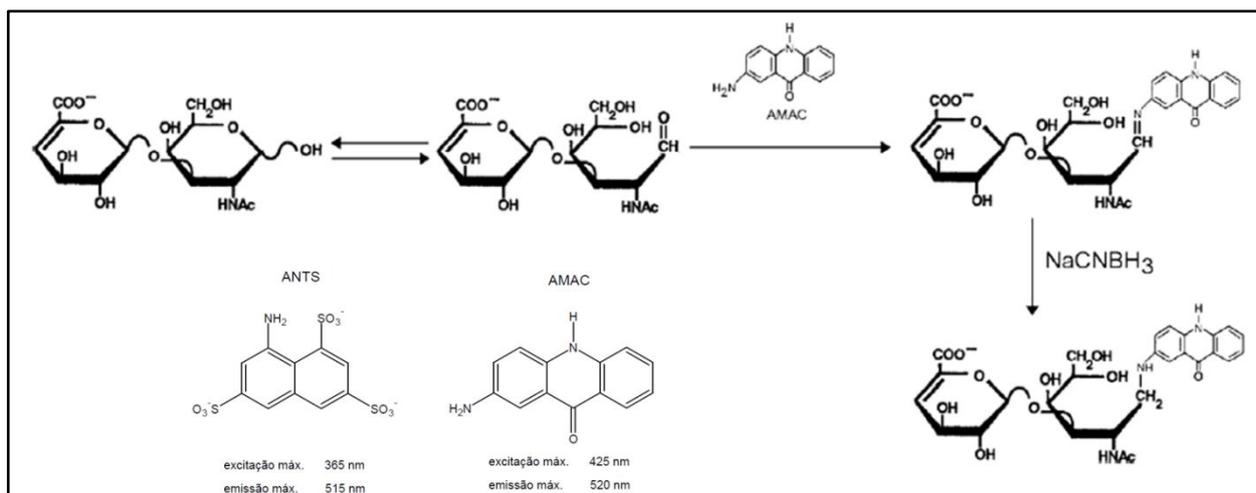


Figura 5 – Derivatização de dissacarídeo insaturado não sulfatado de condroitim sulfato/dermatam sulfato com AMAC na presença de cianoborohidreto de sódio (NaCNBH₃). A estrutura dos fluoróforos ANTS e AMAC, bem como seus comprimentos de onda de excitação e emissão estão apresentados. Adaptado de JACKSON, 1994 e VOLPI, 2010.

1.3.4 ANÁLISE FARMACOPEICA DE CONDROITIM SULFATO

De acordo com as Farmacopeias Europeia e Americana (EP 6.0, 2007; USP 32, 2008), as análises atualmente reportadas em laudos de controle de qualidade de condroitim sulfato se limitam a testes como composição química elementar (nitrogênio, enxofre), materiais poluentes (cloretos, proteínas, metais pesados), presença de solventes orgânicos ou patógenos e algumas informações estruturais pouco relevantes, como espectro de absorção no infravermelho, rotação óptica específica, viscosidade intrínseca e pH (Tabela 2). Essas análises, apesar de necessárias, não fornecem informações relevantes sobre a estrutura do condroitim sulfato nem sua origem.

O teor de condroitim sulfato é geralmente determinado por método de titulação com cloreto de cetilpiridínio. A titulação é realizada por fotometria (turbidimetria), utilizando titulador automático equipado com um fototrodo que registra alterações na absorbância em função do volume de titulante adicionado e determina o ponto final. A Farmacopeia Europeia ainda descreve um método de titulação visual. Nesse caso, à medida que a titulação prossegue a turbidez da solução aumenta, sendo que no ponto de equivalência a solução fica mais clara e pode-se observar um precipitado branco em suspensão (EP 6.0, 2007; USP 32, 2008).

Tabela 2 – Especificações Geralmente Reportadas em Laudos de Certificado de Análise de Condroitím Sulfato de Sódio.

Análises/Componentes	Especificações
Aparência	Pó fino higroscópico branco a creme
Identificação por Absorção no Infravermelho	Mesmas bandas do padrão de referência
Identificação de Sódio	Positiva
Teor de Condroitím Sulfato	USP - 90 a 105% (base seca) EP - 95 a 105% (base seca)
pH (1% H ₂ O)	5,5 – 7,5
Rotação Específica (4% H ₂ O)	Entre -20,0° e -30°
Cloreto	Não mais que 0,5%
Nitrogênio (Kjeldahl)	2,5 – 3,4%
Proteínas (Lowry)	USP - Não mais que 6% EP - Não mais que 3%
Enxofre	4,8 – 6,5%
Metais Pesados	Não mais que 20 ppm
Resíduo de Ignição	20 – 30%
Metanol	Não mais que 0,1%
Acetona	Não mais que 0,1%
Perda por secagem (105°C, 4h)	Não mais que 10,0%
Contagem microbiana total	Não mais que 10 ³ ufc/g
Patógenos	Ausentes

ppm: partes por milhão; USP: United States Pharmacopoeia; EP: European Pharmacopoeia. Fonte: adaptado de VOLPI, 2007

Este método é fundamentado na interação entre poliânions, por exemplo condroitim sulfato, e cátions como cloreto de cetilpiridínio (CPC) e brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON), formando complexos insolúveis em água (LIANG, 2002; SILVA, 2006). Logo, a especificidade do método para dosagem de condroitim sulfato é afetada por macromoléculas contendo cargas negativas

Os tecidos animais dos quais se obtém condroitim sulfato podem conter também outros tipos de glicosaminoglicanos, como heparina, queratam sulfato, heparan sulfato e dermatam sulfato. Como as técnicas de extração são em sua maioria pouco seletivas para um único tipo de glicosaminoglicano, estes GAGs citados podem aparecer como impurezas em insumos de condroitim sulfato que não tenham passado por métodos de purificação bem controlados. Além disso, a presença de ácidos nucleicos também pode ocorrer, dependendo da origem do tecido animal e do processo de extração. Como estas prováveis impurezas são macromoléculas com cargas negativas, sua presença pode afetar o método de

dosagem de condroitim sulfato, podendo superestimar a concentração deste polímero (VOLPI, 2007)

A dosagem e determinação da pureza de condroitim sulfato extraído de tecidos animais por métodos sensíveis e específicos é um ponto fundamental quando esse composto é produzido para fins farmacêuticos, assim como para uso em suplementos alimentares (VOLPI, 2009).

A utilização de métodos pouco específicos para análise de condroitim sulfato nos levou a investigar diferentes técnicas analíticas capazes de identificar e dosar este insumo em matérias-primas farmacêuticas. Além disso, buscamos também a utilização de técnicas complementares de análise que fornecessem informações relevantes quanto à estrutura da molécula. Neste mesmo raciocínio, coletamos amostras de condroitim sulfato de uso farmacêutico comercializadas em território nacional e realizamos diversas análises com o objetivo de verificar a qualidade destes produtos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem o objetivo de investigar métodos alternativos para análise de condroitim sulfato.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os métodos de eletroforese em gel de agarose e titulação fotométrica para dosagem de condroitim sulfato em insumos farmacêuticos
- Caracterização estrutural do condroitim sulfato presente em insumos farmacêuticos.
- Estabelecer as condições de análise de dissacarídeos insaturados de condroitim sulfato/dermatam sulfato e ácido hialurônico por FACE
- Estabelecer as condições de análise de monossacarídeos e dissacarídeos neutros por FACE
- Produzir e caracterizar a atividade de condroitinases de *Flavobacterium heparinum*
- Produzir e analisar oligossacarídeos e dissacarídeos insaturados de condroitim sulfato.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

- **Matérias-primas e produtos farmacêuticos contendo condroitim sulfato:** Dezesesseis amostras de insumo farmacêutico condroitim sulfato (condroitim sulfato de sódio) foram coletadas em diferentes farmácias magistrais de Juiz de Fora – MG, em abril de 2010, assim como cópia do certificado de análise de controle de qualidade do produto. Cada amostra recebeu aleatoriamente numeração de 1 a 16. Dois medicamentos industrializados (produto final) contendo condroitim sulfato associado a glucosamina foram obtidos no mercado farmacêutico (Condroflex® e Artrolive®).
- **Glicosaminoglicanos e outros açúcares:** condroitim 4-sulfato de traqueia bovina, condroitim 4-sulfato de cartilagem de baleia e dermatam sulfato de mucosa intestinal suína foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Condroitim 6-sulfato de cartilagem de tubarão foi obtido da Seikagaku Kogyo Co. Ltd. (Tóquio, Japão). D-arabinose, D-frutose, D-galactose, D-glucose, D-manose, D-ribose, D-xilose, α -lactose, D-maltose e sacarose (Carbohydrates kit – CAR10), da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA), foram gentilmente doados pelo professor Paulo Mourão. Ácido D-glucurônico, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina, hidrocloreto de glucosamina e sacarolactona (D-saccharic acid 1,4-lactone) foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Dissacarídeos insaturados de condroitim sulfato/dermatam sulfato Δ Di0S, Δ Di2S, Δ Di4S, Δ Di6S, foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Dissacarídeos insaturados de condroitim sulfato/dermatam sulfato Δ Di2,6S, Δ Di4,6S, Δ Di2,4,6S foram obtidos da Seikagaku Kogyo Co. Ltd. (Tóquio, Japão). Todos esses dissacarídeos foram gentilmente doados pelo professor Mauro Pavão, da Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- **FACE:** foi utilizado sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN® *Tetra Cell* da Bio-Rad Laboratories Inc. (Richmond, CA, EUA) e *GelDoc-It Imaging System*, da UVP (Upland, California, EUA) Cianoborohidreto de sódio, 2-aminoacridona (AMAC), N',N',N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED), acetato de mercúrio II, resina dowex 50WX8 *hydrogen form* e glicina foram adquiridos da Sigma-Aldrich

Co. (St. Louis, MO, EUA). Acrilamida foi adquirida da Ludwig Biotecnologia Ltda. (Porto Alegre, RS, Brasil) e *N-N'*-metilbisacrilamida da Neon Comercial Ltda. (São Paulo, SP, Brasil). Tris(hidroximetil)aminometano foi obtido da Biosolve (Valkenswaard, Holanda), e persulfato de amônio e ácido bórico das empresas Vetec Química Fina Ltda. (Duque de Caxias, RJ, Brasil) e ISOFAR Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda. (Duque de Caxias, RJ, Brasil), respectivamente. *Spin-X centrifuge filter unit* foi obtido da Costar (Cambridge, MA, EUA)

- **Produção de condroitinases:** *Flavobacterium heparinum* (ATCC nº 13.125), *American Type Culture Collection* (Rockville, MD, EUA). Desruptor de célula ultrassônico, Unique (Indaiatuba, SP, Brasil). Caldo triptona de soja sem dextrose foi obtido da HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. (Mumbai, Índia), e Bacto Agar da Difco Laboratories (Detroit, MI, EUA). Resina *Phenyl Sepharose High Performance* foi adquirida da GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Suécia). Azul de 1,9-dimetilmetileno (DMB) foi obtido da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA).
- **Cromatografia em papel:** *Whatman cellulose chromatography papers 3MM* (46 x 57 cm) foi adquirido da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA), e papel de cromatografia Whatman nº1 foi da Whatman International, Ltd. (W. & R. Balston Ltd., Maidstone, Inglaterra). Nitrato de prata e hidróxido de amônio foram obtidos da Vetec Química Fina Ltda. (Duque de Caxias, RJ, Brasil) e ácido isobutírico da ISOFAR Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda. (Duque de Caxias, RJ, Brasil)
- **Imunoblotting:** Anticorpo anti-queratam sulfato - MST1 foi gentilmente doado pela professora Yara Michelacci, da Universidade Federal de São Paulo. Anticorpo secundário anti-IgG de camundongo produzido em cabra conjugado com biotina e estreptavidina conjugada com peroxidase foram obtidos da GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Suécia). Substrato para quimioluminescência *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (PIERCE) foi adquirido da Thermo Scientific (Rockford, IL, EUA), e tetrametilbenzidina em solução da KPL Soluções (Barueri, SP, Brasil).
- **Eletroforese em gel de agarose:** Câmara de eletroforese em gel de agarose horizontal, modelo desenvolvido por Jaques et al. (1968), foi adquirido da Técnica Permatron Ltda. (Joinville, SC, Brasil); agarose foi obtida da Bio-Rad Laboratories Inc. (Richmond, CA, EUA). 1,3-diaminopropano, brometo de *N*-cetil-*N,N,N*-

trimetilamônio (CETAVLON) e azul de toluidina foram da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA), Merck (Darmstadt, Alemanha) e Vetec Química Fina Ltda. (Duque de Caxias, RJ, Brasil), respectivamente. Benzina foi adquirida da ISOFAR Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda. (Duque de Caxias, RJ, Brasil)

- **Dosagens bioquímicas:** Reagente de fenol segundo Folin-Ciocalteu, 4-(dimetilamino)-benzaldeído e acetil acetona foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Ácido 3,5-dinitrosalicílico e tartarato de sódio e potássio foram adquiridos da Proquimios Comércio e Indústria Ltda. (Bangu, RJ, Brasil). Sulfato de cobre II foi da LABIMPEX Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda. (Diadema, SP, Brasil), e tetraborato de sódio e carbazol da Reagen Quimibrás Indústrias Químicas S/A (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e Vetec Química Fina Ltda. (Duque de Caxias, RJ, Brasil).
- **Outros reagentes:** Papaina de látex de *Carica papaya*, queratanase de *Pseudomonas sp.* e L-cisteína foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Outros reagentes utilizados de uso comum no laboratório foram de grau analítico.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 FACE (FLUOROPHORE ASSISTED CARBOHYDRATE ELECTROPHORESIS)

3.2.1.1 Derivatização de Amostras e Padrões

O procedimento geral para derivatização de amostras degradadas enzimaticamente ou quimicamente e padrões foi realizado como descrito a seguir: alíquotas contendo entre 10 e 200 nmol de sacarídeos com grupamentos redutores livres foram secas a vácuo e derivatizadas com 5 μ L de solução de AMAC 50 mM (250 nmol) em DMSO:ácido acético (85:15). Após 15 minutos em temperatura ambiente foram adicionados 5 μ L de solução recém preparada de cianoborohidreto de sódio 1M. Essa mistura de derivatização foi mantida em banho a 37°C por 16 horas, e foram adicionados 30 μ L de glicerol 30%. Alíquotas das amostras derivatizadas (2 μ L) foram então analisadas imediatamente por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) ou congeladas a -80°C para posterior análise.

Em alguns experimentos as amostras foram derivatizadas com quantidades diferentes de AMAC. Nestes casos, a derivatização foi realizada sempre com 5 μ L de AMAC em concentrações variadas. A proporção de 5 μ L de cianoborohidreto de sódio 1 M foi mantida em todos os experimentos, independente da concentração de AMAC aplicada.

Tratamento de amostras com mercúrio: para a remoção do resíduo de ácido urônico insaturado em dissacarídeos e oligossacarídeos de condroitim sulfato, alíquotas foram secas a vácuo e ressuspendidas em 100 μ L de solução contendo acetato de mercúrio II 17,5 mM e acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Após 30 minutos em temperatura ambiente, os íons mercúrio foram removidos pela adição de 30 μ L de resina de troca catiônica Dowex H⁺ 50W-X8 em suspensão (50%). A resina contendo os íons mercúrio foi removida por centrifugação em dispositivo *Spin-X centrifuge filter unit*, e a solução obtida foi seca a vácuo e derivatizada (CALABRO et al, 2000).

3.2.1.2 Preparo de Géis de Poliacrilamida e Eletroforese

FACE foi realizada em sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN® Tetra Cell com lâminas de 7,2 cm com espaçadores de 0,75 mm. A corrida eletroforética foi realizada em géis de acrilamida-bisacrilamida 20%, preparados em dois sistemas-tampão diferentes. Para o sistema tampão (1) Tris-glicina os géis foram preparados em tampão Tris-HCl, e foi usado como tampão de corrida Tris-glicina (OONUKI, 2005). Para o sistema tampão (2) Tris-borato os géis foram preparados em tampão Tris-borato, e a corrida foi realizada com tampão contendo Tris-borato-glicina (GAO, 2003).

Géis para Sistema Tris-glicina: Solução para dois géis de corrida foi preparada a partir de 5 mL de solução de acrilamida-bisacrilamida T 40%, C 5%¹; 1,5 mL de tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 e 3,5 mL de água destilada. Solução para o gel de entrada foi preparada misturando 500 µL de solução de acrilamida-bisacrilamida T 40%, C 5%; 660 µL de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,7 e 3,0 mL de água destilada.

Géis para Sistema Tris-borato: Solução para dois géis de corrida foi preparada a partir de 5 mL de solução de acrilamida-bisacrilamida T 40%, C 5%; 2,5 mL de tampão Tris-borato (0,75 M/ 0,5 M), pH 7,0 e 2,5 mL de água destilada. Solução para o gel de entrada foi preparada com 2 mL de solução de acrilamida-bisacrilamida T 10%, C 2,5%; 1,0 mL de tampão Tris-borato (0,5 M/ 0,5 M), pH 6,8 e 1,0 mL de água destilada.

A polimerização do gel de corrida foi iniciada após adição de 100 µL de solução de persulfato de amônio 10% (APS) e 10 µL de TEMED. A solução foi homogeneizada e 3,5 mL foram rapidamente transferidos para o interior de cada placa, e butanol foi adicionado na superfície do gel não polimerizado. Após cerca de 30 minutos, a superfície do gel polimerizado foi lavada com água destilada.

Em seguida 50 µL de APS 10% e 5 µL de TEMED foram adicionados na solução do gel de entrada, e cerca de 850 µL foram transferidos para cada placa contendo o gel de corrida polimerizado. Pentas contendo 10 poços de 0,5 cm foram inseridos entre as placas, e após a polimerização do gel de entrada, as placas com

¹ % T refere-se à concentração total de monômeros, no caso acrilamida mais bisacrilamida, e % C refere-se à concentração de *cross-linker* (bisacrilamida) em relação ao total de monômeros.

os géis foram armazenadas a 4°C para uso em no máximo 24 horas ou utilizadas imediatamente.

Para eletroforese, 150 mL de tampão de corrida diluído (1X) em água destilada a 4°C foram adicionados ao anodo. O tampão de corrida estoque (10X) para sistema Tris-glicina foi Tris-glicina (0,25 M/1,92 M), pH 8,3. O tampão de corrida estoque (5X) para sistema Tris-borato foi Tris-borato-glicina (0,6 M/0,5 M/0,5 M), pH 8,3. Após remoção dos pentes, as amostras foram aplicadas no gel, e o catodo foi preenchido com aproximadamente 500 mL de tampão de corrida diluído a 4°C. A eletroforese foi submetida a uma diferença de potencial de 100 V, e após cerca de 20 minutos foi aumentada para 220 V. A duração da corrida foi de aproximadamente 70 minutos para sistema Tris-glicina e 90 minutos para Tris-borato². Após a corrida, as placas foram lavadas com água destilada e as imagens digitizadas em *GelDoc-It Imaging System* (transiluminador UV com filtro em 365 nm e Câmera *scientific grade CCD GelCam 310*), em diferentes tempos de exposição. Análise densitométrica foi realizada pelo programa TotalLab TL120 1D v2009 (Nonlinear Dynamics Ltd.).

3.2.2 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE CONDROITINASES DE *Flavobacterium heparinum*

3.2.2.1 *Preparo de Extrato Bruto*

Para cultivo e estocagem do microrganismo *F. heparinum* foi utilizado meio semi-sólido preparado com caldo triptona de soja sem dextrose (2,7%) e Bacto Agar (1%), esterilizado em autoclave a 120°C sob pressão de 1 kg, por 30 minutos. O cultivo das bactérias foi feito pela técnica do tubo inclinado e as células foram repicadas a intervalos de, no máximo, 30 dias, e armazenadas a 4°C.

O crescimento da bactéria foi realizado em caldo triptona de soja sem dextrose (2,7%) contendo 150 mg/L de condroitim 4-sulfato (indutor). A bactéria estocada em meio semi-sólido foi repicada em erlenmeyer contendo 50 mL do caldo esterilizado, para crescimento inicial. O meio foi mantido em temperatura ambiente e agitação branda. Após 24 horas todo o conteúdo foi transferido para outro erlenmeyer contendo 950 mL do mesmo meio para crescimento em massa, nas

² A migração dos sacarídeos derivatizados foi acompanhada durante a corrida usando luz UV 320-400nm (luz negra).

mesmas condições. Após 24 horas todo o caldo foi centrifugado a 3.000 rpm, e o *pellet* obtido foi ressuspensionado em 10 mL de tampão Tris-acetato 0,05M, pH 8,0, a 4°C. A partir dessa etapa a suspensão celular foi sempre manuseada a 4°C, em banho de gelo, e armazenada a -80°C.

As células presentes na suspensão foram então rompidas por ultrassom (30 KHz, 4 pulsos de 30 segundos, 4°C). Os restos celulares foram removidos por centrifugação (15.000 rpm, 30 minutos, 4°C), e o sobrenadante, denominado “Extrato Bruto”, foi armazenado a -80°C.

3.2.2.2 Fracionamento e Caracterização das Enzimas Presentes no Extrato Bruto

O extrato bruto de *F. heparinum* foi submetido à cromatografia de interação hidrofóbica (*Hydrophobic Interaction Chromatography* - HIC) em resina *Phenyl Sepharose High Performance* (HP). Alíquota de extrato bruto contendo 10 mg de proteína (3-4 mL) foi diluída em tampão Tris-acetato 0,05 M, pH 8,0 contendo sulfato de amônio para concentração final de 1 M. Essa solução foi submetida a HIC em coluna contendo 5 mL de resina previamente equilibrada no mesmo tampão. A coluna foi eluída em *step wise* com concentrações decrescentes de sulfato de amônio (1 a 0 M) no mesmo tampão, com variação de 0,05 M, em um total de 21 frações de 5 mL.

As frações coletadas foram incubadas com 3 µg de condroitim 4-sulfato, condroitim 6-sulfato e dermatam sulfato em placas de 96 poços, à temperatura ambiente. Após 6 horas, 200 µL do reagente de azul de 1,9-dimetilmetileno (DMB), preparado de acordo com Farndale (1986), foram adicionados e a absorvância medida a 630 nm, em leitor de microplacas.

Esse método foi utilizado para localização das condroitinases nas frações eluídas da coluna de *Phenyl Sepharose* e baseia-se na metacromasia do DMB na presença de glicosaminoglicanos sulfatados (FARNDALÉ et al., 1986), sendo que, no comprimento de onda utilizado (630 nm), observa-se um aumento de leitura devido à degradação desses polímeros pelas condroitinases (a despolimerização dos GAGs diminui a metacromasia do corante, que permanece na sua cor original). A Figura 6 mostra o espectro de absorção do DMB e as modificações que ocorrem na presença de glicosaminoglicanos sulfatados.

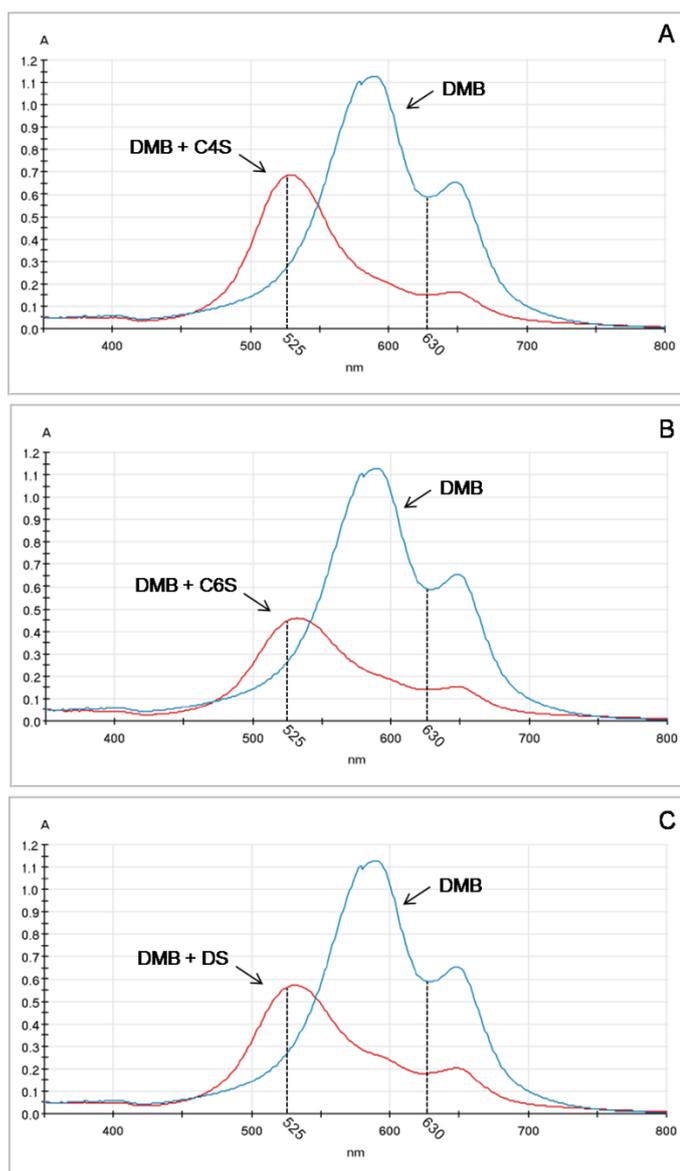


Figura 6 - Espectro de Absorção do Reagente Azul de 1,9-dimetilmetileno (DMB) na Ausência (azul) ou Presença (vermelho) de 10 μ g de Condroitim 4-sulfato (A), Condroitim 6-sulfato (B) e Dermatam Sulfato (C).

As frações com presença de condroitinases foram dialisadas contra tampão Tris-acetato 0,05M, pH 8,0 a 4°C, por 12 horas, com duas trocas de tampão, e submetidas a dois métodos para caracterização de atividade enzimática, como descrito a seguir.

3.2.2.2.1 Método 1 - Determinação de Atividade Enzimática por Absorção em UV_{232nm}

Misturas de incubação contendo 100 µg de substrato, 20 µL de enzima (extrato bruto ou frações da HIC) e tampão Tris-acetato 0,05 M, pH 8,0, para volume final de 1 mL, foram preparadas e transferidas para cubetas de quartzo. Para ensaios com dermatam sulfato foram adicionados 100 µL de solução de acetato de cálcio 0,1 M. A variação da absorbância a 232 nm foi monitorada em espectrofotômetro com câmara de temperatura controlada (30°C) (modelo Evolution 160 UV-Vis, da Thermo Fisher Scientific), por 5 ou 10 minutos em intervalos de 3 segundos. A atividade foi expressa em unidades enzimáticas, a partir de cálculos com base no coeficiente de extinção molar para dissacarídeos insaturados ($\epsilon_{232} = 3.800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), sendo que uma unidade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de dissacarídeo insaturado por minuto

3.2.2.2.2 Método 2 - FACE de Produtos de Degradação de Glicosaminoglicanos por Condroitinases

Misturas de incubação contendo 100 µg de substrato e 2 mU de frações de HIC em *Phenyl Sepharose* HP foram preparadas em volume final de 50 µL. Após diferentes tempos de incubação a temperatura ambiente, as enzimas foram inativadas em banho fervente por 10 minutos. As amostras foram secas a vácuo e derivatizadas com AMAC, como já descrito.

Para análise de enzimas contaminantes nas preparações de condroitinases, 20 nmol de dissacarídeos insaturados de condroitim 4-sulfato ($\Delta\text{Di}0\text{S}$, $\Delta\text{Di}4\text{S}$ ou $\Delta\text{Di}6\text{S}$) foram incubados com 2 mU de frações de HIC em *Phenyl Sepharose* HP, na presença ou ausência de fluoreto de sódio (10 mM) ou sacarolactona (1 mM e 10 mM). Após 24 horas de incubação a 30°C, as enzimas foram inativadas em banho fervente por 10 minutos, e as amostras foram secas a vácuo e derivatizadas com AMAC.

3.2.3 PREPARO DE DISSACARÍDEOS E OLIGOSSACARÍDEOS INSATURADOS E CONDROITIM SULFATO

3.2.3.1 Preparo de dissacarídeos e oligossacarídeos insaturados por Cromatografia Preparativa em Papel

Alternativamente, dissacarídeos e oligossacarídeos insaturados foram preparados a partir de condroitim 4-sulfato de traqueia bovina (100 mg) incubado com 100 mU de condroitinase AC em tampão Tris-acetato 0,05M, pH 8,0, a 30°C, em volume final de 10mL. Após 18 horas, a mistura de incubação foi fervida por 10 minutos e aplicada a 2 folhas de papel Whatman 3MM (cerca de 500 µg/cm). Após 48 horas de cromatografia descendente em sistema solvente ácido isobutírico:NH₄OH 1,25 M (5:3, v/v), cada cromatograma foi seco sob ventilação à temperatura ambiente (sem aquecimento) e duas estreitas tiras laterais foram cortadas e reveladas por reagente de prata em meio alcalino (TREVELYAN et al., 1950). Usando essas tiras como guias, bem como a observação do cromatograma com luz UV distante, os produtos redutores e/ou insaturados foram localizados no restante do cromatograma. As regiões contendo esses produtos foram cortadas e, após lavagem do papel com acetona, os compostos foram eluídos com água destilada, liofilizados e ressuspensos em 1 mL de água destilada. Estes produtos submetidos a análises químicas e enzimáticas.

3.2.3.2 Extração de Condroitim Sulfato de Tecidos Animais

Para a extração de condroitim sulfato de diferentes origens (traqueia bovina, cartilagem de esterno de frango, cartilagem de arraia e nadadeira de lula), os tecidos foram picotados em pequenos fragmentos de aproximadamente 2 mm e submetidos à proteólise com papaína (1 mg/mL em tampão Fosfato-cisteína 0,05M, pH 6,5), na proporção de 2 mL de solução da enzima para 100 mg de tecido. Após incubação por 18-24 horas a 60°C, ácidos nucleicos e proteínas ainda presentes na solução foram precipitados pela adição de ácido tricloro acético (TCA 10%), em presença de NaCl 1 M. Após 10 minutos em banho de gelo, o precipitado formado foi removido por centrifugação (3.000 rpm, 15 minutos). Ao sobrenadante foram adicionados, lentamente e sob agitação, 2,5 volumes de etanol para precipitação de

glicosaminoglicanos. Após 18 horas a - 20°C, o precipitado formado foi coletado por centrifugação (3.000 rpm, 20 minutos) e seco a vácuo.

3.2.4 ANÁLISE DE CONDROITIM SULFATO EM AMOSTRAS FARMACÊUTICAS

3.2.4.1 *Eletroforese*

3.2.4.1.1 *Eletroforese em Gel de Agarose em Tampão PDA*

Glicosaminoglicanos ou seus produtos de degradação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,5% em tampão 1,3-diaminopropano-acetato 0,05 M, pH 9,0 (PDA), com espessura de 2 mm. A corrida eletroforética foi realizada em uma câmara refrigerada, submetida a uma diferença de potencial de 100 V, por aproximadamente 1 hora ou até migração apropriada. Após a corrida, o gel foi mergulhado em solução de brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON) 0,1% por um período mínimo de 2 horas para precipitação dos glicosaminoglicanos. O gel foi seco sob corrente de ar quente e corado com azul de toluidina 0,1% em solução de ácido acético 1%: etanol 50% por 20 minutos. O excesso de corante foi posteriormente removido com solução de ácido acético 1%: etanol 50%.

A aquisição de imagens foi realizada por digitalização em modo de cores RGB a partir de impressora multifuncional (modelo HP C3180), e quantificação das bandas por densitometria usando o programa TotalLab TL120 1D v2009 (Nonlinear Dynamics Ltd.).

3.2.4.1.2 *Eletroforese em Gel de Poliacrilamida*

Análise de peso molecular em amostras de condroitim sulfato foi realizada por adaptação do método de eletroforese em gel de poliacrilamida descrito por Hilborn e Anastassiadis (1971) e modificado por Dietrich e Nader (1974).

Alíquotas (20 µg) foram ressuspensas em 10 µL de tampão de amostra (Tris 40 mM, NaCl 20 mM, EDTA 2 mM, glicerol 40%, vermelho de cresol 0,05%) e aplicadas em gel de poliacrilamida 7,5%, em tampão Tris-HCl 20 mM. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida contendo Tris 40 mM, NaCl 20 mM, EDTA 2 mM (100 V), e após 1 hora de corrida o gel foi removido das placas e corado com azul de

toluidina 0,1% em ácido acético 1%, por 5 minutos. O excesso de corante foi removido com solução de ácido acético 1%, e o gel foi digitalizado e submetido à análise densitométrica pelo programa TotalLab TL120 1D v2009 (Nonlinear Dynamics Ltd.).

3.2.4.2 Imunoblotting para Queratam Sulfato

Alíquotas (5 µg) de amostras farmacêuticas de condroitim sulfato foram submetidas à eletroforese em gel de agarose em tampão PDA, como descrito anteriormente. Após a eletroforese, os compostos foram transferidos, por capilaridade, do gel de agarose para membranas de nitrocelulose previamente lavadas com salina tamponada (PBS), por 2 horas. Ligação inespecífica foi bloqueada pela incubação das membranas com solução de caseína 5% em PBS por 2 horas à temperatura ambiente. Após 3 lavagens com PBS (5 minutos cada), as membranas foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-queratam sulfato - MST1 por 2 horas à temperatura ambiente. Novamente, as membranas foram lavadas com PBS (3 vezes, 5 minutos) e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG conjugado com biotina, diluído 2:5.000 em PBS contendo 1% de albumina bovina sérica (BSA), por 2 horas, na ausência de luz. Após 5 lavagens com PBS as membranas foram incubadas com estreptavidina conjugada com peroxidase (diluída 1:5.000 em PBS/BSA 1%) por 2 horas, na ausência de luz. Após 5 lavagens com PBS as membranas de nitrocelulose foram reveladas por incubação com tetrametilbenzidina em solução. Alternativamente, foi realizada revelação pelo método de quimioluminescência utilizando *SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate* (PIERCE), como descrito pelo fabricante.

3.2.4.3 Titulação Fotométrica

Método de titulação fotométrica modificado para leituras em espectrofotômetro convencional (modelo SP 1105, Bel Photonics®) foi desenvolvido para dosagem de condroitim sulfato. Volumes de 5 mL de soluções teste 1 mg/mL (5 mg) foram transferidos para béquer contendo 25 mL de solução diluente (tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,0) em agitação constante. Alíquota de 2 mL foi retirada para zerar o aparelho e imediatamente retornada para o béquer. A titulação

foi iniciada com adição de solução titulante (brometo de cetiltrimetilamônio – CETAVLON 0,1%). Após 10 segundos de homogeneização, o registro da absorbância (660 nm) foi realizado retirando-se 2 mL da solução, que foram imediatamente devolvidos ao béquer. A titulação prosseguiu com adição de mais titulante até a percepção do ponto final, que pode ser notado tanto visualmente pela floculação do CS pelo titulante quanto pela elevação abrupta da absorbância seguida de ligeira queda. O ponto de inflexão foi calculado usando o programa CurTiPot (versão 3.5.4 para MS-Excel[®]).

3.2.4.4 Espectro de Absorção em Ultravioleta

Espectroscopia de varredura no ultravioleta (190-320 nm) foi realizada em espectrofotômetro Hitachi, Modelo U-2000 (Tóquio, Japão), equipado com células termoestabilizadas, com solução 1mg/mL de cada material. O gráfico de Absorbância (Abs) vs Comprimento de onda de cada amostra foi comparado com o padrão de referência.

3.2.4.5 Degradações Enzimáticas

Degradações enzimáticas com condroitinase AC de *Flavobacterium heparinum* foram realizadas como descrito anteriormente (CÁSSARO e DIETRICH, 1977; AGUIAR et al., 2003).

- **Incubação 1:** Alíquotas de cada amostra da matéria-prima (10 µL de solução 10 mg/mL) foram incubadas com 2 mU de condroitinase AC (10 µL) em tampão etilenodiamino-acetato (EDA) 0,05 M, pH 8,0, a temperatura ambiente por 18 horas. Uma incubação controle com 10 µL de cada amostra e 10 µL de água também foi realizada.
- **Incubação 2:** Alíquotas de cada amostra contendo 100 µg de CS (volumes diversos de solução 10 mg/mL) foram incubados com 10 µL de condroitinase AC. Após 18 horas de incubação em temperatura ambiente, as amostras foram secas por centrifugação à vácuo, e o precipitado foi ressuscitado em 20 µL de água. Incubação controle com os volumes específicos de cada amostra e 10 µL de água também foi realizada.

Alíquotas de 2 μL de todas as incubações realizadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose como descrito acima. O restante do material foi submetido à cromatografia em papel, como descrito a seguir.

3.2.4.6 Cromatografia em papel

Para verificar a estrutura dos dissacarídeos das amostras de CS, produtos de degradação obtidos por meio de ensaios enzimáticos como descrito acima foram analisados por cromatografia em papel. Misturas de incubação das amostras de CS com condroitinase AC foram aplicadas em papel Whatman nº 1 e submetidas à cromatografia descendente em ácido isobutírico: NH_4OH 1,25 M (5:3 v/v). Após 18-24 horas ou período suficiente para corrida do solvente por toda a extensão do papel, o cromatograma foi seco em estufa com aquecimento e circulação de ar. Os produtos redutores foram revelados com nitrato de prata em meio alcalino.

3.2.4.7 Análises Químicas

3.2.4.7.1 Determinação de Açúcares Redutores

Para investigação do potencial redutor das amostras, foi utilizado o reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Este composto, na presença de açúcares redutores, é reduzido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, que absorve intensamente em 540 nm (MILLER, 1959)

Às alíquotas de 100 μL de uma solução 5 mg/mL de cada amostra de CS foram adicionados 100 μL do reagente DNS. Após 10 minutos em banho de 90°C, foi adicionado 1 mL de água destilada em cada tubo. Para leitura da intensidade da cor formada em leitor de microplacas, 100 μL dessa solução foram transferidos para cada poço. A absorbância foi medida em 492 nm. Para a quantificação do poder redutor foi preparada uma curva de calibração com glicose. Os resultados foram expressos em μg de açúcar redutor/mg de amostra

3.2.4.7.2 *Quantificação de Proteínas*

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Lowry (1951). A um tubo de ensaio contendo 400 µg da matéria-prima a ser analisada (volume final de 400 µL), foram adicionados 2 mL de uma mistura reativa preparada no momento do teste, contendo hidróxido de sódio 0,4%, carbonato de sódio 2%, tartarato de sódio e potássio 0,02% e sulfato de cobre 0,01%. Após 10 minutos, 200 µL de solução de Folin-Ciocalteu diluída 1:3 foram adicionados no tubo. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro após 30 minutos em comprimento de onda de 660 nm. Para quantificação de proteínas foi utilizada uma curva de calibração de albumina bovina. Os resultados foram expressos em porcentagem de proteína por peso da amostra.

3.2.4.7.3 *Dosagem de Ácido Urônico*

A dosagem de ácido urônico nas amostras foi realizada pelo método de Di Ferrante (1971), de acordo com Sajdera. Em um tubo contendo 100 µg de matéria-prima (volume final de 250 µL) foram adicionados 100 µL de solução de carbazol 0,1% em etanol, seguido de 2,5 mL do reagente borato (tetraborato de sódio 0,4% em ácido sulfúrico). Os tubos foram então agitados em vórtex e aquecidos em banho fervente por 15 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em 525 nm e os valores de ácido urônico foram calculados por meio de curva de calibração com ácido D-glucurônico.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DE AMOSTRAS FARMACÊUTICAS DE CONDROITIM SULFATO

Resultados encontram-se em Apêndice A – Resultados Preliminares.

4.2 FACE (FLUOROPHORE ASSISTED CARBOHYDRATE ELECTROPHORESIS)

FACE (*Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis*) é um método de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) aplicado à separação e visualização de açúcares derivatizados com fluoróforo em seu grupamento aldeído redutor livre. A marcação dos sacarídeos confere alta sensibilidade para sua detecção e quantificação nos géis (eletrofluorogramas), quando iluminados por luz UV e digitalizados por sistema de aquisição de imagens.

A aplicação da FACE na análise estrutural de condroitim sulfato envolve inicialmente a digestão desse polissacarídeo por condroitinases específicas, que liberam as diferentes unidades dissacarídicas que compõem sua estrutura básica. Em seguida os produtos de digestão com grupos redutores livres são derivatizados com 2-aminoacridona (AMAC), um fluoróforo que não possui carga em pH neutro e alcalino, e os derivados sacarídeo-AMAC são submetidos à separação por PAGE. Neste trabalho, as eletroforeses foram realizadas em sistemas tampão sem borato (Tris-glicina) e com borato (Tris-borato).

