

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RAFAEL GUZELLA DE CARVALHO

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTICOAGULANTE DE CONDROITIM SULFATO DE LULA**
Doryteuthis (Loligo) plei

JUIZ DE FORA

2015

Rafael Guzella de Carvalho

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTICOAGULANTE DE CONDROITIM SULFATO DE LULA
*Doryteuthis (Loligo) plei***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas - Área de concentração: Bioprospecção de Novos Fármacos.

Orientador: Prof. Dr^a. Valquíria Pereira de Medeiros

Coorientador: Prof. Dr. Jair Adriano Kopke de Aguiar

Juiz de Fora

2015

Carvalho, Rafael Guzella de.

Caracterização Estrutural e Avaliação da Atividade Anticoagulante de Condroitim Sulfato de Lula Doryteuthis (Loligo) plei / Rafael Guzella de Carvalho. -- 2015. 144 f. : il.

Orientadora: Valquíria Pereira de Medeiros
Coorientador: Jair Adriano Kopke de Aguiar
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2015.

1. Lula. 2. Condroitim sulfato. 3. Atividade anticoagulante. I. Medeiros, Valquíria Pereira de, orient. II. Aguiar, Jair Adriano Kopke de, coorient. III. Título.

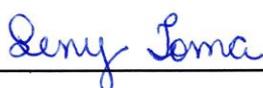
**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTICOAGULANTE DE CONDROITIM SULFATO DE LULA**
Doryteuthis (Loligo) plei

Rafael Guzella de Carvalho

Dra. Valquíria Pereira de Medeiros

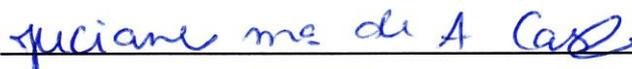
Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 23/07/2015



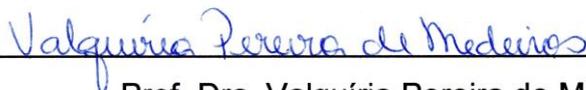
Prof. Dra. Leny Toma

Universidade Federal de São Paulo



Prof. Dra. Juciane Maria de Andrade Castro

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dra. Valquíria Pereira de Medeiros

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico este trabalho aos meus pais Nelson e Izabel, pelo carinho, amor, dedicação e o apoio que sempre me deram, tornando possível a conquista de mais um sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que em todos os dias durante esses dois anos jamais deixou que eu esmorecesse, dando sabedoria para lidar com os momentos difíceis;

Aos meus pais, por me apoiarem nos meus sonhos, fornecendo as condições necessárias para que eu conseguisse desenvolver minhas atividades durante ao mestrado;

Aos meus irmãos, pelo companheirismo, palavras de conselho e apoio nos momentos difíceis;

À Lívia, pelo carinho, amor, paciência e pelo apoio às minhas decisões;

Ao tio Cláudio e vó Maria pelo incentivo na busca contínua do conhecimento;

Ao Prof. Jair por ter ofertado as oportunidades em monitoria, treinamento profissional, iniciação científica, congressos e por ter proporcionado nesses dois anos um crescimento pessoal e profissional imensurável nos vários momentos de avaliação e discussão de resultados, desenvolvimento de colaborações e experimentos com novas técnicas;

À Prof^a. Valquíria, por ter abraçado a ideia do projeto, pelas oportunidades nas atividades de iniciação a docência, pelo suporte para a execução dos experimentos de coagulação e por sempre estar disposta a discussão dos resultados e proposição de novos ensaios;

Ao Dr. Ivarne e Dra. Kátia, por terem me recebido tão bem e disponibilizado as condições para o desenvolvimento dos experimentos com Lipossomos na Universidade de Mogi das Cruzes;

À Dra. Yara Michelacci, por ter aberto o laboratório da disciplina de biologia molecular da UNIFESP para realização dos experimentos de modificações químicas e caracterizações enzimáticas, além é claro das experiências compartilhadas;

Ao Dr. Giovanni e ao grande amigo Pedro, pela execução e informações compartilhadas nos experimentos de RMN;

À Dra. Lenize e Dr. Luiz Fernando, por todo suporte fornecido para os experimentos no Raman;

Aos professores do departamento de bioquímica, pelas experiências compartilhadas;

Ao Gustavo, pela realização dos ensaios anti-inflamatórios;

À Camila e Samara, pela realização dos ensaios anticoagulantes;

Ao André, pela hospedagem e auxílio nos experimentos em São Paulo;

Aos demais alunos do Laboratório por terem contribuído de alguma forma na execução dos experimentos;

Aos técnicos Delfino e Geraldinho, por compartilharem um pouco da vivência e experiência no setor público além é claro dos fatos da vida;

A todo povo brasileiro que com o pagamento de impostos auxilia no financiamento da pesquisa no Brasil;

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

“Mudam-se os tempos, mudam-se as vontades
Muda-se o ser, muda-se a confiança;
Todo o mundo é composto de mudança,
Tomando sempre novas qualidades.”

Luís de Camões

RESUMO

Glicosaminoglicanos (GAGs) são heteropolissacarídeos lineares ligados a um núcleo proteico dos proteoglicanos (PGs). Condroitim sulfato (CS) é GAG sulfatado composto por unidades dissacarídicas repetidas de ácido D-glucurônico e *N*-acetilgalactosamina, esse composto possui atividades biológicas associadas à interação com diferentes elementos da matriz. Estas ações têm sido relacionadas às suas características estruturais relativas ao elevado teor de grupos sulfato e carboxila que originam domínios estruturais que são conhecidos por participar de funções fisiológicas específicas. O presente trabalho teve por objetivo a identificação e caracterização estrutural dos GAGs extraídos de diferentes tecidos de lula (*Doryteuthis plei*) bem como a avaliação da atividade anticoagulante destes compostos. Para isso inicialmente determinamos a técnica de extração dos GAGs dos tecidos de manto, nadadeira, tentáculos e pele utilizando degradação com enzimas proteolíticas e purificação utilizando a técnica de cromatografia de troca iônica. Realizamos a identificação dos GAGs com degradações com liases específicas (chases AC e B de *F. heparinum*), em que ficou evidenciado que CS é o GAG majoritário dos tecidos de *D. plei*. Os CS encontrados tiveram peso molecular detectados na faixa de 30-50 kDa. A dosagem química de sulfato demonstrou que estes CS possuíam relação superior a 1,2 sulfato/hexosamina o que nos forneceu o indicativo que estas macromoléculas eram supersulfatadas. Este fato foi confirmado pela análise por *FACE* dos produtos da digestão de CS de manto e nadadeira com chase AC de *A. aurescens* em que a maior sulfatação foi relacionada à presença de alta proporção de resíduos di-sulfatados, $\Delta\text{Di}_{4,6}\text{S}$ ($\approx 55\%$). Técnicas espectroscópicas de Raman e RMN permitiram confirmar a maior substituição e sulfatação nas posições 4- e 6- da GalNAc, respectivamente. Os CS de manto e nadadeira ainda demonstraram atividade anticoagulante associada à inibição da via intrínseca da coagulação sendo detectada inibição dos fatores IIa e Xa. Desta forma concluímos que CS-E é o tipo de glicosaminoglicano constituinte nos tecidos de lula e que ele possui características tecido-específica, desempenhando sua atividade anticoagulante de acordo com o padrão de sulfatação.

Palavras chave: Lula, condroitim sulfato, atividade anticoagulante.

ABSTRACT

Glycosaminoglycans (GAGs) are linear heteropolysaccharides attached to a core protein of proteoglycans (PGs). Chondroitin sulfate (CS) is sulfated GAG composed of repeating disaccharide units of D-glucuronic acid and *N*-acetyl-galactosamine, this compound has biological activities associated to their interaction with different components of the extracellular matrix. These activities have been related to their structural characteristics due to the high content of sulfate and carboxyl groups originating structural domains which are known to participate in specific physiological functions. This aim of this study was the identification and structural characterization of glycosaminoglycans extracted from squid different tissues (*Doryteuthis plei*) as well as evaluation of the anticoagulant activity of these compounds. Initially, we determined the procedures GAGs extraction in mantle tissue, fin, tentacles and skin using degradation with proteolytic enzymes and purification using ion exchange chromatography. We carried out the identification of GAG to degradation with specific lyases (chases AC and B from *F. heparinum*), wherein we evidenced that CS is the principal GAG of the *D. plei* tissues. Molecular weight of CS had a range of 30-50 kDa. Quantification of sulfate groups demonstrated that these CS had higher ratio of sulfate/hexosamine (1.2), a indicative that these macromolecules were oversulfated. This fact was confirmed by FACE analysis of CS from mantle and fin after digestion with chase AC from *A. aurescens* where most sulfation was related to the presence of high proportion of di-sulfated residues, $\Delta\text{Di}4,6\text{S}$ ($\approx 55\%$). Raman spectroscopic and NMR techniques confirmed the increased substitution and sulfation in positions 4 and 6 of GalNAc, respectively. CS of the mantle and fin demonstrated anticoagulant activity associated with inhibition of the intrinsic coagulation pathway by inhibition of factors Xa and IIa. Thus, we conclude that CS-E is the kind of glycosaminoglycan constituent in squid tissues and it has tissue-specific characteristics, playing their anticoagulant activity according to the sulfation pattern.