4.2.1 ANÁLISE DE MIGRAÇÃO DE DISSACARÍDEOS INSATURADOS DE CONDROITIM SULFATO/DERMATAM SULFATO

Para estabelecer a migração dos dissacarídeos insaturados de condroitim sulfato/dermatam sulfato em FACE, foram utilizados os seguintes dissacarídeos obtidos comercialmente: dissacarídeo insaturado não sulfatado (Δ Di0S), dissacarídeo insaturado 2-sulfatado (Δ Di2S), dissacarídeo insaturado 4-sulfatado (Δ Di4S), dissacarídeo insaturado 6-sulfatado (Δ Di6S), dissacarídeo insaturado 2,6-

dissulfatado ($\Delta\text{Di}2,6\text{S}$), dissacarídeo insaturado 4,6-dissulfatado ($\Delta\text{Di}4,6\text{S}$) e dissacarídeo insaturado 2,4,6-trissulfatado ($\Delta\text{Di}2,4,6\text{S}$)

Alíquotas desses dissacarídeos (cerca de 20 nmol para o não sulfatado e monossulfatados, e 5 nmol para os di- e trissulfatado) foram secas a vácuo e ressuspendidas com 5 μL de solução 50 mM de AMAC (250 nmol), preparada em DMSO:ácido acético (85:15). Após 15 minutos em temperatura ambiente, 5 μL de solução de cianoborohidreto de sódio 1M foram adicionados a cada tubo. A reação de derivatização dos dissacarídeos com o fluoróforo ocorreu durante 16 horas, a 37°C. Após esse tempo foram adicionados 30 μL de solução de glicerol 30% a cada tubo, e 2 μL de cada amostra derivatizada foram submetidos à FACE nos sistemas Tris-glicina e Tris-borato, conforme descrito em Métodos. A Figura 7 mostra a migração dos dissacarídeos em ambos os sistemas tampão.

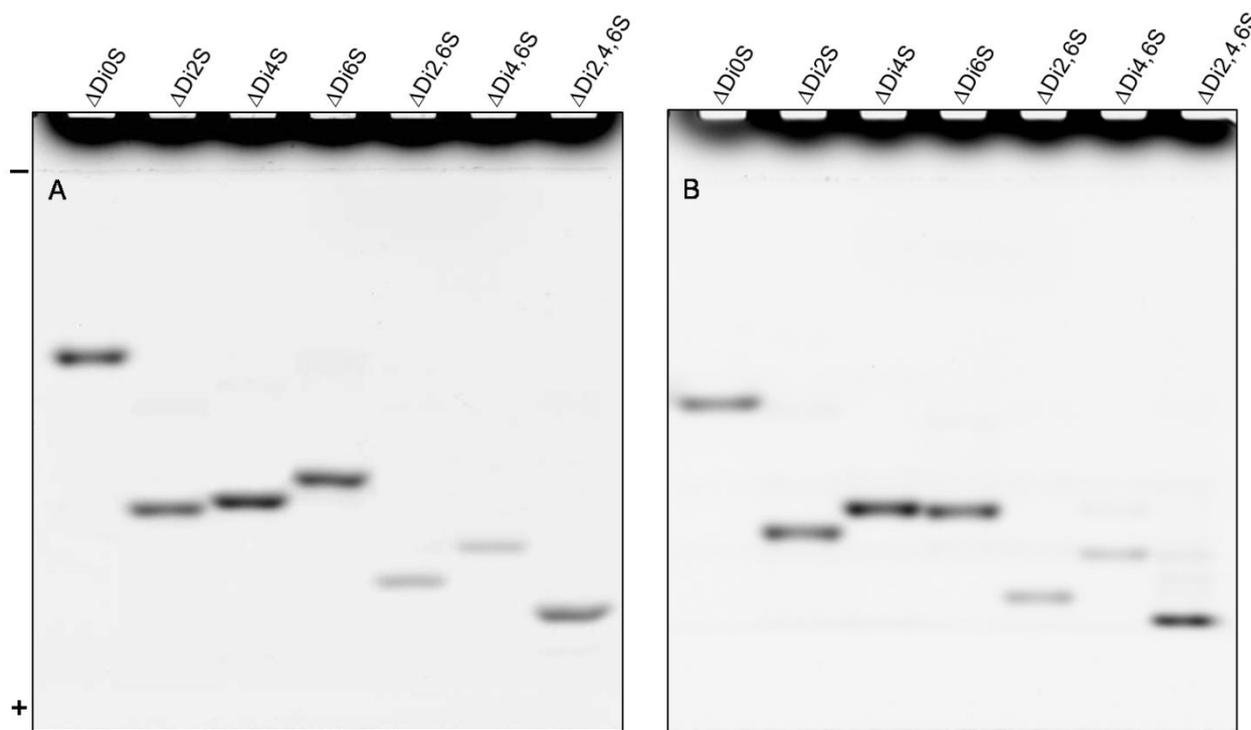


Figura 7 – Eletrofluorogramas em Sistema Tris-glicina (A) e Tris-borato (B) de Dissacarídeos Insaturados de CS/DS Derivatizados com AMAC. Alíquotas (entre 5 e 20 nmol) de cada dissacarídeo foram derivatizadas com 250 nmol de AMAC na presença de cianoborohidreto de sódio e diluídas com glicerol para volume final de 40 μL . Foram aplicados 2 μL de solução em cada poço (0,25 nmol – 1 nmol).

Tanto em sistema Tris-glicina quanto em Tris-borato, podemos observar que o dissacarídeo trissulfatado ($\Delta\text{Di}2,4,6\text{S}$) é o que apresenta a maior mobilidade eletroforética, migrando próximo à frente de corrida. Entre os dissacarídeos dissulfatados, o $\Delta\text{Di}2,6\text{S}$ migra mais que o $\Delta\text{Di}4,6\text{S}$. Já em relação aos

dissacarídeos monossulfatados há uma diferença de resolução entre os dois sistemas tampão. Em Tris-glicina, o $\Delta\text{Di}4\text{S}$ pode ser separado do $\Delta\text{Di}6\text{S}$, que apresenta menor migração. Entretanto, neste tampão o $\Delta\text{Di}2\text{S}$ migra próximo ao $\Delta\text{Di}4\text{S}$. Já no sistema Tris-borato, o $\Delta\text{Di}2\text{S}$ pode ser separado do $\Delta\text{Di}4\text{S}$, que, entretanto, possui a mesma migração do $\Delta\text{Di}6\text{S}$. Por fim, o dissacarídeo não sulfatado ($\Delta\text{Di}0\text{S}$) é o que apresenta a menor migração, nos dois sistemas tampão.

4.2.2 ANÁLISE DE MIGRAÇÃO DE DIFERENTES TIPOS DE *N*-ACETIL-GALACTOSAMINA E DISSACARÍDEO INSATURADO DE ÁCIDO HIALURÔNICO

Para investigar a migração de diferentes resíduos de *N*-acetil-galactosamina em FACE, os dissacarídeos insaturados $\Delta\text{Di}0\text{S}$, $\Delta\text{Di}4\text{S}$ e $\Delta\text{Di}6\text{S}$ (cerca de 20 nmol) foram submetidos a tratamento com sal de mercúrio³, como descrito em Métodos, e derivatizados com 250 nmol de AMAC.

Para análise da migração do dissacarídeo insaturado de ácido hialurônico (ΔDiHA), 100 μg de ácido hialurônico de cordão umbilical foram incubados com condroitinase AC por 6 horas, a temperatura ambiente, e os produtos de digestão derivatizados com AMAC (250 nmol).

A Figura 8 apresenta os eletrofluorogramas em Tris-glicina e Tris-borato dos dissacarídeos $\Delta\text{Di}0\text{S}$, $\Delta\text{Di}4\text{S}$ e $\Delta\text{Di}6\text{S}$ e seus respectivos produtos de degradação com mercúrio, bem como os produtos de digestão de ácido hialurônico por condroitinase AC. Os monossacarídeos GalNAc e GlcNAc obtidos comercialmente também foram analisados.

O eletrofluorograma em Tris-glicina mostra que os dissacarídeos foram completamente degradados pelo tratamento com mercúrio. Os monossacarídeos GalNAc-4S e GalNAc-6S formados a partir de $\Delta\text{Di}4\text{S}$ e $\Delta\text{Di}6\text{S}$, respectivamente, apresentam migração nesse sistema, sendo que GalNAc-6S migra na mesma posição que $\Delta\text{Di}0\text{S}$, e o isômero 4-sulfatado apresenta mobilidade ligeiramente maior. Entretanto, nenhuma banda foi visualizada após o tratamento de $\Delta\text{Di}0\text{S}$ com mercúrio (GalNAc), assim como para GalNAc e GlcNAc obtidos comercialmente.

³ O tratamento de dissacarídeos insaturados com sal de mercúrio remove o ácido urônico insaturado, liberando o resíduo de GalNAc correspondente ao dissacarídeo tratado, de acordo com a presença de sulfatação.

Esses monossacarídeos não são carregados, e dessa forma não são capazes de migrar nesse sistema.

Ainda no sistema Tris-glicina, a digestão de ácido hialurônico por condroitinase AC mostra uma banda comigrando com Δ Di0S e GalNAc-6S, que corresponde a Δ DiHA.

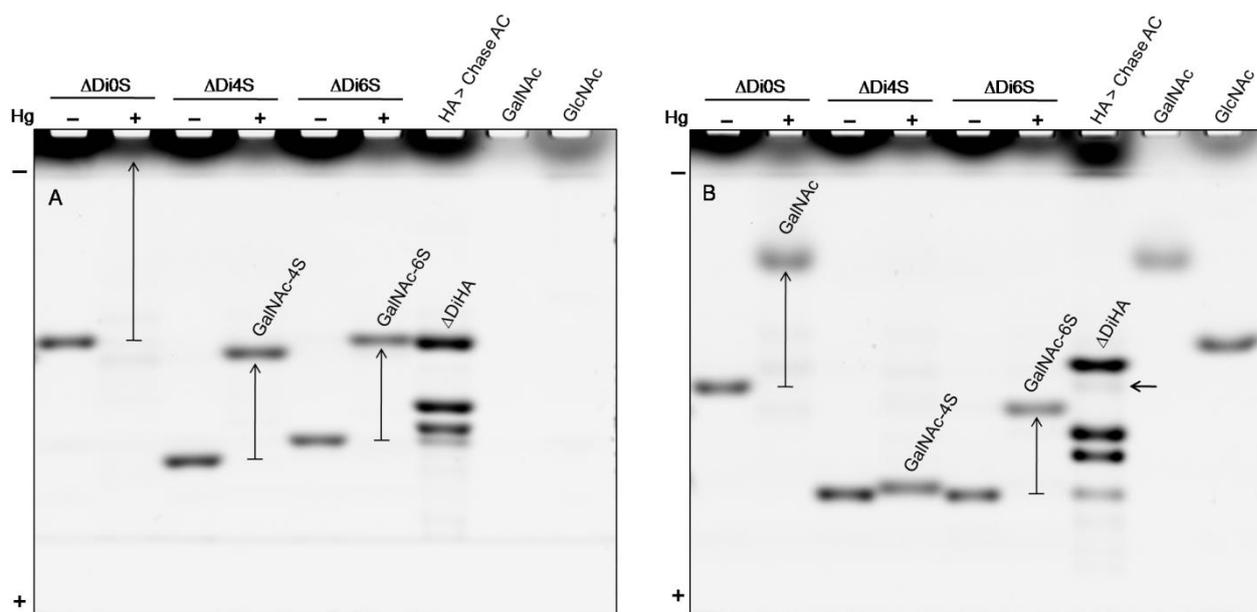


Figura 8 – Eletrofluorogramas em Sistema Tris-glicina (A) e Tris-borato (B) de Diferentes Resíduos de GalNAc e Δ DiHA. Cerca de 20 nmol de Δ Di0S, Δ Di4S e Δ Di6S foram derivatizados diretamente (Hg -) com AMAC (250 nmol) ou após tratamento com mercúrio (Hg +). Produtos de digestão de ácido hialurônico por condroitinase AC foram derivatizados com 250 nmol de AMAC. As setas apresentadas partem da posição de migração do dissacarídeo não tratado e apontam para o produto liberado após tratamento com mercúrio. Hg: mercúrio; HA: ácido hialurônico; Chase AC: condroitinase AC.

Padrão de migração diferente é obtido no sistema tampão Tris-borato. Os monossacarídeos neutros (GalNAc e GlcNAc) apresentam migração, devido à complexação de íons borato com os derivados sacarídeo-AMAC neutros, que passam a apresentar carga negativa. A interação com íons borato ainda proporciona a separação de Δ DiHA, Δ Di0S e GalNAc-6S, sendo que estes apresentam mobilidade crescente nessa ordem. Porém, na presença de borato, GalNAc-4S apresenta migração muito próxima aos dissacarídeos monossulfatados (Δ Di4S e Δ Di6S).

A digestão de ácido hialurônico por condroitinase AC produz, além do Δ DiHA, outros produtos que também são visualizados nos dois eletrofluorogramas da Figura 8. As duas bandas principais migram entre Δ Di0S e Δ Di6S nos dois sistemas, e correspondem a oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização. Outra

banda menos intensa com migração de $\Delta\text{Di}6\text{S}$ ainda é vista em ambos os géis, além de uma quinta banda mais fraca observada apenas no sistema contendo borato (marcada por uma seta horizontal), que comigra com $\Delta\text{Di}0\text{S}$. A observação dessas bandas sugere uma pequena contaminação da preparação de ácido hialurônico utilizada neste teste por condroitim sulfato.

A Figura 9-A apresenta sequência de migração de sacarídeos derivatizados na presença de íons borato. Representações esquemáticas da migração de todos os açúcares analisados em sistema tampão Tris-glicina e Tris-borato também estão apresentadas (Figura 9-B e C, respectivamente).

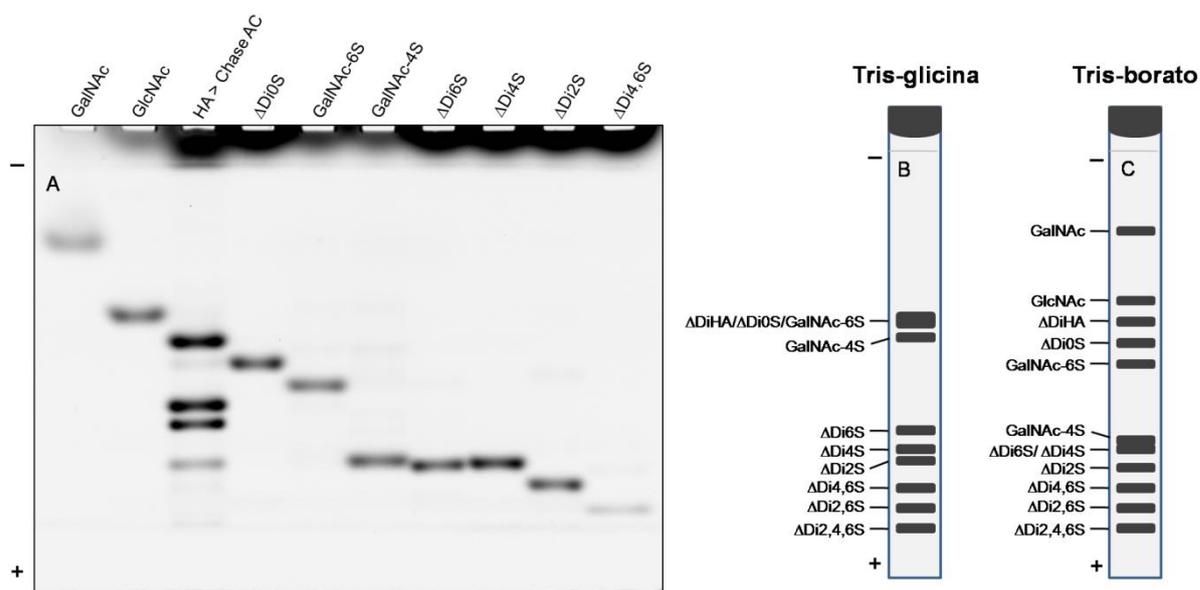


Figura 9 - (A) Eletrofluorograma em Sistema Tris-borato de Diferentes Sacarídeos Derivatizados com AMAC. (B e C) Esquema Representativo da Migração de Diversos Sacarídeos em Sistema Tris-glicina e Tris-borato.

Observamos nos esquemas apresentados na Figura 9, que os 12 diferentes sacarídeos analisados podem ser separados por FACE usando os sistemas tampão Tris-glicina e Tris-borato.

4.2.3 ANÁLISE DA DERIVATIZAÇÃO DE SACARÍDEOS COM AMAC

A concentração de AMAC necessária para a derivatização de amostras contendo glicose ou produtos de digestão de condroitim sulfato foi investigada.

4.2.3.1 Derivatização de Glicose

Alíquotas contendo 50 nmol de glicose foram secas a vácuo e derivatizadas com diferentes quantidades de AMAC (5 a 150 nmol), como descrito em Métodos. Após 16 horas foram adicionados 30 μ L de solução de glicerol 30% e 2 μ L de cada solução foram submetidos à análise por FACE em sistema Tris-borato. As bandas detectadas foram quantificadas por densitometria (Figura 10).

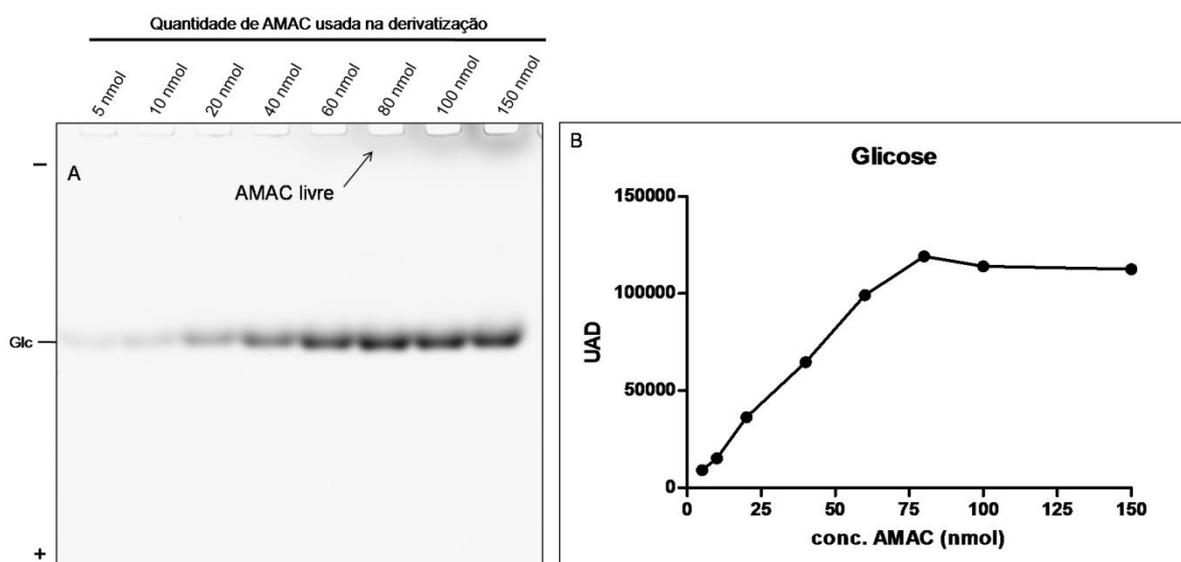


Figura 10 - (A) Eletrofluorograma em Sistema Tris-borato de Glicose Derivatizada com Diferentes Quantidades de AMAC. (B) Análise Densitométrica de Bandas Detectadas em Relação à Concentração de AMAC usada na derivatização. Alíquotas de 50 nmol de glicose foram derivatizadas com quantidades de AMAC entre 5 e 150 nmol. UAD: Unidades Arbitrárias de Densitometria.

Percebemos na Figura 10 que a intensidade das bandas de glicose aumenta de forma linear com o aumento da quantidade de AMAC até 80 nmol, e a partir dessa concentração permanece constante. A AMAC livre não migra por não apresentar carga, e pode ser observada na origem do gel de entrada a partir de 80 nmol, indicando saturação. Esses dados nos permitem afirmar que a derivatização completa de 50 nmol de glicose requer um mínimo de 80 nmol de AMAC.

4.2.3.2 Derivatização de Produtos de Digestão de Condroitim Sulfato

Para investigar a concentração de AMAC necessária para a derivatização de produtos de digestão enzimática de condroitim sulfato, alíquotas contendo 100 μ g de condroitim 4-sulfato de traqueia bovina foram incubadas com 2 mU de condroitinase AC na presença de fluoreto de sódio 10 mM, por 18 horas a temperatura ambiente. As misturas obtidas após a digestão (máximo de 200 nmol de dissacarídeos

insaturados) foram derivatizados com diferentes quantidades de AMAC (20 a 400 nmol). Após a derivatização as amostras foram submetidas a análise por FACE em sistema Tris-glicina. Os produtos de digestão detectados foram quantificados por densitometria (Figura 11).

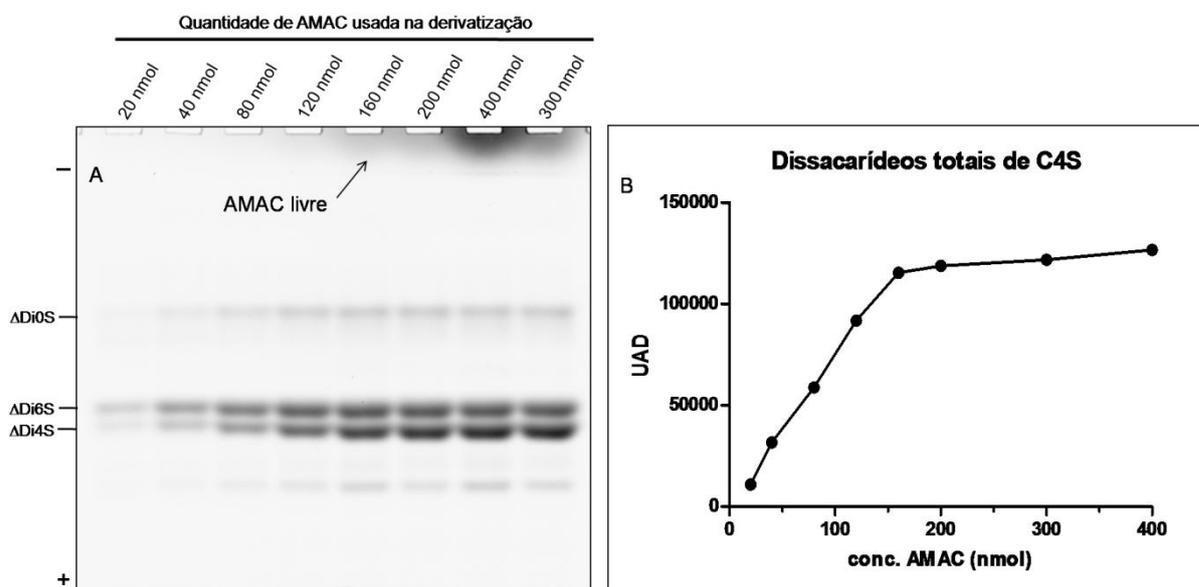


Figura 11 - (A) Eletrofluorograma em Sistema Tris-glicina de Produtos de Digestão de Condroitim 4-Sulfato por Condroitinase AC Derivatizados com Diferentes Quantidades de AMAC. (B) Análise Densitométrica do Total de Produtos Formados. Aliquotas contendo 100 μ g de C4S de traqueia bovina foram submetidas a digestão por condroitinase AC, e os produtos foram derivatizados com diferentes quantidades de AMAC (entre 20 e 400 nmol). UAD: Unidades Arbitrárias de Densitometria.

Na Figura 11, os produtos detectados ganham intensidade de forma linear com o aumento da concentração de AMAC até 160 nmol, e a partir desse ponto não há grande variação na quantidade total de dissacarídeos detectados. A difusão de AMAC livre no gel de entrada é observada a partir de 160 nmol, e ganha intensidade com o aumento da concentração de AMAC aplicada.

A análise individual de cada dissacarídeo mostra preferência para a derivatização do Δ Di6S, em relação ao Δ Di4S, em quantidade de AMAC inferior a 160 nmol (Figura 12). A porcentagem relativa entre Δ Di4S e Δ Di6S é invertida a partir de 160 nmol de AMAC (Figura 12-B).

Esses resultados nos permitiram estabelecer que para a derivatização total dos produtos de digestão de 100 μ g de condroitim 4-sulfato são necessários, no mínimo, 300 nmol de AMAC.

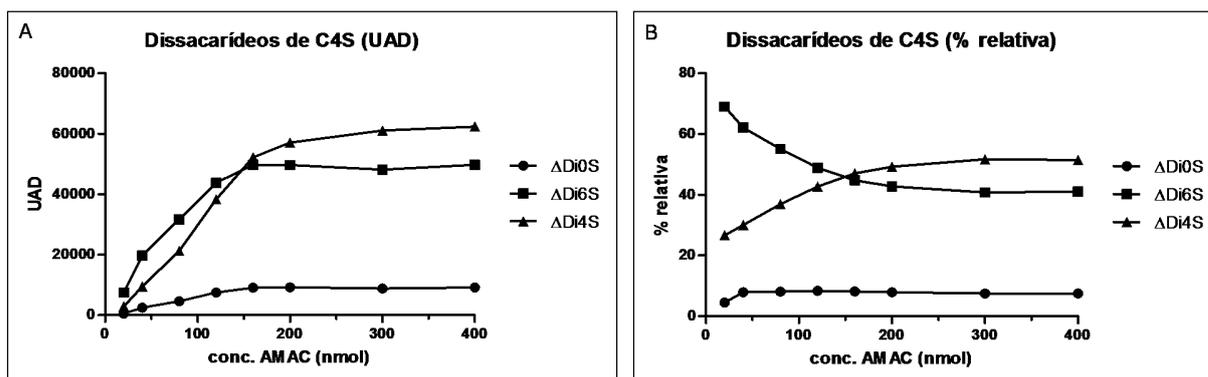


Figura 12 – (A) Análise Densitométrica de Dissacarídeos Insaturados Formados por Digestão de Condroitim 4-Sulfato por Condroitinase AC e Derivatizados com Diferentes Quantidades de AMAC. (B) Porcentagem Relativa de Dissacarídeos Insaturados Detectados. Alíquotas contendo 100 µg de C4S de traqueia bovina foram submetidas a digestão por condroitinase AC, e os produtos derivatizados com diferentes quantidades de AMAC (entre 20 e 400 nmol). UAD: Unidades Arbitrárias de Densitometria.

4.3 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS DE DIGESTÃO ENZIMÁTICA DE CONDROITIM SULFATO

Para a obtenção de dissacarídeos e oligossacarídeos insaturados, 100 mg de condroitim 4-sulfato de traqueia bovina foram incubados com 100 mU de condroitinase AC por 18 horas em tampão Tris-acetato 0,05M, pH 8,0, a 30°C, em volume final de 10mL. Os produtos formados foram aplicados a 2 folhas de papel Whatman 3MM e submetidos à cromatografia descendente usando sistema solvente ácido isobutírico:NH₄OH 1,25 M (5:3, v/v) .

Após a corrida, cada cromatograma foi seco sob ventilação à temperatura ambiente (sem aquecimento) e duas estreitas tiras laterais foram cortadas e reveladas por reagente de prata em meio alcalino (Figura 13)⁴.

⁴ A mistura de digestão de C4S foi aplicada a duas folhas de papel, que foram submetidas aos mesmos processos para purificação dos dissacarídeos e oligossacarídeos. Resultados semelhantes entre os dois cromatogramas foram obtidos, e serão apresentados os resultados de apenas uma folha.

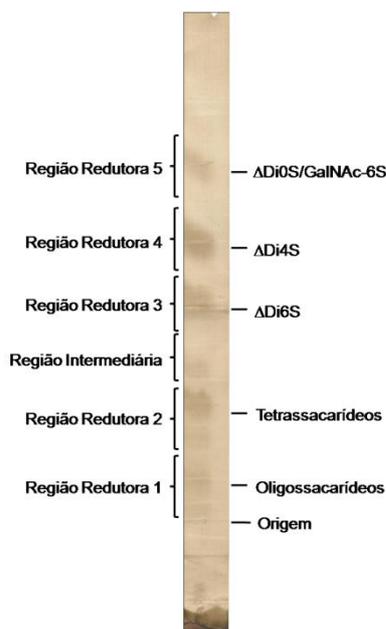


Figura 13 – Lateral Direita de Cromatograma Preparativo Revelado com Reagente de Prata Alcalino. Produtos de digestão de C4S por condroitinase AC foram submetidos à cromatografia descendente em papel, e duas tiras laterais foram cortadas e reveladas.

Na Figura 13, cinco regiões contendo produtos redutores foram observadas. A Região Redutora (RR) 1, com menor migração, corresponde a oligossacarídeos de diferentes graus de polimerização. A RR 2 possui principalmente tetrassacarídeos insaturados de condroitim sulfato. As RR 3, 4 e 5 correspondem à migração de $\Delta\text{Di}6\text{S}$, $\Delta\text{Di}4\text{S}$ e $\Delta\text{Di}0\text{S}/\text{GalNAc-6S}$, respectivamente (MICHELACCI, HORTON, POBLACIÓN, 1987). Além disso, uma Região Intermediária (RI) entre tetrassacarídeos e $\Delta\text{Di}6\text{S}$, contendo baixa quantidade de açúcares redutores, também foi identificada. As regiões contendo esses produtos foram cortadas e, após lavagem do papel com acetona, os compostos foram eluídos com água destilada, liofilizados e ressuspensos em 1 mL de água destilada.

As soluções contendo produtos de digestão de condroitim 4-sulfato obtidas após esse processo de separação foram submetidas à dosagem de ácido urônico (Figura 14) e analisadas por FACE em sistema Tris-glicina (Figura 15).

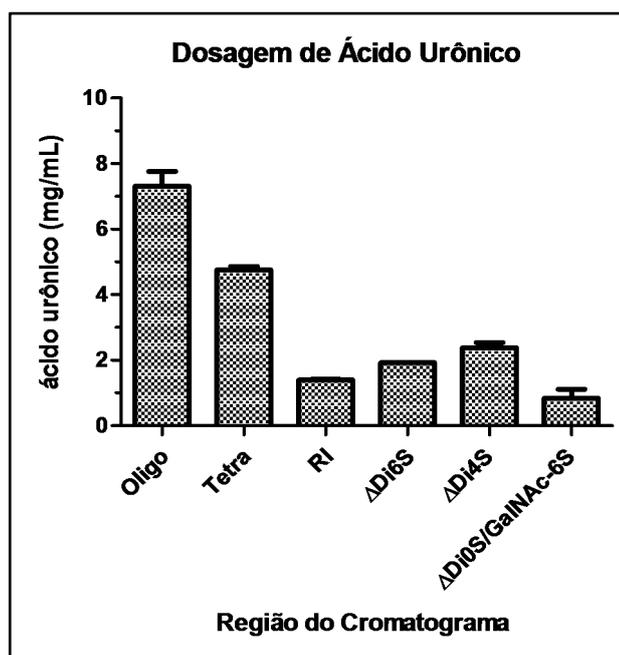


Figura 14 – Dosagem de Ácido Urônico por Método de Carbazol em Soluções Obtidas por Cromatografia Preparativa em Papel. Alíquotas de 5 μ L de cada solução foram analisadas em duplicata, conforme descrito em Métodos.

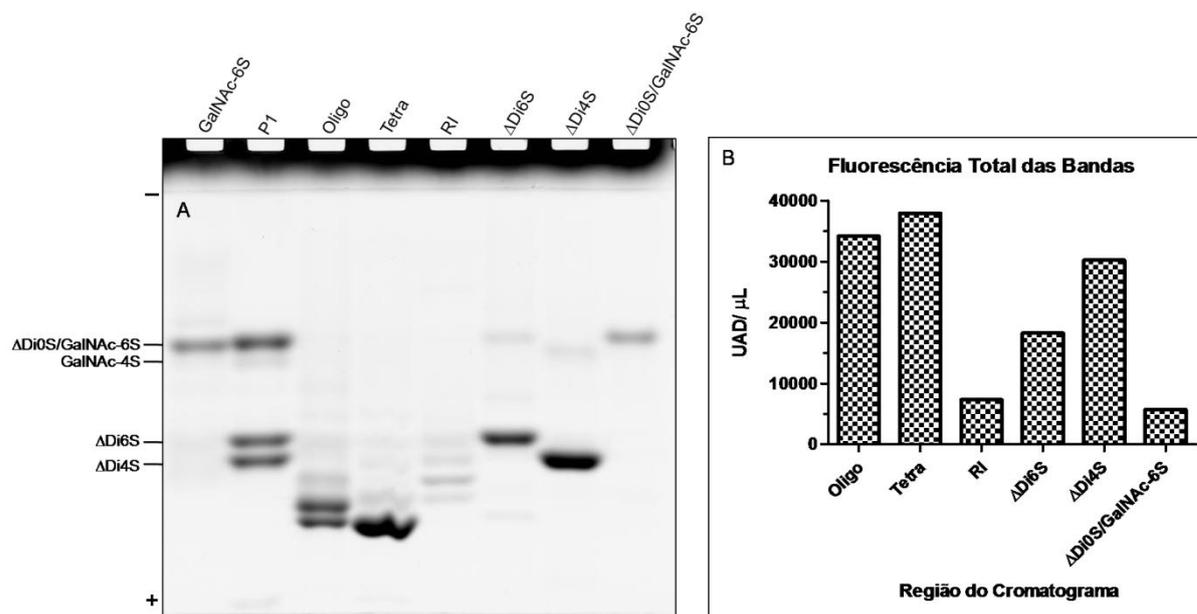


Figura 15 – (A) Eletrofluorograma em Sistema Tris-glicina de Produtos de Digestão Enzimática de Condroitim 4-Sulfato Separados por Cromatografia Preparativa em Papel. (B) Análise Densitométrica do Total de Fluorescência das Bandas de Cada Região. Alíquotas de 10 μ L de cada solução obtida após a cromatografia foram derivatizadas com 250 nmol de AMAC. P1: mistura padrão contendo Δ Di0S, Δ Di6S, Δ Di4S e GalNAc-6S; UAD: Unidades Arbitrárias de Densitometria.

A Figura 16 apresenta a porcentagem dos produtos obtidos por cromatografia preparativa, calculada pela razão entre fluorescência total das bandas detectadas no eletroferograma e dosagem de ácido urônico. Os principais produtos formados foram

Δ Di4S (27,1%), Δ Di6S (20,3%) e tetrassacarídeos (17,0%). A formação dos demais produtos foi inferior a 15%.

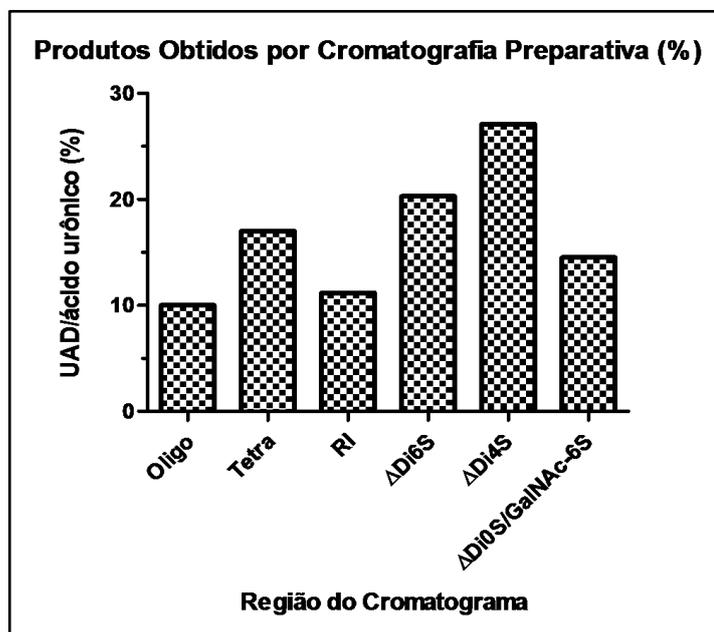


Figura 16 – Razão Entre Fluorescência das Bandas Detectadas no Eletroferograma (UAD) e Dosagem de Ácido Urônico por Método de Carbazol em Soluções Obtidas por Cromatografia Preparativa em Papel. UAD: Unidades Arbitrárias de Densitometria.

Para caracterização dos açúcares eluídos da cromatografia em papel, alíquotas de aproximadamente 20 nmol foram submetidas a tratamento com sal de mercúrio e derivatizadas com 250 nmol AMAC. Essas amostras foram analisadas por FACE em sistema tampão Tris-glicina e Tris-borato (Figuras 17 e 18).

Na região contendo oligossacarídeos insaturados, observamos dois produtos principais com elevada mobilidade eletroforética. Apesar do maior peso molecular, esses produtos apresentam maior migração devido à grande densidade de cargas negativas na molécula.

Para os tetrassacarídeos percebemos uma banda com migração semelhante à de oligossacarídeos, devido à menor resistência pelo tamanho, apesar de apresentar menor densidade de cargas negativas.

Após remoção do resíduo de ácido urônico insaturado por tratamento com mercúrio, uma pequena redução na mobilidade eletroforética desses compostos foi observada.

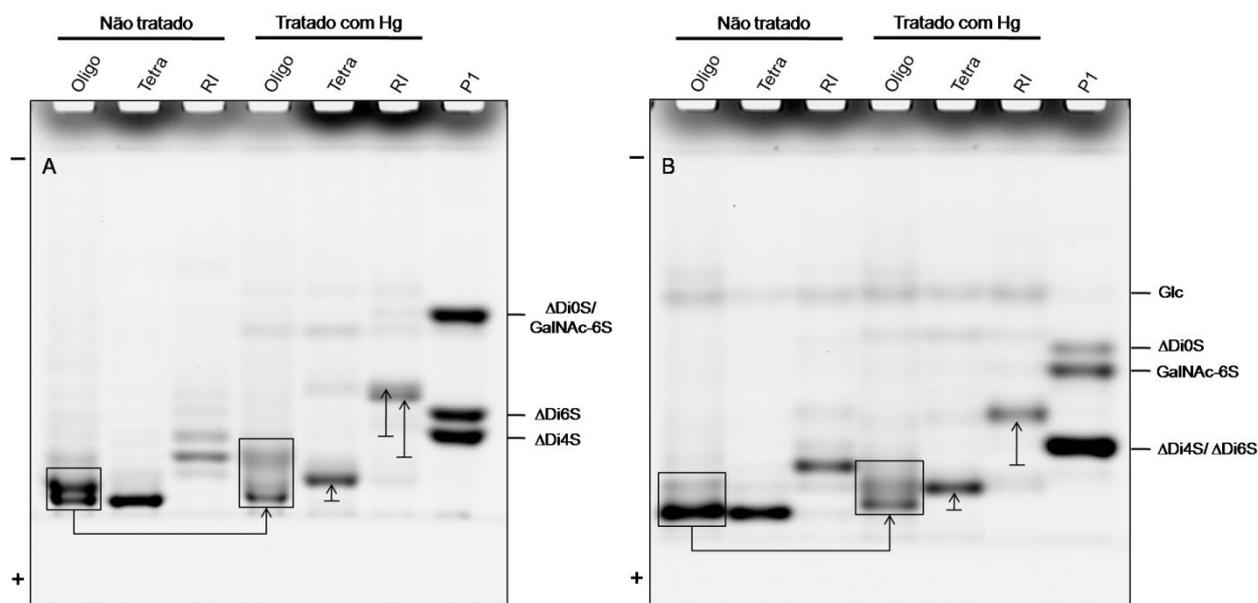


Figura 17 – Eletrofluorogramas em Sistema Tris-glicina (A) e Tris-borato (B) de Produtos Presentes em Regiões Redutoras 1, 2 e Região Intermediária, Submetidos a Tratamento com Mercúrio. Alíquotas foram derivatizadas diretamente ou tratadas com sal de mercúrio e derivatizadas com 250 nmol de AMAC. As setas apresentadas partem da posição de migração dos produtos não tratados e apontam para os produtos liberados após tratamento com mercúrio. P1: mistura padrão contendo Δ Di0S, Δ Di6S, Δ Di4S e GalNAc-6S; RR: Região Redutora; RI: Região Intermediária;

Na Região Intermediária (RI), duas bandas principais se destacam, com migração ligeiramente superior a Δ Di4S. Essas duas bandas provavelmente correspondem a tetrassacarídeos monossulfatados na posição 4 (Δ glcA- β 1,3-galNAc - Δ glcA- β 1,3-galNAc-4S – maior migração) ou 6 (glcA- β 1,3-galNAc - Δ glcA- β 1,3-galNAc-6S – menor migração) de um resíduo de *N*-acetil-galactosamina. Estes compostos apresentam três cargas negativas, sendo duas referentes ao grupo carboxila do ácido urônico e a outra ao grupo sulfato. Após a remoção do ácido urônico insaturado do terminal não redutor, essas duas bandas (trissacarídeos com duas cargas) apresentam migração menor que dissacarídeos monossulfatados (duas cargas negativas). Apesar de apresentarem o mesmo número de cargas, o trissacarídeo resultante apresenta menor migração devido ao maior tamanho.

A partir dessas proposições, conjecturamos que os tetrassacarídeos visualizados na Região Redutora 2 são dissulfatados.

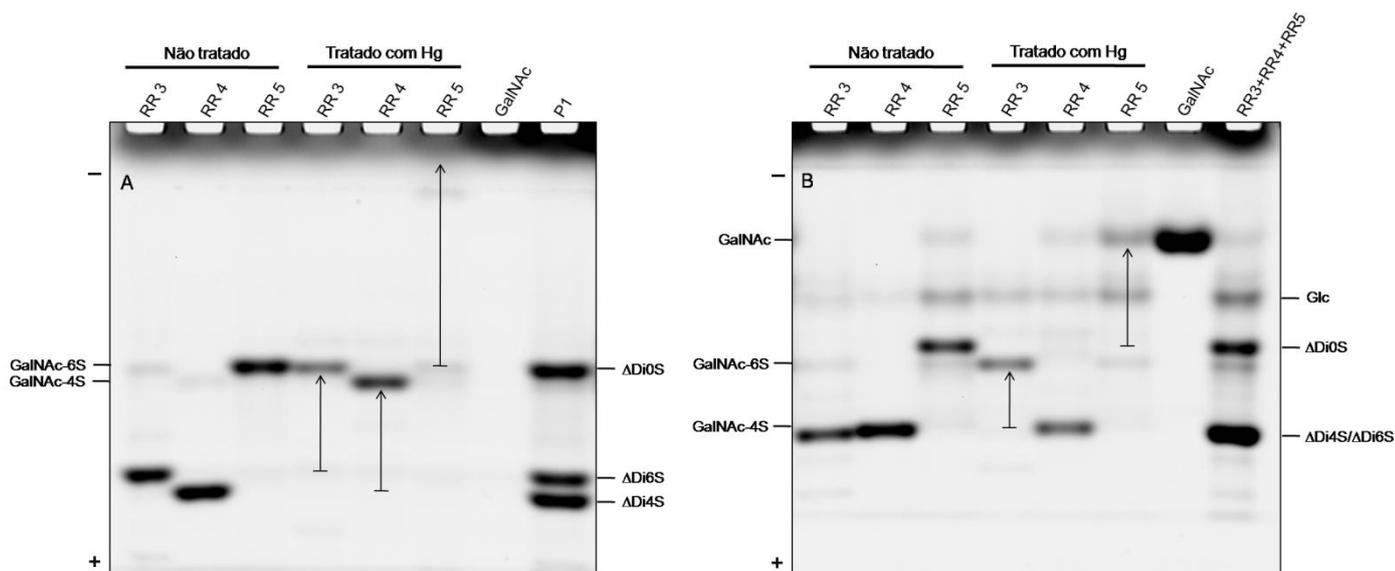


Figura 18 – Eletrofluorogramas em Sistema Tris-glicina (A) e Tris-borato (B) de Produtos Presentes em Regiões Redutoras 3, 4 e 5 Submetidos a Tratamento com Mercúrio. Alíquotas foram derivatizadas diretamente ou tratadas com sal de mercúrio (Hg) e derivatizadas com 250 nmol de AMAC. As setas apresentadas partem da posição de migração dos produtos não tratados e apontam para os produtos liberados após tratamento com mercúrio. P1: mistura padrão contendo Δ Di0S, Δ Di6S, Δ Di4S e GalNAc-6S; RR: Região Redutora; RI: Região Intermediária;

Como já descrito anteriormente, os dissacarídeos Δ Di0S, Δ Di4S e Δ Di6S, após tratamento com sal de mercúrio, liberam suas *N*-acetil-galactosaminas correspondentes (Figura 8). Resultados semelhantes foram observados na Figura 18, o que confirma a presença de Δ Di6S, Δ Di4S e Δ Di0S nas RR 3, RR 4 e RR 5, respectivamente. Esses dissacarídeos produzidos apresentam uma pequena contaminação por suas respectivas GalNAc, como observado nas amostras não tratadas. Além disso, Δ Di0S possui ainda pequena contaminação por GalNAc-6S, sendo que estes apresentam a mesma mobilidade na cromatografia em papel.

Em sistema Tris-borato, uma banda com migração característica de açúcares neutros (glicose) é observada em todos os produtos obtidos por cromatografia, e pode ser explicada por contaminação proveniente da celulose do papel.

4.4 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE CONDROITINASES DE *Flavobacterium heparinum*

As condroitinases são endoglicosidases da classe das liases que quebram ligações glicosídicas via mecanismo de eliminação, gerando insaturação entre os carbonos 4 e 5 do resíduo de ácido urônico adjacente ao local da clivagem. Essa insaturação absorve luz na região do UV_{232 nm}, sendo possível monitorar atividade enzimática com base no surgimento dessas insaturações.

Quatro condroitinases de *Flavobacterium heparinum* foram descritas com base em sua especificidade: condroitinase AC, quebra ligações β -glicosídicas entre *N*-acetilgalactosamina ou *N*-acetilglucosamina e ácido glucurônico; condroitinase B atua quebrando as ligações β ,1-4 entre os resíduos de *N*-acetilgalactosamina e ácido L-idurônico; condroitinase C, quebra ligações β ,1-4 entre resíduos de *N*-acetilgalactosamina ou *N*-acetilglucosamina e ácido glucurônico apenas quando a hexosamina não está sulfatada na posição 4 e condroitinase ABC, com amplo espectro de ação, quebra ligações β -glicosídicas tanto de condroitim sulfato, dermatam sulfato quanto ácido hialurônico. Diferentemente das outras condroitinases, a condroitinase ABC cliva ligações a partir do terminal não-redutor.

Devido a sua especificidade, as condroitinases são importantes ferramentas para análise estrutural de glicosaminoglicanos. Para análise de amostras de condroitim sulfato de diferentes origens, essas enzimas foram fracionadas a partir de extrato bruto induzido de *F. heparinum* e caracterizadas por dois diferentes métodos: Método 1 - Determinação de atividade enzimática por absorção em UV_{232 nm} e Método 2 - Análise por FACE de produtos de degradação de glicosaminoglicanos por condroitinases.

4.4.1 PREPARO E ANÁLISE DE EXTRATO BRUTO DE *Flavobacterium heparinum*.

O preparo de extrato de *F. heparinum* foi realizado a partir de cultivo do microrganismo em caldo tripton de soja sem dextrose (2,7%), utilizando condroitim 4-sulfato como indutor para expressão de condroitinases. Após dois dias de crescimento, o *pellet* bacteriano foi obtido após centrifugação do meio de cultura e

ressuspendido em tampão Tris-acetato 0,05M, pH 8,0, e as células presentes na suspensão foram rompidas por ultrassom. O sobrenadante deste material, denominado “extrato bruto”, foi coletado por centrifugação e congelado a -80°C.

Alíquotas (20 μ L) do extrato bruto obtido foram incubadas com 100 μ g de substrato (condroitim 4-sulfato, condroitim 6-sulfato ou dermatam sulfato), em tampão Tris-acetato 0,05M, pH 8,0, em volume final de 1mL. A variação da absorbância a 232 nm foi monitorada em função do tempo em célula de temperatura controlada (30°C). A Figura 19 apresenta as curvas de velocidade, em abs/min, da degradação de cada substrato pelas condroitinases presentes no extrato bruto.

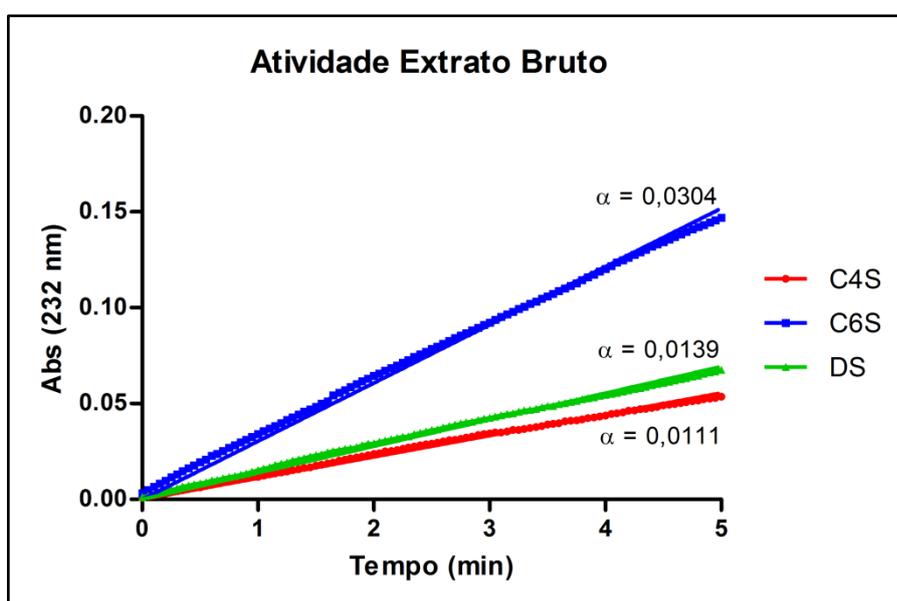


Figura 19 – Curva de Velocidade das Condroitinases Presentes em Extrato Bruto de *F. heparinum*. Determinação pelo Método 1. Os valores de velocidade ($\alpha = \text{abs/min}$) sobre cada substrato são apresentados.

Na Figura 19 pode-se observar que a velocidade de degradação sobre condroitim 6-sulfato (0,0304 abs/min) é maior que a sobre condroitim 4-sulfato (0,0111 abs/min) e dermatam sulfato (0,0139 abs/min). A atividade do extrato bruto, expressa em unidades enzimáticas, foi calculada com base no coeficiente de extinção molar para dissacarídeos insaturados ($\epsilon_{232} = 3.800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), sendo que uma unidade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de dissacarídeo insaturado por minuto. A Tabela 3 resume os valores de velocidade de formação de produtos insaturados para os três substratos, em abs/min e Unidades/mL de extrato bruto.

Tabela 3 – Atividade de Condroitinases Presentes em Extrato Bruto de *F. heparinum*.

	Atividade	
	Abs/min	U/mL
C4S	0,0111	0,146
C6S	0,0304	0,400
DS	0,0139	0,183

4.4.2 FRACIONAMENTO DE CONDROITINASES PRESENTES NO EXTRATO BRUTO

As condroitinases presentes no extrato bruto foram fracionadas por cromatografia de interação hidrofóbica (*Hydrophobic Interaction Chromatography - HIC*) em resina *Phenyl Sepharose High Performance* (HP). Alíquota de extrato bruto contendo 10 mg de proteína (3-4 mL) foi diluída em tampão Tris-acetato 0,05 M, pH 8,0 contendo sulfato de amônio para concentração final de 1 M. Essa solução foi submetida a HIC em coluna contendo 5 mL de resina previamente equilibrada no mesmo tampão. A eluição foi realizada em *step wise* com concentrações decrescentes de sulfato de amônio (1 a 0 M) no mesmo tampão, com variação de 0,05 M, em um total de 21 frações de 5 mL. Essas frações foram submetidas a diferentes métodos para caracterização da atividade enzimática.

Alíquotas de 20 µL de cada fração foram incubadas com 3 µg de condroitim 4-sulfato, condroitim 6-sulfato ou dermatam sulfato, por 6 horas à temperatura ambiente. Após adição de 200 µL de reagente de azul de 1,9-dimetilmetileno (DMB), a absorbância foi medida a 630 nm (Figura 20).

Na presença de glicosaminoglicanos sulfatados, o corante DMB apresenta metacromasia com pico de absorção em 525 nm. A despolimerização dos GAGs pela ação das condroitinases diminui a metacromasia do corante, que retorna à sua cor original, absorvendo intensamente a 630 nm (Figura 6).

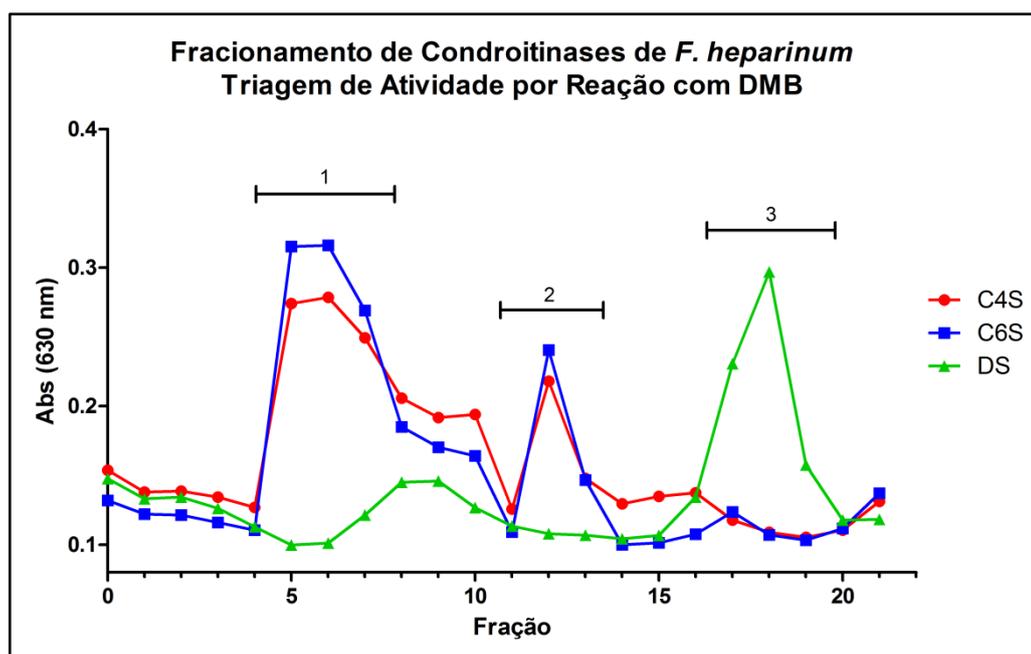


Figura 20 – Fracionamento de Condroitinases de *Flavobacterium heparinum* por Cromatografia de Interação Hidrofóbica em *Phenyl Sepharose HP*. Triagem de atividade enzimática pela reação com azul de dimetilmetileno (DMB). As regiões com atividade enzimática estão marcadas por números.

Na Figura 20 observamos três regiões com maior absorção a 630 nm, indicativas da ação de condroitinases. A Região 1, correspondente às frações 5, 6 e 7, possui atividade somente sobre condroitins 4- e 6-sulfato. Estes substratos também foram degradados pela fração 12 (Região 2), porém com menor atividade. Já as frações 17 e 18 (Região 3) apresentaram atividade apenas sobre dermatam sulfato. As frações presentes nas três regiões foram submetidas a determinação da atividade enzimática pelo Método 1 (UV_{232nm}).

4.4.3 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DAS FRAÇÕES ELUÍDAS POR HIC EM PHENYL SEPHAROSE HP

4.4.3.1 Determinação de Atividade Enzimática por Absorção em $UV_{232 nm}$ (Método 1).

Alíquotas (20 μ L) de cada fração foram incubadas com 100 μ g de substrato, em tampão Tris-acetato 0,05M, pH 8,0, em volume final de 1mL, a 30°C. As frações 4, 5, 6, 7 (Região 1), 11, 12 e 13 (Região 2) tiveram sua atividade testada com condroitim 6-sulfato, enquanto dermatam sulfato foi usado para ensaio das frações

16, 17, 18 e 19 (Região 3). As atividades dessas frações sobre os substratos utilizados estão apresentadas na Figura 21

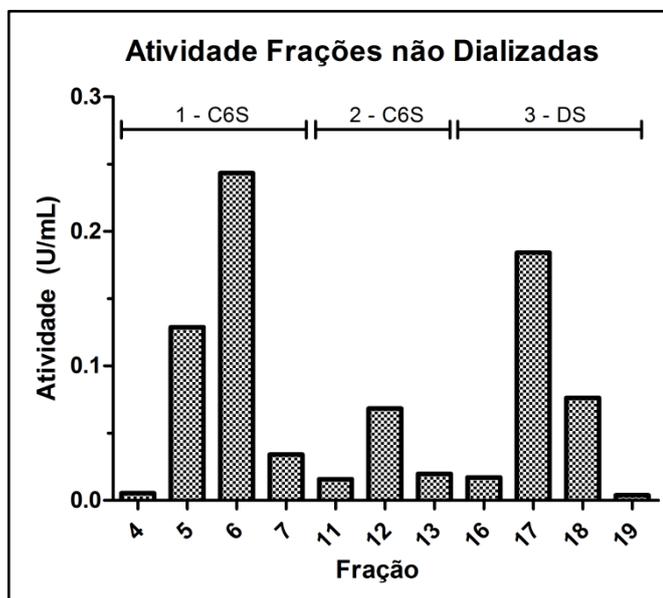


Figura 21 - Atividade (U/mL) de Frações Eluídas por HIC em *Phenyl Sepharose HP*. Determinação pelo Método 1 – absorção em UV (232 nm). Os substratos utilizados para a determinação de atividade das frações de cada região são apresentados

Dentre as frações contidas nas Regiões 1, 2 e 3 da Figura 20, as frações 6, 12 e 17 apresentaram as maiores atividades, respectivamente. Essas frações foram então dialisadas contra tampão Tris-acetato 0,05M, pH 8,0 a 4°C, e sua atividade foi analisada novamente pelo Método 1, usando condroitim 4-sulfato, condroitim 6-sulfato ou dermatam sulfato como substratos (Figura 22). A atividade (U/mL) de cada fração sobre os substratos está apresentada na Tabela 4.

A fração 6 apresenta atividade significante sobre condroitim 4-sulfato e condroitim 6-sulfato e baixa atividade sobre dermatam sulfato. Já a fração 12 possui atividade sobre ambos os condroitins, mas não sobre dermatam sulfato, que é degradado pela fração 17. Esta, por sua vez, não apresenta atividade sobre os condroitins sulfato. Esses achados corroboram os resultados apresentados no teste de diminuição de metacromasia por reação com DMB (Figura 20).

As frações 5 e 18 também apresentaram atividade significativa (igual ou superior a 0,05 U/mL) e foram submetidas a diálise e analisadas pelo Método 1. A atividade (U/mL) dessas frações sobre os substratos testados encontra-se na Tabela 4.

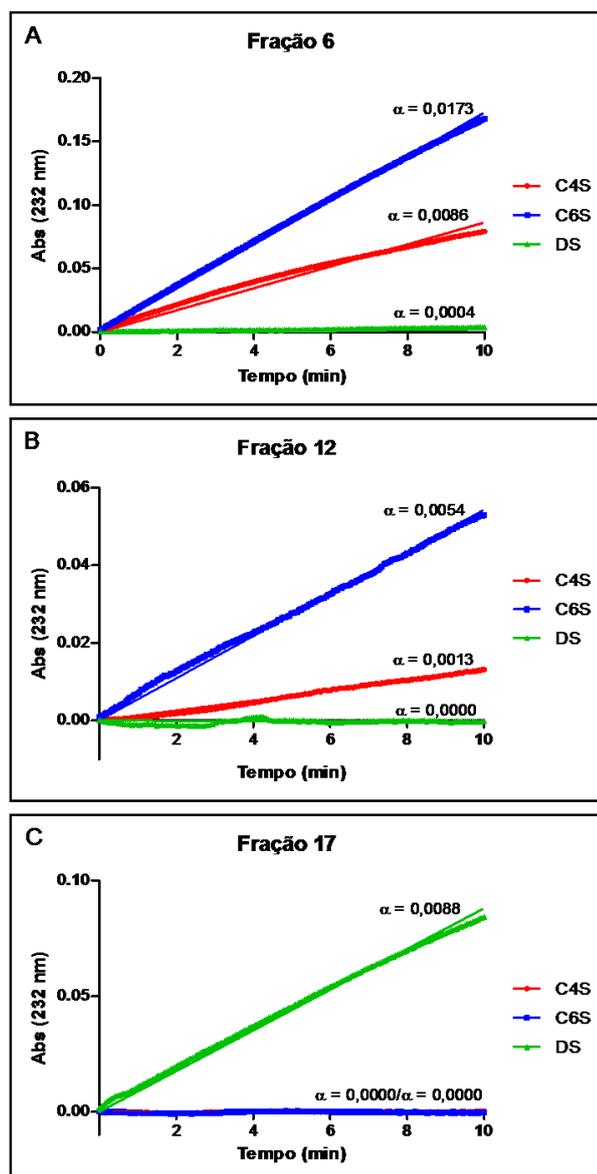


Figura 22 – Atividade de Condroitinasas Presentes em Frações Eluídas por HIC em *Phenyl Sepharose* HP. Determinação da atividade pelo Método 1. Os valores de velocidade ($\alpha = \text{abs}/\text{min}$) sobre cada substrato são apresentados.

Tabela 4 – Atividade de Frações Dialisadas Eluídas por HIC em *Phenyl Sepharose* HP.

	Fração (20 μL)	Atividade (U/mL)			
		C4S	C6S	DS	C6S/C4S
Condroitinase AC	5	0,055	0,091	–	1,64
	6	0,113	0,228	0,004	2,01
Condroitinase C	12	0,017	0,071	–	4,15
Condroitinase B	17	–	–	0,116	–
	18	–	–	0,050	–

*Os espaços preenchidos com – apresentam valores não significativos de atividade

As frações 5 e 6 apresentam maior velocidade de digestão sobre condroitim 6-sulfato, sendo que a razão da atividade de condroitim 6-sulfato/condroitim 4-sulfato é de 1,64 e 2,01, respectivamente. Já para a fração 12 essa razão é cerca de duas vezes maior (4,15). Estes resultados são consistentes com as atividades de condroitinase AC para as frações 5 e 6 e condroitinase C para a fração 12.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 22-C e Tabela 4, fica evidente que as frações 17 e 18 apresentam condroitinase B, que quebra regiões idurônicas do dermatam sulfato.

4.4.3.2 FACE de Produtos de Degradação de Glicosaminoglicanos por Condroitinases (Método 2).

Os produtos formados pela ação das condroitinases fracionadas por HIC em *Phenyl Sepharose* HP sobre diferentes substratos foram analisados por FACE.

4.4.3.2.1 Condroitinase AC (Frações 5 e 6)

Inicialmente, misturas de incubação contendo 100 µg de condroitim 4-sulfato de traquéia bovina e 2 mU de condroitinase AC foram preparadas e mantidas à temperatura ambiente. Após diferentes tempos de incubação (0, 1, 2, 4, 6, 12, 18 e 24 horas), as enzimas foram inativadas em banho fervente por 10 minutos. Para o tempo 0, a mistura foi fervida imediatamente após a adição da enzima ao substrato. As misturas foram secas a vácuo e submetidas à derivatização com 400 nmol de AMAC, na presença de cianoborohidreto de sódio 0,5 M, a 37°C por 16 horas. Após esse tempo, 30 µL de glicerol 30% foram adicionados à cada mistura. Aliquotas (2 µL, 5% do total derivatizado) foram submetidos à análise por FACE nos sistemas Tris-glicina e Tris-borato (Figura 23).

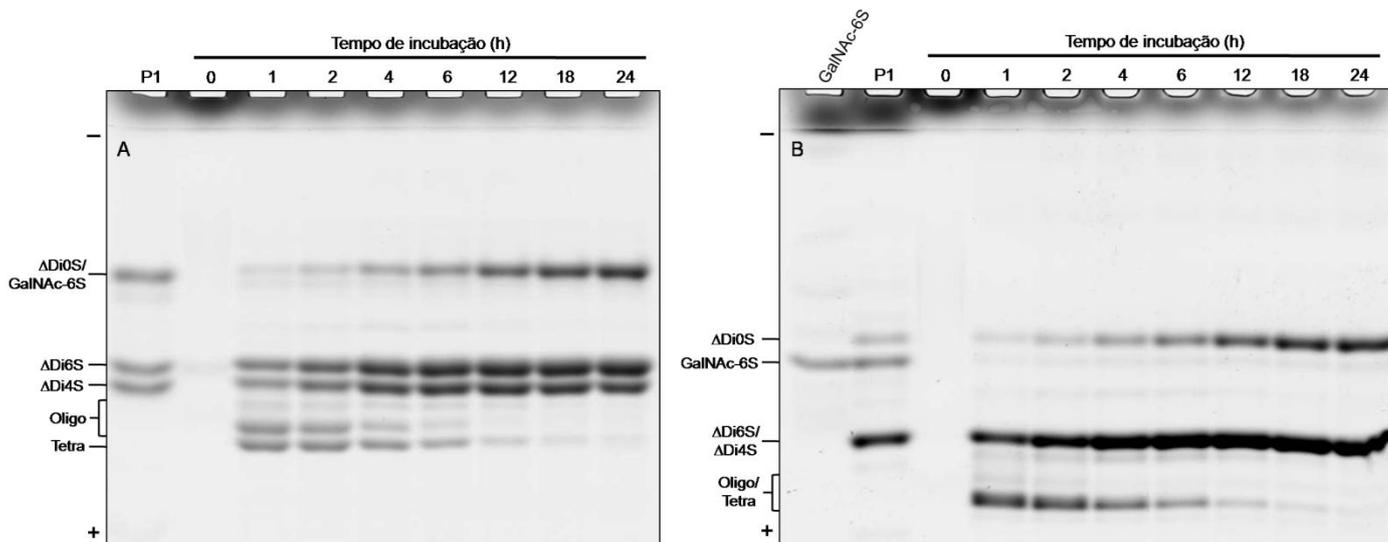


Figura 23 – Eletrofluorogramas nos Sistemas Tris-glicina (A) e Tris-borato (B) de Produtos de Digestão de C4S de Traquéia Bovina por Condroitinase AC. Aliquotas (100 µg) de C4S foram incubadas com 2 mU de condroitinase AC em diferentes tempos e derivatizadas com AMAC (400 nmol). P1: mistura padrão contendo Δ Di0S, Δ Di4S, Δ Di6S e GalNAc-6S; Oligo: oligossacarídeos; Tetra: tetrassacarídeos.

Após uma hora de digestão, cinco produtos principais foram observados no sistema Tris-glicina (Figura 23-A). Uma banda, com menor migração, comigrando com Δ Di0S/GalNAc-6S, duas bandas com migração intermediária correspondendo aos dissacarídeos Δ Di4S e Δ Di6S, e outras duas com maior mobilidade eletroforética (oligossacarídeos e tetrassacarídeos, respectivamente). No sistema Tris-borato, somente três bandas foram detectadas, Δ Di0S, Δ Di4S/ Δ Di6S e oligossacarídeo/tetrassacarídeo.(Figura 23-B)

Alterações nas intensidades das bandas foram observadas com o aumento do tempo de incubação. As bandas relativas a oligossacarídeos e tetrassacarídeos perderam intensidade, enquanto as bandas dos dissacarídeos ficaram mais fortes. A Figura 24 apresenta as porcentagens relativas de cada produto formado nos diferentes tempos de incubação com a condroitinase AC no gel em Tris-glicina.

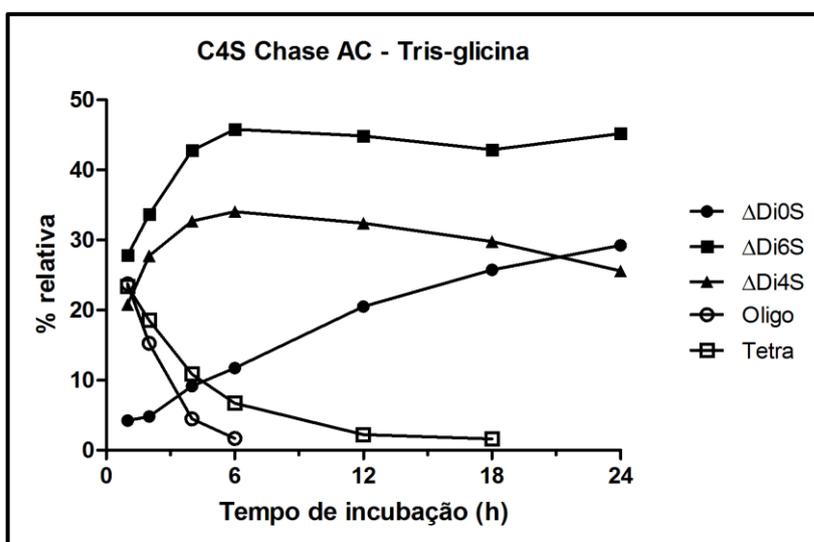


Figura 24 – Porcentagem Relativa de Produtos de Digestão de C4S por Condroitinase AC. Os cálculos foram realizados a partir de análise densitométrica das bandas identificadas no gel em Tris-glicina (Figura 23-A).

Ao final de 24 horas de incubação foram produzidos aproximadamente 45% de Δ Di6S, 26% de Δ Di4S e 29% de Δ Di0S. Análises dissacarídicas de condroitim 4-sulfato de traquéia bovina por outros métodos apresentam uma distribuição de cerca de 5% de Δ Di0S, 58% de Δ Di4S e 36% de Δ Di6S (VOLPI, 2010). Esses dados indicam uma grande diferença na quantidade de Δ Di4S e Δ Di0S em relação ao obtido neste trabalho. Além disso, observamos na Figura 24 uma queda na porcentagem relativa de Δ Di4S acompanhada do aumento de Δ Di0S a partir de 6 horas de incubação. A proporção de Δ Di6S permanece constante nesse tempo. Estes resultados indicam contaminação da preparação de condroitinase AC por sulfatase específica para o dissacarídeo 4-sulfatado.

A incubação de condroitim 4-sulfato de traquéia bovina com condroitinase AC foi repetida com adição de fluoreto de sódio 10 mM para investigar a presença e a inibição de sulfatase pelos íons fluoreto (ROY, 1991). A Figura 25 apresenta os resultados obtidos.

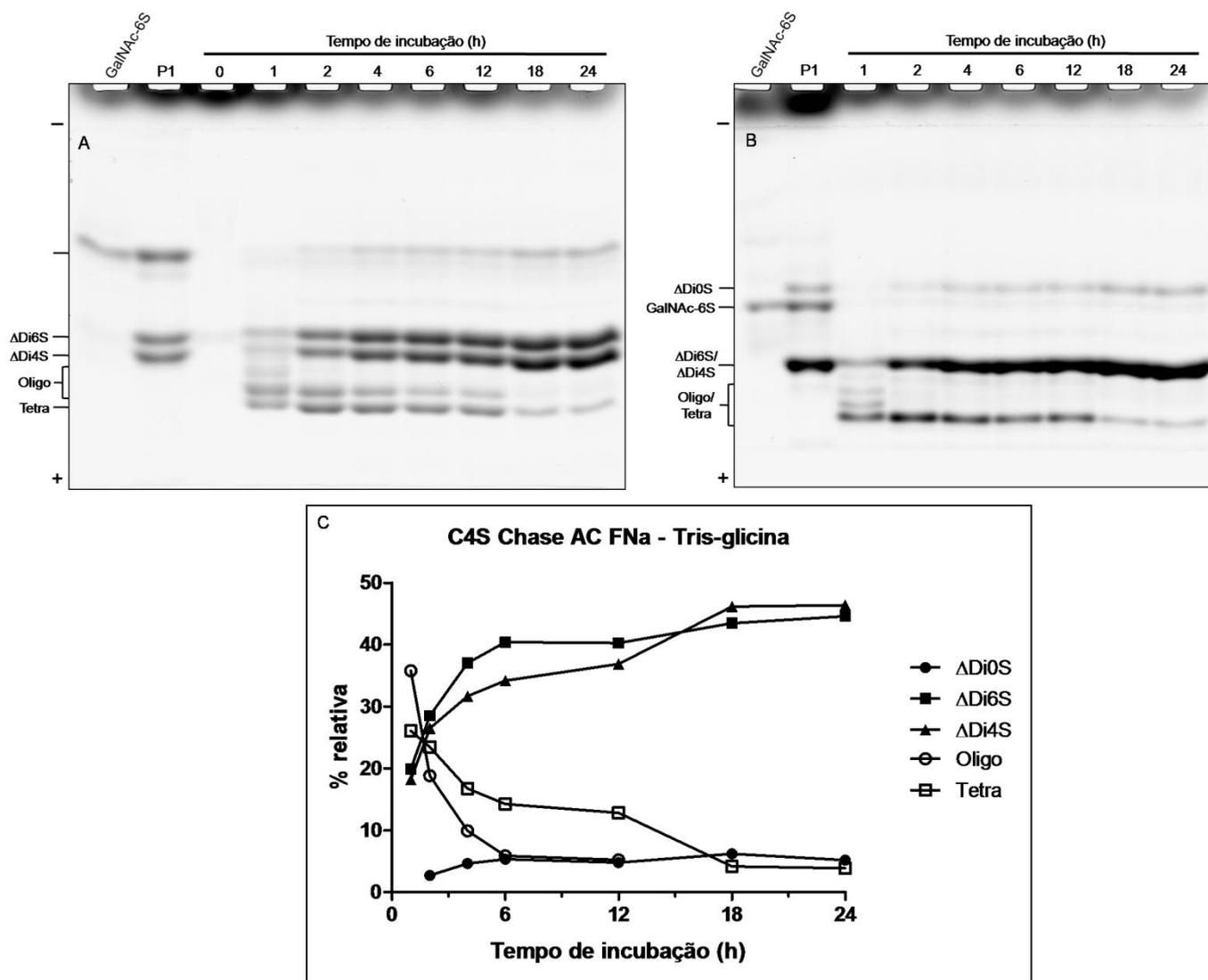


Figura 25 – Eletroferogramas nos Sistemas Tris-glicina (A) e Tris-borato (B) de Produtos de Digestão de C4S de Traquéia Bovina por Condroitinase AC na Presença de Fluoreto de Sódio. (C) Porcentagem Relativa de Produtos de Digestão de C4S por Condroitinase AC na Presença de Fluoreto de Sódio. Aliquotas (100 μ g) de C4S foram incubadas com 2 mU de condroitinase AC, na presença de fluoreto de sódio 10 mM, em diferentes tempos e derivatizadas com AMAC (400 nmol). P1: mistura padrão contendo Δ Di0S, Δ Di6S, Δ Di4S e GalNAc-6S; Oligo: oligossacarídeos; Tetra: tetrassacarídeos. Os cálculos foram realizados a partir de análise densitométrica das bandas identificadas no eletroferograma em Tris-glicina.

Na presença de fluoreto de sódio, observamos um aumento da porcentagem relativa dos dissacarídeos insaturados monossulfatados, Δ Di4S e Δ Di6S, ao longo das 24 horas de incubação, enquanto a porcentagem de Δ Di0S permanece inalterada a partir de 6 horas (Figura 25-C), indicando inibição da sulfatase. O condroitim sulfato analisado nessas condições apresenta 46% de Δ Di4S, 45% de Δ Di6S e 5% de Δ Di0S, ao final de 24 horas de digestão, sendo que 4% de tetrassacarídeos também são encontrados. Esses resultados estão de acordo com a porcentagem dissacarídica descrita para o condroitim 4-sulfato obtido de traquéia

bovina, além de reforçar os indícios de presença de sulfatase com atividade específica para sulfatação na posição 4 da *N*-acetilgalactosamina na preparação de condroitinase AC. A partir de então, misturas de incubação para condroitinase AC foram realizadas com adição de fluoreto de sódio 10 mM.

A formação de produtos de digestão de condroitim 6-sulfato de cartilagem de tubarão por condroitinase AC em diferentes tempos de incubação também foi investigada (Figura 26).

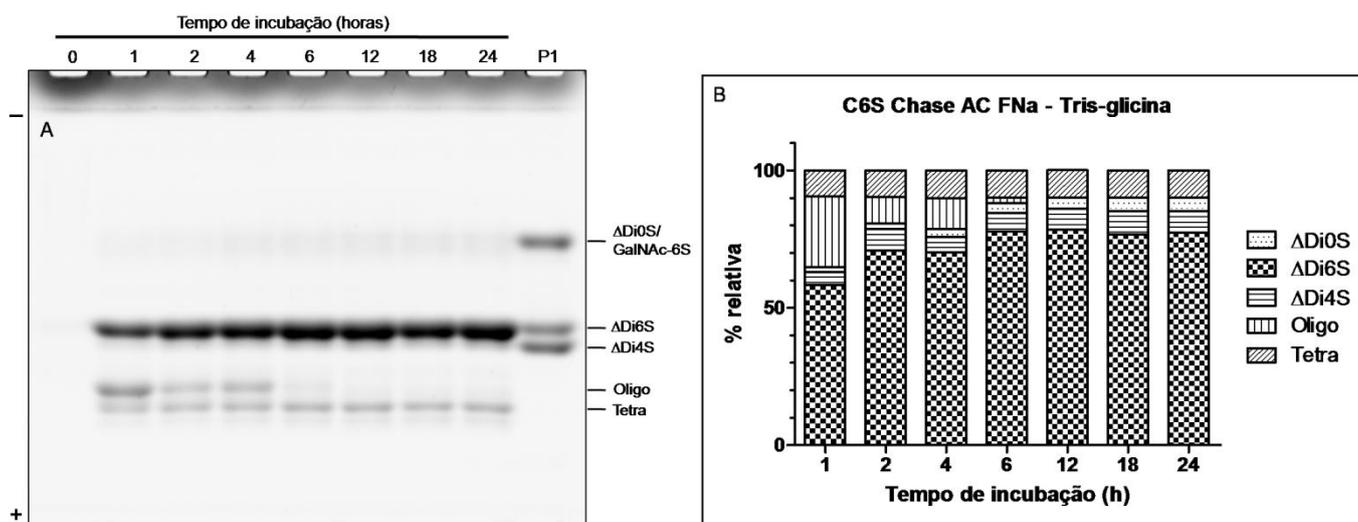


Figura 26 – (A) Eletrofluorograma em Sistema Tris-glicina de Produtos de Digestão de C6S de Cartilagem de Tubarão por Condroitinase AC. (B) Porcentagem Relativa de Produtos de Digestão de C6S por Condroitinase AC. Aliquotas (100 µg) de C6S foram incubadas com e 2 mU de condroitinase AC, na presença de fluoreto de sódio 10 mM, em diferentes tempos e derivatizadas com AMAC (400 nmol). P1: mistura padrão contendo ΔDi0S, ΔDi6S, ΔDi4S e GalNAc-6S; Oligo: oligossacarídeos; Tetra: tetrassacarídeos.

Nas primeiras 6 horas notamos um aumento na proporção relativa do ΔDi6S, que estabiliza em 78%, acompanhado de queda nos oligossacarídeos, que em 12 horas já não são vistos. A partir de 6 horas, não há alteração significativa na proporção relativa nos produtos formados. Esse condroitim ainda possui 8% de ΔDi4S e 5% de ΔDi0S. Os outros 10% correspondem a uma banda com migração de tetrassacarídeo que aparece já em 1 hora de digestão e é resistente à quebra por condroitinase AC.

A ação da condroitinase AC sobre dermatam sulfato extraído de mucosa intestinal suína produz diversas bandas ao longo do gel, caracterizando a quebra de regiões glucurônicas presentes nesse glicosaminoglicano. (Figura 27)

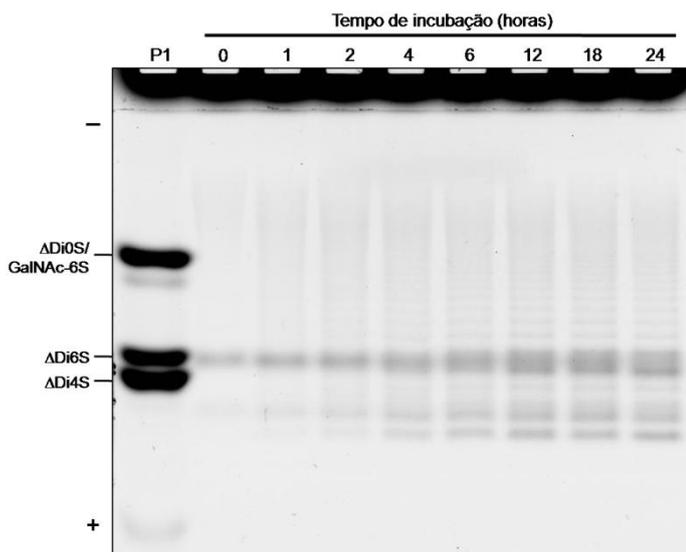


Figura 27 – Eletrofluorograma em Sistema Tris-glicina de Produtos de Digestão de DS de Mucosa Intestinal Suína por Condroitinase AC. Alíquotas (100 µg) de DS foram incubadas com 2 mU de condroitinase AC, na presença de fluoreto de sódio 10 mM, em diferentes tempos e derivatizadas com AMAC (400 nmol). P1: mistura padrão contendo Δ Di0S, Δ Di6S, Δ Di4S e GalNAc-6S.