Key words: Squid, chondroitin sulfate, anticoagulant activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema da Composição Típica de Diferentes Famílias de Glicosaminoglicanos.	24
Figura 2 – Estrutura Química dos Dissacarídeos que Constituem Diversos Tipos de Condroitim Sulfato e Dermatan Sulfato.	27
Figura 3 – Vias De Sulfatação de CS.	29
Figura 4 – Anatomia da Lula Loligo Macho.	33
Figura 5 – Via de Ativação de NF- κ B.	35
Figura 6 - Cascata de Coagulação.	37
Figura 7 – <i>Doryteuthis plei</i> .	42
Figura 8 – Lula <i>Doryteuthis (Loligo) Plei</i> e suas Regiões Anatômicas (A) Tentáculos e Pele; (B) Manto e Nadadeira.	56
Figura 9 – Eletroforese em Gel de Agarose em Tampão 1,3-Diaminopropano-Acetato (PDA) 0,05 M, pH 9,0 de Glicosaminoglicanos (GAG) extraídos de Tecidos De Lula.	57
Figura 10 – Eletroforese em Gel de Agarose em Tampão PDA 0,05 M (pH 9,0) de Frações Obtidas por Cromatografia de Troca-Iônica (<i>Q-Sepharose FF</i>) de Manto e Nadadeira em Escala Analítica.	60
Figura 11 – Eletroforese em Gel de Agarose em Tampão PDA 0,05 M (pH 9,0) de Frações Obtidas por Cromatografia de Troca-Iônica (<i>Q-Sepharose FF</i>) de Tentáculos e Pele em Escala Analítica.	61
Figura 12 – Eletroforese em Gel de Agarose em Tampão PDA 0,05 M (pH 9,0) de Cromatografia de Troca Iônica (<i>Q-Sepharose</i>) de Nadadeira em Escala Preparativa.	62
Figura 13 – Eletroforese em Gel de Agarose em Tampão PDA 0,05 M (pH 9,0) de Glicosaminoglicanos de Tecidos de Lula Purificados por Cromatografia de Troca Iônica (<i>Q-Sepharose FF</i>).	63
Figura 14 – Eletroforese da Degradação de GAGs de Lula Incubados com Condroitinases AC E B.	65
Figura 15 – Gel de Poliacrilamida para Peso Molecular de Amostras de CS de Lula.	66
Figura 16 – Gel de Poliacrilamida para Peso Molecular de Amostras de CS de Lula β -Eliminadas.	67
Figura 17 – Eletroforese em Gel de Agarose em Tampão PDA 0,05 M (pH 9,0) Condroitim Sulfato (CS) Extraído de Tecidos de Lula, Eluídos Com NaCl 2 M em Coluna de Troca-Iônica (<i>Q-Sepharose</i>).	68
Figura 18 – Espectro de Absorção em Ultravioleta das Quatro Amostras de Tecidos de Lula.	70
Figura 19 – Eletrofluorograma no Sistema Tris-Glicina (pH 8,8) de Produtos de Digestão de CS de Amostras de Lula por Condroitinase AC de <i>F. Heparinum</i> .	71

Figura 20 – Curva de Velocidade de Condroitinase AC <i>F. Heparinum</i> Incubada com Condroitim Sulfato Padrão e Condroitim Sulfato de Amostras de Lula.	73
Figura 21 - Eletroforese em Gel de Agarose em Tampão PDA 0,05 M (pH 9,0) de GAGs Extraídos de Tecidos de Lula após Purificação em Coluna de Q-Sepharose FF.	75
Figura 22 – Gel de Poliacrilamida para Peso Molecular de Amostras de CS de Tecidos De Lula.	77
Figura 23 – Eletrofluorogramas no Sistema Tris-Glicina de Produtos de Digestão de Condroitim Sulfato de Diferentes Origens por Condroitinase AC de <i>Arthrobacter aurescens</i> .	79
Figura 24 – Eletrofluorogramas no Sistema Tris-Glicina de Produtos de Digestão de Condroitim Sulfato de Diferentes Origens por Condroitinase AC de <i>Flavobacterium Heparinum</i> .	80
Figura 25 – Eletrofluorogramas no Sistema Tris-Glicina de Produtos de Digestão de Condroitim Sulfato de Diferentes Origens por Condroitinase ABC de <i>Proteus Vulgaris</i> .	82
Figura 26 – Eletrofluorogramas no Sistema Tris-Glicina de Produtos de Digestão de Condroitim Sulfato de Diferentes Origens por Condroitinase AC de <i>Flavobacterium Heparinum</i> (24h E 48h) e Adição de Condroitinase ABC de <i>Proteus Vulgaris</i> após Período de 24h.	84
Figura 27 – Eletrofluorogramas no Sistema Tris-Glicina de Produtos de Digestão de Condroitim Sulfato de Diferentes Origens por Condroitinase ABC de <i>Proteus Vulgaris</i> (24h e 48h) e Adição de Condroitinase AC de <i>Flavobacterium Heparinum</i> Após Período de 24h.	86
Figura 28 – Eletrofluorogramas no Sistema Tris-Glicina de Produtos de Digestão de Condroitim Sulfato de Diferentes Origens por Extrato Bruto de <i>Flavobacterium Heparinum</i> .	87
Figura 29 – Eletrofluorogramas no Sistema Tris-Glicina de Produtos de Digestão de Condroitim Sulfato de Lula por Condroitinase AC <i>Flavobacterium Heparinum</i> (24h e 48h) Adição de Condroitinase B de <i>Flavobacterium Heparinum</i> Após 24h. Produtos de Digestão de Condroitim Sulfato de Lula por Condroitinase B <i>Flavobacterium Heparinum</i> (24h e 48h) Adição de Condroitinase AC de <i>Flavobacterium Heparinum</i> Após 24h.	88
Figura 30 – Eletrofluorogramas no Sistema Tris-Glicina de Produtos de Digestão de Condroitim 4-Sulfato de Traquéia Bovina Por Condroitinase AC <i>Flavobacterium Heparinum</i> (24h E 48h) Adição de Condroitinase B de <i>Flavobacterium Heparinum</i> Após 24h. Produtos de Digestão de Condroitim 4-Sulfato de Traquéia Bovina por Condroitinase B <i>Flavobacterium Heparinum</i> (24h E 48h) Adição de Condroitinase AC de <i>Flavobacterium Heparinum</i> Após 24h.	89
Figura 31 – Espectro Raman de C4S Comercial e Suas Modificações.	91
Figura 32 – Espectro Raman de CS Padrão e CS de Lula.	93
Figura 33 – Espectro de ¹ H RMN de C4S, C6S, CS Manto, CS Nadadeira.	95
Figura 34 – Espectro de ¹³ C RMN de C4S, C6S, CS Nadadeira, CS Manto.	96

Figura 35 – Expansão de Espectro 2D ^1H ^{13}C de C4S Padrão.	97
Figura 36 – Expansão de Espectro 2D ^1H ^{13}C de C6S Padrão.	97
Figura 37 – Expansão de Espectro 2D ^1H ^{13}C de CS Manto.	98
Figura 38 – Expansão de Espectro 2D ^1H ^{13}C de CS Nadadeira.	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Rendimento da Extração de Glicosaminoglicanos em diferentes Tecidos de Lula <i>Doryteuthis Plei</i> .	58
Tabela 2 – Dosagens Químicas de CS de Lula.	69
Tabela 3 – Atividade de Condroitinase AC sobre Diferentes Substratos.	74
Tabela 4 – Porcentagem de Condroitim Sulfato de Nadadeira e Manto após Extração e Purificação.	76
Tabela 5 – Composição Química de Condroitim Sulfato de Diferentes Origens e Modificações.	77
Tabela 6 – Porcentagem Relativa de Produtos de Digestão de CS de Diferentes Origens por Condroitinase AC-II de <i>Arthrobacter aureescens</i> , Determinada por FACE Tris-Glicina.	79
Tabela 7– Porcentagem Relativa de Produtos de Digestão de CS de Diferentes Origens por Condroitinase AC de <i>Flavobacterium Heparinum</i> , Determinada por FACE Tris-Glicina	81
Tabela 8 – Porcentagem Relativa de Produtos de Digestão de CS de Diferentes Origens Por Condroitinase ABC de <i>Proteus Vulgaris</i> , determinada por FACE Tris-Glicina	83
Tabela 9– Porcentagem Relativa de Produtos de Digestão de CS de Diferentes Origens por Digestão com Condroitinase AC de <i>Flavobacterium Heparinum</i> e Condroitinase ABC de <i>Proteus Vulgaris</i> , Determinada por FACE Tris-Glicina.	85
Tabela 10- Porcentagem Relativa de Produtos de Digestão de CS de Diferentes Origens por Digestão com Condroitinase ABC de <i>Proteus Vulgaris</i> e Condroitinase AC de <i>Flavobacterium Heparinum</i> e, Determinada por FACE Tris-Glicina.	86
Tabela 11-Composição Química de Condroitim 4-Sulfato Comercial e suas Modificações.	90
Tabela 12- Bandas Raman e Atribuições Vibracionais de C4S, C6S, CS Manto, CS Nadadeira.	94
Tabela 13- Deslocamento Químico ^1H E ^{13}C (ppm) de Manto e Nadadeira e Comparativo com os Valores Correspondentes aos de Condroitim Sulfato Padrão da Literatura.	99
Tabela 14 – Atividade Anticoagulante dos CS de Manto e Nadadeira de <i>Doryteuthis plei</i> .	100
Tabela 15 – Teste aPTT.	100
Tabela 16 – Teste PT.	101

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
μ	micro
Abs	absorbância
Ac	acetato ou acetil
AMAC	2-aminoacridona
C4S	condroitim 4-sulfato
C6S	condroitim 6-sulfato
C4SS1	condroitim 4-sulfato sigma 1
C4SS2	condroitim 4-sulfato sigma 2

CCD	charged coupled device
CE	<i>capillary electrophoresis</i>
CETAVLON	brometo de <i>N</i> -cetil- <i>N,N,N</i> -trimetilamônio
Chase AC	condroitinase AC
Chase ABC	condroitinase ABC
CS	condroitim sulfato
CS-A	condroitim sulfato A
CS-B	condroitim sulfato B
CS-C	condroitim sulfato C
CS-D	condroitim sulfato D
CS-E	condroitim sulfato E
Di4,6S	Dissacarídeo 4,6-dissulfatado
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>
GAG	glicosaminoglicano
GAGs	glicosaminoglicanos
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

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
LPS	Lipopolissacarídeo
M	molar
NaCNBH ₃	cianoborohidreto de sódio
OARSI	<i>osteoarthritis research society international</i>
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PGs	proteoglicanos
Rf	fator de retenção
RMN	ressonância magnética nuclear
TCA	ácido tricloro acético
TLC	<i>thin layer chromatography</i>
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	unidades
USP	<i>The United States Pharmacopeia</i>
UV	ultravioleta
Xil	xilose

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	JUSTIFICATIVA	21
1.2	PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS	22
1.3	CONDROITIM SULFATO	26
1.3.1	ESTRUTURA	26
1.3.2	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE CONDROITIM SULFATO	30
1.3.3	AMBIENTE MARINHO E CONDROITIM SULFATO	31
1.4	LULA (<i>DORYTEUTHIS (LOLIGO) PLEI</i>)	32
1.5	ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE CONDROITIM SULFATO	34
1.5.1	PROCESSO INFLAMATÓRIO	34
1.5.2	HEMOSTASIA E COAGULAÇÃO	35
1.5.2.1	Hemostasia	35
1.5.2.2	Coagulação Sanguínea	36
1.5.2.2.1	Via Extrínseca ou Via do Fator Tecidual	37
1.5.2.2.2	Via Intrínseca Ou Via Do Contato	38
1.5.3	ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE CONDROITIM SULFATO	38
1.5.3.1	Atividade Anti-Inflamatória	38
1.5.3.2	Atividade Anticoagulante	40
2	OBJETIVOS	41
2.1	OBJETIVO GERAL	41
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1	MATERIAIS	42
3.1.1	LULAS	42
3.2	MÉTODOS	44
3.2.1	EXTRAÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS DOS TECIDOS DE LULA	44
3.2.2	PURIFICAÇÃO DOS GLICOSAMINOGLICANOS DE TECIDOS DE LULA	45
3.2.2.1	Purificação dos Glicosaminoglicanos com Cromatografia de Troca Iônica (Q-Sepharose)	45
3.2.2.2	β -Eliminação de Frações Purificadas em Coluna de Q-Sepharose	46
3.2.2.3	Dessalinização de Frações Purificadas por Cromatografia de Gel Filtração em Sephadex G-50	46
3.2.3	ANÁLISE DOS GLICOSAMINOGLICANOS DE TECIDOS DE LULA	46
3.2.3.1	Eletroforese	46
3.2.3.1.1	Eletroforese em Gel De Agarose Em Tampão PDA	46
3.2.3.1.2	Eletroforese em Gel De Poliacrilamida	47
3.2.3.1.3	Eletroforese de Carboidratos Assistidas por Fluoróforo – FACE	48
3.2.3.2	Caracterização Química	49
3.2.3.2.1	Dosagem de Ácido Urônico	49
3.2.3.2.2	Dosagem de Hexosamina	49

3.2.3.2.3	<i>Dosagem de Sulfato Inorgânico</i>	49
3.2.3.3	Caracterização Enzimática.....	50
3.2.3.3.1	<i>Degradação Enzimática</i>	50
3.2.3.3.2	<i>Análise da Digestão Enzimática</i>	51
3.2.3.4	Caracterização Espectroscópica e Espectrofotométrica.....	52
3.2.3.4.1	<i>Espectroscopia Raman</i>	52
3.2.3.4.2	<i>Ressonância Magnética Nuclear</i>	52
3.2.3.4.3	<i>Espectro De Absorção Em Ultravioleta</i>	53
3.2.4	MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DO CONDROITIM SULFATO	53
3.2.4.1	Carboxi-Redução do Condroitim Sulfato.....	53
3.2.4.2	Dessulfatação do Condroitim Sulfato.....	53
3.2.5	TESTES ANTICOAGULANTES IN VITRO	54
3.2.5.1	Atividade Anticoagulante -Método USP ,1965.....	54
3.2.5.2	Atividade Anticoagulante – Ensaios aTPP, TP E TT.....	54
3.2.5.3	Análise Da Atividade Anti-Fator XA e Anti-FATOR IIA.....	55
4	RESULTADOS	56
4.1	PARTE I- EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS DE DIFERENTES TECIDOS DE LULA.....	56
4.1.1	<i>EXTRAÇÃO DE GAGS DE DIFERENTES TECIDOS DE LULA</i>	57
4.1.2	<i>PURIFICAÇÃO DE GAGS EXTRAÍDOS DE TECIDOS DE LULA POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM Q-SEPHAROSE (FF)</i>	59
4.1.2.1	Escala Analítica.....	59
4.1.2.2	Escala Preparativa.....	62
4.1.3	<i>CARACTERIZAÇÃO DO GLICOSAMINOGLICANOS DE LULA</i>	64
4.1.3.1	Identificação por Degradação Enzimática.....	64
4.1.3.2	Determinação de Peso Molecular por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	65
4.1.3.3	Dosagens Químicas.....	68
4.1.3.4	Espectro De Absorção No Ultravioleta.....	69
4.1.3.5	Análise dos Produtos da Degradação de Condroitim Sulfato por Condroitinase AC.....	70
4.1.3.6	Monitoramento de Digestão Enzimática por Absorção em Ultravioleta (232nm).....	72
4.2	PARTE II- EXTRAÇÃO EM LARGA ESCALA E DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE CONDROITIM SULFATO DE NADADEIRA E MANTO.....	75
4.2.1	<i>PREPARAÇÃO EM LARGA ESCALA</i>	75
4.2.2	<i>DEGRADAÇÕES ENZIMÁTICAS E ANÁLISE DISSACARÍDICA</i>	78
4.2.3	<i>ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS</i>	89
4.2.3.1	Espectroscopia de Raman.....	90
4.2.3.2	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	94
4.3	PARTE III- ATIVIDADE ANTICOAGULANTE.....	100
5	DISCUSSÃO	103
6	CONCLUSÃO	110

REFERÊNCIAS	111
APÊNDICE	123

1 INTRODUÇÃO

1.1 JUSTIFICATIVA

Matriz extracelular (MEC), encontrada em tecidos animais, é uma estrutura complexa composta por diferentes macromoléculas que circundam e dão suporte às células. Seus principais componentes podem ser classificados em três grupos: (1) proteínas estruturais fibrosas, (ex. colágeno); (2) glicoproteínas não-colágenas multiadesivas, (ex. fibronectina); e (3) proteoglicanos e ácido hialurônico. Estas macromoléculas interagem na matriz formando agregados não-covalentes, que podem variar no tipo, na concentração destes constituintes e nas diferentes combinações que determinam as características físicas dos tecidos e muitas das propriedades biológicas das células nela mergulhadas.

Os proteoglicanos são importantes componentes da superfície celular e da MEC, e distintos proteoglicanos interagem com outros componentes da matriz, como colágeno, fibronectina, laminina, bem como fatores de crescimento e citocinas (IOZZO, 1998; . WOLANSKA & BANKOWSKI, 2004; SCHONHERR *et al.*, 2005). Estas interações são dependentes das cadeias de glicosaminoglicanos e podem afetar a proliferação, migração e diferenciação celular (MERLE *et al.*, 1999).