4.4.3.2.2 Condroitinase C (Fração 12)

A Figura 28 mostra os produtos da ação da condroitinase C sobre condroitim 6-sulfato de tubarão, analisados em sistema Tris-glicina (A) e Tris-borato (B), e os produtos de condroitim 4-sulfato em sistema Tris-glicina (C).

Diferentemente ao observado para a condroitinase AC, a degradação de condroitim 4-sulfato e condroitim 6-sulfato pela condroitinase C apresentou um maior número de bandas no gel, devido à especificidade restrita desta enzima para regiões 6-sulfatadas destes compostos.

Nas primeiras 4 horas de incubação do condroitim 6-sulfato com condroitinase C, observamos a formação de três oligossacarídeos principais. O primeiro oligossacarídeo (Oligo 1) aumenta até 6 horas, e a partir daí permanece resistente à ação da enzima, provavelmente por ser rico em regiões quatro sulfatadas. A partir de 6 horas, notamos ainda uma alteração na migração dos outros oligossacarídeos (Oligo 2), que perdem intensidade com o decorrer da incubação, por ainda apresentarem regiões sensíveis à ação enzimática.

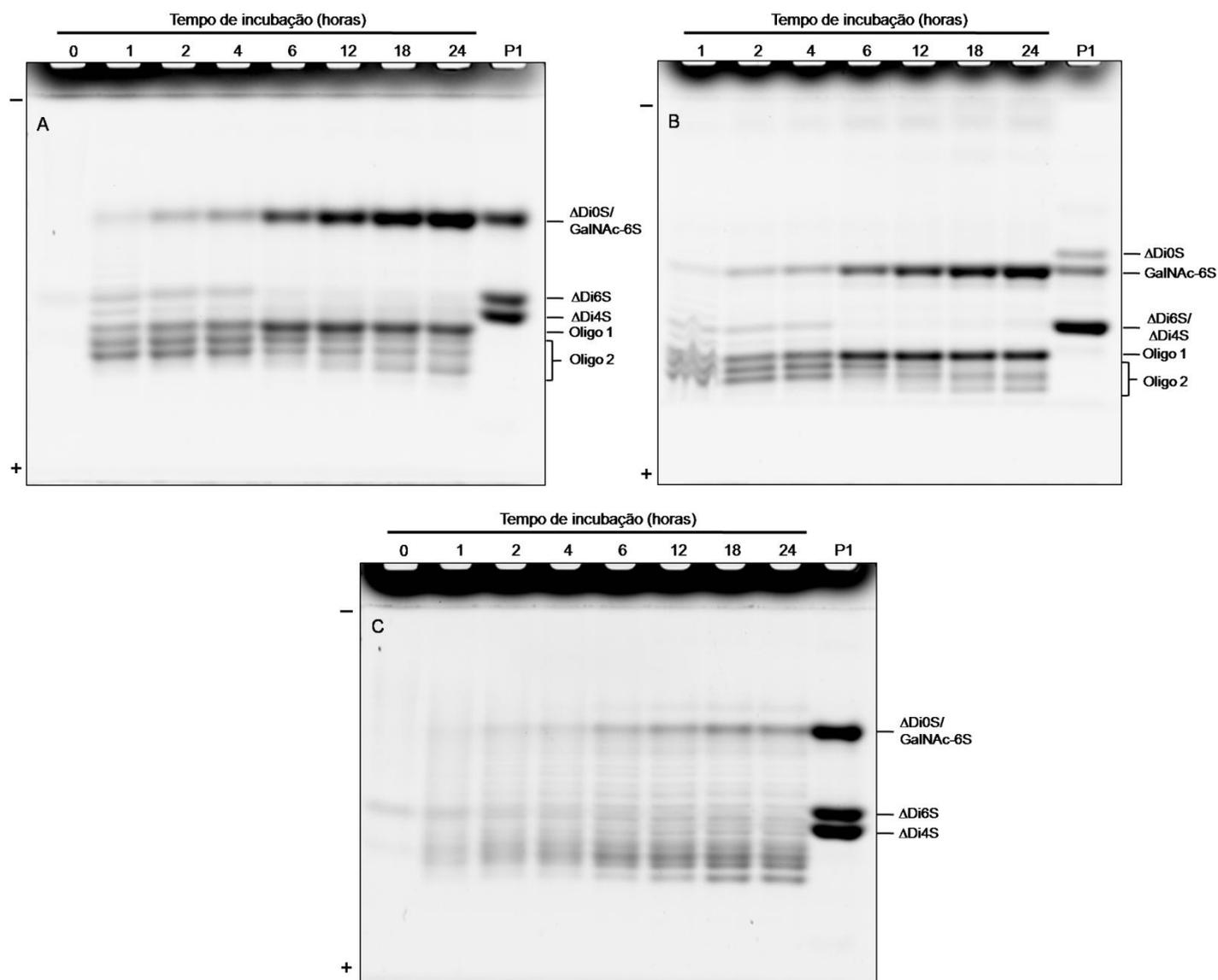


Figura 28 – Eletrofluorogramas nos Sistemas Tris-glicina (A e C) e Tris-borato (B) de Produtos de Digestão de C6S de Cartilagem de Tubarão (A e B) e C4S de Traquéia Bovina (C) por Condroitinase C. Aliquotas (100 μg) de C6S e C4S foram incubadas com 2 mU de condroitinase C, na presença de fluoreto de sódio 10 mM, em diferentes tempos e derivatizadas com AMAC (400 nmol). P1: mistura padrão contendo $\Delta\text{Di}0\text{S}$, $\Delta\text{Di}6\text{S}$, $\Delta\text{Di}4\text{S}$ e GalNAc-6S; Oligo: oligossacarídeos.

Observamos também o desaparecimento do $\Delta\text{Di}6\text{S}$ formado nas primeiras horas de incubação, acompanhado do aumento da formação de GalNAc-6S, evidenciado principalmente a partir de 6 horas. A presença desse monossacarídeo como principal produto da ação da condroitinase C indica contaminação dessa enzima com glucuronidase.

4.4.3.2.3 Condroitinase B (Frações 17 e 18)

A Figura 29 apresenta o padrão de digestão de dermatam sulfato por condroitinase B.

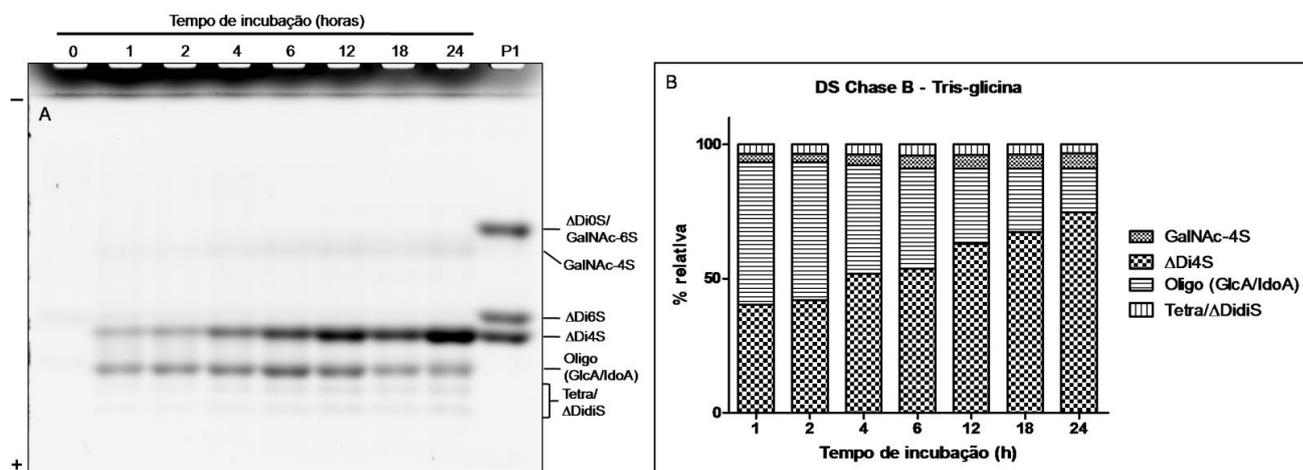


Figura 29 – (A) Eletrofluorograma em Sistema Tris-glicina de Produtos de Digestão de DS de Mucosa Intestinal Suína por Condroitinase B. (B) Porcentagem Relativa de Produtos de Digestão de DS por Condroitinase B. Aliquotas de DS foram incubadas com 2 mU de condroitinase B, na presença de fluoreto de sódio 10 mM, em diferentes tempos e derivatizadas com AMAC (400 nmol). P1: mistura padrão contendo Δ Di0S, Δ Di6S, Δ Di4S e GalNAc-6S. Oligo: oligossacarídeos; Tetra: tetrassacarídeos; Δ DidiS: dissacarídeos insaturados dissulfatados.

Podemos notar no início da incubação (1 hora) uma banda relativa ao Δ Di4S, cuja intensidade aumenta com o decorrer da incubação, e outra mais intensa correspondente a oligossacarídeos (oligo GlcA/IdoA). Essa também aumenta até 6 horas, e a partir daí perde intensidade. Estes oligossacarídeos provavelmente contêm regiões de ácido glucurônico e ácido idurônico.

Uma banda com migração de GalNAc-4s também é vista em menor intensidade, bem como outras duas bandas (Tetra/ Δ DidiS) que podem ser tanto tetrassacarídeos resistentes à ação da enzima quanto dissacarídeos insaturados dissulfatados (Δ DidiS).

4.4.4 ANÁLISE DAS ENZIMAS CONTAMINANTES NAS PREPARAÇÕES DE CONDRUITINASES POR FACE.

Os resultados anteriores demonstraram que as preparações de condroitinases eluídas da HIC em *Phenyl Sepharose HP* apresentam também outras atividades de enzimas (sulfatase e glucuronidase) da via catabólica de condroitim sulfato/dermatam sulfato em *Flavobacterium heparinum*. A Figura 30 apresenta os

produtos formados após 24 horas de incubação (30°C) de glicosaminoglicanos (20 µg) com as frações de condroitinases (2 mU) preparadas neste trabalho.

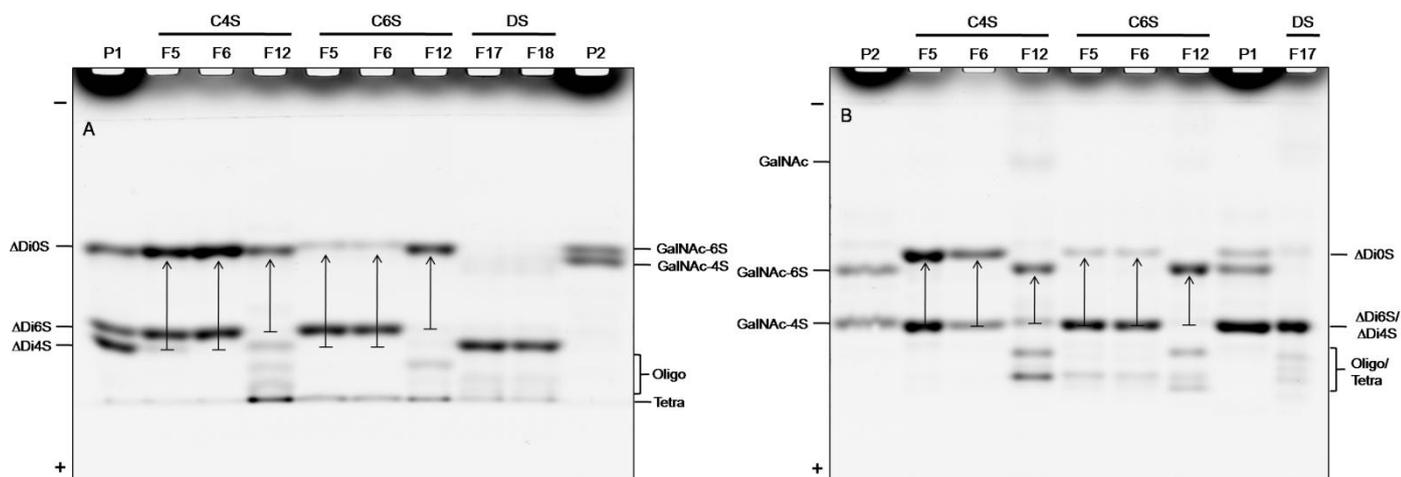


Figura 30 – Eletrofluorogramas nos Sistemas Tris-glicina (A) e Tris-borato (B) de Produtos de Digestão de Glicosaminoglicanos por Incubação com Condroitinases de *F. heparinum* Fracionadas por HIC em *Phenyl Sepharose* HP. Alíquotas (20 µg) de C4S de traquéia bovina, C6S de cartilagem de tubarão e DS de mucosa intestinal suína foram incubadas por 24 horas com 2 mU de cada fração e derivatizadas com AMAC (60 nmol). Foram adicionados 5 µL de solução de glicerol 60% e 2 µL da solução derivatizadas foram aplicados no gel. As setas apresentadas partem da posição original do dissacarídeo produzido pelas das condroitinases e apontam para o produto liberado após ação das enzimas contaminantes. P1: mistura padrão contendo Δ Di0S, Δ Di6S, Δ Di4S e GalNAc-6S; P2: mistura padrão contendo GalNAc-4S e GalNAc-6S; Oligo: oligossacarídeos. Tetra: tetrassacarídeos.

Testes de inibição da atividade das enzimas contaminantes sobre dissacarídeos insaturados de condroitim sulfato foram realizados com a incubação (24 horas, 30°C) de 20 nmol de Δ Di0S, Δ Di4S ou Δ Di6S com 2 mU de cada fração de condroitinase, na presença e ausência de inibidores. Fluoreto de sódio (FNa) foi utilizado como inibidor de sulfatase (ROY, 1991). Para a inibição de glucuronidase foram realizadas também incubações contendo sacarolactona (SaL) em concentrações de 10 mM e 1 mM (HOPWOOD et al., 1979). Nesse caso, alíquotas de SaL contendo 500 nmol e 50 nmol também foram derivatizadas separadamente. Após 24 horas de incubação a 30°C, os tubos contendo as misturas foram mantidos em banho fervente por 10 minutos para a inativação das enzimas. As amostras foram secas a vácuo e derivatizadas com 100 nmol de AMAC em presença de cianoborohidreto de sódio 0,5 M. Após a derivatização, 30 µL de glicerol 30% foram adicionados, e alíquotas de 2 µL foram analisadas por FACE em sistema Tris-glicina e Tris-borato. A Figura 31 apresenta os resultados com fluoreto de sódio.

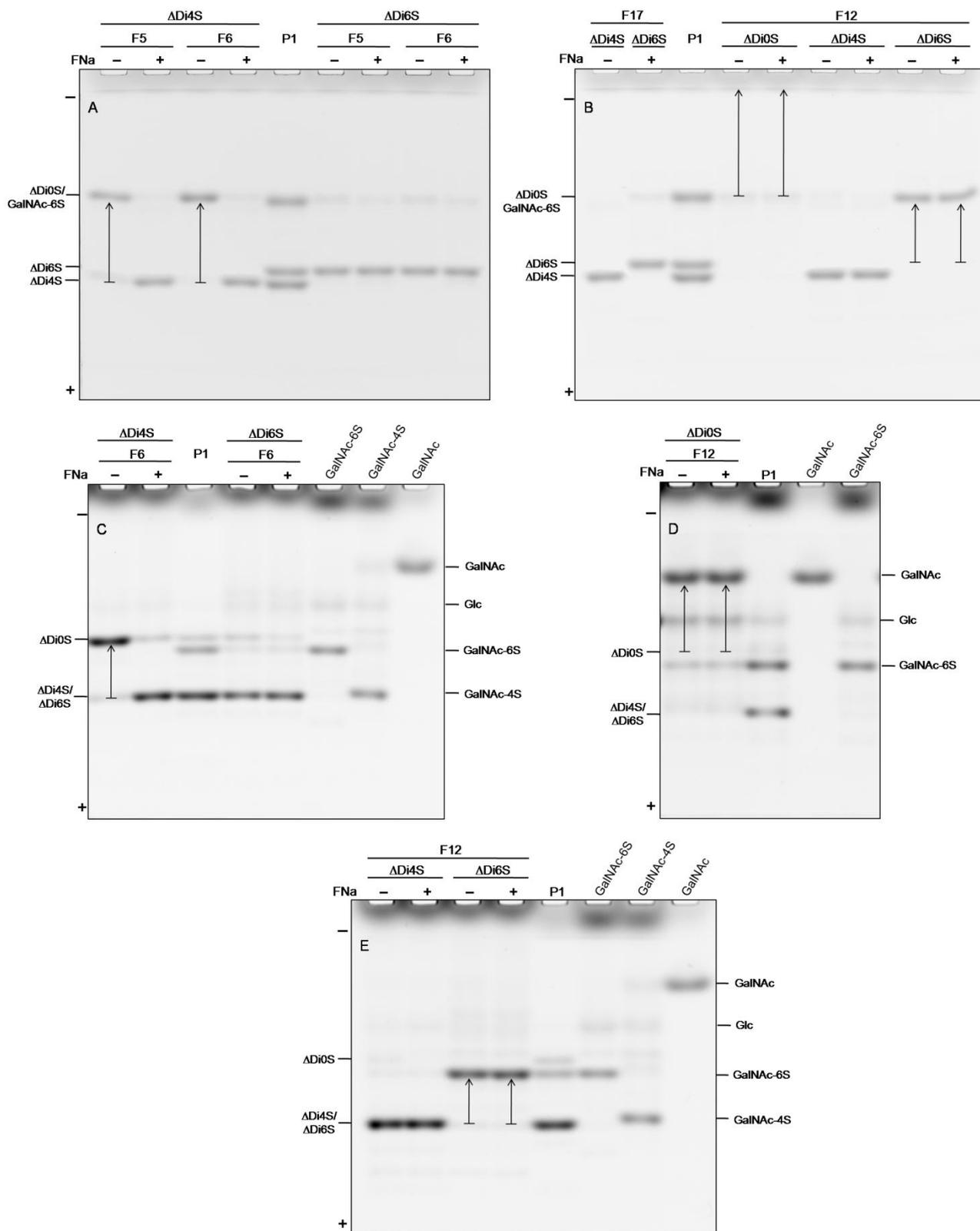


Figura 31 – Eletrofluorogramas nos Sistemas Tris-glicina (A e B) e Tris-borato (C, D e E) de Diferentes Dissacarídeos Insaturados Após Incubação com Condroitinases de *F. heparinum* Fracionadas por HIC em *Phenyl Sepharose HP*. Alíquotas (20 nmol) de cada dissacarídeo foram incubadas com frações contendo 2 mU de condroitinases, na ausência (-) ou presença (+) de fluoreto de sódio 10 mM, e derivatizadas com AMAC (100 nmol). As setas apresentadas partem da posição original do dissacarídeo e apontam para o produto liberado após a incubação. P1: mistura padrão contendo $\Delta Di0S$, $\Delta Di6S$, $\Delta Di4S$ e $GalNAc-6S$.

Na Figura 31, percebemos que o Δ Di4S foi convertido em Δ Di0S na incubação com frações 5 e 6 (condroitinase AC). Porém, na presença de fluoreto de sódio o Δ Di4S não sofreu degradação. Já o Δ Di6S permaneceu inalterado nas incubações com essas frações, tanto na ausência quanto presença de fluoreto de sódio (imagens A e C). Esses resultados confirmam que as frações de condroitinase AC produzidas neste trabalho apresentam contaminação por sulfatase com especificidade para Δ Di4S, que é inibida por fluoreto de sódio em concentração final de 10 mM.

Nenhuma modificação foi observada quando os dissacarídeos monossulfatados foram incubados com a fração 17 (condroitinase B) (Figura 31-B).

Na incubação com a fração 12 (condroitinase C), os dissacarídeos Δ Di0S e Δ Di6S foram degradados, liberando respectivamente GalNAc e GalNAc-6S, enquanto Δ Di4S não sofreu alteração. Os mesmos resultados foram obtidos nas incubações na ausência e presença de fluoreto de sódio (imagens B, D e E). Dessa forma, podemos inferir que a condroitinase C apresenta contaminação por glucuronidase com atividade sobre Δ Di0S e Δ Di6S, e fluoreto de sódio não foi capaz de inibir essa atividade.

A Figura 32 mostra as alterações apresentadas por esses dissacarídeos quando incubados com a fração 12 na presença de SaL em concentração final de 10 mM e 1mM.

Percebemos que a quebra de Δ Di0S pela glucuronidase com conseqüente liberação de GalNAc foi inibida apenas com SaL 10 mM. Entretanto, não houve inibição da ação da glucuronidase sobre Δ Di6S em nenhuma das concentrações de SaL.

Alíquotas de SaL foram derivatizadas individualmente com AMAC. Esse sacarídeo comigra com GalNAc-4S em sistema Tris-glicina, e em Tris-borato apresenta mobilidade entre GalNAc-6S e GalNAc-4S. Entretanto, nas amostras testadas para a inibição de glucuronidase por SaL, não detectamos a migração desse açúcar.

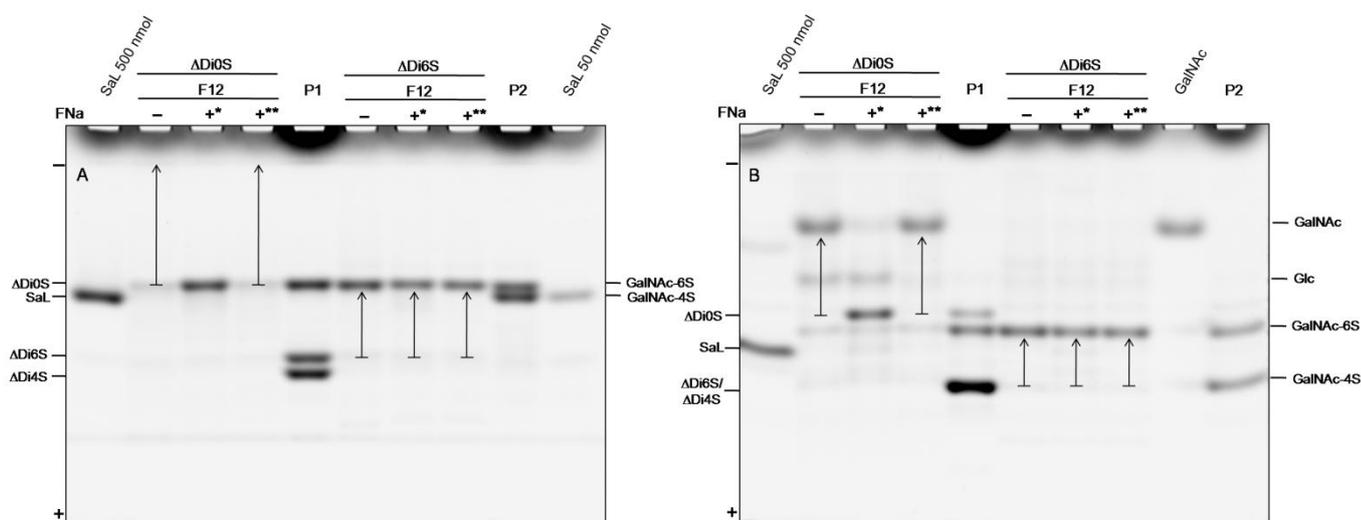


Figura 32 – Eletrofluorogramas nos Sistemas Tris-glicina (A) e Tris-borato (B) de Δ Di0S e Δ Di6S Após Incubação com Fração 12 (condroitinase C) de HIC em *Phenyl Sepharose* HP. Aliquotas (20 nmol) de cada dissacarídeo foram incubadas com 2 mU da fração 12 (F12) na ausência (-) ou presença de sacarolactona (SaL) em concentração final de 10 mM (+*) ou 1 mM (+**), e derivatizadas com AMAC (100 nmol). As setas apresentadas partem da posição original do dissacarídeo e apontam para o produto liberado após a incubação. P1: mistura padrão contendo Δ Di0S, Δ Di6S, Δ Di4S e GalNAc-6S; P2: mistura padrão contendo GalNAc-4S e GalNAc-6S; SaL: sacarolactona.

A Figura 33 mostra os resultados de inibição das enzimas contaminantes por fluoreto de sódio em incubações de condroitim 4-sulfato, condroitim 6-sulfato e dermatam sulfato (20 μ g) com frações de condroitinases. Os resultados de inibição de glucuronidase presente na fração 12 por SaL estão apresentados na Figura 34.

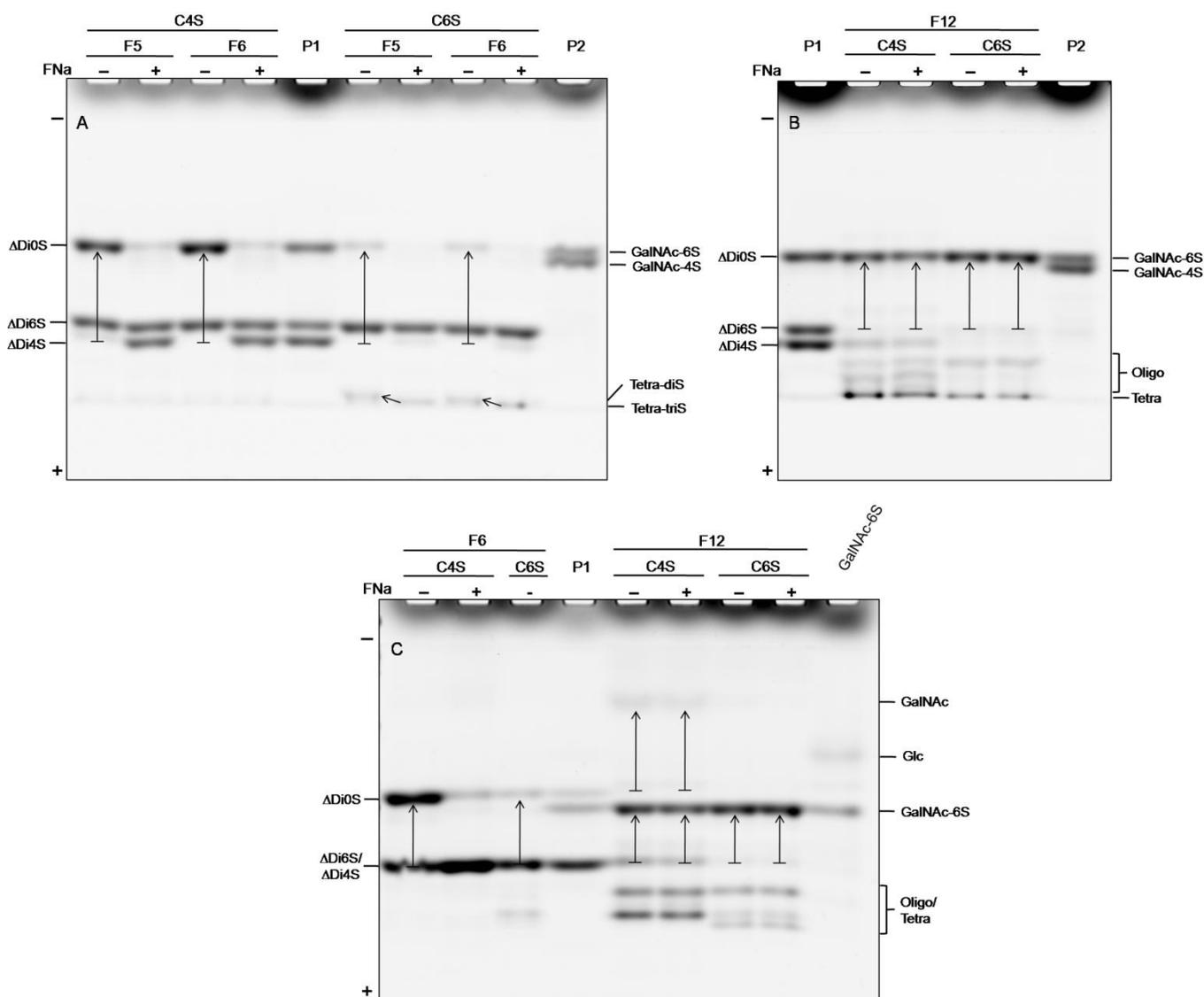


Figura 33 – Eletrofluorogramas nos Sistemas Tris-glicina (A e B) e Tris-borato (C) de Produtos de Digestão de Condroitim Sulfato por Incubação com Condroitinases de *F. heparinum* Fracionadas por HIC em *Phenyl Sepharose* HP na Presença de Fluoreto de Sódio. Aliquotas (20 μ g) de C4S de Traquéia Bovina e C6S de Cartilagem de Tubarão foram incubadas por 24 horas com 2 mU de cada fração, na ausência (-) ou presença (+) de fluoreto de sódio 10 mM, e derivatizadas com AMAC (60 nmol). As setas apresentadas partem da posição original do dissacarídeo produzido pelas condroitinases e apontam para o produto liberado após ação das enzimas contaminantes. P1: mistura padrão contendo Δ Di0S, Δ Di6S, Δ Di4S e GalNAc-6S; P2: mistura padrão contendo GalNAc-4S e GalNAc-6S; Oligo: oligossacarídeos. Tetra: tetrassacarídeos; Tetra-diS: tetrassacarídeo dissulfatado; Tetra-triS: tetrassacarídeo trissulfatado.

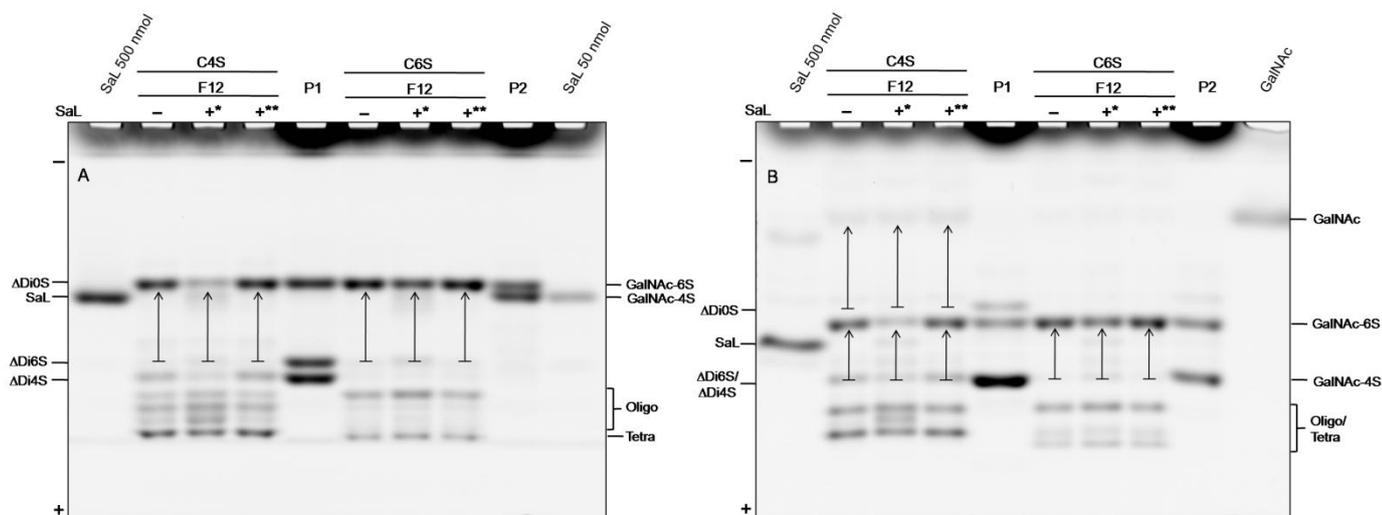


Figura 34 – Eletrofluorogramas nos Sistemas Tris-glicina (A) e Tris-borato (C) de Produtos de Digestão de Glicosaminoglicanos por Incubação com Fração 12 (condroitinase C) de HIC em *Phenyl Sepharose* HP, na Presença de Sacarolactona. Aliquotas (20 μ g) de C4S de Traquéia Bovina e C6S de Cartilagem de Tubarão foram incubadas por 24 horas com 2 mU da fração 12 (F12) na ausência (-) ou presença de sacarolactona (SaL) em concentração final de 10 mM (+*) ou 1 mM (+**), e derivatizadas com AMAC (60 nmol). As setas apresentadas partem da posição original do dissacarídeo produzido pelas condroitinases e apontam para o produto liberado após ação das enzimas contaminantes. P1: mistura padrão contendo Δ Di0S, Δ Di6S, Δ Di4S e GalNAc-6S; P2: mistura padrão contendo GalNAc-4S e GalNAc-6S; Oligo: oligossacarídeos. Tetra: tetrassacarídeos;

4.5 APLICAÇÃO DE FACE NA ANÁLISE DE CONDROITIM SULFATO EXTRAÍDO DE DIVERSAS FONTES.

FACE foi utilizada para análise dissacarídica de amostras de condroitim sulfato obtidas da Sigma (condroitim 4-sulfato de traqueia bovina e condroitim 4-sulfato de cartilagem de baleia) e Seikagaku (condroitim 6-sulfato de cartilagem de tubarão), bem como de condroitim sulfato extraído em nosso laboratório, conforme descrito em métodos, de diferentes tecidos de animais (traqueia bovina, cartilagem de esterno de frango, cartilagem de arraia e nadadeira de lula). Aliquotas (20 μ g) de cada material foram incubadas com 2 mU de condroitinase AC, na presença de fluoreto de sódio 10 mM por 24 horas, a 30°C. As misturas obtidas após a digestão foram secas a vácuo e os produtos foram derivatizados com 60 nmol de AMAC. Após a derivatização foram adicionados 5 μ L de solução de glicerol 60% e alíquotas de 2 μ L foram submetidas à análise por FACE em sistema Tris-glicina e Tris-borato (Figura 35). Os produtos de digestão identificados foram quantificados por análise densitométrica (Tabela 5).

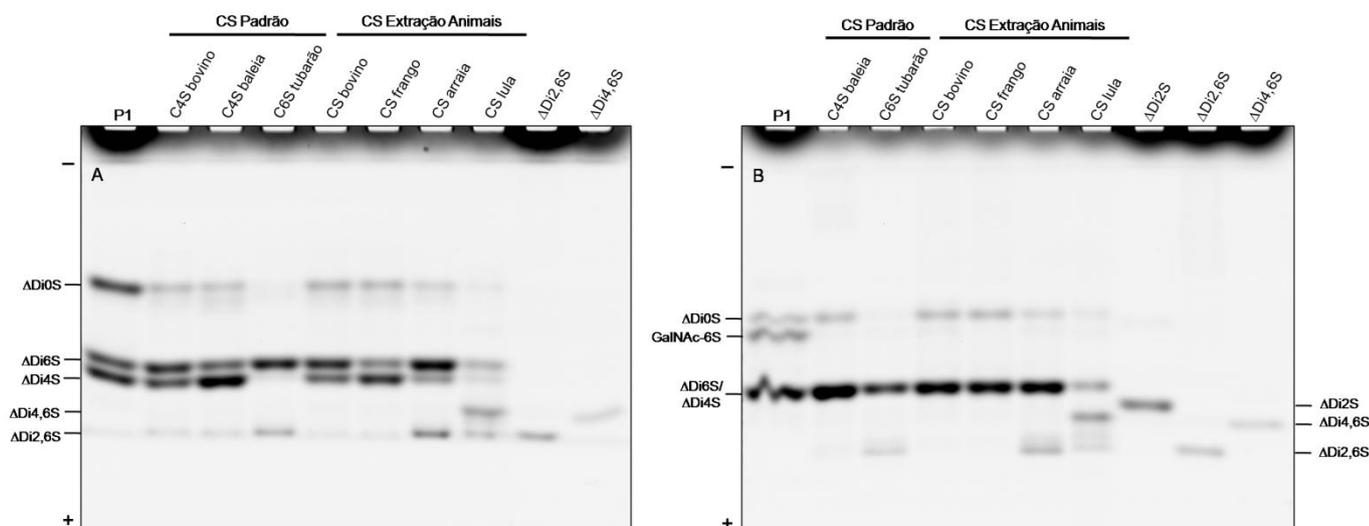


Figura 35 – Eletrofluorogramas nos Sistemas Tris-glicina (A) e Tris-borato (B) de Produtos de Digestão de Condroitim Sulfato de Diferentes Origens por Condroitinase AC de *F. heparinum* Fracionada por HIC. Alíquotas (20 μ g) de cada amostra foram incubadas por 24 horas com 2 mU de condroitinase AC, na presença de fluoreto de sódio 10 mM, e derivatizadas com AMAC (60 nmol). P1: mistura padrão contendo Δ Di0S, Δ Di6S, Δ Di4S e GalNAc-6S; Tetra: tetrassacarídeos; C4S bovino: padrão usado foi o C4S S2 da Sigma.

Tabela 5 – Porcentagem Relativa de Produtos de Digestão de CS de Diferentes Origens por Condroitinase AC de *F. heparinum* Fracionada por HIC, Determinada por FACE em Sistema Tris-Glicina.

Origem CS	% Relativa de Produtos Identificados					
	Δ Di0S	Δ Di4S	Δ Di6S	Δ Di2,6S	Δ Di4,6S	Tetra
Traqueia Bovina (Sigma)	10,6	38,9	47,1			3,4
Cartilagem Baleia (Sigma)	5,9	62,3	28,6			3,2
Cartilagem Tubarão (Seikagaku)	2,4	8,0	74,7	14,8		
Traqueia Bovina	12,7	33,7	51,0			2,6
Esterno Frango	12,1	55,5	29,6			2,7
Cartilagem Arraia	5,9	18,3	58,7	17,1		
Nadadeira Lula	3,2	11,9	28,1		38,8	18,0

Tetra: tetrassacarídeo

4.6 APLICAÇÃO DE FACE NA ANÁLISE DE AMOSTRAS FARMACÊUTICAS DE CONDROITIM SULFATO.

4.6.1 ANÁLISE DISSACARÍDICA DE CONDROITIM SULFATO

A análise das unidades dissacarídicas presentes em condroitim sulfato de uso farmacêutico foi realizada nas amostras com teor de condroitim sulfato superior a 80% (amostras 3, 4, 6, 12, 16). Alíquotas (20 µg) dessas amostras, bem como de dois padrões diferentes de condroitim 4-sulfato de traqueia bovina obtidos da Sigma-Aldrich, foram incubadas com 2 mU de condroitinase AC, na presença de fluoreto de sódio 10 mM por 24 horas, a 30°C. As misturas obtidas após a digestão foram secas a vácuo e os produtos foram derivatizados com 60 nmol de AMAC. Foram adicionados 5 µL de solução de glicerol 60% e alíquotas de 2 µL foram submetidas a análise por FACE em sistema Tris-glicina e Tris-borato (Figura 36). Os produtos de digestão identificados foram quantificados por análise densitométrica (Tabela 6).

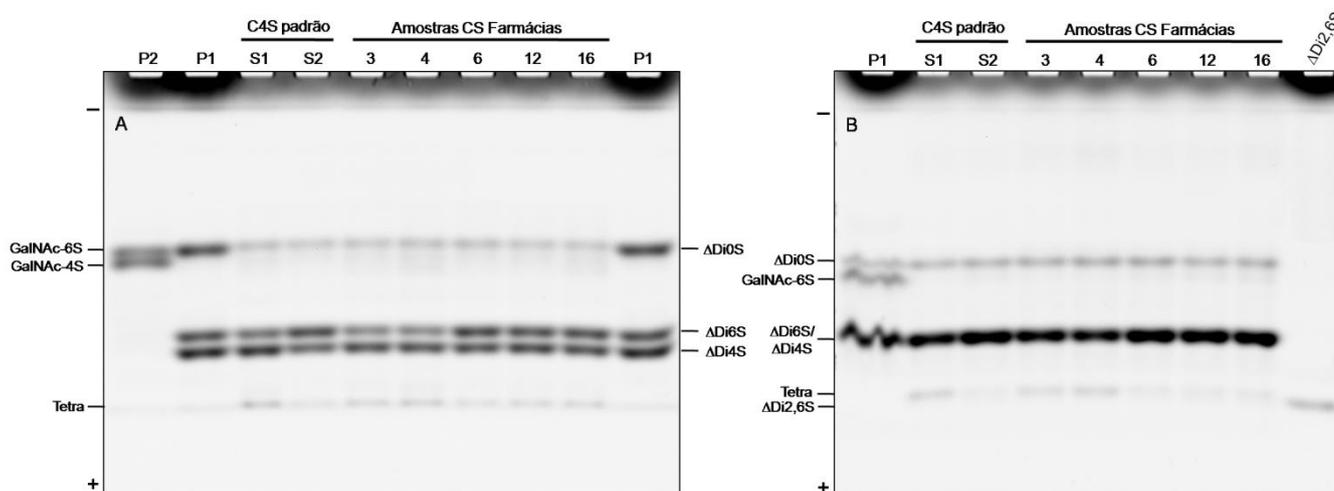


Figura 36 – Eletrofluorogramas nos Sistemas Tris-glicina (A) e Tris-borato (B) de Produtos de Digestão de Condroitim Sulfato de Amostras Farmacêuticas por Condroitinase AC de *F. heparinum* Fracionada por HIC. Alíquotas (20 µg) de cada amostra foram incubadas por 24 horas com 2 mU de condroitinase AC, na presença de fluoreto de sódio 10 mM, e derivatizadas com AMAC (60 nmol). P1: mistura padrão contendo ΔDi0S, ΔDi6S, ΔDi4S e GalNAc-6S; P2: mistura padrão contendo GalNAc-4S e GalNAc-6S; Tetra: tetrassacarídeos; C4S padrão S1 e C4S padrão S2: condroitim 4-sulfato de traqueia bovina obtidos da Sigma (dois produtos distintos).