Os glicosaminoglicanos podem ser encontrados tanto em animais vertebrados quanto em invertebrados. Estudo de caracterização de glicosaminoglicanos em invertebrados conduzidos por Cássaro & Dietrich (1976) demonstra o quão ampla e diferente é a composição de GAGs dos tecidos nos animais analisados. As diferenças na concentração, perfil de sulfatação e epimerização têm sido correlacionados com as propriedades biológicas de GAGs como migração/adesão/diferenciação, funções neurorregulatórias, atividade anticoagulante e também a interação com proteínas específicas. Além desses fatores, a expressão de proteoglicanos apresenta relação temporal e espacial, podendo estar envolvida com a homeostase do tecido, modulando várias funções (LIMA *et al.*, 2012; MIKAMI & KITAGAWA, 2013; SUGAHARA *et al.*, 2003).

A ocorrência de CS-E (Di4,6S) em invertebrados foi originalmente descrita em cartilagem de lula (SUZUKI *et al.*, 1968). Diferentes PGs ricos em E-unidades foram identificados em mastócitos, células NK (*natural killer*) e em leucócitos de mamíferos (RAZIN *et al.*, 1982; STEVENS, 1986). Deve-se considerar que a proporção relativa destes dissacarídeos na mesma cadeia varia dependendo do tecido e espécie animal. Por isso passa a ser interessante verificar que tipos de ações CS-E de lula teria nos processos biológicos verificados em humanos, por exemplo.

Esses e outros estudos têm demonstrado o importante papel biológico dos proteoglicanos/glicosaminoglicanos no comportamento e desenvolvimento tecidual/celular em diferentes condições fisiopatológicas. Além da atividade biológica, vários grupos buscam evidências de atividade farmacológica destes compostos. Recentemente, nosso grupo descreveu ação anti-inflamatória de condroitim 4-sulfato em modelos experimentais de doenças inflamatórias intestinais e em modelo de colestase extra-hepática. (GUEDES, 2013; OLIVEIRA, 2012). Embora estudos da atividade farmacológica dos GAGs tenham sido intensificados, questões relevantes permanecem sem respostas. Por exemplo, qual a estrutura necessária (padrão de sulfatação) para exercer os efeitos farmacológicos? Qual é o mecanismo de ação?

Baseado nessas questões, o objetivo do presente projeto é analisar os tipos e a estrutura dos glicosaminoglicanos de matriz extracelular presentes em manto, nadadeira, tentáculos e pele de lula *Doryteuthis plei*, por métodos químicos, enzimáticos e espectroscópicos, bem como determinar sua atividade anticoagulante.

1.2 PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS

Proteoglicanos (PGs) são importantes componentes de matriz extracelular (MEC), sendo caracterizados como macromoléculas que possuem pelo menos uma cadeia de glicosaminoglicano (GAG) ligada covalentemente a um núcleo proteico (KJÉLLEN & LINDAHL, 1991).

Os PGs podem estar localizados na região intracelular, geralmente em grânulos secretórios como o serglicim, na superfície celular encontram-se os sindecans e glipicans. Na matriz extracelular intersticial estão presentes vários

outros PGs, como agregam e versicam (PGs de alto peso molecular), decorim e biglicam (PGs de baixo peso molecular) e na membrana basal encontramos o perlecam (IOZZO, 1998). Os PGs são encontrados em vários tecidos, sendo particularmente abundantes no tecido cartilaginoso articular no qual desempenham uma importante atividade de regulação osmótica associada à presença das cadeias de GAG hidrofílicas, mantendo-o altamente hidratado. A cartilagem possui uma composição importante para a sua propriedade de compressão, onde contém 70-75% (p/p) de água, alto teor de colágeno fibrilar (~20% p/p) e também uma elevada porcentagem de PGs (5-7% p/p) (SEIBEL *et al.*, 2006).

Os glicosaminoglicanos são polissacarídeos de cadeias longas lineares que consistem de unidades dissacarídicas repetidas, tipicamente são polidispersos tendo cadeias com tamanho médio de 10-50 kDa. As unidades dissacarídicas são constituídas por uma hexosamina (glucosamina ou galactosamina) e açúcar não nitrogenado (ácido D-glucurônico, ácido L-idurônico ou D-galactose), unidos entre si por ligações glicosídicas e 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 (BRIMACOMBE & WEBBER, 1964; JACKSON *et al.*, 1991).

A ligação dos GAGs sulfatados ao esqueleto proteico nos PGs, 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/treonina. A extremidade não redutora se liga à cadeia de GAG (IOZZO, 1998; SAMPAIO & NADER, 2006).

De acordo com o tipo de hexosamina, os GAGs podem ser divididos em galactosaminoglicanos, que incluem condroitins sulfato e dermatam sulfato, e em glucosaminoglicanos, a exemplo de heparam sulfato, heparina, queratam sulfato e ácido hialurônico. A hexosamina é sempre *N*-acetilada em condroitim sulfato, dermatam sulfato, ácido hialurônico e queratam sulfato, enquanto na heparina a glucosamina é geralmente *N*-sulfatada, e em heparam 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 queratam sulfato apresenta galactose. Já em dermatam sulfato, heparam

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 (MEYER, 1938; JEANLOZ, 1960; 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 apresenta as unidades mais frequentes de cada uma dessas famílias (ESKO, KIMATA & LINDAHL, 2009).

O número de grupamentos sulfato por unidade dissacarídica também é característico, sendo que heparam sulfato e heparina tendem a ser mais sulfatados que condroitim e dermatam sulfatos.

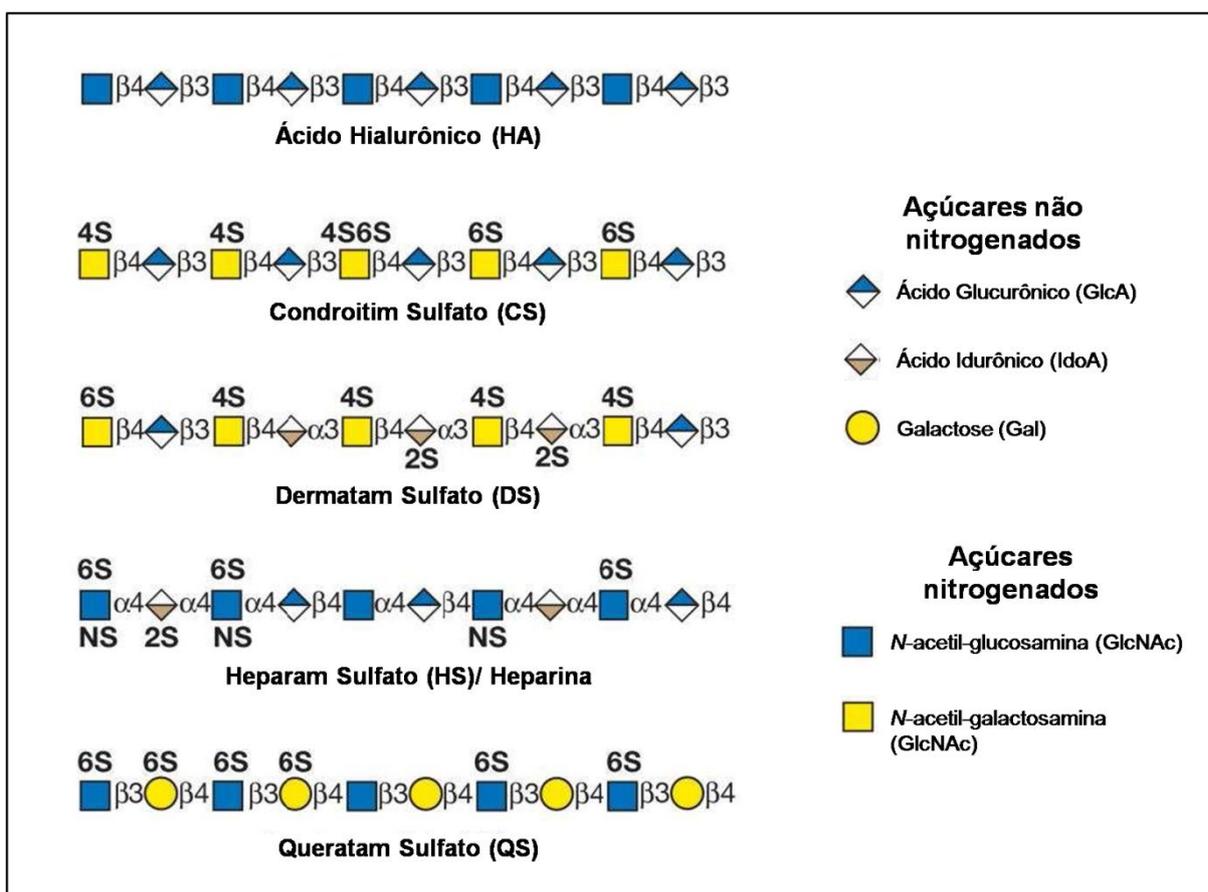


FIGURA 1. ESQUEMA DA COMPOSIÇÃO TÍPICA DE DIFERENTES FAMÍLIAS DE GLICOSAMINOGLICANOS. Fonte: Adaptado de ESKO, KIMATA & LINDAHL, 2009.