Tabela 6 – Porcentagem Relativa de Produtos de Digestão de CS de Amostras Farmacêuticas e Padrões Sigma-Aldrich por Condroitinase AC de *F. heparinum* Fracionada por HIC, Determinada por FACE em Sistema Tris-Glicina.

Amostra	% Relativa de Produtos Identificados					
	Δ Di0S	Δ Di6S	Δ Di4S	Tetra	Densidade de Carga	4S/6S
C4S S1 (Sigma)	10,6	32,9	50,7	5,8	0,84	1,5
C4S S2 (Sigma)	9,6	47,7	39,3	3,3	0,87	0,8
Amostra 3	11,1	31,4	52,5	5,0	0,84	1,7
Amostra 4	12,0	32,1	50,4	5,5	0,83	1,6
Amostra 6	10,2	46,0	40,7	3,1	0,87	0,9
Amostra 12	8,5	42,8	45,0	3,7	0,88	1,1
Amostra 16	9,6	42,6	44,1	3,8	0,87	1,0

Tetra: tetrassacarídeo. C4S padrão S1 e C4S padrão S2: condroitim 4-sulfato de traqueia bovina obtidos da Sigma (dois produtos distintos). Densidade de carga: número de grupamentos sulfato por unidade dissacarídica.

As cinco amostras farmacêuticas analisadas apresentam perfil de sulfatação semelhante aos condroitins padrão de traqueia bovina (C4S S1 e C4S S2), apesar de existir pequena variação na proporção relativa de dissacarídeos sulfatados na posição 4 e 6 da *N*-acetil-galactosamina (4S/6S). Todas as amostras apresentaram a mesma densidade de carga

4.6.2 ANÁLISE DE AÇÚCARES CONTAMINANTES

De acordo com os resultados preliminares em Apêndice A, onze amostras farmacêuticas de condroitim sulfato analisadas apresentaram contaminação por outros açúcares. Para investigar a natureza dessa contaminação, diferentes açúcares neutros (monossacarídeos e dissacarídeos), submetidos ou não à hidrólise ácida, foram derivatizados com AMAC e submetidos à FACE no sistema tampão Tris-borato (Figura 37).

Percebemos que glicose e galactose apresentam migração diferente, e frutose não foi observada. A lactose apresenta migração intermediária a seus dois monossacarídeos constituintes, os quais podem ser separados após a hidrólise do dissacarídeo. Maltose apresenta a mesma mobilidade da glicose, e quando hidrolisada apresenta banda com maior intensidade. Nenhuma banda foi observada para sacarose, uma vez que este não é um açúcar redutor e portanto não ocorre derivatização pelo fluoróforo, e na sua hidrólise é vista banda de glicose.

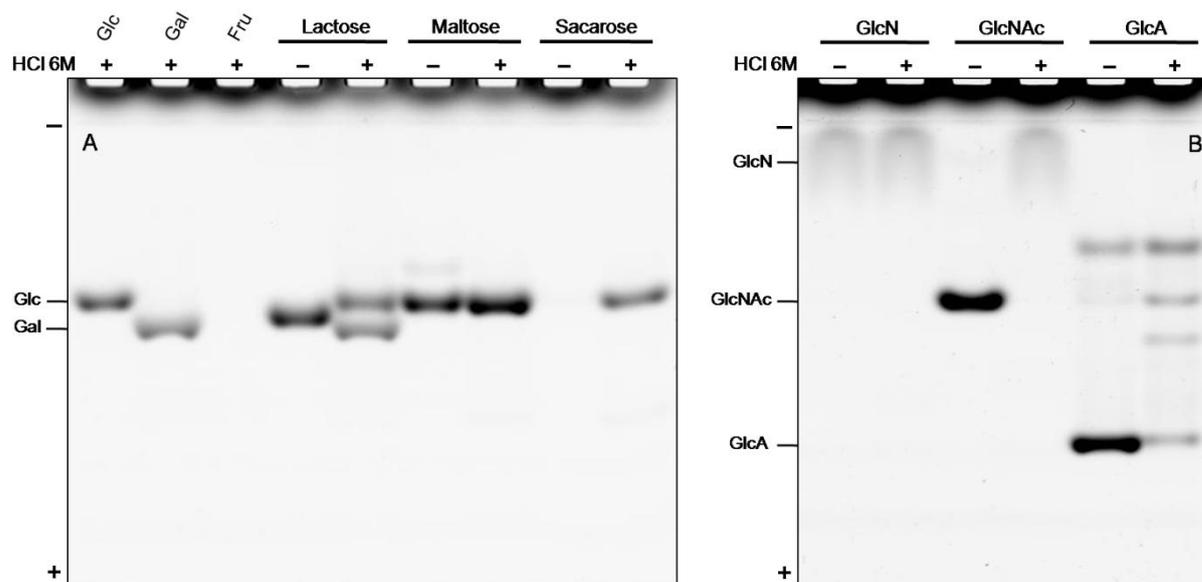


Figura 37 – (A e B) Eletrofluorogramas em Sistema Tris-borato de Diversos Açúcares Submetidos ou não à Hidrólise Ácida e Derivatizados com AMAC. Cerca de 50 nmol de cada sacarídeo foram submetidos à hidrólise com HCl 6M, por 4 horas a 100°C e derivatizados com AMAC (250 nmol), ou derivatizados diretamente. GlcN: glucosamina; GlcNAc: *N*-acetil-glucosamina; GlcA: ácido glucurônico.

Quanto aos açúcares modificados de glicosaminoglicanos, a glucosamina é o único monossacarídeo que não apresenta diferença de migração antes e após a hidrólise. Essa hexosamina penetra pouco no gel de corrida e é visualizada no topo do eletrofluorograma como banda difusa. Já *N*-acetil-glucosamina apresenta maior penetração no gel de corrida, e após hidrólise possui migração semelhante à glucosamina, o que evidencia a perda do grupamento acetil durante a hidrólise ácida. São observadas três bandas para ácido glucurônico, uma mais intensa com maior migração, e outras duas de menor intensidade. Quando esse açúcar é submetido à hidrólise, a banda com maior migração ainda pode ser vista, porém em menor intensidade, sendo que as outras duas bandas mais fracas apresentam-se mais ressaltadas, e uma quarta banda ainda é notada.

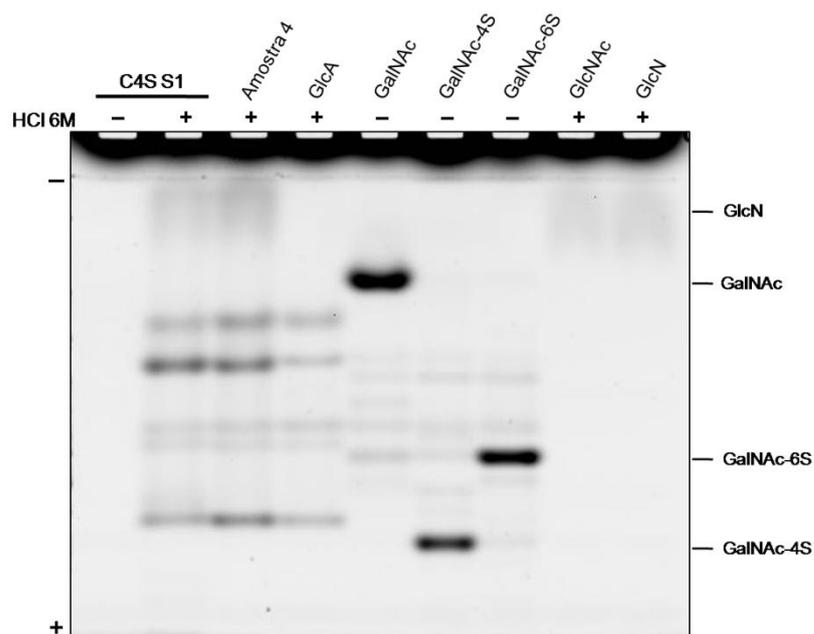


Figura 38 – Eletrofluorograma em Sistema Tris-borato de Condroitim Sulfato Submetido ou não à Hidrólise Ácida. Cerca de 20 µg de C4S padrão Sigma ou Amostra Farmacêutica 4 foram submetidos à hidrólise com HCl 6M, por 4 horas a 100°C e derivatizados com AMAC (250 nmol). Alíquota não hidrolizadas (40 µg) de condroitim padrão também foi analisada.

Amostra Farmacêutica contendo teor de condroitim sulfato superior a 90% (Amostra 4) foi submetida à hidrólise ácida e analisada por FACE, bem como condroitim 4-sulfato de traqueia bovina padrão (C4S S1) (Figura 38). Podemos observar a formação dos mesmos produtos de degradação ácida para os dois compostos. Estes produtos correspondem aos mesmos produtos de hidrólise de ácido glucurônico e *N*-acetil-galactosamina.

Para análise de açúcares contaminantes nas amostras com baixo teor de condroitim sulfato (Amostras 1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 e 15), 20 µg foram submetidos à hidrólise com ácido clorídrico 6M, a 100°C, por 4 horas. As amostras hidrolizadas, bem como alíquotas não hidrolizadas contendo 40 µg de material, foram derivatizadas com 250 nmol de AMAC e submetidas à análise por FACE em sistema tampão Tris-borato (Figura 39).

Observamos nas amostras 13 e 15 bandas com a mesma migração de lactose, e após hidrólise são formadas glicose e galactose (Figura 39-D). Esse resultado nos permite concluir que lactose é o principal açúcar nessas duas amostras.

Nas demais amostras (Figura 39-A, B e C) percebemos diversas bandas, que após hidrólise dão origem a glicose, confirmando a presença majoritária de oligossacarídeos de glicose com diferentes graus de polimerização.

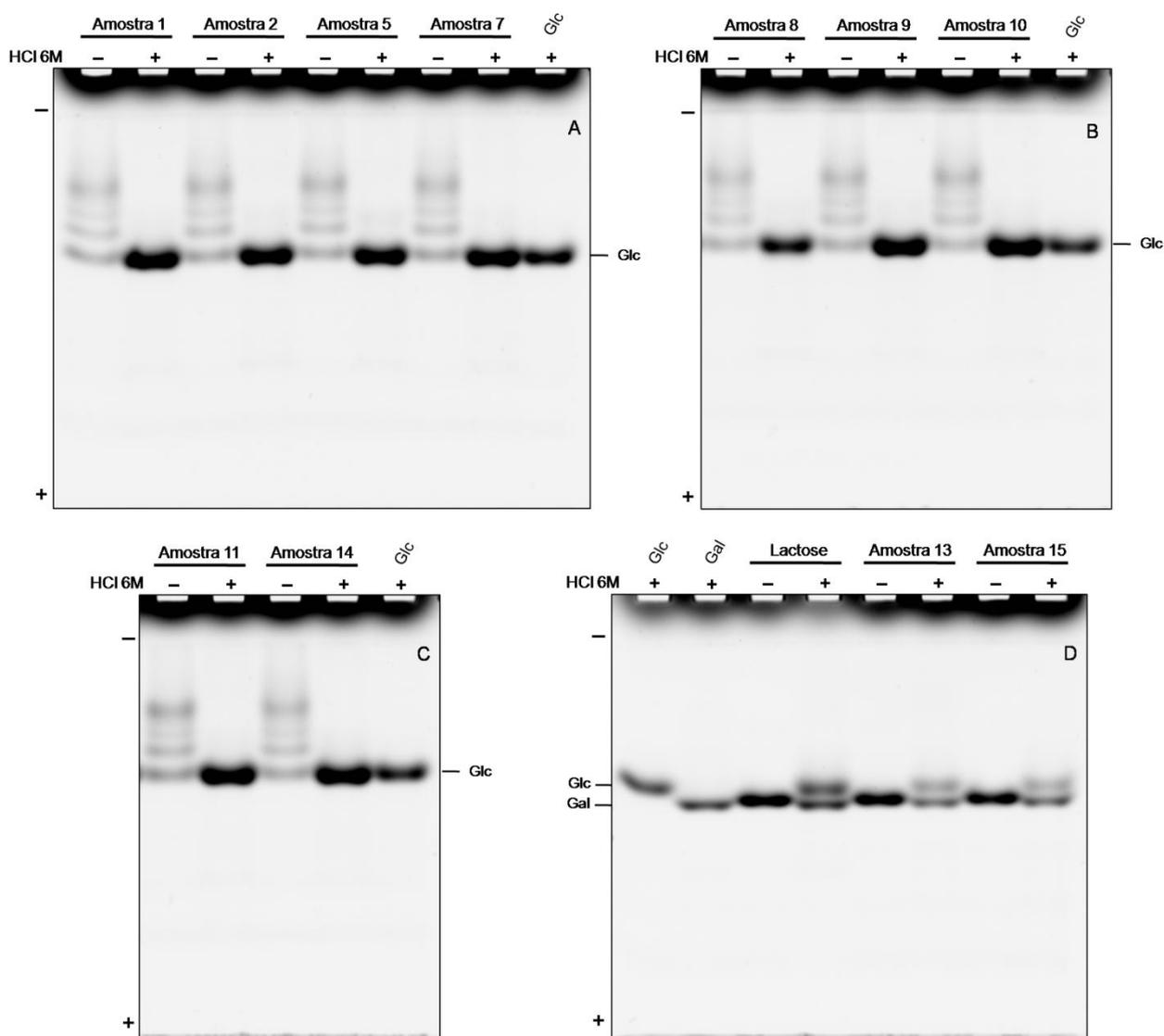


Figura 39 – Eletrofluorogramas em Sistema Tris-borato de Amostras Farmacêuticas de Condroitim Sulfato Contaminadas por Outros Açúcares. Cerca de 20 µg de cada amostra foram submetidos à hidrólise com HCl 6M, por 4 horas a 100°C e derivatizados com AMAC (250 nmol). Aliquotas não hidrolizadas (40 µg) também foram derivatizadas.

5 DISCUSSÃO

As matérias-primas utilizadas na fabricação de medicamentos constituem um ponto crítico para a qualidade do produto final, determinando a eficácia de um produto ou não. Até chegarem às prateleiras, os produtos passam por diversas etapas, que geralmente começam com a importação dos insumos farmacêuticos. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), muitos casos de desvios de qualidade de medicamentos estão ligados à falta de características ideais nos insumos. Dessa forma, os insumos farmacêuticos devem estar sujeitos a rigoroso controle e fiscalização durante todas as etapas do processo de produção do medicamento (BRASIL, 2006).

Vários insumos farmacêuticos ativos são obtidos a partir da extração de fontes naturais, tanto vegetais quanto animais, e necessitam passar por processos de purificação para isolamento da molécula de interesse. Este é o caso do condroitim sulfato, um glicosaminoglicano constituinte da cartilagem, extraído principalmente de traqueia bovina que é muito utilizado para tratamento de osteoartrite e como suplemento alimentar (CLEGG et al., 2006; SIM et al., 2007).

O condroitim sulfato é um polissacarídeo de natureza complexa, e apresenta variações importantes tanto no peso molecular quanto no grau e posição da sulfatação de suas unidades dissacarídicas. Essas variações refletem em diferentes efeitos biológicos, e dessa forma necessitam ser investigadas. Recentemente, lotes de heparina foram associados ao desenvolvimento de reações alérgicas agudas em pacientes após injeção intravenosa, devido à presença de condroitim sulfato com perfil de sulfatação atípico (*oversulfated*), levando muitos desses pacientes a óbito (GUERRINI et al., 2008; LIU, ZANG, LINHARDT, 2009).

De acordo com a fonte e o processo de extração e purificação, pode-se produzir condroitim sulfato com diferentes estruturas moleculares e pureza. A dosagem e determinação da pureza de condroitim sulfato extraído de tecidos animais é um ponto fundamental quando esse composto é produzido para fins farmacêuticos, assim como para uso em suplementos alimentares. (VOLPI, 2009)

Diversos casos de inconformidades em formulações a base de condroitim sulfato foram descritos em diferentes trabalhos que detectaram insumos contendo teor de condroitim sulfato inferior ao especificado ou até mesmo ausência desse

composto. Algumas amostras ainda apresentaram contaminações por outros açúcares e glicosaminoglicanos, como por exemplo, ácido hialurônico (ADEBOWALE et al., 2000; SIM et al., 2005; SIM et al., 2007; VOLPI, 2009). Contudo, no Brasil são escassos os estudos sobre a qualidade dos insumos de condroitim sulfato utilizados no mercado nacional, que são em sua maioria importados.

A Farmacopeia Brasileira carece de monografia para o condroitim sulfato, e recomenda o uso de outros compêndios, como a Farmacopeia Americana (*The United States Pharmacopeia* - USP) e a Farmacopeia Europeia (*The European Pharmacopeia* - EP). As análises estruturais atualmente descritas para esse composto fornecem poucas informações relevantes frente à complexidade da molécula. Além disso, o teste que determina o teor de condroitim sulfato é realizado por um método de titulação pouco específico (VOLPI, 2007).

A utilização de técnicas analíticas pouco específicas para identificação e dosagem de condroitim sulfato, bem como os relatos de produtos irregulares, nos levou a investigar diferentes técnicas para a análise desse composto em matérias-primas farmacêuticas. Buscamos também a utilização de técnicas complementares de análise que fornecessem informações relevantes quanto à estrutura da molécula. Para isso, coletamos dezesseis amostras de matérias-primas comercializadas em território nacional e realizamos diversas análises, com o objetivo de verificar a qualidade destes produtos.

Os resultados obtidos até setembro de 2011, data da defesa do projeto de qualificação, estão apresentados em Apêndice A – Resultados Preliminares, e resumidos a seguir.

Para a análise qualitativa e quantitativa das amostras foi utilizado o método de eletroforese em gel de agarose em tampão PDA, segundo Dietrich e Dietrich (1976). Neste método, condroitim sulfato é separado de outros glicosaminoglicanos, como dermatam sulfato, heparam sulfato e heparina, e pode ser quantificado sem equívocos por análise densitométrica, na faixa de 1 a 8 µg, mesmo na presença de outras macromoléculas negativas, como ácidos nucleicos (Figuras A1-4).

O método de titulação para análise do teor de condroitim sulfato, atualmente recomendado pelas Farmacopeias Europeia e Americana, também foi investigado. Este método é fundamentado na interação entre poliânions, como condroitim sulfato, e alguns detergentes catiônicos, a exemplo de cloreto de cetilpiridínio (CPC) e

brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON), formando complexos insolúveis em água (LIANG, 2002; SILVA, 2006). De acordo com Liang et al. (2002), o método é rápido, específico e preciso para a dosagem de condroitim sulfato em formulações farmacêuticas. De fato esse método possui boa linearidade para quantificação de condroitim sulfato em amostras puras (Figura A5). Porém, nossos resultados usando CETAVLON como titulante contestam a afirmação quanto à especificidade do método, uma vez que a presença de outros poliânions afetou significativamente a titulação (Figura A6).

A dosagem de condroitim sulfato nas amostras farmacêuticas por eletroforese em gel de agarose revelou que apenas uma matéria-prima apresentou teor superior a 90%, sendo que outras quatro amostras ficaram entre 80 e 90% (Figura A8). Nenhum outro glicosaminoglicano foi detectado nestas amostras por eletroforese (Figura A7).

Por *imunoblotting* detectamos também a presença de queratam sulfato nessas cinco amostras, bem como no condroitim sulfato padrão (Figura A23). Comparando a intensidade das bandas percebemos que três amostras farmacêuticas apresentam maior contaminação por esse glicosaminoglicano. Após o tratamento das matérias-primas com queratanase nenhuma banda foi vista no *imunoblotting*.

Na dosagem por titulação, essas mesmas amostras apresentaram teor superior a 95% (Figura A8). A análise por esse método é realizada a partir de maior quantidade de amostra (1.000 vezes), em relação ao método de eletroforese. Dessa forma, substâncias contaminantes que não são detectadas na eletroforese podem interferir e superestimar os resultados obtidos na titulação.

Quando analisadas por espectroscopia em UV, três matérias-primas apresentaram espectros muito semelhantes ao condroitim sulfato padrão, enquanto elevação no pico de 258 nm foi observada nas outras duas (Figura A11). Esse pico é dado provavelmente por resíduos aromáticos de aminoácidos presentes na amostra, o que é corroborado pela análise de proteínas, que apresentou os dois maiores valores dentro dessas amostras (Figura A16).

O tratamento dessas cinco amostras com condroitinase AC mostrou três produtos de digestão principais (Δ Di6S, Δ Di4S, e Δ Di0S/GalNAc-6S) por cromatografia em papel (Figuras A19-20). Entretanto, devido às inconveniências

deste método, que serão discutidas a seguir, não fomos capazes de quantificar esses produtos.

Tanto o método de eletroforese em gel de agarose quanto a titulação mostraram teor de condroitim sulfato inferior a 20% nas outras onze amostras analisadas, as quais apresentaram espectros de absorção em UV diferentes do padrão de referência (Figuras A12-13). Análises complementares indicaram contaminação por diferentes açúcares. Em nove amostras observamos vários produtos redutores em cromatografia em papel, e apenas uma banda foi vista nas outras duas amostras (Figura A15). Esses açúcares redutores apresentam a mesma migração cromatográfica após tratamento das amostras com condroitinase AC, o que indica que eles não são provenientes do condroitim sulfato. A dosagem de ácido urônico nesses produtos apresentou coloração marrom-alaranjada, característica da interferência de açúcares neutros nesse método colorimétrico (FILISSETTI-COZZI, CARPITA, 1991), o que superestimou a concentração de ácido urônico nessas amostras (Figura A17). As duas amostras contendo apenas uma banda na cromatografia ainda apresentaram dosagem de proteínas acima do limite de 6% especificado pela USP (Figura A16).

Até o momento da obtenção destes resultados, cromatografia em papel era nossa única técnica de análise diferencial de monossacarídeos e dissacarídeos neutros, bem como para análise dissacarídica de glicosaminoglicanos. Estes experimentos foram realizados no laboratório da disciplina de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, em colaboração com a professora Dra. Yara Michelacci. Entretanto, esse método apresenta algumas desvantagens, como baixa sensibilidade, uso de solventes tóxicos que requerem ambiente com exaustão especial, tempo de análise longo e realização trabalhosa, além da dificuldade de obtenção de imagens e quantificação das bandas nos cromatogramas frente a novas técnicas disponíveis. As desvantagens desse método, aliadas à ausência de cuba cromatográfica e infra-estrutura em nosso laboratório, nos levaram a investigar métodos alternativos para análise diferencial de carboidratos.

O grande número de isômeros espaciais e de possíveis combinações de monômeros, além da falta de grupamentos cromóforos, fazem da análise de carboidratos uma tarefa desafiadora. Dentre as principais técnicas atualmente empregadas para esse fim podemos citar cromatografia em camada delgada (TLC), cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC),

eletroforese capilar (CE) e ressonância magnética nuclear (RMN) (CHURMS, 1990; HOFFSTETTER-KUHN et al., 1991). Para análise da composição dissacarídica do condroitim sulfato, HPLC e CE destacam-se entre os métodos mais empregados (VOLPI, 2004). Apesar de muito eficientes, essas técnicas necessitam de aparelhos caros que, até o presente momento, não são acessíveis ao nosso laboratório.

Dessa forma, resolvemos investir na técnica FACE (*Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis*), um método de eletroforese em gel de poliacrilamida, como alternativa para análise dissacarídica de condroitim sulfato e dos açúcares presentes nas amostras farmacêuticas. Para isso, foi necessário estabelecer o preparo e caracterização da atividade de condroitinases em nosso laboratório. Esses dois temas principais foram apresentados em Resultados.

A análise de carboidratos por eletroforese em gel de poliacrilamida apresenta três desafios a ser superados: (1) Carboidratos que não apresentam carga não são capazes de migrar no gel; (2) Em geral os carboidratos não apresentam grupo cromóforo, e dessa forma não podem ser corados no gel; (3) Oligossacarídeos e monossacarídeos de interesse biológico são pequenos em relação ao tamanho do poro da matriz de poliacrilamida geralmente utilizada para análises de proteínas (STARR et al., 1996).

A FACE é baseada na ligação de marcadores fluorescentes ao terminal redutor dos carboidratos, seguida de separação por eletroforese em géis de poliacrilamida de alta densidade (20-40%). Existem diversos fluoróforos para este fim, sendo que alguns são carregados negativamente, como ANTS, e outros são neutros, como AMAC. A escolha do fluoróforo adequado é essencial para a obtenção de separações de alta resolução. Por exemplo, quando sacarídeos são derivatizados com um marcador com carga negativa, os derivados irão migrar independentemente da natureza do carboidrato nativo e do sistema tampão utilizado. Já quando são usados marcadores neutros, como AMAC, apenas os açúcares com carga negativa apresentam migração em sistemas tampão convencionais, como Tris-glicina. A migração de sacarídeos neutros derivatizados com AMAC torna-se possível quando usado sistema tampão contendo íons borato, que interagem com o derivado formando um complexo com carga negativa (JACKSON, 1991, 1994; STARR et al., 1996; LAMARI, KUHN, KARAMANOS, 2003).

Neste trabalho as amostras analisadas por FACE foram derivatizadas com AMAC e submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida 20%, tendo sido

empregados dois sistemas tampão diferentes e independentes. Para o sistema Tris-glicina, os géis de corrida foram preparados em tampão Tris-HCl 225 mM, pH 8,8, e a eletroforese foi realizada em tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM. Para o sistema Tris-borato os géis foram preparados em tampão Tris-borato (188 mM/ 125 mM), pH 7,0, e a corrida foi realizada em tampão Tris-borato-glicina (120 mM/100 mM/100 mM).

Percebemos que todos os dissacarídeos insaturados de condroitim sulfato/dermatam sulfato e ácido hialurônico são capazes de migrar em ambos os sistemas tampão (Resultados - Figuras 7 e 8), pois essas moléculas apresentam carga negativa conferida pelos grupos sulfato esterificados e/ou pelos grupos carboxila do ácido urônico. O dissacarídeo trissulfatado apresentou a maior migração. Os dissacarídeos dissulfatados migraram mais que os monossulfatados, e os dissacarídeos não sulfatados foram os que apresentaram a menor migração. Com base nesses resultados, podemos inferir que a migração destes dissacarídeos em ambos os sistemas tampão obedece essencialmente ao número de grupamentos sulfato *O*-esterificados presentes, o que confere mais cargas negativas e aumenta sua mobilidade eletroforética. Estes resultados estão de acordo com os reportados na literatura (CALABRO et al., 2000; OONUKI et al., 2005).

A estrutura específica de cada dissacarídeo, como a posição do grupamento sulfato, também interfere na sua interação com o tampão e a malha do gel. Como observado na Figura 7, o $\Delta\text{Di}2\text{S}$ apresenta a maior migração dentre os dissacarídeos monossulfatados, e $\Delta\text{Di}4\text{S}$ migra mais que $\Delta\text{Di}6\text{S}$ na ausência de borato. Entre os dissacarídeos dissulfatados, percebemos que $\Delta\text{Di}2,6\text{S}$ migra mais que $\Delta\text{Di}4,6\text{S}$. Apesar de não ter sido possível a análise de $\Delta\text{Di}2,4\text{S}$ neste trabalho, este é o dissacarídeo dissulfatado com maior mobilidade em FACE, apresentando migração próxima ao dissacarídeo trissulfatado (CALABRO et al., 2000a; OONUKI et al., 2005). Dessa forma, podemos inferir que a sulfatação na posição 2 do resíduo de ácido urônico confere maior mobilidade aos dissacarídeos, seguida da sulfatação na posição 4 da *N*-acetil-galactosamina.

Apesar de $\Delta\text{Di}0\text{S}$ e ΔDiHA não possuírem grupo sulfato, a migração desses dissacarídeos na ausência de borato deve-se à carga negativa conferida pela carboxila do ácido urônico, que se encontra desprotonada no pH alcalino usado nos tampões das eletroforeses. Em Tris-glicina ΔDiHA apresentou migração ligeiramente superior a $\Delta\text{Di}0\text{S}$ (Figura 8-A), o que não permite sua diferenciação. Por outro lado,

esses dissacarídeos não sulfatados foram separados em sistema Tris-borato, sendo que o Δ DiHA apresentou menor migração que Δ DiOS (Figuras 8-B e 9-A). Estes resultados estão de acordo com os de Oonuki et al. (2005), usando AMAC como fluoróforo, que mostraram que Δ DiHA apresenta maior migração que Δ DiOS em gel de 20%, usando tampão Tris-glicina 50 mM, pH 8,3, e a inversão de migração entre esses dois dissacarídeos também foi observada quando a eletroforese foi realizada em géis de 36% com tampão contendo borato.

Os resíduos de ácido urônico insaturado presentes em dissacarídeos formados pela ação de condroitinases são suscetíveis a tratamento com mercúrio. Essa reação remove o ácido urônico insaturado localizado no terminal não redutor, liberando o monossacarídeo intacto (ou o restante do oligossacarídeo) (CALABRO et al., 2000a; CALABRO et al., 2001; LUDWIGS et al., 1987).

Os produtos liberados da ação do mercúrio sobre Δ DiOS, Δ Di4S e Δ Di6S (GalNAc, GalNAc-4S e GalNAc-6S) apresentaram comportamento eletroforético diferente nos dois sistemas tampão utilizados (Figuras 8 e 9).

GalNAc e GlcNAc são monossacarídeos neutros e não migram em sistema Tris-glicina. A interação desses açúcares com íons borato confere carga negativa ao complexo, e os derivados neutros passam a migrar na eletroforese. Entre todos os açúcares analisados neste trabalho, GalNAc é o que apresenta menor migração, seguido de GlcNAc. A presença de sulfatação em GalNAc permite que GalNAc-4S e GalNAc-6S possam migrar em sistema Tris-glicina, sendo GalNAc-4S com maior mobilidade. Na presença de borato a distância de migração entre as duas hexosaminas sulfatadas é aumentada. A posição da sulfatação no carbono 4 do resíduo de *N*-acetil-galactosamina, novamente, confere maior mobilidade para esses compostos em FACE em relação à posição 6.

A migração observada em FACE pelos diferentes isômeros de açúcares derivatizados com AMAC pode servir de paradigma para o entendimento da interação intra e intermolecular de carboidratos com diferentes íons ou moléculas. A formação de complexos estáveis com borato, por exemplo, depende da configuração e do número de hidroxilas presentes na molécula, e ainda da presença de substituintes. Sabe-se que grupos hidroxila vicinais com configuração *cis*, bem como em carbonos alternados, formam complexos mais estáveis com borato que estruturas com conformação *trans*. Essas interações entre os sacarídeo-fluoróforo e a matriz do gel determinam a migração desses derivados no campo elétrico. Porém,

a explicação irrefutável das separações observadas ainda não está clara (HOFFSTETTER-KUHN et al., 1991; JACKSON, 1994).

A reação de derivatização de açúcares com AMAC é realizada em diversos trabalhos com excesso de fluoróforo de cerca de 10 a 100 vezes (CALABRO et al., 2000; JACKSON et al., 1991). Neste trabalho não observamos grandes variações na derivatização dos sacarídeos com proporções maiores que 1,5 vezes de AMAC (Figuras 10-12). Dessa forma, foi padronizado para a derivatização de amostras com concentração de açúcares conhecida a proporção mínima de 2 mols de fluoróforo por mol de sacarídeo.

Utilizamos cromatografia preparativa em papel para a produção de oligossacarídeos e dissacarídeos insaturados de condroitim sulfato. Os principais produtos formados foram Δ Di4S (27,1%), Δ Di6S (20,3%) e tetrassacarídeos (17,0%). Oligossacarídeos representaram 10% do total (Figuras 13-16).

A separação de oligossacarídeos na FACE é influenciada tanto pela carga intrínseca quanto pelo tamanho. Segundo Oonuki et al. (2005), octa e decassacarídeos de ácido hialurônico migram mais que oligossacarídeos de baixo peso (di, tetra e hexassacarídeos), quando derivatizados com AMAC. Isso ocorre porque a maior carga líquida negativa conferida pelos grupos carboxila dos resíduos de ácido urônico confere maior mobilidade aos oligossacarídeos maiores. Entretanto, com o aumento da polimerização da cadeia a partir de decassacarídeos, ocorre diminuição da mobilidade, de forma com que o tamanho das estruturas passa a ter mais relevância na interação com a malha do gel. A estrutura do fluoróforo também é muito importante nestes casos, uma vez que marcadores carregados, como ANTS, equalizam a carga líquida efetiva para a migração, e os oligossacarídeos podem ser separados pelo tamanho (JACKSON, 1994; OONUKEI, 2005; STARR et al., 1996).

A análise da migração dos oligossacarídeos e tetrassacarídeos obtidos por cromatografia na FACE contribuiu significativamente para a o entendimento dos produtos de degradação de condroitinases analisados por esta técnica (Figura 17).

A identificação dos dissacarídeos insaturados obtidos foi confirmada por FACE. Entretanto, Δ Di0S, Δ Di4S e Δ Di6S apresentaram pequena contaminação por suas respectivas GalNAcs e glicose. Em Δ Di0S foi notada também contaminação por GalNAc-6S, devido à mesma migração destes compostos na cromatografia em papel. A presença destes outros produtos não interferiu na utilização destes

dissacarídeos para a pesquisa de enzimas contaminantes em preparações de condroitinases, como descrito a seguir (Figura 18).

Para o fracionamento das condroitinases utilizadas neste trabalho, empregamos uma metodologia baseada em cromatografia de interação hidrofóbica, de acordo com Aguiar et al. (2003), e resultados semelhantes foram obtidos (Figuras 19-22). Os produtos formados pela ação das condroitinases sobre condroitim sulfato e dermatam sulfato foram analisados por FACE (Figuras 23-29).

A condroitinase AC apresentou atividade sobre condroitim 4-sulfato e condroitim 6-sulfato. Essa enzima age sobre regiões 4 e 6 sulfatadas e não sulfatadas do condroitim, com preferência pelo substrato sulfatado na posição 6.

Inicialmente, incubações em diferentes tempos de condroitim 4-sulfato com condroitinase AC foram realizadas para a determinação do perfil de digestão deste glicosaminoglicano. Uma vez que a condroitinase AC é uma endoglicosidase, produtos de maior peso molecular são produzidos nas primeiras horas, e com o passar do tempo ocorre formação dos dissacarídeos constituintes do condroitim sulfato. Entretanto, após 24 horas de digestão, encontramos proporções elevadas de $\Delta\text{Di}0\text{S}$ e subestimadas de $\Delta\text{Di}4\text{S}$ em relação ao descrito na literatura para este composto (VOLPI, 2007), indicando contaminação por sulfatase dessa preparação enzimática.

De acordo com Roy (1991), sulfatases podem ser inibidas por íons fluoreto. Incubações de condroitim 4-sulfato com condroitinase AC foram repetidas com a adição fluoreto de sódio 10 mM. Neste experimento encontramos proporções de $\Delta\text{Di}0\text{S}$ e $\Delta\text{Di}4\text{S}$ mais condizentes com a literatura. Com base nestes resultados, confirmamos a contaminação de sulfatase em nossa preparação de condroitinase AC, e a partir de então as incubações com essa enzima foram realizadas na presença de fluoreto de sódio.

Na incubação de condroitinase AC com condroitim 6-sulfato, o mesmo perfil de degradação foi obtido, porém os dissacarídeos foram formados em menor tempo e observamos ainda a presença de um tetrassacarídeo resistente à ação da enzima.

A baixa atividade de condroitinase AC sobre dermatam sulfato se deve aos poucos resíduos de ácido glucurônico presentes nesse glicosaminoglicano, o que mostra na FACE diversos produtos de tamanhos variados.

Condroitinase C, que não quebra regiões contendo hexosamina sulfatada na posição 4, apresentou velocidade de quebra sobre condroitim 6-sulfato quatro vezes

maior que sobre condroitim 4-sulfato. A degradação deste último por essa enzima ocorre devido à presença de regiões 6-sulfatadas, sendo que o condroitim 4-sulfato utilizado como substrato possui 32% de unidades dissacarídicas sulfatadas na posição 6 da *N*-acetil-galactosamina. A digestão de ambos os condroitins por condroitinase C gerou diversas bandas de oligossacarídeos na FACE. Entretanto, GalNAc-6S foi o produto mais visualizado ao final de 24 horas de degradação, indicando a presença de glucuronidase.

A condroitinase B, como esperado, apresentou atividade apenas sobre dermatam sulfato, e o principal dissacarídeo formado foi Δ Di4S. Oligossacarídeos também foram visualizados, devido à presença de regiões glucurônicas que não são suscetíveis à ação da enzima.

Para melhor caracterização das enzimas contaminantes das preparações enzimáticas, incubações com os diferentes dissacarídeos insaturados produzidos por nós foram realizadas. Confirmamos a contaminação de condroitinase AC por sulfatase com atividade específica sobre Δ Di4S, que foi inibida por fluoreto de sódio 10 mM. Já na condroitinase C foi detectada glucuronidase com ação sobre Δ Di0S e Δ Di6S. Sacarolactona em concentração igual a 10 mM foi capaz de inibir a ação dessa enzima apenas sobre o dissacarídeo não sulfatado (Figuras 30-34).

Utilizamos então a preparação de condroitinase AC para análise dissacarídica de condroitim sulfato de diferentes origens por FACE. Foram analisados produtos obtidos da Sigma-Aldrich e Seikagaku, assim como de extrações realizadas em nosso laboratório (Figura 35, Tabela 5). Em relação aos padrões, verificamos que o condroitim de cartilagem de baleia é o que apresenta maior proporção de Δ Di4S (62%), e Δ Di6S é o dissacarídeo majoritário em cartilagem de tubarão (75%). O condroitim sulfato de traqueia bovina possui maior equilíbrio na porcentagem relativa entre esses dois dissacarídeos. O condroitim de traqueia bovina extraído por nós apresentou proporção dissacarídica semelhante ao da Sigma, e o de esterno de frango possui mais Δ Di4S (55%). Nos condroitins de animais marinhos extraídos de cartilagem de arraia e de nadadeira de lula observamos, além dos dissacarídeos monossulfatados, a presença de Δ Di2,6S e Δ Di4,6S, respectivamente.

A proporção de dissacarídeos encontrada na análise por FACE está de acordo com o descrito na literatura (LAMARI, KARAMANOS, 2006; MICHELACCI, HORTON, 1989; VOLPI, 2004, 2007, 2010). Algumas diferenças entre os resultados são esperadas, pois, como já discutido, a estrutura do condroitim pode variar de

acordo com a fonte e o processo de extração e purificação. Esses resultados confirmam que a técnica FACE estabelecida em nosso laboratório pode ser utilizada para análise dissacarídica de condroitim sulfato.

Realizamos então a digestão das cinco amostras farmacêuticas com teor de condroitim sulfato superior a 80% com condroitinase AC, e analisamos os produtos por FACE (Figura 36, Tabela 6). Dois condroitins de traqueia bovina obtidos da Sigma-Aldrich também foram analisados. Em três amostras a proporção de Δ Di4S em relação a Δ Di6S foi próxima de 1,0, como obtido para um dos padrões. Nas outras duas amostras e no outro padrão essa razão foi de aproximadamente 1,6, demonstrando predomínio do dissacarídeo 4-sulfatado.

A análise de peso molecular por PAGE mostrou resultados interessantes quanto aos dois padrões diferentes de condroitim 4-sulfato de traqueia bovina, obtidos da Sigma-Aldrich. Apesar da mesma origem de extração, esses padrões possuem migração diferente na eletroforese, indicando diferenças no peso molecular entre eles. O peso molecular estimado do condroitim sulfato nas cinco amostras farmacêuticas variou entre 16 e 26 kDa (Figura A21). Esses resultados estão de acordo com o peso modal descrito para condroitim sulfato de traqueia bovina (VOLPI, 2007).