Os GAGs desempenham um papel crítico na sinalização de uma variedade de processos fisiológicos incluindo interação célula-célula, adesão célula-matriz,

proliferação celular, divisão celular, morfogênese, regulação e sinalização molecular (MIKAMI & KITAGAWA, 2013; SAMPAIO & NADER, 2006; SCOTT, 1992; SUGAHARA *et al.*, 2003, TAIPALE & KESKI-OJA, 1997).

Os GAGs são encontrados tanto em animais vertebrados quanto em invertebrados. Estudos pioneiros reportaram a diversidade estrutural de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato em vertebrados, em que foi demonstrado que cada tecido analisado possuía uma composição característica, diferindo entre si quanto à quantidade relativa, tipo e tamanho molecular dos GAGs constituintes, nesses estudos ainda foi visualizado que um mesmo tecido de diferentes vertebrados possuem em geral, o mesmo glicosaminoglicano (DIETRICH *et al.*, 1976; GOMES & DIETRICH, 1982; TOLEDO & DIETRICH, 1977). Em 1976, CÁSSARO & DIETRICH, publicaram o primeiro estudo sistemático da distribuição de GAG em todas as classes de invertebrados. Entretanto, somente a partir do isolamento e caracterização da especificidade de várias liases, sulfatases e glucuronidases bacterianas foi possível realizar a determinação estrutural dos diferentes GAGs. Novas tecnologias têm sido empregadas na determinação estrutural destes compostos, tais como, Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), Espectroscopia RAMAN e Eletroforese Capilar (EC). (DESAIRE & LEARY, 2000; MAINRECK *et al.*, 2010; MICHELACCI & DIETRICH, 1975; MICHELLACCI & DIETRICH, 1976; KARAMANOS *et al.*, 1994; MITROPOULOU & STAGIANNIS, 2004; VOLPI, 2007).

A biossíntese da complexa estrutura dos GAGs é regulada e os diversos padrões de sulfatação tem demonstrado uma relação tecido e organismo específica, podendo ainda ter alterações durante o crescimento e desenvolvimento. Mutações em muitos genes de enzimas biossintéticas de GAGs em vertebrados conduzem a severas consequências, indicando que a expressão de específicas estruturas sulfatadas de GAGs desempenham um papel importante na vida. (YAMADA, SUGAHARA & OZBEK, 2011).

1.3 CONDROITIM SULFATO

1.3.1 ESTRUTURA

Condroitim sulfato é um glicosaminoglicano formado por unidades dissacarídicas repetitivas de ácido D-glucurônico (GlcA) e *N*-acetil-galactosamina (GalNAc), unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow4)$, $[\rightarrow4\text{GlcA}\beta1\rightarrow3\text{GalNAc}\beta1\rightarrow]$. De acordo com a sulfatação dos dissacarídeos, diferentes tipos de condroitim sulfato são conhecidos. Os principais tipos de condroitim sulfato são classificados como condroitim 4-sulfato (C4S), ou condroitim sulfato A (CS-A), rico em dissacarídeos sulfatados na posição 4 da *N*-acetil-galactosamina (~65% Di4S) e condroitim 6-sulfato (C6S), ou condroitim sulfato C (CS-C), que possui essencialmente *N*-acetil-galactosamina sulfatada na posição 6 (~90% Di6S). O DS, conhecido anteriormente como CS-B, possui uma estrutura híbrida devido à modificação do resíduo de ácido glucurônico, envolvendo epimerização do C-5 para formar ácido idurônico. (LAMARI & KARAMANOS, 2006; VOLPI, 2007).

A proporção relativa dos dissacarídeos na cadeia de condroitim sulfato varia de acordo com o tecido e a 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 (85%) do dissacarídeo 6-sulfatado (MICHELACCI *et al.*, 1979; MICHELACCI & HORTON, 1989).

Em animais de origem marinha são encontrados também outros tipos de unidades dissacarídicas. O dissacarídeo E extraído de cartilagem de lula (CS-E) 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 (CS-D), apresenta dissacarídeos di-sulfatados na posição 2 do ácido glucurônico e 6 da *N*-acetil-galactosamina (VOLPI, 2007). No ambiente marinho, em caranguejos, dissacarídeos conhecidos como tipo K (CS-K), que

possuem sulfatação na posição 4 da GalNac e também são 3-O-sulfatados em GlcA (LAMARI & KARAMANOS, 2006; SUGAHARA & YAMADA, 2000).

A Figura 2 mostra a estrutura de dissacarídeos que formam os diferentes tipos de condroitim sulfato e dermatam sulfato.

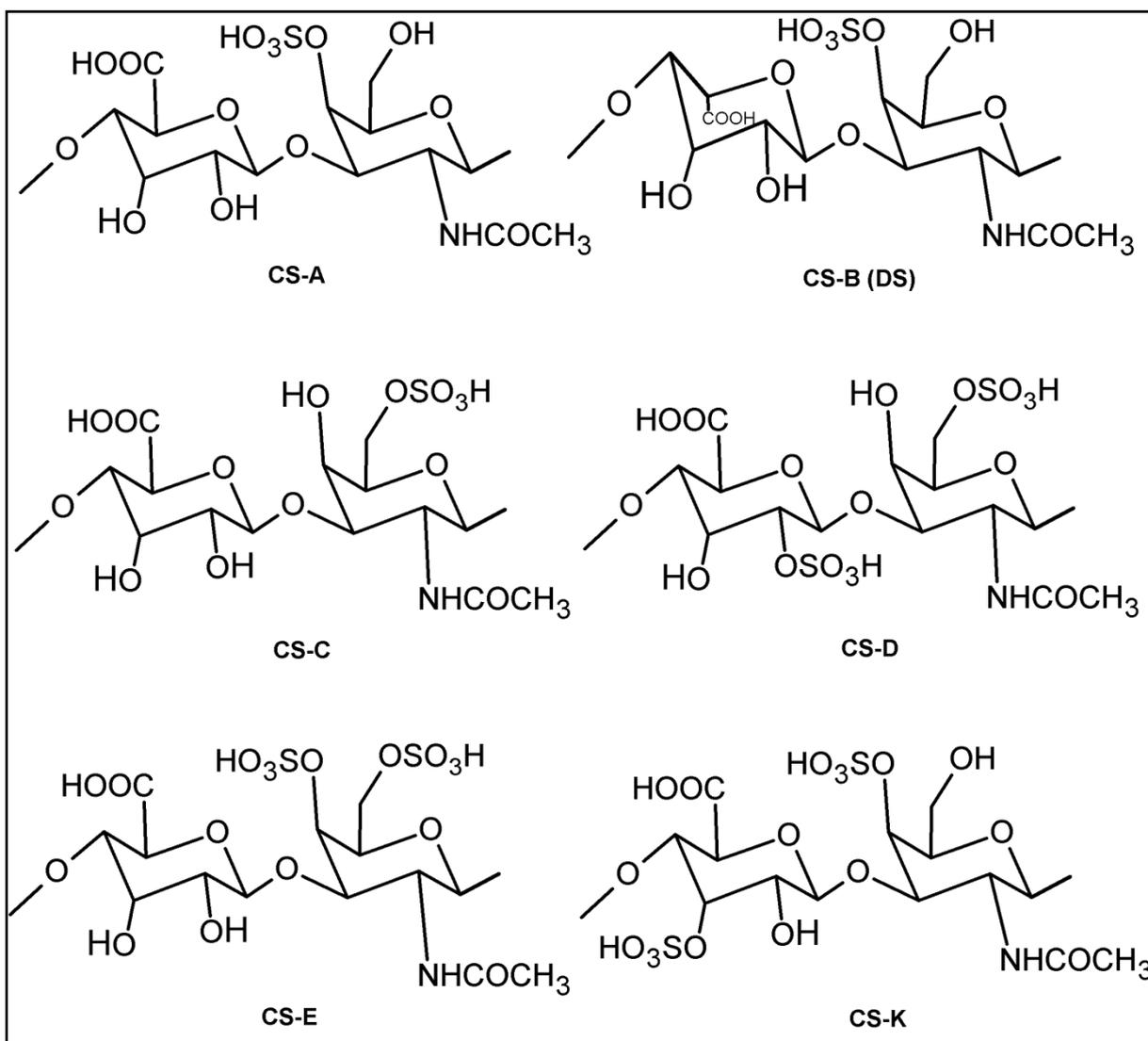


FIGURA 2. ESTRUTURA QUÍMICA DOS DISSACARÍDEOS QUE CONSTITUEM DIVERSOS TIPOS DE CONDRITIM SULFATO E DERMATAM SULFATO.