A análise de monossacarídeos neutros também pode ser realizada por FACE. As diferentes conformações espaciais de glicose e galactose, por exemplo, permitem com que esses dois epímeros sejam separados (STARR et al., 1996; GAO, LEHRMAN, 2003). A separação destes dois monossacarídeos derivatizados com AMAC pode ser observada na Figura 37.

As amostras farmacêuticas com baixo teor de condroitim sulfato e presença de açúcares contaminantes, como já discutido, foram então analisadas por FACE (Figura 39). Concluímos que duas amostras tratam-se, na verdade, de lactose, um excipiente farmacêutico, e que as demais são compostas majoritariamente por oligossacarídeos de glicose com diferentes graus de polimerização.

Os resultados obtidos nessas amostras nos levantaram sérios questionamentos quanto à qualidade dos insumos farmacêuticos de condroitim sulfato comercializados no Brasil. É notável que, por se tratarem de matérias-primas para produção de medicamentos para consumo humano, esses produtos deveriam conter a maior pureza possível. O baixo teor de condroitim sulfato encontrado é muito preocupante. Ambos os métodos utilizados para dosagem do teor forneceram

resultados próximos, que foram ainda corroborados por análises complementares. A identificação dos contaminantes ainda sugere casos graves de adulteração do insumo farmacêutico em questão.

O descaso com o controle de qualidade do condroitim sulfato fica ainda mais evidente se nos atentarmos ao certificado de análise das amostras que possuem lactose (Tabela A1, amostras 13 e 15). De acordo com as informações reportadas, essas amostras apresentam teor de proteínas superior a 18%, o que está em desacordo com a especificação da Farmacopeia Americana. Os laudos apresentam como especificação para proteínas mínimo de 16%. As informações reportadas no certificado de análise ainda são contraditórias. Por exemplo, a amostra 15 apresentou teor de condroitim sulfato (um açúcar) igual a 99,8%, e 21,12% de proteínas.

A utilização de medicamentos com baixo teor do princípio ativo, além de não ser eficaz para o tratamento farmacológico, pode desencadear sérios malefícios à saúde. Apesar dos insumos analisados terem sido coletados na cidade de Juiz de Fora, MG, suas distribuidoras têm abrangência nacional, e dessa forma espera-se que as inconformidades detectadas neste trabalho se estendam ao resto do país.

6 CONCLUSÃO

Concluimos neste trabalho que há grande distorção entre os resultados reportados no certificado de análise de vários insumos analisados e os resultados obtidos nesse trabalho. Torna-se necessário, portanto, maior fiscalização e regulação do comércio deste produto.

A técnica FACE utilizada neste estudo é rápida, sensível, versátil, barata e de fácil execução para análises de carboidratos.

REFERÊNCIAS

- ADEBOWALE, A. O.; COX, D. S.; ZHONGMING L.; EDDINGTON, N. D. Analysis of Glucosamine and Chondroitin Sulfate Content in Marketed Products and the Caco-2 Permeability of Chondroitin Sulfate Raw Materials. **The Journal of the American Nutraceutical Association**, v. 3, n. 1, p. 37-44, 2000
- AGUIAR, J. A. K.; LIMA, C. R.; BERTO, A. G. A.; MICHELACCI, Y. M. An improved methodology to produce *Flavobacterium heparinum* chondroitinases, important instruments for diagnosis of diseases. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 37, p. 115-127, 2003.
- AGUIAR, J. A. K. Purificação e utilização das condroitinases B e AC de *Flavobacterium heparinum* no estudo de proteoglicanos de matriz extracelular. 2004. 237f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2004.
- ALVES, M. L.; STRAUS, A. H.; TAKAHASHI, H. K., MICHELACCI, Y. M. Production and characterization of monoclonal antibodies to shark cartilage proteoglycan. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, n. 9, p. 2103-2108, 1994.
- BITTER, T.; MUIR, H. M. A modified uronic acid-carbazole reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 4, n. 4, p. 330-334, 1962.
- BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância sanitária. Insumos Farmacêuticos. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 2, p. 359-360, 2006.
- CALABRO, A.; HASCALL, V. C; MIDURA, R. J. Adaptation of FACE methodology for microanalysis of total hyaluronan and chondroitin sulfate composition from cartilage. **Glycobiology**, v. 10, n. 3, p. 283-293, 2000
- CALABRO, A.; MIDURA, R.; WANG, A.; WEST, L.; PLAAS, A.; HASCALL, V.C. Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) of glycosaminoglycans. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 9, suplemento A, p. S16-S22, 2001.
- CÁSSARO, C. M.F.; DIETRICH. C. P. Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 7, p. 2254-2261, 1977.
- CHOI, D.W.; KIM, M. J.; KIM, H.S.; CHANG, S. H.; JUNG, G. S.; SHIN, K. Y.; CHANG, S. Y. A size-exclusion HPLC method for the determination of sodium chondroitin sulfate in pharmaceutical preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, n. 6, p. 1229-1236, 2003.
- CHURMS, S. C. Recent developments in the chromatographic analysis of carbohydrates. **Journal of Chromatography A**, v. 500, p. 555-583, 1990.

CLEGG, D. O.; REDA, D. J.; HARRIS, C. L.; KLEIN, M. A.; O'DELL, J.R.; HOOPER, M. M.; BRADLEY, J. D.; BINGHAM, C.O.; WEISMAN, M. H.; JACKSON, C. G.; LANE, N. E.; CUSH, J. J.; MORELAND, L. W.; SCHUMACHER, H. R.; ODDIS, C. V.; WOLFE, F.; MOLITOR, J. A.; YOCUM, D. E.; SCHNITZER, T. J.; FURST, D. E.; SAWITZKE, A. D.; SHI, H.; BRANDT, K. D.; MOSKOWITZ, R. W.; WILLIAMS, H.J. Glucosamine, Chondroitin Sulfate, and the Two in Combination for Painful Knee Osteoarthritis. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 8, p. 795-808, 2006.

CUNHA, A. L. **Análise qualitativa e quantitativa de condroitim sulfato (condroitina sulfato de sódio) utilizado em farmácias magistrais de Juiz de Fora**. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia)--- Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.

DI FERRANTE, N.; NICHOLS, B. L.; DONNELLY, P.V.; NERI, G.; HRGOVCIC, R.; BERGLUND, R. K. Induced degradation of glycosaminoglycans in Hurler's and Hunter's syndromes by plasma infusion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 68, n. 2, p. 303-307, 1971.

DISCHE, Z. A new specific color reaction of hexuronic acids. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 167, n. 1, p. 189-198, 1947.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Eletrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.

DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Fractionation and properties of four heparitin sulfates from beef lung tissue. Isolation and partial characterization of a homogeneous species of heparitin sulfate. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 343, n. 1, p. 43-44, 1974.

DIETRICH, C. P.; SCHIBUOLA, C. T.; SAMPAIO, L. O.; IBARA, I. Changes in the composition of sulfated mucopolysaccharides during neoplastic transformation of cerebral tissue. **Cancer Research**, v. 38, p. 3969-3971, 1978.

ESKO, J. D.; KIMATA, K.; LINDAHL, U. , 2009. Proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans. In: VARKI, A.; CUMMINGS, R.D.; ESKO, J. D et al. (Ed.). **Essentials of glycobiology**. Cold Spring Harbor (NY), 2 ed., 2009.

EVERED, D.; WHELAN, J. **The Biology of Hyaluronan**. John Wiley & Sons, 1989

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of Uronic Acids without Interference from Neutral Sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, n. 1, p. 157-162, 1991

GUERRINI, M.; BECCATI, D.; SHRIVER, Z.; NAGGI, A.; VISWANATHAN, K.; BISIO, A.; CAPILA, I., LANSING, J. C.; GUGLIERI, S.; FRASER, B.; AL-HAKIM, A.; GUNAY, N. S.; ZHANG, Z.; ROBINSON, L.; BUHSE, L.; NASR, M.; WOODCOCK, J.; LANGER, R.; VENKATARAMAN, G.; LINHARDT, R. J.; CASU, B.; TORRI, G.; SASISEKHARAN, R. Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin

associated with adverse clinical events. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 669-675, 2008.

HILBORN, J. C.; ANASTASSIADIS, P. A. Estimation of the molecular weights of acidic mucopolysaccharides by polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 88-92, 1971.

HOFFSTETTER-KUHN, S. H.; PAULUS, A.; GASSMANN, E.; WIDMER, M. Influence of borate complexation on the electrophoretic behavior of carbohydrates in capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, n. 63 p. 1541-1547, 1991.

IMADA, K.; OKA, H.; KAWASAKI, D.; MIURA, N.; SATO, T.; ITO, A. Anti-arthritis action mechanisms of natural chondroitin sulfate in human articular chondrocytes and synovial fibroblasts. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 3, p. 410-414, 2010.

IOVU, M.; DUMAIS, G.; DU SOUICH, P. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 16, supplement 3, p. S14-S18, 2008.

IOZZO, R. V. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. **Annual Reviews in Biochemistry**, v. 67, p. 609-652, 1998.

JACKSON, R.L.; BUSCH, S.J.; CARDIN, A.D. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. **Physiological Reviews**, v. 71, n. 2, p. 481-539, 1991.

JACKSON, P. The use of polyacrylamide-gel electrophoresis for the high-resolution separation of reducing saccharides labelled with the fluorophore 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid. Detection of picomolar quantities by an imaging system based on a cooled charge-coupled device. **The Biochemical Journal**, v. 270, n.3, p. 705-713, 1990

JACKSON, P. Polyacrylamide gel electrophoresis of reducing saccharides labeled with the fluorophore 2-aminoacridone: subpicomolar detection using an imaging system based on a cooled charge-coupled device. **Analytical biochemistry**, v. 196, n. 2, p. 238-244, 1991.

JACKSON, P. The analysis of fluorophore-labeled glycans by high-resolution polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical biochemistry**, v. 216, p. 243-252, 1994

KAHAN, A.; UEBELHART, D.; DE VATHAIRE, F.; DELMAS, P. D.; REGINSTER, J.Y. Long-term effects of chondroitins 4 and 6 sulfate on knee osteoarthritis: the study on osteoarthritis progression prevention, a two-year, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Arthritis and Rheumatism**, v. 60, n. 2, p. 524-533, 2009.

LAMARI, F. N.; KUHN, R.; KARAMANOS, N. K. Derivatization of carbohydrates for chromatographic, electrophoretic and mass spectrometric structure analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 793, p. 15-36, 2003.

LAMARI, F. N.; KARAMANOS, N. K. Structure of Chondroitin Sulfate. In: VOLPI, N. (Ed.). **Chondroitin Sulfate: Structure, Role and Pharmacological Activity**. Advances in Pharmacology, Elsevier, v. 53, p. 1-568, 2006.

LIANG, Z.; BONNEVILLE, C.; SENEZ, T. HENDERSON, T.; Development and validation of a photometric titration method for the quantitation of sodium chondroitin sulfate (bovine) in Cosequin[®] DS chewable tablet. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, n. 2, p. 245-249, 2002

LIMA, C. R.; BACCARIN, R. Y. A. MICHELACCI, Y. M. Reliability of 1,9-dimethylmethylene blue tests in comparison to agarose gel electrophoresis for quantification of urinary glycosaminoglycans. **Clinica Chimica Acta**, v. 378, p. 205-215, 2007.

LIU, H.; ZHANG, Z.; LINHARDT, R. J. Lessons learned from the contamination of heparin. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 3, p. 313-321, 2009

LOHMANDER, L.S.; DE LUCA, S.; NILSSON, B.; HASCALL, V.C.; CAPUTO, C.P.; KIMURA, J.H.; HEINEGARD, D. Oligosaccharides on proteoglycans from the Swarm rat chondrosarcoma. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 13, p. 6084-6091, 1980.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MALAVAKI, C. J.; ASIMAKOPOULOU, A. P.; LAMARI, F. N.; THEOCHARIS, A.D.; TZANAKAKIS, G. N.; KARAMANOS, N. K. Capillary electrophoresis for the quality control of chondroitin sulfates in raw materials and formulations. **Analytical Biochemistry**, v. 374, p. 213-220, 2008.

MARTEL-PELLETIER, J.; BOILEAU, C.; PELLETIER, J. P.; ROUGHLEY, P. J. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 22, n. 2, p. 351-384, 2008.

MICHELACCI, Y. M.; DIETRICH, C. P. A comparative study between a chondroitinase B and a chondroitinase AC from *Flavobacterium heparinum*: Isolation of a chondroitinase AC-susceptible dodecasaccharide from chondroitin sulphate B. **Biochemical Journal**, v. 151, n. 1, p. 121-129, 1975

MICHELACCI, Y. M.; DIETRICH, C. P. Chondroitinase C from *Flavobacterium heparinum*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 1154-1158, 1976.

MICHELACCI, Y. M.; HORTON, D. S. P. Q. Proteoglycans from the cartilage of young hammerhead shark *Sphyrna-lewini*. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v. 92, n. 4, p. 651-658, 1989.

MICHELACCI, Y. M.; HORTON, D. S. P. Q.; POBLACIÓN, C. A. Isolation and characterization of an induced chondroitinase ABC from *Flavobacterium heparinum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 923, p. 291-301, 1987.

MICHELACCI, Y. M.; MOURÃO, P. A.; LAREDO, J.; DIETRICH, C. P. Chondroitin sulfates and proteoglycans from normal and arthrosic human cartilage. **Connective Tissue Research**, v. 7, n. 1, p. 29–36, 1979.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

NADER, H. B. Characterization of a heparan sulfate and a peculiar chondroitin 4-sulfate proteoglycan from platelets: Inhibition of the aggregation process by platelet chondroitin sulfate proteoglycan. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, 10518–10523, 1991.

OONUKEI, Y.; YOSHIDA, Y.; UCHIYAMA, Y.; ASARI, A. Application of fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis to analysis of disaccharides and oligosaccharides derived from glycosaminoglycans. **Analytical Biochemistry**, v. 343, p. 212-222, 2005.

ROY, A. B. Aluminofluorides and beryllifluorides as inhibitors of sulphatases. **Biochemical Journal**, v. 279, p. 361-365, 1991.

SAMPAIO, L. O.; NADER, H. B. Emergence and structural characteristics of chondroitin sulfates in the animal kingdom. In: VOLPI, N. (Ed.). **Chondroitin Sulfate: Structure, Role and Pharmacological Activity**. Advances in Pharmacology, Elsevier, v. 53, p. 1-568, 2006.

SILVA, L. C. F. Isolation and Purification of Chondroitin Sulfate. In: VOLPI, N. (Ed.). **Chondroitin Sulfate: Structure, Role and Pharmacological Activity**. Advances in Pharmacology, Elsevier, v. 53, p. 1-568, 2006.

SIM, J. S.; JUN, G.; TOIDA, T.; CHO, S. Y.; CHOI, D. W.; CHANG, S. Y.; LINHARDT, R. J.; KIM, Y. S. Quantitative analysis of chondroitin sulfate in raw materials, ophthalmic solutions, soft capsules and liquid preparations. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technology in the Biomedical and Life Sciences** v. 818, n. 2, p. 133-139, 2005.

SIM, J. S.; IM, A. R.; CHO, S. M.; JANG, H. J.; JO, . H.; KIM, Y. S. Evaluation of chondroitin sulfate in shark cartilage powder as a dietary supplement: Raw materials and finished products. **Food Chemistry**, v. 101, p. 532-539, 2007.

SUZUKI, S.; SAITO, H.; YAMAGATA, T.; ANNO, K.; SENO, N.; KAWAI, Y.; FURUHASHI, T. Formation of three types of disulfated disaccharides from chondroitin sulfates by chondroitinase digestion. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 243, p. 1543–1550, 1968

STARR, C. M.; MASADA, I.; HAGUE, C.; SKOP, E; KLOCK, J.C. Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis in the separation, analysis, and sequencing of carbohydrates. **Journal of Chromatography A**, v. 720, p. 295-321, 1996.

STYLIANOU, M.; TRIANTAPHYLLIDOU, I. E.; VYNIOS, D. H. Advances in the Analysis of Chondroitin/Dermatan Sulfate. In: VOLPI, N. (Ed.). **Chondroitin Sulfate: Structure, Role and Pharmacological Activity**. Advances in Pharmacology, Elsevier, v. 53, p. 1-568, 2006.

TAMEGUSHI, A. S.; TRELHA, C. S., DELLAROZA, M. S. G.; CABRERA, M.; RIBEIRO, T. N. Capacidade Funcional de Idosos com Osteoartrite de Joelhos e Quadril. **Revista Espaço para a Saúde**, Londrina, v. 9, n. 2, p. 08-16, 2008.

TAMURA J.; ARIMA, K.; IMAZU, A.; TSUTSUMISHITA, N.; FUJITA, H.; YAMANE, M.; MATSUMI, Y. Sulfation patterns and the amounts of chondroitin sulfate in the diamond squid, *Thysanoteuthis rhombus*. **Bioscience, Biotechnology and biochemistry**, v. 73, n. 6, p. 1387-1391, 2009.

THONAR, E.J.; SWEET, M.B.E. An oligosaccharide component in proteoglycan of articular cartilage. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 584, n. 2 p. 353-357, 1979.

TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.S. Detection of sugar on paper chromatograms. **Nature**, v. 166, p. 444-445, 1950.

UEBELHART, D.; KNOLS, R.; DE BRUIN, E. D.; VERBRUGGEN, G. Chondroitin sulfate as a structure-modifying agent. **Advances in Pharmacology**, v. 53, p. 475-488, 2006.

UEBELHART, D. Clinical review of chondroitin sulfate in osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 16, supplement 3, p. S19-S21, 2008.

VOLPI, N. Fractionation of Heparin, Dermatan Sulfate, and Chondroitin Sulfate by Sequential Precipitation: A Method to Purify a Single Glycosaminoglycan Species from a Mixture. **Analytical Biochemistry**, v. 218, n. 2, p. 382-391, 1994.

VOLPI, N. Purification of Heparin, Dermatan Sulfate and Chondroitin Sulfate from Mixtures by Sequential Precipitation with Various Organic Solvents. **Journal of Chromatography. B, Biomedical Applications**, v. 685, n. 1, p. 27-34, 1996.

VOLPI, N.; MACCARI, F. Detection of submicrogram quantities of glycosaminoglycans on agarose gels by sequential staining with toluidine blue and Stains-All. **Electrophoresis**, v. 23, n. 24, p. 4060-4066, 2002

VOLPI, N. Oral bioavailability of chondroitin sulfate (Condrosulf®) and its constituents in healthy male volunteers. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 10, p. 768-777, 2002.

VOLPI, N. Oral absorption and bioavailability of ichthyic origin chondroitin sulfate in healthy male volunteers. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 11, p. 433-441, 2003.

VOLPI, N. Disaccharide mapping of chondroitin sulfate of different origins by high-performance capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, p. 273-281, 2004.

VOLPI, N. Analytical Aspects of Pharmaceutical Grade Chondroitin Sulfates. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 12, p. 3168-3180, 2007.

VOLPI, N. Quality of different chondroitin sulfate preparations in relation to their therapeutic activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 10, p. 1271-1280, 2009.

VOLPI, N. High-performance liquid chromatography and on-line mass spectrometry detection for the analysis of chondroitin sulfates/hyaluronan disaccharides derivatized with 2-aminoacridone. **Analytical Biochemistry**, v. 397, p. 12-23, 2010.

ZHANG, W.; MOSKOWITZ, W.; NUKI, G.; ABRAMSON, S.; ALTMAN, R. D.; ARDEN, N.; BIERMA-ZEINSTRAS, S.; BRANDT, K. D.; CROFT, P.; DOHERTY, M.; DOUGADOS, M.; HOCHBERG, M.; HUNTER, D. J.; KWOH, K.; LOHMANDER, L. S.; TUGWELL, P. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part I: Critical appraisal of existing treatment guidelines and systematic review of current research evidence. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 15, p. 981-1000, 2007.

ZHANG, W.; MOSKOWITZ, W.; NUKI, G.; ABRAMSON, S.; ALTMAN, R. D.; ARDEN, N.; BIERMA-ZEINSTRAS, S.; BRANDT, K. D.; CROFT, P.; DOHERTY, M.; DOUGADOS, M.; HOCHBERG, M.; HUNTER, D. J.; KWOH, K.; LOHMANDER, L. S.; TUGWELL, P. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 16, p. 137-162, 2008.

ZHANG, W.; NUKI, G.; MOSKOWITZ, W.; ABRAMSON, S.; ALTMAN, R. D.; ARDEN, N.; BIERMA-ZEINSTRAS, S.; BRANDT, K. D.; CROFT, P.; DOHERTY, M.; DOUGADOS, M.; HOCHBERG, M.; HUNTER, D. J.; KWOH, K.; LOHMANDER, L. S.; TUGWELL, P. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, p. 476-499, 2010.

APÊNDICE A – RESULTADOS PRELIMINARES

Esta seção apresenta os resultados obtidos até setembro de 2011, data em que foi defendida a qualificação do projeto relativo a essa dissertação. O método de eletroforese em gel de agarose, muito utilizado em laboratórios de pesquisa de glicoconjugados, foi avaliado para análise de produtos farmacêuticos contendo condroitim sulfato. O método de titulação descrito em farmacopeias para análise de teor também foi estudado. Além desses dessas técnicas de análise, outros métodos complementares foram utilizados para avaliar a qualidade de insumos comercializados no Brasil.

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Em 1976 Dietrich e Dietrich desenvolveram um método para separação de glicosaminoglicanos por eletroforese em gel de agarose, baseando-se na interação entre as cargas destes compostos e diaminas orgânicas, tais como diaminopropano. Após a corrida, os glicosaminoglicanos presentes no gel podem ser precipitados por solução de brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON), um detergente catiônico, e corados por azul de toluidina, corante que se complexa com os grupamentos sulfato destes compostos produzindo metacromasia, corando-os em roxo. A posição das bandas obtidas pode ser comparada à posição correspondente à de glicosaminoglicanos padrão de uma solução de concentração conhecida, permitindo assim a identificação do(s) tipo(s) de glicosaminoglicanos (s) presente(s) em uma amostra analisada.

A Figura A1-A mostra um gel de agarose em tampão 1,3-propanodiaminoacetato (PDA) 0,05 M, pH 9,0, ao qual foram aplicados 5 µL de soluções padrão 1 mg/mL de diferentes glicosaminoglicanos: heparina (Hep), heparan sulfato, dermatam sulfato e condroitim sulfato. Foi aplicada também uma mistura padrão (M) contendo os glicosaminoglicanos condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparan sulfato (5 µL, solução 1 mg/mL). Além destes glicosaminoglicanos, a mistura padrão contém também o corante vermelho de cresol, utilizado para orientação durante a corrida eletroforética devido à migração semelhante ao condroitim sulfato.

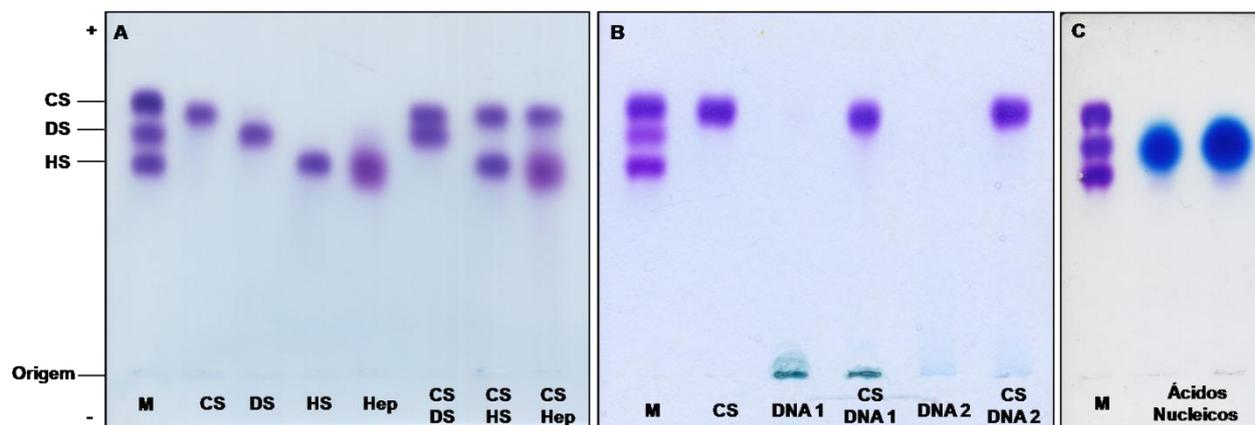


Figura A1 – Eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3 diaminopropano acetato (PDA) de diferentes glicosaminoglicanos e ácidos nucleicos. A: separação eletroforética de diferentes GAGs. M: mistura padrão de CS, DS e HS. **B:** Migração eletroforética de CS na presença de DNA extraído de morango por dois protocolos diferentes (CETAVLON/clorofórmio – DNA 1; fenol/clorofórmio – DNA 2). **C:** Migração eletroforética e coloração de ácidos nucleicos extraídos de fígado de rato.

Pode-se observar que heparina e heparan sulfato apresentam menor migração eletroforética que condroitim sulfato e dermatam sulfato, o que pode ser explicado pela maior densidade de cargas negativas dos dois primeiros, levando assim à maior interação com a diamina do tampão.

Condroitim sulfato e dermatam sulfato têm densidade de cargas semelhantes entre si. Entretanto, essas moléculas também podem ser separadas por este método devido à diferença na conformação espacial conferida ao dermatam sulfato pela presença de regiões contendo ácido L-idurônico, e consequente interação diferencial com o tampão.

Como observado na Figura A1-B, a migração de condroitim sulfato não é afetada pela presença de ácidos nucleicos extraídos de morango, que podem ser vistos em azul na origem do gel de agarose. A coloração azul dos ácidos nucleicos se deve à interação de suas cargas negativas com azul de toluidina, porém não há ocorrência de metacromasia. Dessa forma, ácidos nucleicos com migração semelhante a glicosaminoglicanos podem ser detectados em geis de agarose pela coloração azul assumida pelos primeiros (Figura A1-C).

Após a eletroforese, os glicosaminoglicanos revelados por azul de toluidina podem ser quantificados por densitometria. Este processo é realizado a partir de softwares de análise de imagens digitalizadas por scanners convencionais, ou ainda é possível o uso de aparelhos específicos de aquisição e análise de imagens. Neste trabalho as análises densitométricas foram realizadas pelo programa TotalLab

TL120 1D v2009 (Nonlinear Dynamics Ltd.), a partir de imagens digitalizadas por scanner convencional, como descrito em Métodos.

A quantificação de condroitim sulfato por análise densitométrica de bandas em géis de agarose envolve coloração de lâminas, processo que se não for conduzido de maneira adequada e uniforme pode levar a grandes variações de intensidade de cor, tanto em uma mesma lâmina quanto em lâminas diferentes. As variações intra-corrída (intra-lâmina) e inter-corrída (inter-lâmina) do método de eletroforese em gel de agarose para quantificação de condroitim sulfato foram avaliadas neste trabalho.

Para análise da variação intra-lâmina, diferentes concentrações de condroitim sulfato padrão (0,1-12 μg) foram aplicadas em triplicata em uma mesma lâmina. Já a variação inter-lâmina foi obtida aplicando-se cada replicata em três lâminas diferentes. A Figura A2 mostra as lâminas coradas e na Figura A3 está representada a média das unidades arbitrárias de densitometria de cada concentração das análises inter e intra-lâmina, assim como o desvio padrão entre as replicatas.

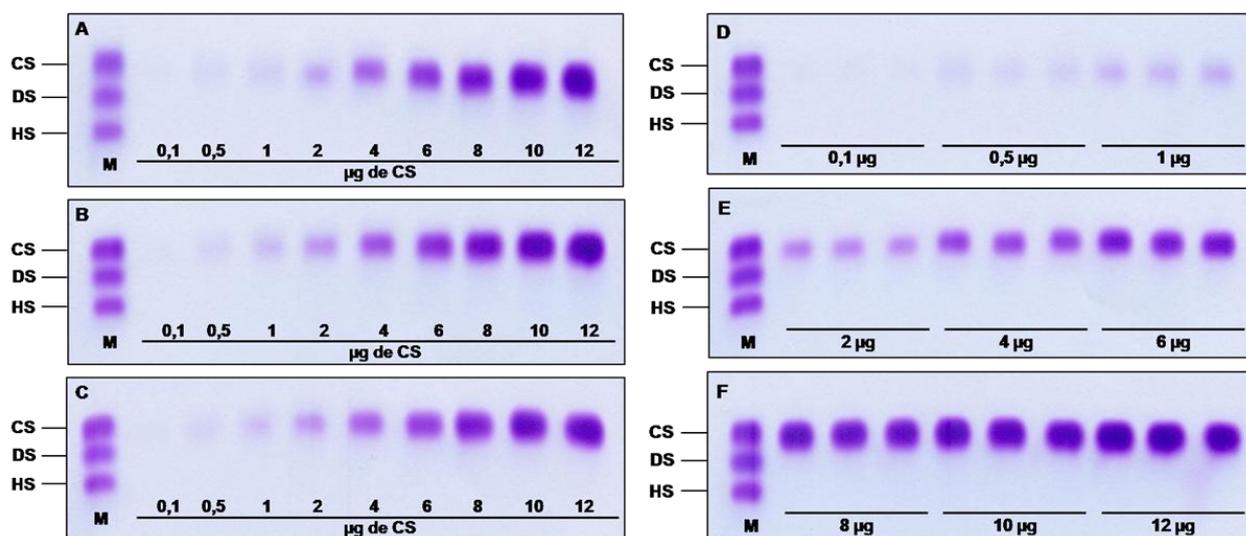


Figura A2 – Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA de condroitim sulfato. Eletroforeses foram realizadas com diferentes concentrações de CS (0,1 μg - 12 μg). **A, B, C:** Análise de variação inter-lâmina. **D, E, F:** Análise de variação intra-lâmina. M: mistura padrão de CS, DS e HS

Na Figura A2, pode-se observar banda de condroitim sulfato a partir de 0,5 μg , sendo essa a menor concentração detectável pelo método. Essa concentração foi padronizada como limite de detecção do método de eletroforese em gel de agarose.

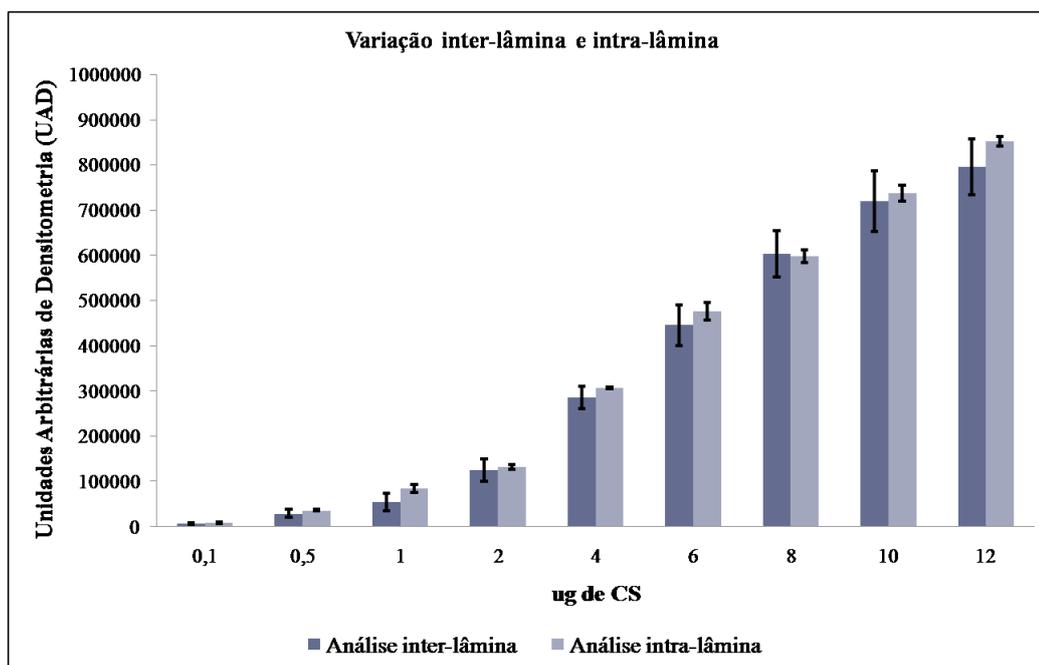


Figura A3 – Variação inter-lâmina e intra-lâmina do método de eletroforese em gel de agarose. As médias dos valores de unidades arbitrárias de densitometria de cada concentração estão representadas, assim como os desvios padrão.

A Figura A3 mostra maiores valores de desvio padrão na análise inter-lâmina, ou seja, replicatas analisadas em lâminas diferentes apresentam maior variação que quando analisadas na mesma lâmina. Isso reflete as diferenças de coloração entre as lâminas e sugere que análises comparativas entre diferentes amostras devem ser realizadas apenas na mesma lâmina.

Com o objetivo de analisar a linearidade entre a intensidade da banda formada e a concentração de material aplicado, curvas de calibração foram construídas a partir das médias dos valores de densitometria obtidos na análise inter-lâmina (Figura A4).

Duas equações de curva estão apresentadas na Figura A4. A regressão representada por reta tracejada compreende toda a faixa de concentração (0,1 μg - 12 μg), enquanto a reta contínua envolve apenas os pontos entre 1 μg e 8 μg .

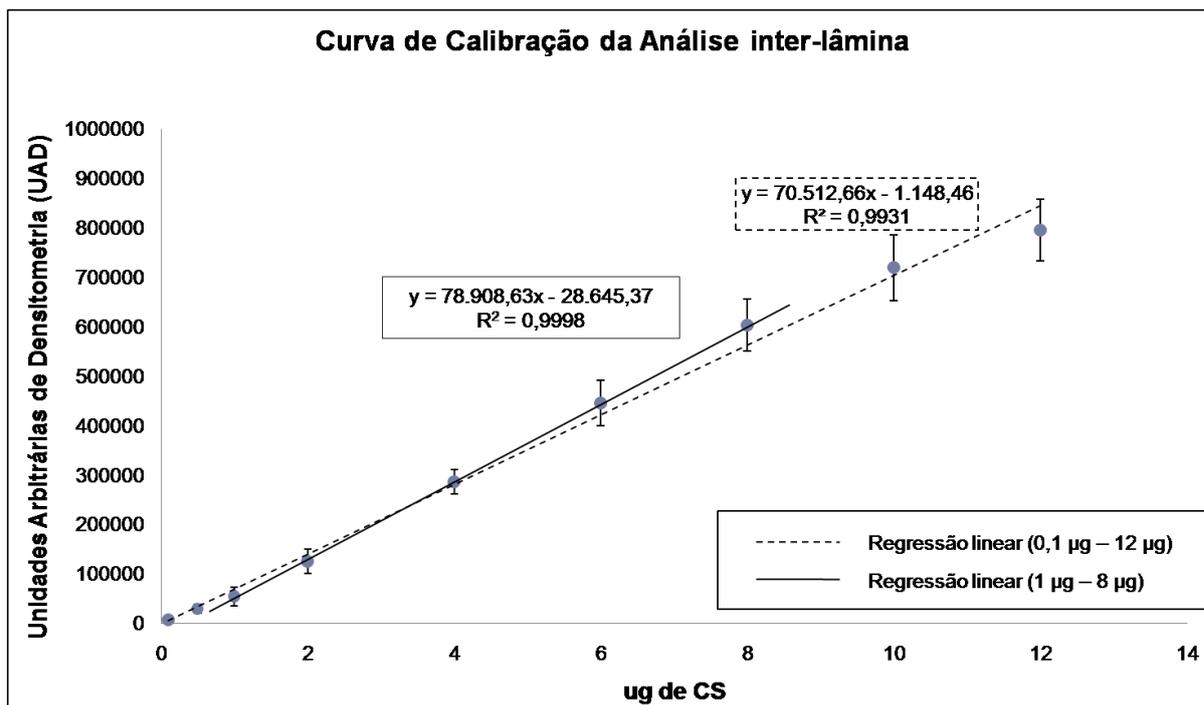


Figura A4 – Curva de calibração da análise inter-lâmina. Estão representadas curvas de regressão linear de todos os pontos 0,1 µg - 12 µg e de pontos intermediários (1 µg e 8 µg).

Linearidade pode ser definida como a capacidade de um método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. É visível na análise inter-lâmina que à medida que a concentração de condroitim aumenta para valores maiores que 8 µg ocorre saturação da resposta densitométrica. A equação de reta que apresenta valor de coeficiente de determinação mais próximo de 1 corresponde à faixa entre 1 e 8 µg ($R^2 = 0,9998$). Nessa faixa de concentração o método possui ótima linearidade e pode ser usado para quantificação de condroitim sulfato.

TITULAÇÃO DE CONDROITIM SULFATO

As titulometrias realizadas nesse estudo foram conduzidas por um método modificado para leitura de Abs em espectrofotômetro convencional, como descrito em Métodos. A Figura A5-A mostra três curvas de titulação com diferentes concentrações de condroitim sulfato de traquéia bovina (padrão Sigma-Aldrich) e seus respectivos volumes de inflexão. Na Figura A5-B nota-se que há uma relação de linearidade entre volume de inflexão e concentração de condroitim sulfato na faixa de concentração de 0,5 – 7,5 mg.

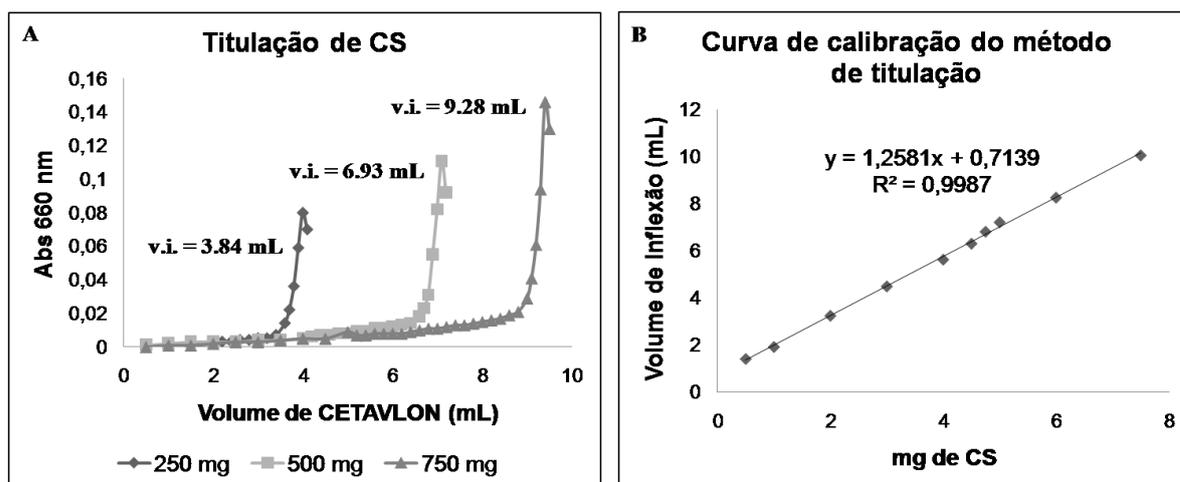


Figura A5 – Titulação de condroitim sulfato com brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON) 0,1%. A: Curvas de titulação de três concentrações de CS com seus respectivos volumes de inflexão (v.i.). **B:** curva de calibração do método de titulação usando diferentes concentrações de CS (0,5 – 7,5 mg).

A dosagem de condroitim sulfato pelo método de titulação baseia-se na precipitação de poliânions por compostos catiônicos. A interferência de polímeros contendo cargas negativas na dosagem de condroitim sulfato pelo método de titulação foi analisada. Os resultados estão apresentados na Figura A6.

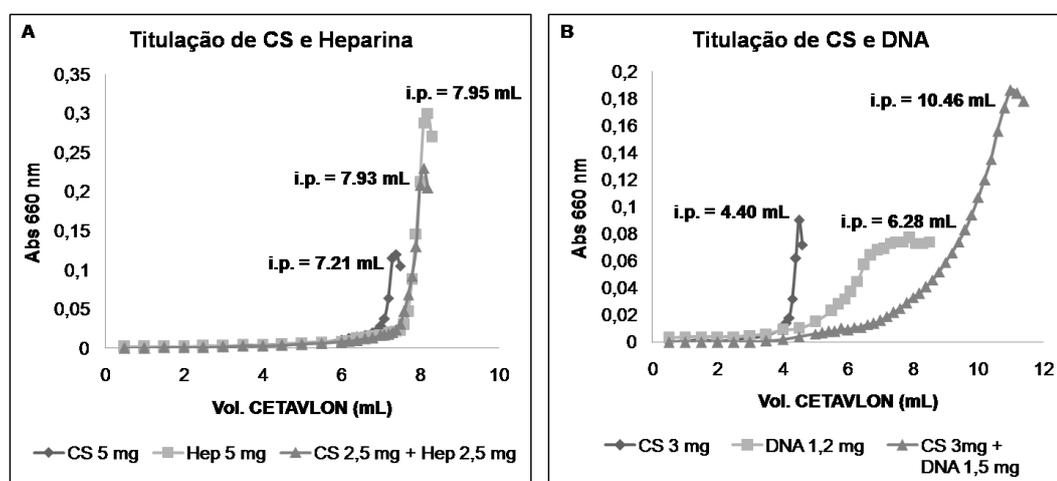


Figura A6 – Curvas de titulação de diferentes polímeros aniônicos com brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON) 0,1%. A: curvas de titulação de CS, heparina (Hep), e os dois em combinação. **B:** curvas de titulação de CS, DNA extraído de morango e os dois em combinação.

Na Figura A6-A, o volume de inflexão da titulação de 5 mg de condroitim sulfato com CETAVLON foi de 7,21 mL, enquanto a mesma quantidade de heparina atingiu volume de inflexão em 7,95 mL. Já na titulação de uma mistura contendo a mesma quantidade de condroitim sulfato e heparina (2,5 mg cada) o ponto final foi 7,93 mL, o que mostra que a presença de heparina superestima a concentração de

condroitim sulfato na titulação. O mesmo pode ser notado na titulação de condroitim sulfato com ácidos nucleicos extraídos de morango (Figura A6-B)

ANÁLISE DE AMOSTRAS FARMACÊUTICAS DE CONDROITIM SULFATO

Com o objetivo de analisar a qualidade de insumos farmacêuticos de condroitim sulfato disponíveis no mercado brasileiro, amostras coletadas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose em tampão PDA e por titulação utilizando CETAVLON como titulante, para dosagem de condroitim sulfato. Métodos complementares como espectroscopia em ultravioleta, digestão específica por condroitinase AC, cromatografia em papel e dosagens químicas também foram realizados.

DOSAGEM DE CONDROITIM SULFATO

Eletroforese em Gel de Agarose

Alíquotas de 5 μ L de cada amostra (solução 1mg/mL) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose. As amostras foram divididas em duas lâminas (8 amostras em cada), corridas em quadruplicata. A quantificação foi realizada por densitometria por comparação com a banda relativa ao condroitim sulfato padrão Sigma (5 μ L de solução 1 mg/mL), que foi aplicado nas duas lâminas. A Figura A7 apresenta uma replicata de cada lâmina.

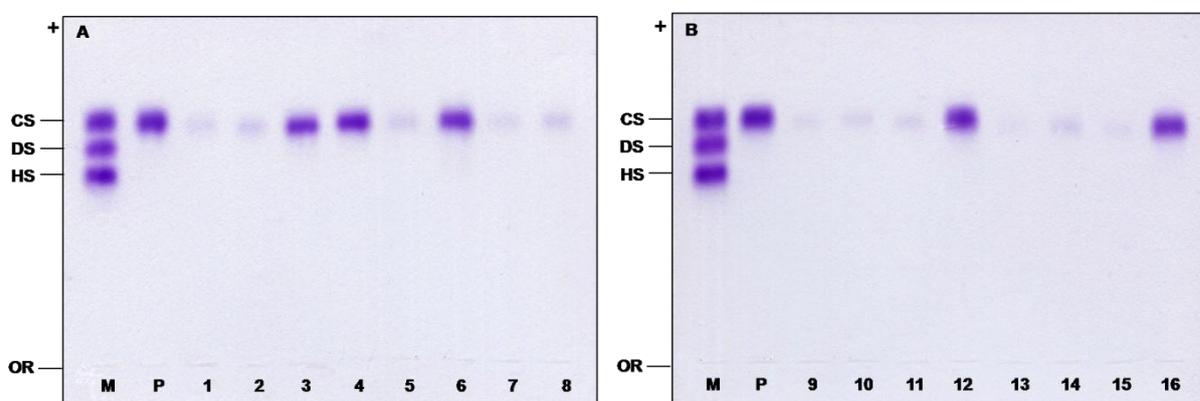


Figura A7 – Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA de amostras de condroitim sulfato coletadas em farmácias de manipulação de Juiz de Fora. OR: origem; M: mistura padrão de glicosaminoglicanos CS, DS e HS. P: condroitim-4-sulfato padrão de referência Sigma-Aldrich.

Como pode ser observado na Figura A7, todas as amostras apresentaram banda única comigrando com condroitim sulfato. Entretanto, há uma grande diferença de concentração entre as amostras. Por densitometria das bandas, a concentração de condroitim sulfato em cada gel foi determinada por comparação com o padrão do mesmo gel (Figura A8). Percebe-se que apenas cinco amostras (3, 4, 6, 12 e 16) apresentaram teor de condroitim sulfato superior a 80% (80,8 – 91,2%), sendo que todas as demais ficaram abaixo de 15%.

Titulação Fotométrica com CETAVLON

Na dosagem de condroitim sulfato por titulometria, 5 mg de condroitim sulfato foram titulados por solução de CETAVLON 0,1%. Após obtenção de cada curva de titulação, o ponto final foi calculado como descrito em Métodos e a concentração de condroitim sulfato em cada amostra foi determinada utilizando-se a equação determinada na curva de calibração deste método (Figura A5-B). Os resultados estão apresentados na Figura A8. Nota-se que as amostras 3, 4, 6, 12 e 16 apresentaram teor de condroitim sulfato superior a 90% na dosagem por titulação, enquanto nas demais amostras o teor de condroitim sulfato foi inferior a 20%.

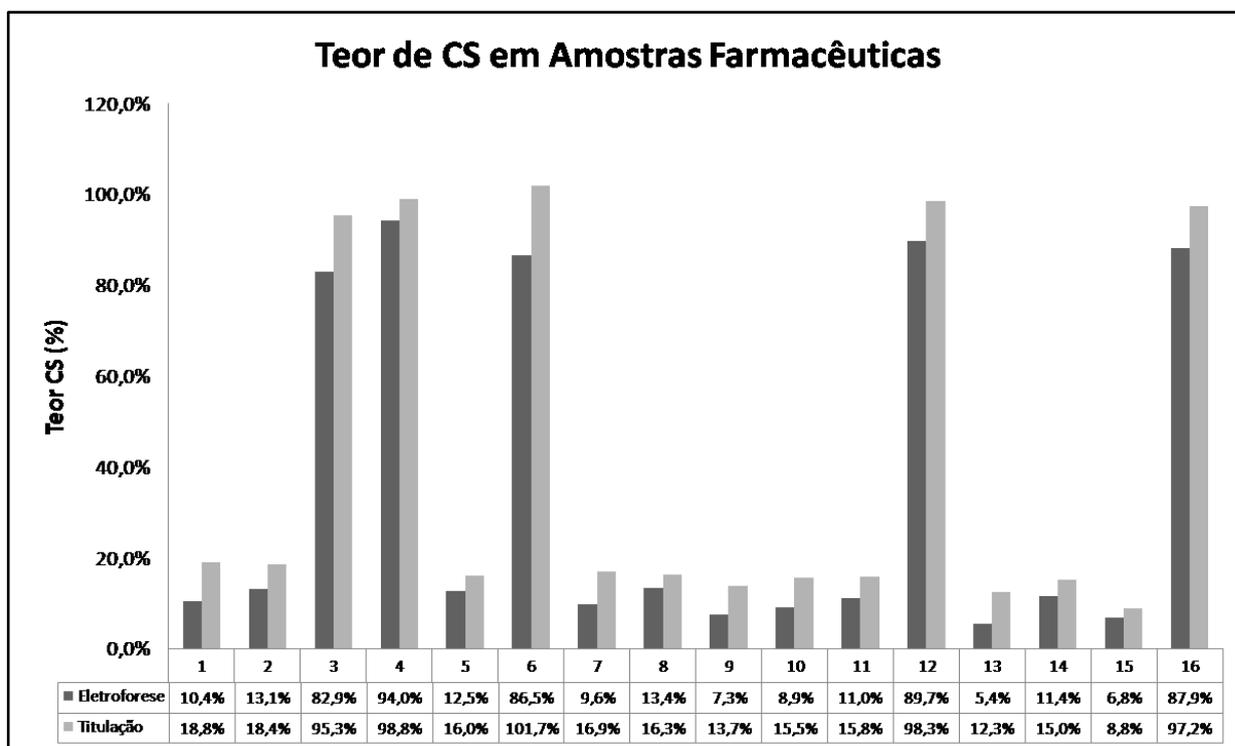


Figura A8 – Teor de condroitim sulfato em Amostras Farmacêuticas analisadas por eletroforese em gel de agarose e titulação fotométrica com CETAVLON.

ESPECTRO DE ABSORÇÃO EM ULTRAVIOLETA

Alíquotas do condroitim sulfato padrão e das amostras analisadas (1 mL, 1 mg/mL em água destilada) foram submetidas à varredura em espectrofotômetro na região UV (190 a 320 nm, 200nm por segundo). A Figura A9 apresenta o espectro de varredura do condroitim sulfato padrão.

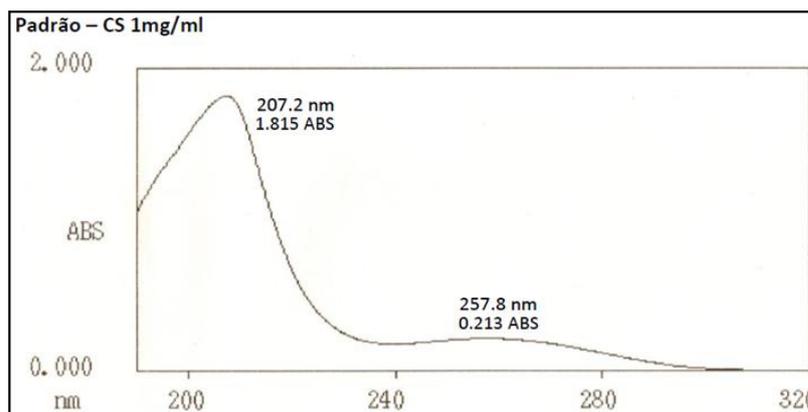


Figura A9 – Espectro de absorção em ultravioleta de condroitim sulfato padrão Sigma. Varredura realizada em faixa de comprimento de onda de 190 a 320 nm (200nm por segundo), utilizando 1 mL de solução 1 mg/mL.

Observa-se na Figura A9 a presença de dois picos no espectro de varredura do condroitim sulfato padrão, um em 207 nm com Abs de 1,812 (PICO 1) e outro, não tão bem caracterizado, em 258 nm com 0,213 de Abs (PICO 2). Este último é característico de resíduos aromáticos de aminoácidos ou ácidos nucleicos.

Para melhor entender a absorção do condroitim sulfato em UV, soluções padrão (1 mL, 1 mg/mL em água destilada) dos monossacarídeos que constituem o condroitim sulfato (ácido D-glucurônico e *N*-acetil-galactosamina, no caso foi usado *N*-acetil-glucosamina, epímero em C4) também foram submetidas à varredura em UV.

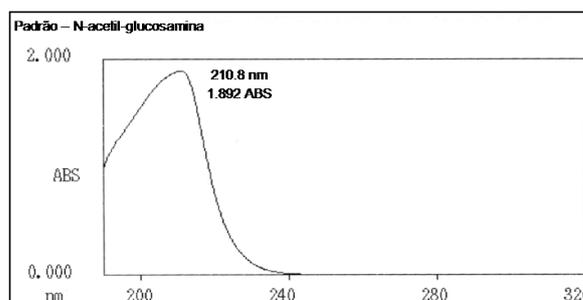
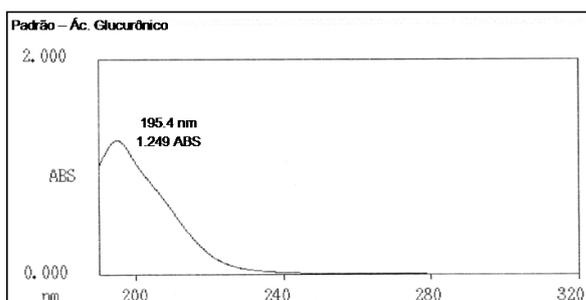


Figura A10 – Espectro de absorção em ultravioleta de soluções padrão de ácido glucurônico e N-acetil-glucosamina. Varredura realizada em faixa de comprimento de onda de 190 a 320 nm (200nm por segundo), utilizando 1 mL de solução 1 mg/mL.

Nota-se que na Figura A10 que o ácido D-glucurônico apresenta um pico de absorção em 195 nm com intensidade de 1,249 Abs, enquanto *N*-acetil-glucosamina absorve com mais intensidade (1,892 Abs) em 211 nm.

Os espectros de varredura das amostras analisadas foram comparados com o espectro de varredura do condroitim sulfato padrão. A Figura A11 mostra os espectros das amostras 3, 4, 6, 12 e 16, que apresentaram teor de condroitim sulfato superior a 80%, determinado por eletroforese em gel de agarose.

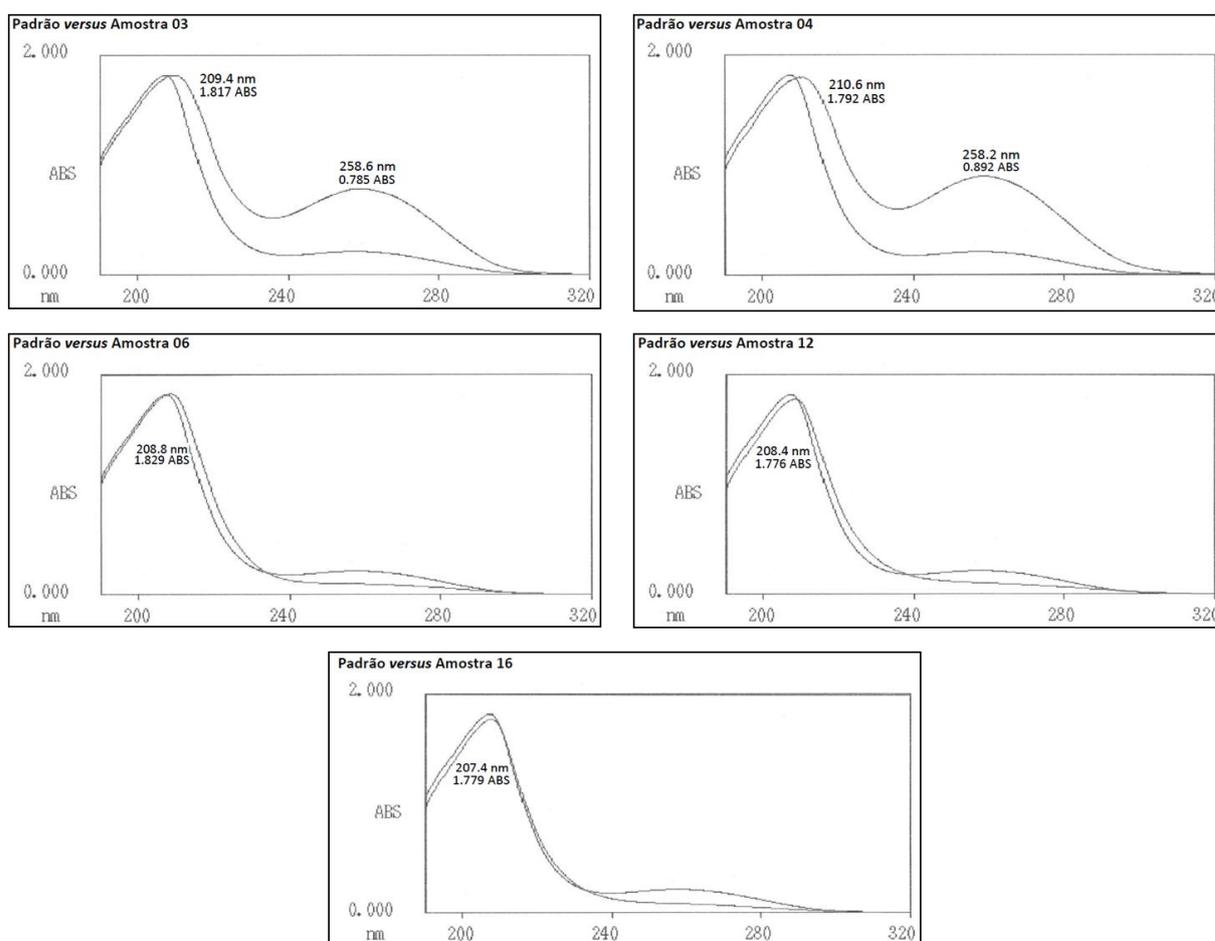


Figura A11 – Espectro de absorção em ultravioleta de amostras 3, 4, 6, 12 e 16. Varredura realizada em faixa de comprimento de onda de 190 a 320 nm (200nm por segundo), utilizando soluções 1 mg/mL.

As amostras 6, 12 e 16 apresentaram espectros de absorção semelhantes ao espectro do condroitim padrão. Já nas amostras 3 e 4 percebe-se, além de um pico em 210 nm com intensidade próxima ao padrão, outro pico em 258 nm com intensidade quatro vezes maior que o PICO 2 do padrão.

As amostras 13 e 15 (Figura A12), com teor de condroitim sulfato inferior a 10%, apresentam um pico em 212 nm com intensidade próxima a 1,810 Abs.

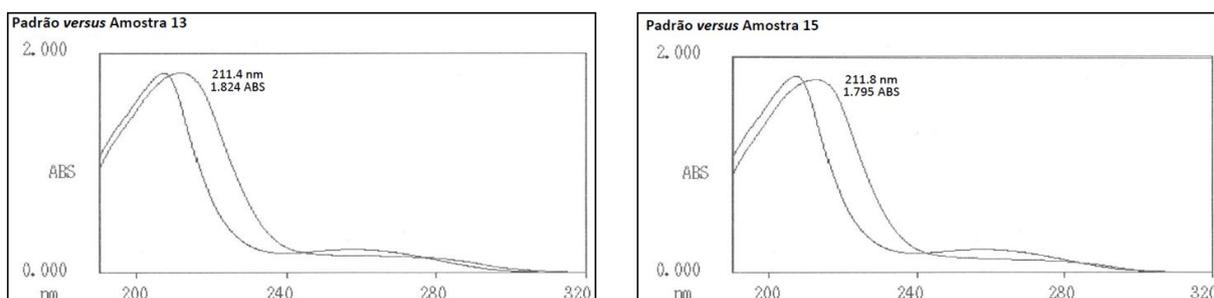


Figura A12 – Espectro de absorção em ultravioleta de amostras 13 e 15. Varredura realizada em faixa de comprimento de onda de 190 a 320 nm (200nm por segundo), utilizando soluções 1 mg/mL.

As demais amostras (1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11 e 14), todas com teor de condroitim sulfato inferior a 15%, apresentaram pico único de absorção em 192 nm com intensidade próxima a 0,960 Abs (Figura A13). Na Figura A13 ainda pode ser visualizada a sobreposição dos espectros de absorção de todas as amostras, inclusive do padrão.

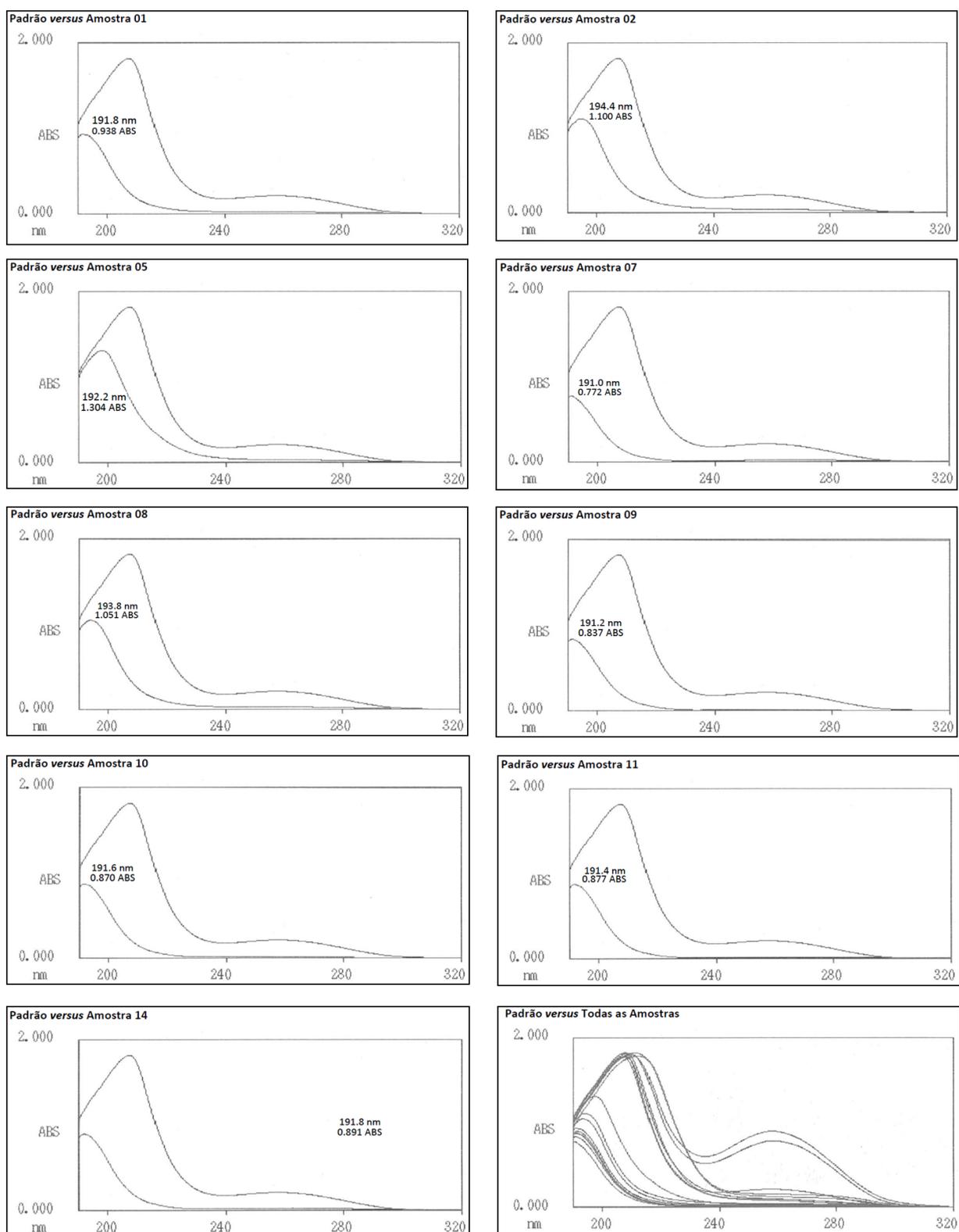


Figura A13 – Espectro de absorção em ultravioleta de amostras 1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 14 e de todas as 16 amostras mais o padrão. Varredura realizada em faixa de comprimento de onda de 190 a 320 nm (200nm por segundo), utilizando soluções 1 mg/mL.

ANÁLISES QUÍMICAS

Determinação de Açúcares Redutores

O condroitim sulfato é uma macromolécula linear que possui uma extremidade redutora e outra não redutora. A investigação do potencial redutor das amostras foi realizada por colorimetria utilizando o reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Este composto, na presença de açúcares redutores, é reduzido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, que absorve intensamente em 540 nm. A Figura A14 apresenta os resultados obtidos

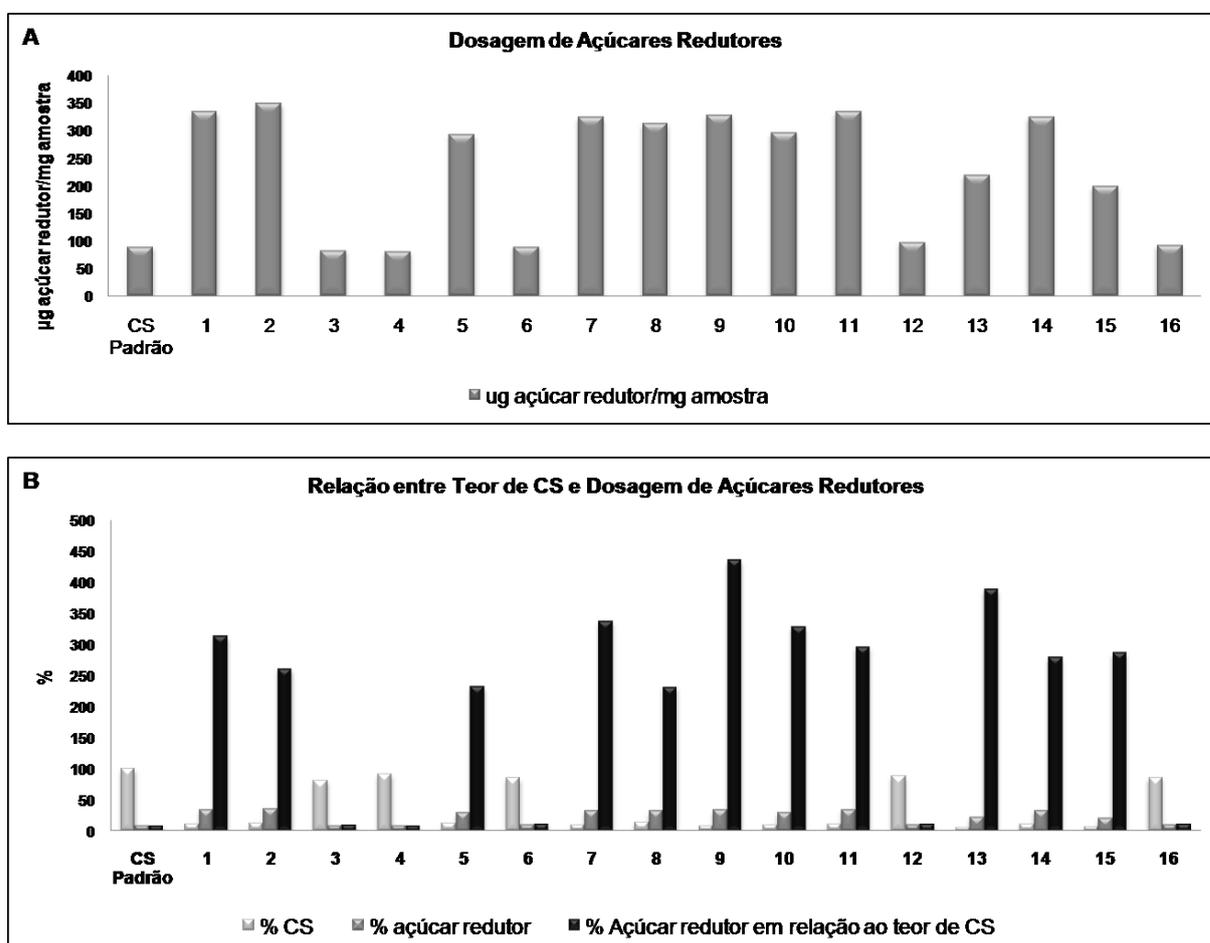


Figura A14 – Dosagem de açúcares redutores por método do DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) em amostras de condroitim sulfato coletadas em farmácias de manipulação de Juiz de Fora. A: concentração de substâncias redutoras expressa em µg de açúcar redutor/mg de amostra. **B:** porcentagem de açúcares redutores em relação ao teor de CS.

Percebemos na Figura A14-A que as amostras 3, 4, 6, 12 e 16 apresentam concentração de açúcares redutores próxima à obtida para o padrão; as amostras

13 e 15 possuem valores maiores que o dobro e nas demais o poder redutor é próximo de 3,5 vezes maior que o padrão.

Os valores obtidos para açúcares redutores estão relacionados ao peso da amostra que, em teoria, deveria apresentar teor próximo a 100% de condroitim sulfato. Como observado na dosagem por eletroforese, várias amostras apresentaram teor de condroitim sulfato muito baixo. A Figura A14-B ilustra o potencial redutor das amostras em relação ao teor de condroitim sulfato. É possível claramente visualizar que essa relação encontra-se extremamente elevada nas amostras com baixo teor de condroitim sulfato.

De acordo com o grau de polimerização do condroitim sulfato, soluções contendo a mesma massa (g) de condroitim sulfato apresentam uma relação inversamente proporcional entre a massa molecular (g/mol) e o número de hidroxilas anoméricas livres. Dessa forma, a determinação do potencial redutor de uma amostra de condroitim sulfato pode servir como estimativa do grau de polimerização.

Entretanto, a presença de outros açúcares (monossacarídeos, dissacarídeos etc.) pode também aumentar o valor do poder de redução. Como as amostras com alto potencial redutor possuem baixo teor de condroitim sulfato, resolvemos utilizar cromatografia em papel para análise de açúcares redutores.

Alíquotas (5 uL, sol. 10mg/mL) de cada amostra foram submetidas à cromatografia descendente em papel Whatman nº1 usando a mistura de solvente ácido isobutírico: NH_4OH 1,25 M (5:3 v/v). Padrões de monossacarídeos também foram submetidos à cromatografia no mesmo papel. Após a corrida do solvente o cromatograma foi seco e os produtos redutores revelados com nitrato de prata em meio alcalino (Figura A15).

Podemos observar em nove amostras (1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11 e 14) a presença de vários compostos redutores com migração diferenciada na mistura de solvente utilizada. As amostras 13 e 15 apresentaram apenas uma banda com coloração bem intensa após revelação por prata, enquanto para o restante (3, 4, 6, 12 e 16) não houve o aparecimento de bandas.

A partir da comparação dos fatores de retenção (R_f s) das bandas de cada amostra com os R_f s dos padrões, foi possível identificar apenas a banda com R_f mais alto (próximo de 0,470) como glicose. As demais bandas não apresentaram comigração com nenhum dos padrões.

Este tipo de cromatografia indica que quanto maior o peso molecular de um composto menor será sua migração, tendo sua presença revelada em posições mais próximas da origem. Dessa forma, acreditamos que as demais bandas correspondam a açúcares de maior peso, como dissacarídeos, tetrassacarídeos e oligossacarídeos.

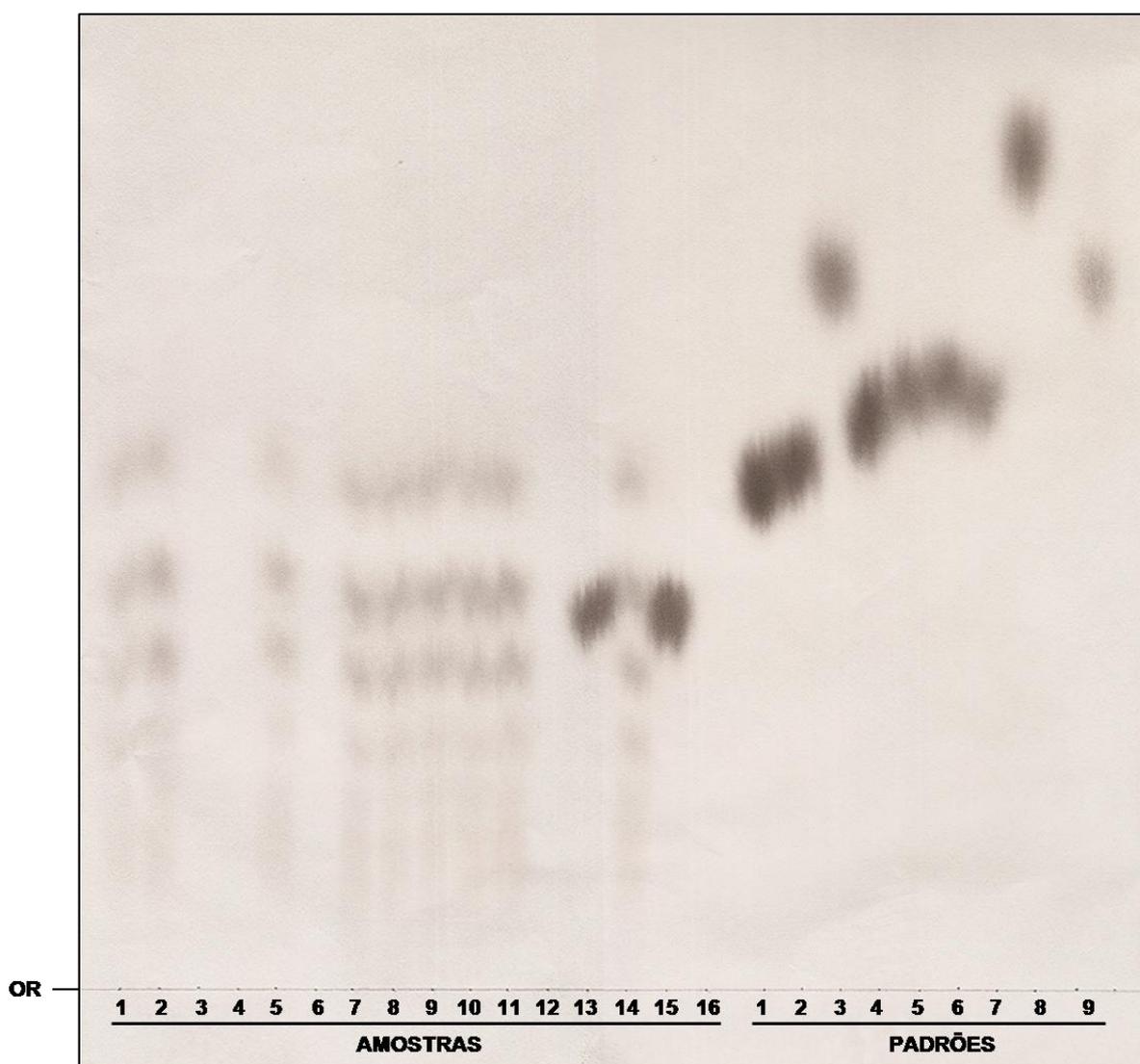


Figura A15 – Cromatografia em papel das amostras de insumo farmacêutico condroitim sulfato coletadas em farmácias de manipulação. Diversos padrões de monossacarídeos também foram aplicados (1: glicose 10 µg; 2: galactose 10 µg; 3: fucose 6 µg; 4: manose 5 µg; 5: frutose 6 µg; 6: arabinose 6 µg; 7: xilose 5 µg; 8: glucosamina 10 µg; 9: N-acetil-glucosamina 10 µg).

Dosagem de proteínas

De acordo com a Farmacopéia Americana (USP 32, 2008), o teor de proteínas em condroitim sulfato não deve exceder 6%, calculado em relação à base seca.

Com o objetivo de quantificar as proteínas totais presentes nas amostras, foi realizado método de Lowry (1951). A dosagem, realizada em 400 µg da matéria prima, foi expressa em % de proteínas em relação ao peso da amostra (Figura A16-A). A Figura A16-B mostra a porcentagem de proteína nas amostras em relação ao teor de condroitim sulfato

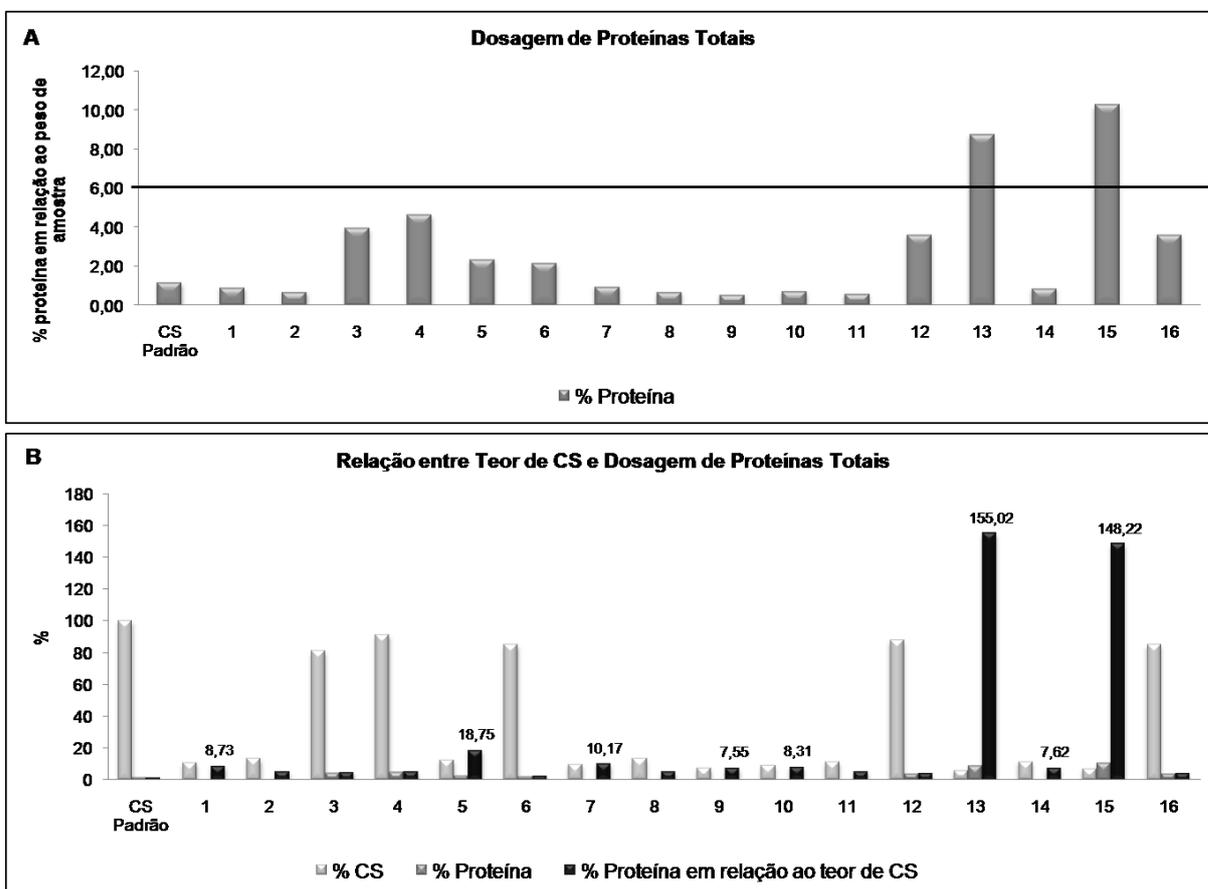


Figura A16 – Dosagem de proteínas totais por método de Lowry em amostras de condroitim sulfato coletadas em farmácias de manipulação de Juiz de Fora. A: % de proteína em relação ao peso da amostra. A linha preta representa o limite de proteínas calculado em relação à base seca segundo USP 32 (6%). **B:** porcentagem de proteínas em relação ao teor de CS (os valores que excedem 6% estão representados).

Percebe-se na Figura A16-A que as amostras 13 e 15 possuem teor de proteínas, calculado em relação ao peso da amostra, acima do especificado pela USP 32. Quando o teor de proteínas é relacionado à concentração de condroitim sulfato (Figura 18-B), a porcentagem de proteínas nessas duas amostras encontra-

se exageradamente elevada, ficando também acima do especificado em outras seis amostras (1, 5, 7, 9, 10, 14).

Dosagem de ácido urônico

O condroitim sulfato é formado por unidades dissacarídicas compostas por resíduos de ácido D-glucurônico e *N*-acetil-galactosamina, sendo que o resíduo de ácido urônico representa cerca de 38% do peso de cada unidade dissacarídica sulfatada.

Dosagem de ácido urônico pelo reagente de carbazol foi realizada nas amostras com o objetivo de estabelecer relação com a concentração de condroitim sulfato nas mesmas. Após o processamento da reação e leitura em espectrofotômetro (525 nm), a concentração de ácido urônico foi calculada por meio de uma curva de calibração de ácido glucurônico (Figura A17).