A heterogeneidade de estruturas do condroitim sulfato é responsável pelas mais diversas e 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 (STYLIANOU *et al.*, 2006; MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2008).

Diversas evidências indicam que as cadeias de CS desempenham importantes funções biológicas na inflamação, proliferação celular, diferenciação, migração, morfogênese de tecidos, organogênese, infecção e reparo tecidual, devido a sua capacidade de interagir com diversos compostos tais como moléculas de matriz, fatores de crescimento, inibidores de protease, citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e fatores de virulência, capacidade esta relacionada à grande densidade de cargas negativas, a suas longas cadeias e em domínios funcionais dependendo da combinação de dissacarídeos formadores (BANDTLOW, C.E. & ZIMMERMANN, 2000; GEMBA *et al.*, 2002; MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2008; VOLPI, 2011).

A compreensão abrangente dos mecanismos nos processos catabólicos e de biossíntese de CS são essenciais para o entendimento de suas funções no organismo. A biossíntese de CS inicia pela síntese da região de ligação GAG-proteína, $\text{GlcA}\beta 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4Xyl}\beta 1\text{-O-Ser}$, que é covalentemente ligada a resíduos específicos de serina inseridos em diferentes núcleos proteicos. A estrutura do tetrassacarídeo da região de ligação é montada por adição sequencial progressiva de unidades monossacarídicas: uma Xil (xilose), duas Gal (galactose) sucessivas, e um resíduo de GlcA, pelas correspondentes glicosil-transferases específicas, XilT (xilosiltransferase), GalT-I ($\beta 1,4$ -galactosiltransferase I), GalT-II ($\beta 1,3$ -galactosiltransferase II) e GlcAT-I ($\beta 1,3$ -glucuroniltransferase I), respectivamente. Após o término da formação do tetrassacarídeo da região de ligação, o primeiro resíduo de GalNAc é transferido para o terminal não-redutor do resíduo GlcA do tetrassacarídeo da região de ligação pela ação de GalNAc transferase I (GalNAcT I), desencadeando a síntese de CS. Em seguida resíduos de GlcA e GalNAc são alternadamente transferidos para as crescentes cadeias de CS pelas ações de enzimas GlcAT-II (glucuroniltransferase II) e GalNAcT-II (*N*-acetilgalactosaminiltransferase II) respectivamente. Glicosiltransferases com dupla atividade (glucuroniltransferase II e *N*-acetilgalactosaminiltransferase II) também têm sido descritas como responsáveis pela síntese das unidades dissacarídicas repetidas de CS, essas enzimas foram designadas como condroitim sintases (SILBERT & SUGAMARAN, 2002; PRYDZ & DALEN, 2000). Modificações destas cadeias crescentes de CS são realizadas por enzimas, tais como GlcA C5-epimerase e uma série de sulfotransferases, construindo a diversidade estrutural de CS. As sulfotransferases catalisam a transferência de um resíduo de sulfato de 3'-

fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (PAPS) para uma posição específica GalNAc, GlcA ou IdoA em CS/DS, formando desse modo padrões de sulfatação altamente heterogêneos. As sulfatações dos polímeros de CS podem compreender apenas GalNAc4S; somente GalNAc6S; tanto GalNAc4S e GalNAc6S no mesmo polissacarídeo e ainda GalNAc4,6S; GlcA 2- ou 3- sulfato e também GalNAc não sulfatada também podem ser formadas. No mecanismo de sulfatação de CS, uma unidade O não sulfatada é utilizada como um substrato aceitor comum de dois tipos de O-sulfotransferases, uma catalisa a sulfatação na posição 4 da GalNAc formando GalNAc4S e outra realiza 6-O-sulfatação dos resíduos de GalNAc, originando GalNAc6S. Subsequentes sulfatações das unidades A e C formadas também podem ocorrer formando dissacarídeos dissulfatados D e E (Figura 3) (BAENZINGER, 2003; ITO & HABUCHI, 2000; MIKAMI & KITAGAWA, 2013; SAMPAIO & NADER, 2006).

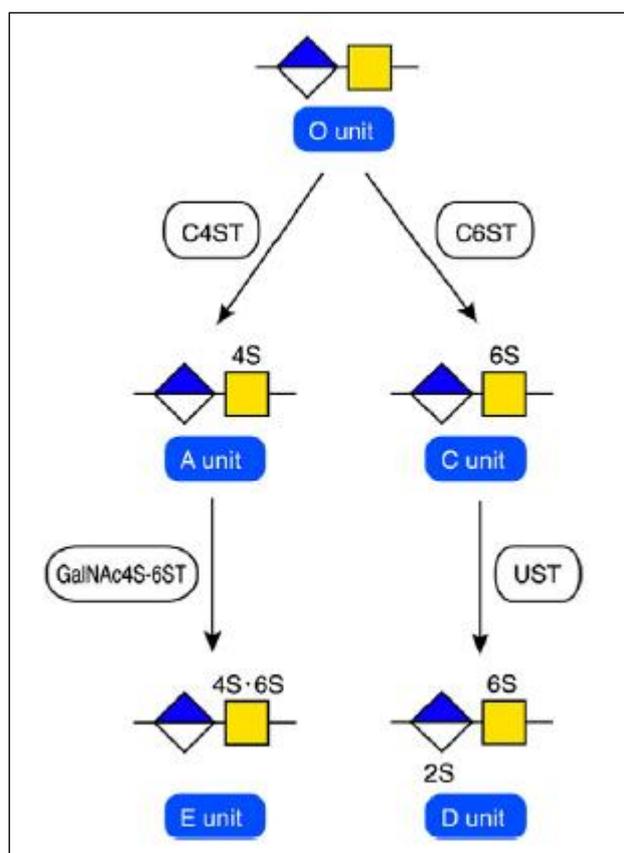


FIGURA 3. VIAS DE SULFATAÇÃO DE CS. Fonte: Adaptado de Mikami & Kitagawa, 2013.

1.3.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE CONDROITIM SULFATO

Em tecidos animais, o condroitim sulfato encontra-se associado a outros componentes da matriz extracelular, e para sua extração é necessário primeiramente realizar a digestão proteolítica do tecido utilizando 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 cartilaginosos (VOLPI, 2007).

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 ou 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 4,5-5,0 em porco). Por outro lado, condroitim sulfato de animais marinhos possui densidade de carga superior a 1,0 (pois apresenta também dissacarídeos di-sulfatados e até tri-sulfatados) e a razão 4S/6S varia de acordo com a espécie (VOLPI, 2004; VOLPI, 2007).

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 (TAMURA *et al.*, 2009; VOLPI, 2009).

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).

1.3.3 AMBIENTE MARINHO E CONDRITIM SULFATO

Mares e oceanos ocupam mais de 2/3 da superfície da Terra e abrigam quase todos os grupos de organismos vivos, incluindo representantes de 34 dentre os 36 filos descritos. Dessa forma os ecossistemas marinhos podem ser considerados como detentores da maior biodiversidade de filos, com potencial biotecnológico associado praticamente ilimitado (LOTUFO, 2009).

O ambiente marinho é muito mais diversificado que o ambiente terrestre, porém, devido às dificuldades de coleta de organismos, ainda é pouco conhecido. Durante muito tempo, o isolamento e a elucidação estrutural de produtos naturais marinhos, teve como objetivo, a obtenção de substâncias com atividades farmacológicas e o conhecimento de mecanismos biossintéticos existentes nos seres vivos (TEIXEIRA, 2009).

A partir da década de 90, muitos trabalhos têm surgido sobre microrganismos marinhos e organismos fitoplanctônicos, resultantes da descoberta da origem de substâncias biologicamente ativas em invertebrados marinhos. Muitas ações conhecidas de produtos naturais tóxicos de invertebrados foram objeto de estudos, e posteriormente, detectados serem microrganismos os seus reais produtores. Dentre os invertebrados marinhos as esponjas, os corais, os moluscos e, em menor escala equinodermos são fontes mais comuns de produtos naturais marinhos. Embora haja um surpreendente número de produtos naturais isolados de invertebrados marinhos, as inferências biológicas são cuidadosas, uma vez que essas substâncias têm sua origem em microrganismos ou na dieta alimentar. Dessa forma, necessita-se de estudos aprofundados para obtenção e elucidação de estruturas químicas complexas desses organismos vivos (TEIXEIRA, 2009).