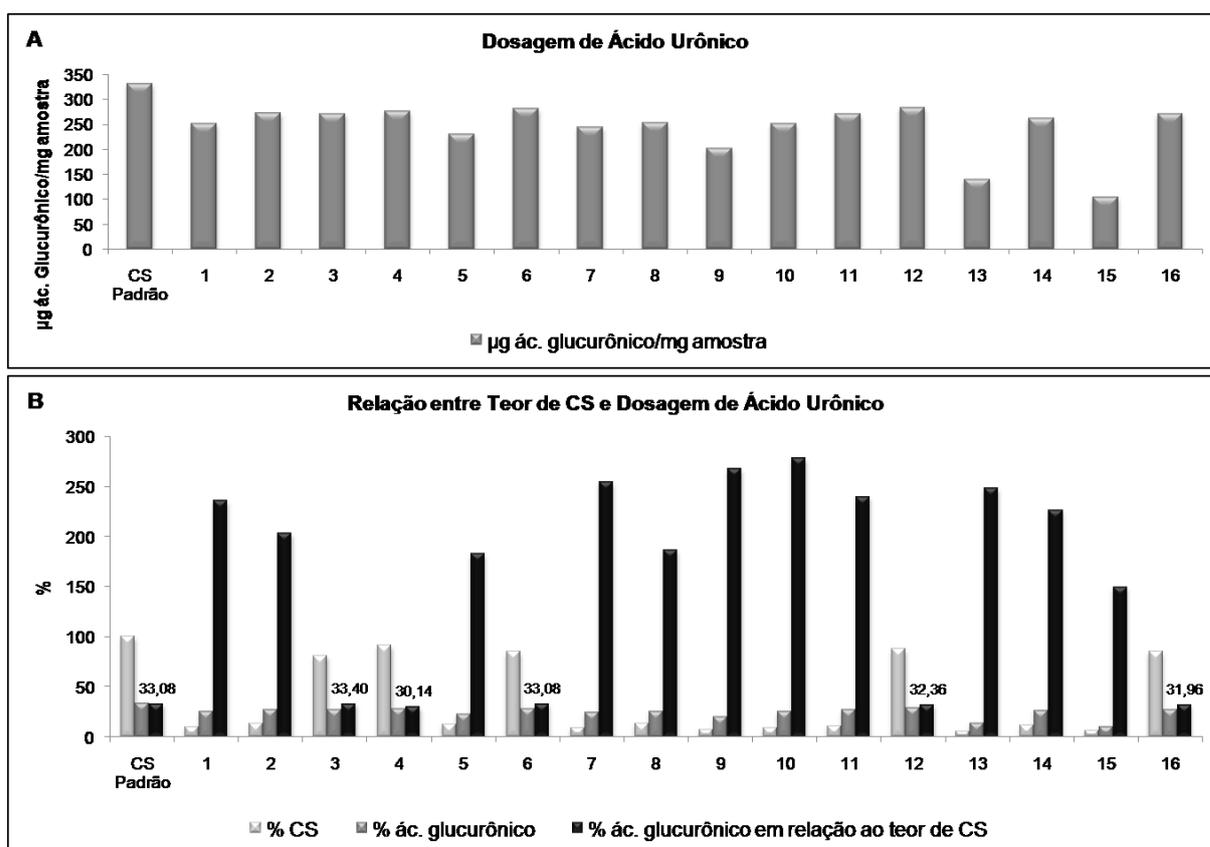


Figura A17 – Dosagem de ácido urônico por método de carbazol em amostras de condroitim sulfato coletadas em farmácias de manipulação de Juiz de Fora. A: concentração de ácido urônico em µg de ácido glucurônico/mg de amostra. **B:** porcentagem de ácido urônico em relação ao teor de CS.

Como observado na Figura A17-A, condroitim sulfato padrão apresentou cerca de 330 µg de ácido glucurônico por mg de amostra, o que representa 33% em relação ao peso da amostra. Nota-se ainda que a maioria das amostras possui, em média, 25% de ácido urônico.

Porém, quando o teor de ácido urônico obtido por esta dosagem é relacionado ao teor de condroitim sulfato determinado por eletroforese em gel de agarose (Figura A17-B), percebe-se que, nas amostras com alto teor de condroitim sulfato essa relação permanece próxima de 32%, enquanto que nas amostras com baixo teor de condroitim sulfato ela ultrapassa 200%.

Durante a leitura espectrofotométrica dessa dosagem, percebemos visualmente que diversas amostras apresentaram coloração marrom-alaranjada, diferente das cores obtidas nos diversos pontos da curva de calibração com solução padrão de ácido glucurônico. Esta curva apresenta coloração rosa, que varia de tonalidades mais claras em menores concentrações a tons mais fortes nos pontos de maior concentração.

De fato, a presença de açúcares neutros na amostra em análise, principalmente hexoses, produz coloração marrom que interfere significativamente na dosagem, comprometendo a especificidade do método (FILISSETTI-COZZI; CARPITA, 1991). Dessa forma, é possível supor contaminação por outros açúcares neutros nas amostras em que a relação entre ácido glucurônico e teor de condroitim sulfato encontra-se exageradamente alta.

ANÁLISE ENZIMÁTICA

Enzimas capazes de degradar glicosaminoglicanos têm grande importância no estudo destas moléculas. Diversos micro-organismos, especialmente bactérias de solo como *Flavobacterium heparinum*, produzem estas enzimas. Condroitinase AC é capaz de degradar condroitins 4 e 6-sulfato. Essa reação ocorre por mecanismo de eliminação e produz oligossacarídeos contendo um resíduo de ácido urônico com insaturação entre os carbonos 4 e 5. Essa insaturação apresenta máximo de absorvância em 232 nm, o que permite a detecção de produtos de degradação destas enzimas por métodos espectroscópicos em ultravioleta (AGUIAR et al., 2003).

Para melhor caracterização das amostras foi realizada digestão enzimática do condroitim sulfato com condroitinase AC de *Flavobacterium heparinum*. Inicialmente foi realizada incubação de 10 µL de solução 10 mg/mL de cada amostra (100 µg de amostra) com 10 µL de condroitinase AC. Incubação controle com 10 µL de amostra e de água também foi realizada.

A dosagem de condroitim sulfato por eletroforese em gel de agarose revelou diferentes concentrações deste insumo nas diversas amostras analisadas, sendo que muitas delas apresentaram teor muito baixo (Figura A8). Para melhor analisar a degradação do condroitim sulfato por métodos descritos a seguir, foi realizada também outra incubação com volumes corrigidos de solução 10 mg/mL de amostra, para que 100 µg de condroitim sulfato fossem incubados com 10 µL de condroitinase AC. Incubação controle também foi preparada com os volumes relativos a cada amostra e 10 µL de água.

Após 18 horas de incubação, 2 µL de cada mistura dos ensaios foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, e o restante foi aplicado em cromatograma. A Figura A18 apresenta geis de agarose da incubação realizada com 100 µg de condroitim sulfato. As Figuras A19 e A20 correspondem aos cromatogramas da incubação com 100 µg de amostra e 100 µg de condroitim sulfato, respectivamente, após corrida com solvente ácido isobutírico: NH₄OH 1,25 M (5:3 v/v) e revelação dos produtos redutores com nitrato de prata em meio alcalino.

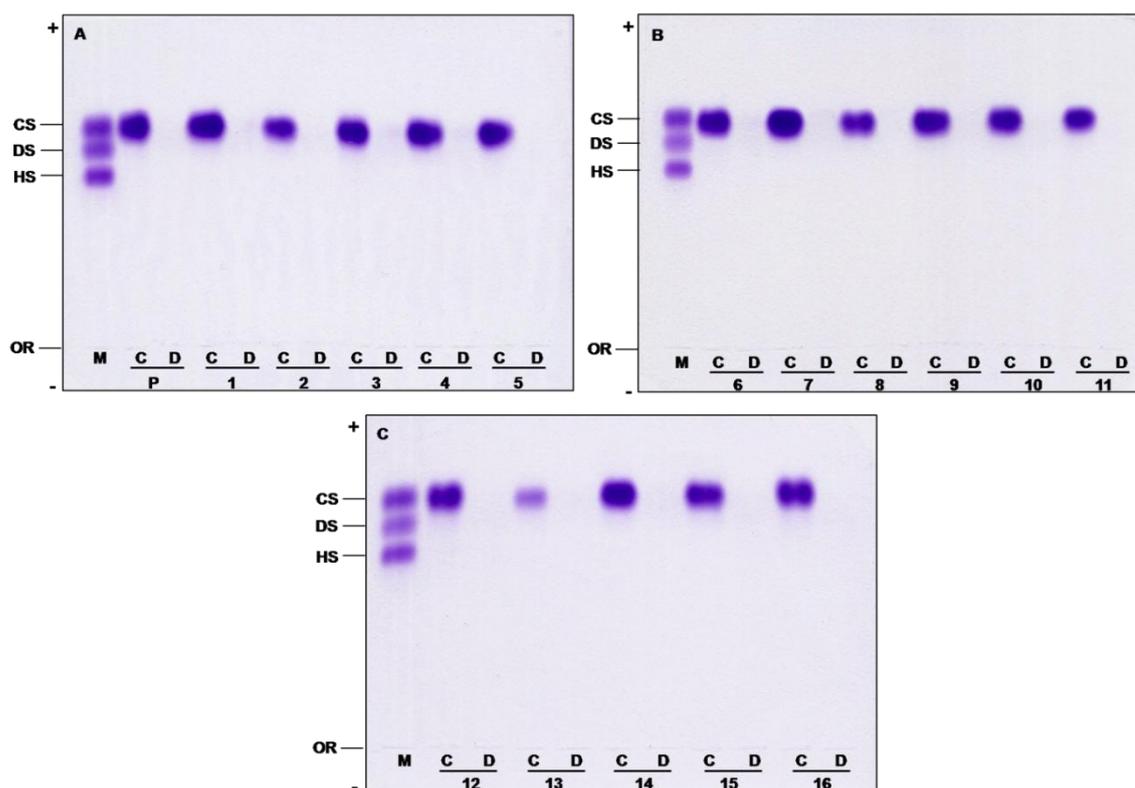


Figura A18 – Eletroforese em gel de agarose de amostras submetidas à degradação com condroitinase AC. Incubação de volumes variados de cada amostra para atingir 100 µg de condroitim sulfato. OR: origem; M: mistura padrão de GAGs (CS, DS e HS); P: condroitim-4-sulfato padrão; C: incubação controle com água; D: amostras incubadas com condroitinase AC.

Na Figura A18, bandas de condroitim sulfato são vistas nas incubações controle com água (C). A não visualização das bandas nas incubações com condroitinase AC (D) mostra que o condroitim foi degradado pela enzima.

O condroitim sulfato não degradado possui alto peso molecular e não migra em cromatografia em papel nesse sistema solvente. Como já discutido anteriormente, o poder redutor das amostras analisadas depende do grau de polimerização da molécula. A degradação de condroitim sulfato por condroitinase AC gera produtos de degradação de menor peso que apresentam migração em cromatografia e são revelados por nitrato de prata.

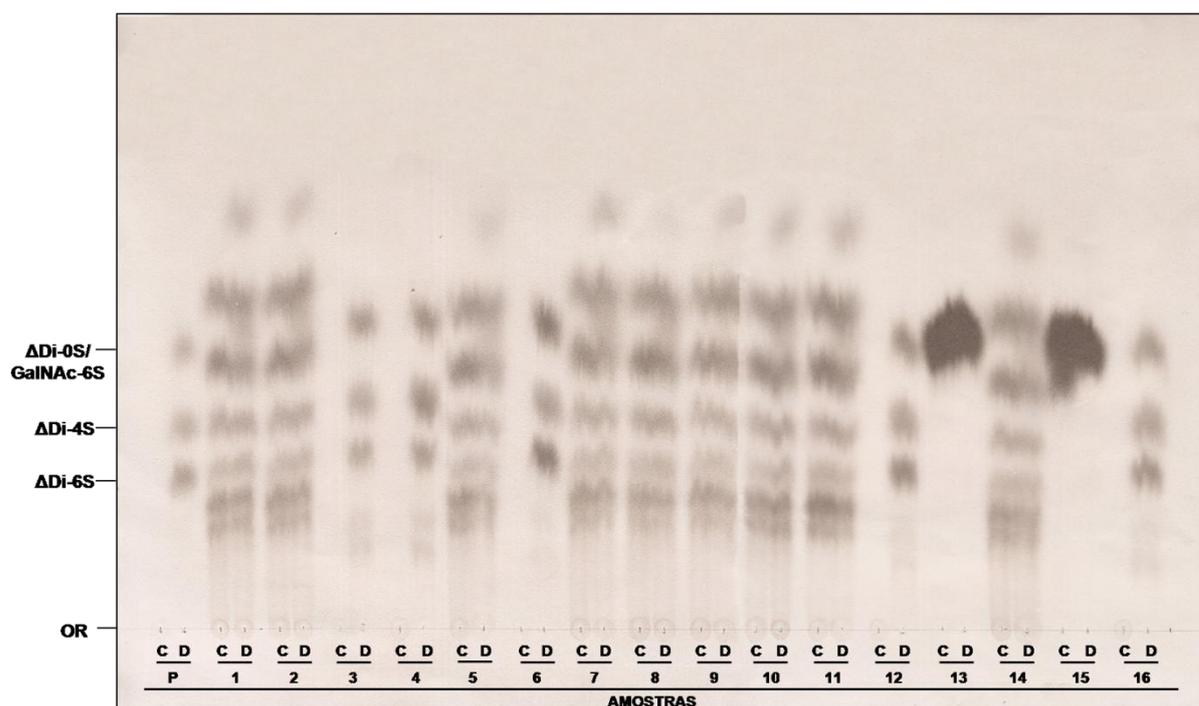


Figura A19 – Cromatografia em papel de amostras submetidas à degradação com condroitinase AC. Incubação de 100 µg de amostra. OR: origem; Δ Di-6S: dissacarídeo insaturado sulfatado na posição 6; Δ Di-4S: dissacarídeo insaturado sulfatado na posição 6; Δ Di-0S: dissacarídeo insaturado não sulfatado; GalNAc-6S: N-acetil-galactosamina-6-sulfato; P: condroitim-4-sulfato padrão; C: incubação controle com água; D: amostras incubadas com condroitinase AC.

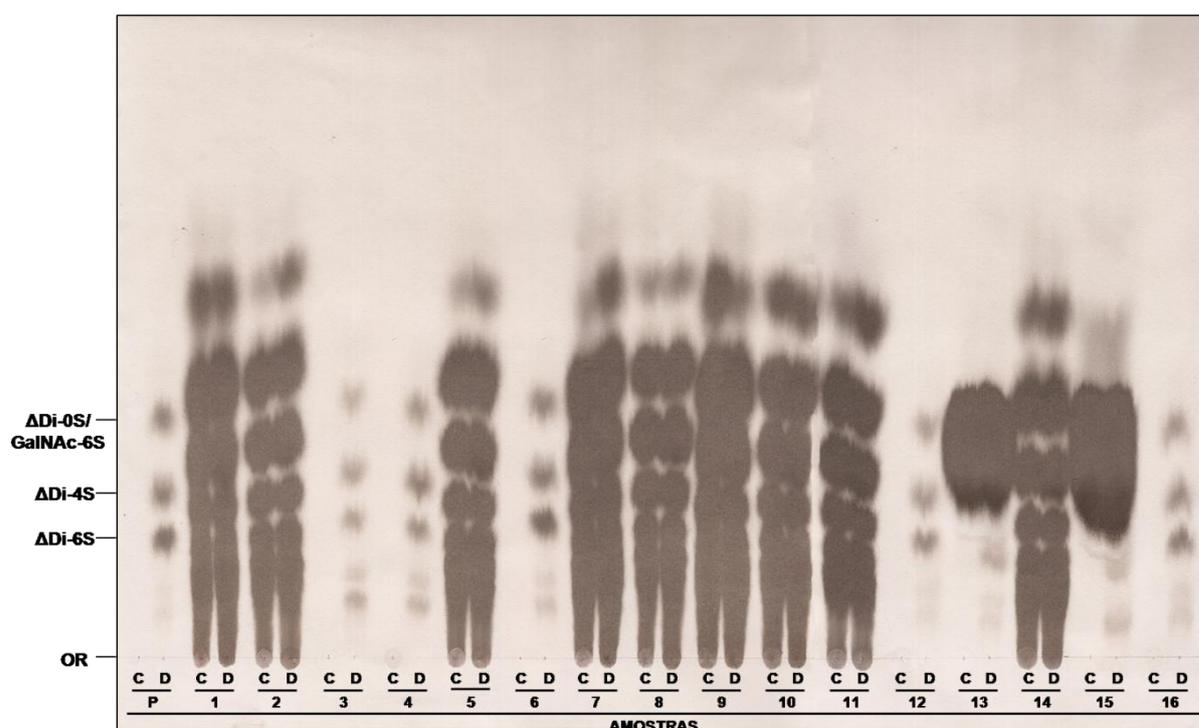


Figura A20 – Cromatografia em papel de amostras submetidas à degradação com condroitinase AC. Incubação de volumes variados de cada amostra para atingir 100 µg de condroitim sulfato. OR: origem; Δ Di6S: dissacarídeo insaturado sulfatado na posição 6; Δ Di4S: dissacarídeo insaturado sulfatado na posição 6; Δ Di0S: dissacarídeo insaturado não sulfatado; GalNAc-6S: N-acetil-galactosamina-6-sulfato; P: condroitim-4-sulfato padrão; C: incubação controle com água; D: amostras incubadas com condroitinase AC.

Nos dois cromatogramas realizados (Figuras A19 e A20) podemos perceber que a degradação de condroitim sulfato padrão por condroitinase AC revelou três bandas bem definidas com Rfs iguais a 0,184, 0,246 e 0,347.

Dos três dissacarídeos insaturados principais obtidos por degradação enzimática do condroitim sulfato, o não sulfatado é o que migra mais distante da origem na cromatografia em papel utilizando ácido isobutírico: NH_4OH como solvente. Em sequência migra o $\Delta\text{Di}4\text{S}$, sendo o $\Delta\text{Di}6\text{S}$ o dissacarídeo com menor migração. $\Delta\text{Di}0\text{S}$ e N-acetil-galactosamina-6-sulfato comigram neste método (MICHELACCI, HORTON, POBLACIÓN, 1987).

As amostras 3, 4, 6, 12 e 16, quando degradadas pela enzima, revelaram também os dissacarídeos insaturados. Essas amostras possuem tetrassacarídeos e oligossacarídeos formando um arraste próximo à origem.

Os Rfs das bandas mais evidentes das outras amostras foram calculados com base no primeiro cromatograma (Figura A19). Essas bandas não sofreram alteração após tratamento com condroitinase AC, o que indica que a natureza destes produtos não está relacionada ao condroitim sulfato.

ANÁLISE DE PESO MOLECULAR POR PAGE.

Para análise de peso molecular de condroitim sulfato em amostras farmacêuticas, alíquotas (20 μg) de matérias-primas com teor de condroitim sulfato superior a 80% foram ressuspendidas em 10 μL de tampão de amostra e aplicadas em gel de poliacrilamida 7,5%. Após eletroforese, como descrito em Métodos, o gel foi corado com azul de toluidina (Figura A21).

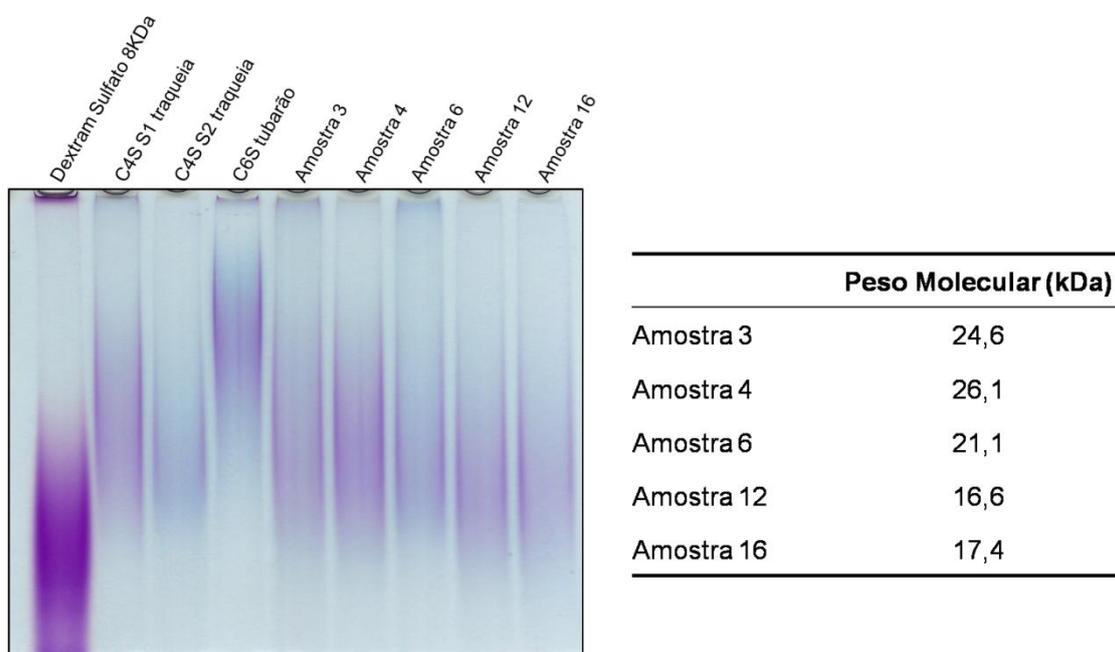


Figura A21 – PAGE de condroitim sulfato de amostras farmacêuticas. Amostras foram analisadas em gel de Poliacrilamida 7,5%, corado com azul de toluidina 0,1%. A tabela apresenta o peso molecular das amostras, calculado conforme descrito no texto. C4S S1 e C4S S2: condroitim 4-sulfato de traqueia bovina obtidos da Sigma (dois produtos distintos).

O peso molecular médio (peso modal) das amostras de condroitim sulfato foi estimado com base no Rf do pico obtido na análise densitométrica (Figura A22), a partir de curva padrão construída por regressão logarítmica com os padrões de dextram sulfato (8kDa), condroitim 4-sulfato de traqueia bovina – C4S S1 (26 kDa), e condroitim 6-sulfato de tubarão (67 kDa).

Observamos um variação de peso molecular das amostras farmacêuticas analisadas de cerca de 17 a 26 kDa, característica de condroitim 4-sulfato.

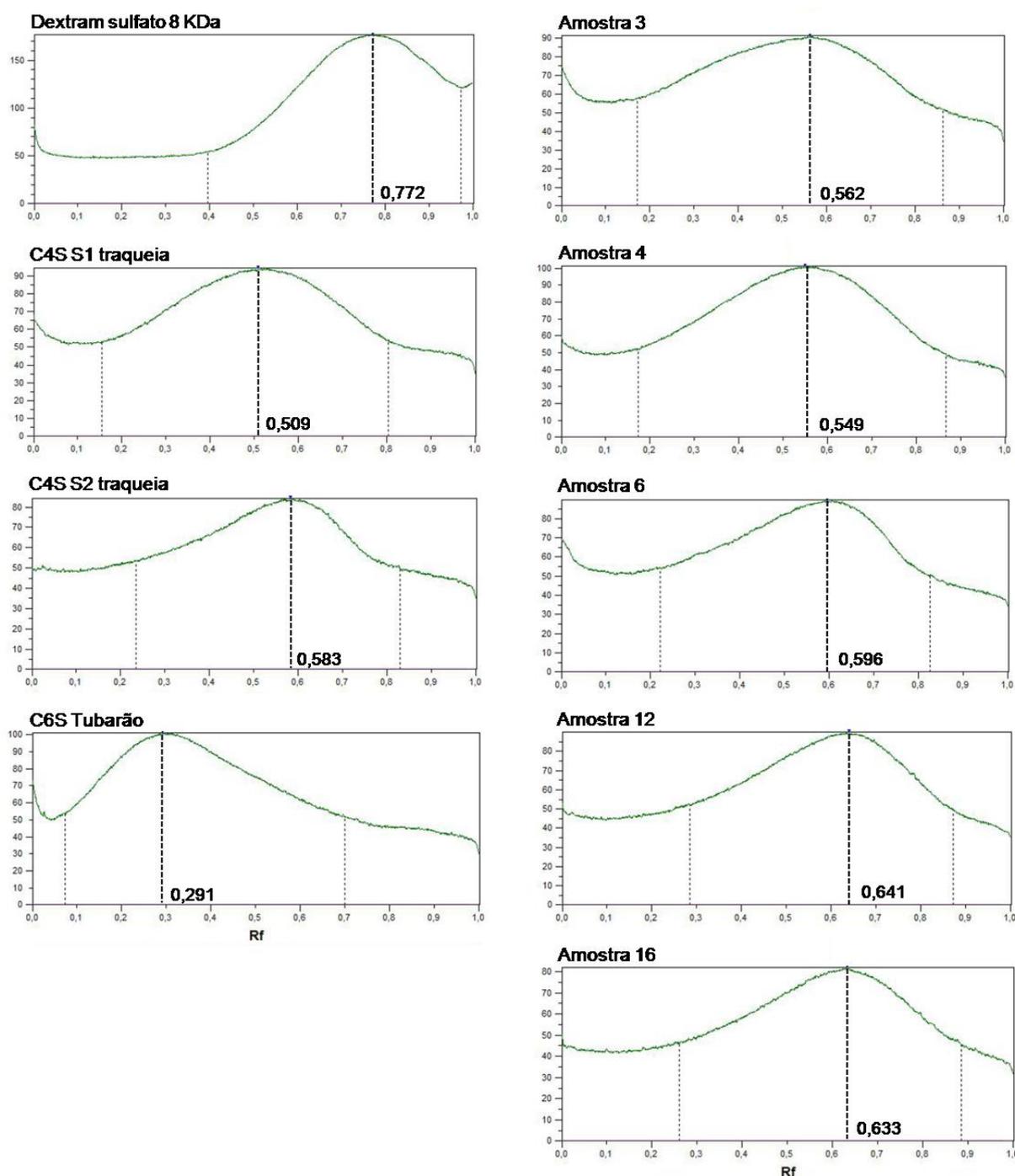


Figura A22 – Análise densitométrica das bandas de condroitim sulfato de amostras farmacêuticas em gel de PAGE. As bandas foram densitometradas usando o programa TotalLab TL120 1D v2009 (Nonlinear Dynamics Ltd.). Os valores de Rf estão apresentados.

PESQUISA DE QUERATAM SULFATO

Pesquisa de queratam sulfato em amostras farmacêuticas de condroitim sulfato foi realizada por *imunoblotting*. Alíquotas de 5 de μg de amostras com teor

maior que 80% foram submetidas à eletroforese em gel de agarose. Após transferência dos glicosaminoglicanos por capilaridade para membranas de nitrocelulose, o bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado por incubação com solução de caseína 5%. As membranas foram então incubadas com anticorpo monoclonal anti-queratam sulfato (MST1), seguido de anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. A revelação foi realizada por quimioluminescência e por incubação com substrato para peroxidase (tetrametilbenzidina em solução) (Figura X).

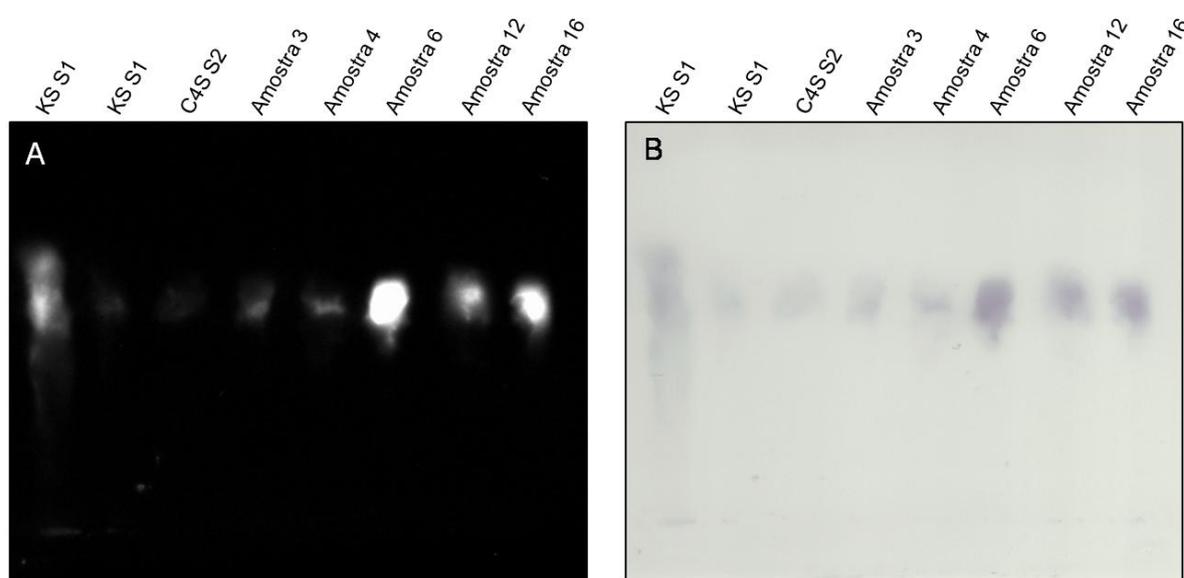


Figura A23 – Imunoblotting contra queratam sulfato de amostras farmacêuticas de condroitim sulfato. Alíquotas (5 µg) de cada amostra foram submetidas à eletroforese em gel de agarose seguida de transferência para membranas de nitrocelulose. Após incubação com anticorpo primário MST1 e secundário conjugado com peroxidase a membrana foi revelada por quimioluminescência (A) e por reação com substrato para peroxidase (tetrametilbenzidina) (B). KS S1: queratam sulfato extraído de núcleo pulposo bovino; KS S2: queratam sulfato extraído de córnea bovina. C4S S2: condroitim 4-sulfato de traqueia bovina obtido da Sigma.

Na Figura A23 observamos que as cinco amostras farmacêuticas de condroitim sulfato analisadas apresentam contaminação por queratam sulfato. A identificação desse glicosaminoglicano foi confirmada pelo desaparecimento das bandas detectadas no *imunoblotting* após tratamento das amostras com queratanase (resultados não apresentados).

INFORMAÇÕES REPORTADAS NO CERTIFICADO DE ANÁLISE

Para melhor comparação dos resultados obtidos pelos métodos realizados neste trabalho com as informações reportadas no certificado de análise, decidimos agrupar as amostras com base na análise por eletroforese em gel de agarose. Resumidamente, três grupos foram formados:

- **Grupo 1 – Amostras com teor de condroitim sulfato superior a 80%.** Encontram-se neste grupo as amostras 3, 4, 6, 12 e 16.
- **Grupo 2 – Amostras com teor de condroitim sulfato inferior a 15%, e que apresentaram pico de absorção UV em 210 nm próximo de 1,800 Abs.** As amostras 13 e 15 representam este grupo.
- **Grupo 3 – Amostras com teor de condroitim sulfato inferior a 15%, e que apresentaram pico de absorção UV em 192 nm próximo de 1,000 Abs.** Este grupo é constituído pelas amostras 1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11 e 14.

O Grupo 1 possui amostras de duas distribuidoras A e B. Quatro destas amostras possuem a mesma procedência do país X, sendo que a amostra 6 tem origem em Y. As amostras do Grupo 2 têm a mesma distribuidora C e procedência Z. Já o Grupo 3 engloba quatro diferentes distribuidoras (D, E, F e G), sendo a procedência a mesma (W). A Figura A24 apresenta um organograma para melhor visualização dessa classificação.

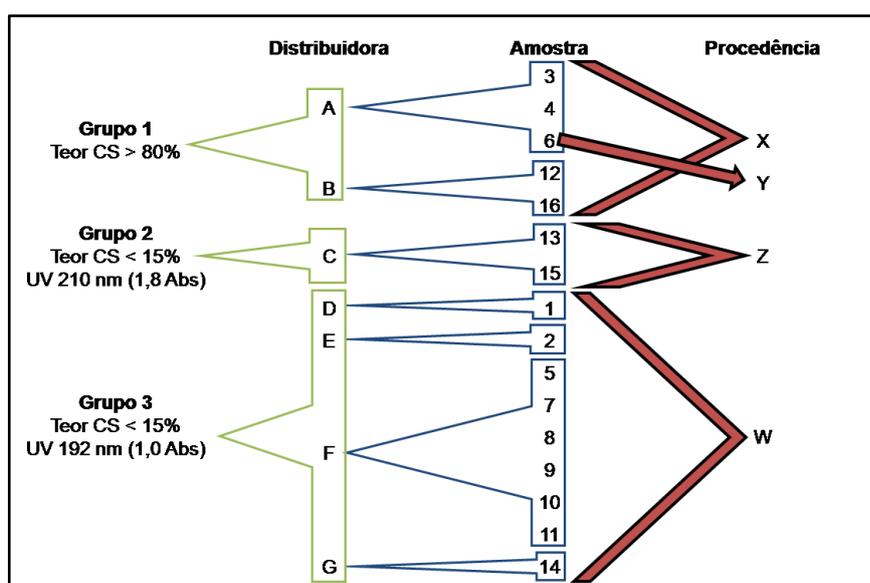


Figura A24 – Organograma com a classificação das amostras de condroitim sulfato quanto à distribuidora e procedência (país de origem da matéria-prima)

Dentre as análises realizadas neste trabalho, as dosagens de teor de condroitim sulfato por eletroforese em gel de agarose e por titulação, bem como a dosagem de proteínas por método de Lowry, podem ser comparadas com os resultados reportados no certificado de análise das amostras. A Tabela A1 apresenta estes resultados.

Percebemos que, para o teor de condroitim sulfato, segundo as informações reportadas no certificado de análise, todas as amostras encontram-se dentro do limite definido pela Farmacopeia Americana (90-105%). Porém, comparando estes resultados com os obtidos por eletroforese, apenas a amostra 4 apresentou resultados semelhantes e dentro da especificação farmacopeica. As demais amostras do Grupo 1, apesar de possuírem teor acima de 80%, encontram-se abaixo da especificação e apresentam resultados diferentes do valor reportado nos laudos. Entretanto, na dosagem de condroitim sulfato por titulação essas amostras apresentaram teor superior a 90%. Já as amostras dos Grupos 2 e 3 possuem teor próximo a 15% em ambos os métodos realizados neste trabalho

As amostras do Grupo 1 apresentaram teor de proteínas inferior a 6% em ambos os resultados e, portanto, encontram-se de acordo com as preconizações da Farmacopeia Americana (não mais que 6% de proteínas). Já as amostras do Grupo 2 mostraram, tanto no certificado quanto na dosagem deste trabalho, valor superior a 6%. Já para o Grupo 3 não constam informações sobre dosagem de proteínas no certificado de análise, sendo que, segundo a dosagem realizada neste estudo, todas possuem teor inferior a 6%.

Tabela A1 – Comparação dos Resultados de Teor de Condroitím Sulfato e de Proteínas Obtidos Neste Trabalho com as Informações Reportadas no Certificado de Análise do Controle de Qualidade do Produto

Amostra	Teor CS			Teor Proteínas	
	Eletroforese em gel de agarose	Titulação Fotométrica	Certificado de Análise	Dosagem Lowry	Certificado de Análise
1	10,4%	18,83%	97,32%	0,93%	n.c.
2	13,1%	18,36%	95,89%	0,70%	n.c.
3	82,9%	95,30%	90,50%	3,95%	5,40%
4	94,0%	98,80%	91,90%	4,64%	5,50%
5	12,5%	15,97%	95,77%	2,36%	n.c.
6	86,5%	101,66	96,80%	2,18%	2,70%
7	9,6%	16,93%	97,28%	0,98%	n.c.
8	13,4%	16,29%	99,89%	0,68%	n.c.
9	7,3%	13,75%	99,89%	0,57%	n.c.
10	8,9%	15,50%	95,77%	0,75%	n.c.
11	11,0%	15,81%	99,89%	0,61%	n.c.
12	89,7%	98,32%	96,49%	3,64%	4,50%
13	5,4%	12,32%	97,84%	8,75%	18,15%
14	11,4%	15,02%	91,92%	0,89%	n.c.
15	6,8%	8,82%	99,78%	10,27%	21,12%
16	84,8%	97,21%	96,49%	3,61%	4,50%

n.c.: não consta no Certificado de análise

ANÁLISE DE CONDROITIM SULFATO EM MEDICAMENTOS INDUSTRIALIZADOS

O método de eletroforese em gel de agarose foi utilizado para análise de dois medicamentos industrializados a base de CS, sendo um comercializado na forma de sachê e outro em cápsulas. A partir do pó de cada medicamento foram preparadas soluções 1 mg/mL em relação à concentração de condroitim sulfato especificada no rótulo de cada produto (1,2 g no sachê e 400 mg na cápsula), tendo sido aplicados no gel 5 µL de cada solução, em triplicata. Os resultados estão apresentados na Figura A25.

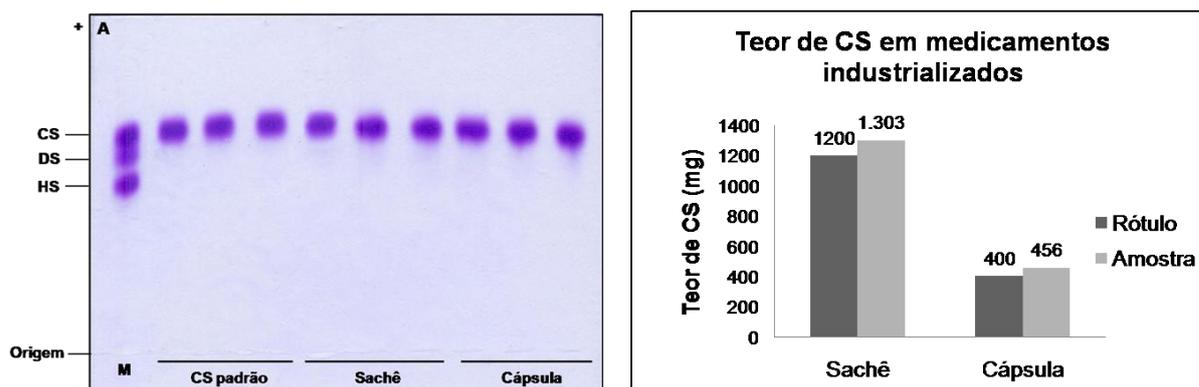


Figura A25 – (A) Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA de dois medicamentos industrializados contendo condroitim sulfato. B: Concentração de CS (em mg) determinada por densitometria das bandas do gel de agarose. M: mistura padrão de CS, DS e HS.

Como observado na Figura acima, o teor de CS nestas amostras de medicamentos atende ao especificado no rótulo, sendo inclusive ligeiramente superior.

APÊNDICE B – PRODUÇÃO INTELECTUAL

Trabalhos publicados em anais de congressos:

CARVALHO, R. G.; CUNHA, A. L.; OLIVEIRA, I. F. G. ARAGÃO, D. M. O.; SCIO, E.; AGUIAR, J. A. K. Inhibitory effects of plant extracts on activities of α -amylase and α -glucosidase. In: ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY SOCIETY, XLI, 2012, Foz do Iguaçu, **Anais...**, Foz do Iguaçu, PR, 2012.

CUNHA, A. L.; OLIVEIRA, L. G.; CARDOSO, F. V.; PERES, G. B.; MICHELACCI, Y. M., AGUIAR, J. A. K. Comparison of different methods for chondroitin sulfate quantification. In: ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY SOCIETY, XL, 2011, Foz do Iguaçu, **Anais...**, Foz do Iguaçu, PR, 2011.

CUNHA, A. L.; OLIVEIRA, L. G.; F. V.; PERES, G. B.; MICHELACCI, Y. M., AGUIAR, J. A. K. Pharmaceutical grade chondroitin sulfate analysis. In: ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY SOCIETY, XL, 2011, Foz do Iguaçu, **Anais...**, Foz do Iguaçu, PR, 2011.

CUNHA, A. L.; OLIVEIRA, L. G.; CARDOSO, F. V.; PERES, G. B.; MICHELACCI, Y. M., AGUIAR, J. A. K. Análise de insumo farmacêutico condroitim sulfato de sódio usado em farmácias de manipulação. In: SIMPÓSIO FARMACÊUTICO: ENSINO, PESQUISA E INOVAÇÃO, 2011, Juiz de Fora, **Anais...**, Juiz de Fora, MG, 2011.

REIS, E. S.; CARDOSO, F. V.; CUNHA, A. L.; SCIO, E.; AGUIAR, J. A. K. Inhibition of urease (*Canavalia ensiformis*) by methanol plant extracts. In: ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY SOCIETY, XL, 2011, Foz do Iguaçu, **Anais...**, Foz do Iguaçu, PR, 2011.

OLIVEIRA, L. G.; SANTOS, B. C.; CUNHA, A. L.; DUARTE, A. C.; CASTAÑÓN, M. C. M. N.; CHEBLI, J. M.; MICHELACCI, Y. M.; AGUIAR, J. A. K. Evaluation of the effects of chondroitin sulfate and glucosamine sulfated in an experimental model of ulcerative colitis in rats. In: ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY SOCIETY, XLI, 2012, Foz do Iguaçu, **Anais...**, Foz do Iguaçu, PR, 2012.

OLIVEIRA, L. G.; LOPES, C. B.; CUNHA, A. L.; DUARTE, A. C.; CASTAÑÓN, M. C. M. N.; CHEBLI, J. M.; AGUIAR, J. A. K. Evaluation of the effects of chondroitin sulfate and glucosamine sulfated in an experimental model of ulcerative colitis in rats. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON EXTRACELLULAR MATRIX AND INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EXTRACELLULAR MATRIX, XI and VI, 2011, Armação dos Búzios, **Anais...**, Armação dos Búzios, RJ, 2011.