Variações de cadeias de condroitim sulfato supersulfatado (CS-D, CS-E, CS-H e CS-K) caracterizadas por unidades dissacarídicas di- e tri- sulfatadas, foram originalmente descobertas em tecidos de organismos marinhos: cartilagem de

tubarão, cartilagem de lula, notocorda de mixinídeos e cartilagem de caranguejos, respectivamente. Os estudos realizados por Kawai e colaboradores (1966), foram os primeiros a identificar CS supersulfatado em tecidos de lula. Posteriormente vários trabalhos têm demonstrado a presença desses tipos de CS em diferentes espécies de lula e com diferentes proporções entre os tecidos constituintes. O CS supersulfatado obtido destes animais (CS-E) tem demonstrado interessantes atividades como: inibição de receptores *Midkine* que medeiam adesão celular em células neuronais e inibição da etapa de ligação de vírus a células T humanas na Leucemia Tipo 1 (JINNO-OUE *et al.*, 2013; UEOKA *et al.*, 2000). Willis & Kluppel (2014) demonstraram que CS-E é um regulador negativo de uma via pró-tumorogênica conhecida como Wnt/Beta-Catenina colágeno em linhagem de células mamárias cancerígenas. Ressalta-se ainda que os resultados recentes verificados quanto à atividade de CS-E foram particularmente evidenciados e restritos a este tipo de CS, não tendo outras isoformas de CS as mesmas respostas. Dessa forma cria-se novas expectativas quanto a bioprospecção desses CS supersulfatados e de suas possíveis atividades biológicas e farmacológicas associadas.

1.4 LULA (*DORYTEUTHIS (LOLIGO) PLEI*)

As lulas são moluscos marinhos inseridas no táxon dos cefalópodes. O corpo das lulas consiste de dez apêndices preênses e flexíveis (braços e tentáculos) dispostos em cinco pares em torno da cabeça. Os oito braços são curtos e espessos, mas o quarto par contado a partir do dorso do animal é formado por longos tentáculos retráteis. Possuem também manto, que consiste de uma camada espessa de músculos circulares, entremeada por músculos radiais menores. Os músculos envolvem a cavidade do manto e encontram-se entre túnicas de colágeno interna e externa, sendo empregados na locomoção ao lançar um jato de água pelo funil. As nadadeiras são componentes do aparato locomotor, permanecem em movimento constante para elevação dinâmica e fazem com que a lula permaneça em determinada posição na coluna d'água, evitando dessa forma que afunde. O tegumento desses cefalópodes é constituído por fina epiderme externa em contato com tecido conjuntivo subjacente que forma derme. A derme é composta de fibras

de colágeno, matriz e órgãos cromatóforicos abundantes. Além dos tecidos supracitados as lulas também possuem rádula, brânquias e vísceras (Figura 4) (RUPPERT *et al.*, 2005).

A lula *Doryteuthis (Loligo) plei* (Blainville, 1823) pertencente à família Lolignidae é um cefalópode endococleado, cujas conchas são ausentes. Pode ser encontrada desde a costa da Florida até o Rio Grande do Sul (RODRIGES, A. R., 2007 apud PEREZ *et al.*, 2005), ocorrendo em águas mais mornas, sendo sua distribuição, no sul do Brasil, frequentemente associada com a influência da Corrente do Brasil (HAIMOVICI & PEREZ, 1991). A pesca destes Lolignídeos apresenta importância crescente na costa Sudeste e Sul do Brasil, onde *L. plei*, é capturada comercialmente entre Cabo Frio (RJ) e Cabo de Santa Marta (SC), sendo a espécie mais importante dessa família na pesca dos Estados de Santa Catarina e São Paulo (PEREZ & PEZZUTO, 1998).

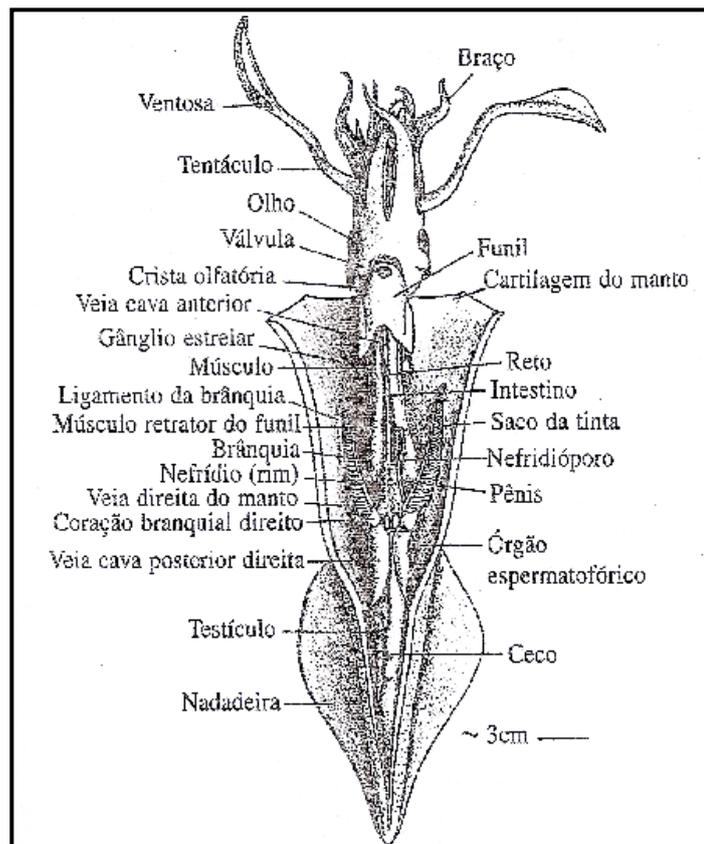


FIGURA 4. ANATOMIA DA LULA LOLIGO MACHO. VISTA VENTRAL COM O MANTO ABERTO LONGITUDINALMENTE AO LONGO DA LINHA MEDIANA VENTRAL, PARA REVELAR OS ÓRGÃOS NO INTERIOR DA CAVIDADE DO MANTO (por Mary Ann Nelson Adaptado de Ruppert *et al.*, 2005).

1.5 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE CONDROITIM SULFATO

1.5.1 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é uma resposta protetora iniciada pelo organismo após lesões causadas por danos físicos ou por infecções por microrganismos. Consiste de respostas locais ou sistêmicas, sendo processo essencial com as funções de eliminar fatores nocivos, promovendo o reparo tecidual e a cicatrização (VOLPI, 2011).

Tanto em infecções causadas por bactérias, protozoários, fungos ou vírus, quantos nos casos de danos teciduais, ocorre a ativação de receptores reconhecedores de padrão (PRRs) que levam a fosforilação e a ativação de diversas enzimas quinases extracelulares 1/2 reguladas por sinal (ERK 1/2), proteínas quinase p38 ativadas por mitógenos (p38MAPK) e quinases c-Jun NH₂-terminais (JNK) (BRADLEY, 2008; CINEL & OPAL, 2009).

As quinases ativadas neste processo fosforilam a quinase I κ B (IKK) que por sua vez fosforila e inativa o inibidor κ B α , responsável por reter o fator nuclear NF- κ B no citosol, liberando o mesmo e como consequência, este fator inicia sua translocação para o núcleo onde é responsável pela regulação da transcrição de genes envolvidos na inflamação, imunidade, apoptose, proliferação e diferenciação celular (ZHONG & KYRIAKIS, 2007) (Figura 5).

Como resultado da ligação do NF- κ B aos genes, há um aumento de diversas proteínas como interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral TNF- α e enzimas como óxido nítrico sintase (NOS2), ciclooxigenase 2 (COX-2), fosfolipase A2 (PLA2), metaloproteases de matriz extracelular (MMP-2) e MMP-9, por exemplo) e outras, todos os fatores que serão responsáveis pela reação inflamatória.

Segundo Villiers e outros (2010) há evidências de que a ativação do NF- κ B tem papel fundamental na patogênese de inúmeras doenças, se tornando assim um alvo de interesse para remissão do processo inflamatório.

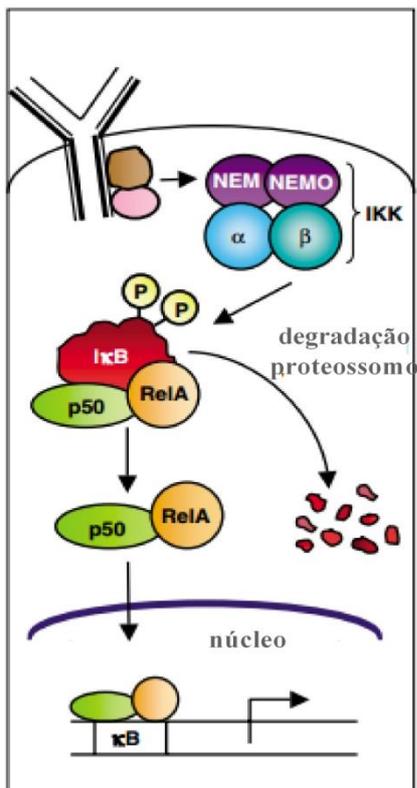


FIGURA 5. VIA DE ATIVAÇÃO DE NF- κ B. IKK: quinase que fosforila complexo I κ B; I κ B: proteína inibidora da ativação NF- κ B; p50 e Rel A: Subunidades de NF- κ B. Fonte: Adaptado de Gilmore, 2006.

1.5.2 HEMOSTASIA E COAGULAÇÃO

1.5.2.1 HEMOSTASIA

A hemostasia compreende uma série de mecanismos fisiológicos que devem ser regulados simultaneamente para contrapor a perda excessiva de sangue e evitar a formação de trombos vasculares. Desta forma o processo de formação do coágulo (pró-coagulação) deve estar em equilíbrio com os processos de parada de formação do coágulo (anticoagulação) e dissolução do coágulo (fibrinólise) (FRANCO, 2001; VOLPI 2007).

A lesão de um vaso leva a uma sequência de reações para tentar reparar a injúria. O processo de pró-coagulação resulta na produção de fibrina a partir de complexas interações entre proteases plasmáticas e seus cofatores, que culminam na gênese da enzima trombina, que por proteólise, converte o fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel. Ainda nesse processo ocorre a agregação plaquetária no local da lesão para conter a perda sanguínea. Alterações morfológicas que as plaquetas sofrem causam a liberação de compostos químicos contidos nelas, que auxiliam em outros aspectos do processo. Alguns desses compostos liberados aumentam a agregação plaquetária, outros causam vasoconstrição que visa retardar a perda sanguínea extravascular e diminuir o fluxo sanguíneo local e alguns são enzimas que ajudam diretamente na formação do coágulo. A etapa seguinte da hemostasia denominada anticoagulação, tem a finalidade de impedir a formação excessiva de coágulo. Finalmente, o processo de dissolução do coágulo ou fibrinólise ocorre quando o vaso lesado está suficientemente reparado (MURRAY, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2012).

1.5.2.2 Coagulação Sanguínea

Em 1964, dois grupos independentes propuseram o modelo clássico do sistema de coagulação (MACFARLANE, 1964; DAVIE & RATNOFF, 1964). Esse modelo descreve que a coagulação ocorre por meio de ativação proteolítica, sequencial de zimógenos, por proteases do plasma levando ao final a formação de trombina que catalisa a ativação de outros fatores além da formação de fibrina a partir de fibrinogênio, etapa essencial para formação do coágulo (DEVLIN, 2007). Essa sequência de reações envolve duas vias: a via intrínseca ou do fator de contato e a via extrínseca ou do fator tecidual. A Figura 6 mostra a representação das duas vias.

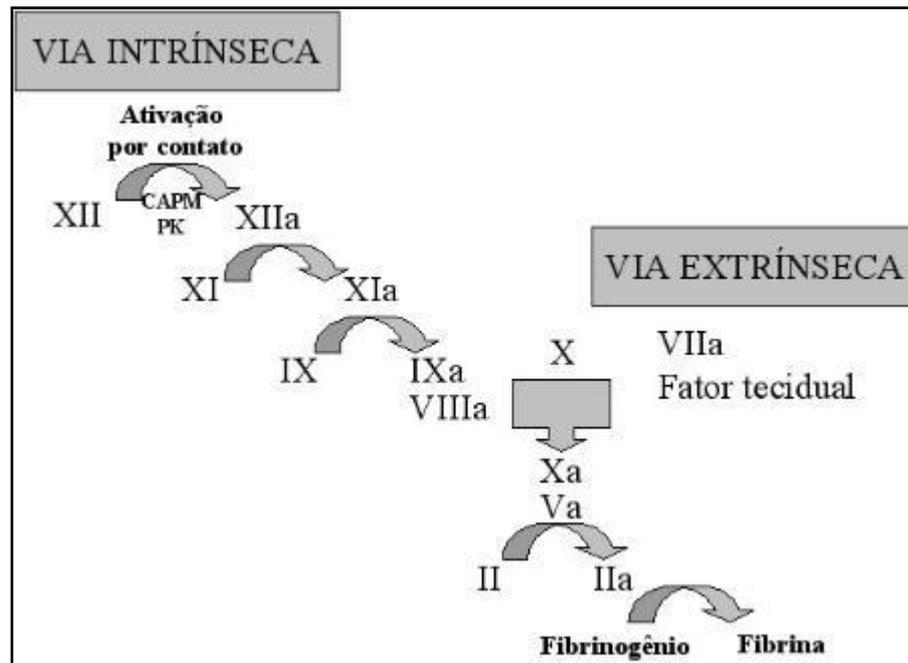


FIGURA 6. CASCATA DE COAGULAÇÃO. Fonte: Adaptado de Franco, 2001.

1.5.2.2.1 Via extrínseca ou via do fator tecidual

Esta via recebeu esta denominação após observarem que há um fator extrínseco ao sangue circulante que facilita a coagulação. Este fator foi identificado como fator tecidual (fator III) ou fator tissular (TF). Quando o fator tissular é exposto após uma lesão do vaso, o fator VII se liga na presença de cálcio, formando um complexo (FVII-Ca²⁺-TF) que inicia o processo de coagulação do sangue ativando o fator X. O fator Xa e o fator Va formam um complexo que catalisa a formação de trombina por proteólise da protrombina. A pequena quantidade de trombina formada catalisa a ativação dos fatores V, VII, VIII e XIII, além da formação de fibrina a partir de fibrinogênio (FRANCO, 2001; DEVLIN, 2007; MURRAY *et al.*, 2007).

1.5.2.2.2 *Via intrínseca ou via do contato*

Na via intrínseca, quando o endotélio está lesado, ocorre o contato do sangue com membranas aniônicas expostas, levando a ativação do fator XII e desencadeando a cascata de coagulação. Tal processo é denominado “ativação por contato” e requer ainda a presença de outros componentes do plasma: pré-caliceína (uma serinoprotease) e cininogênio de alto peso molecular (um cofator não enzimático). O fator XIIa ativa o fator XI, que, por sua vez, ativa o fator IX. O fator IXa, na presença de fator VIII, ativa o fator X da coagulação, desencadeando a geração de trombina e subsequente formação de fibrina (FRANCO, 2001; DEVLIN, 2007; MURRAY *et al.*, 2007).

1.5.3 ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE CONDROITIM SULFATO

1.5.3.1 Atividade Anti-inflamatória

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 à 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*”. 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).

Muitos trabalhos mostram o potencial farmacológico do CS para a inibição do processo inflamatório. A adição de diferentes doses de glicosaminoglicanos extraídos do plasma humano e condrócitos estimulados com LPS foi capaz de reduzir as citocinas inflamatórias e iNOS pelo bloqueio da ativação de NF-κB (CAMPO *et al.*, 2008). Em estudo conduzido em modelo animal foi verificado que condroitim-4-sulfato inibe a translocação de NF-κB e ativação de caspases em artrite induzida (CAMPO *et al.*, 2008). Jomphe e outros (2008) demonstram que o CS diminui a translocação de NF-κB induzida por IL-1β, além de inibir a fosforilação da p38MAPK e da ERK 1/2 induzida por essa mesma interleucina. Já Canãs e colaboradores (2010) que este GAG pode reduzir potencialmente a neuro-inflamação também por indução do NF-κB.

Apesar de todos os trabalhos mencionados ainda não é claro como CS gera esses efeitos. Foi mostrado que o condroitim sulfato é internalizado na célula por receptores como o receptor de hialuronam (HARE), CD36, CD34 entre outros. Entretanto, o mecanismo pelo qual o CS reduz a fosforilação da p38MAPK e da ERK1/2 e a translocação do NF-κB ainda não foi completamente elucidado (VALLIÉRES & SOUICH, 2010).

1.5.3.2 Atividade Anticoagulante

Nos processos de regulação da formação do coágulo, alguns inibidores naturais estão envolvidos, entre eles: antitrombina III (AT III), proteína C (PC), inibidor da via do fator tecidual (TFPI), cofator II da heparina (HCII), inibidor de protease dependente de proteína Z (ZPI) e ativador de plasminogênio tecidual (tPA) (DEVLIN, 2007).

Glicosaminoglicanos sulfatados, como heparina, dermatam sulfato e heparan sulfato obtidos de animais vertebrados e invertebrados, com diferentes composições e características estruturais apresentam atividade anticoagulante e antitrombótica relacionadas em modelos *in vivo* e *in vitro*. Heparina age como um composto anticoagulante porque forma um complexo ternário com antitrombina III (ATIII) e diferentes serino-proteases da cascata de coagulação. As características estruturais da interação envolvendo ATIII e heparina parecem estar bem estabelecidas (BOURIN & LINDAHL, 1993; McGEE *et al.*, 1995; NADER *et al.*, 2004). Diferentes CS têm sido testados para atividade anticoagulante, porém somente CS-E tem demonstrado esse potencial, que foi descrito associado à inibição de fatores da coagulação da via intrínseca (fator VIIIa/IXa) (McGEE *et al.*, 1995). Em estudo de Scully e colaboradores (1986), CS-E prolongou o tempo de trombina e potencializou a ação de inibidores das proteases plasmáticas como ATIII e HC II. Condroitim monosulfatado submetido a processo de O-sulfonação demonstrou atividade anticoagulante relacionada à inibição de fator Xa após modificação estrutural (MURUYAMA *et al.*, 1997). Em trabalho de Sakai e colaboradores (2000), CS-E induziu o aumento da ativação plasminogênio por t-PA, importante processo para fibrinólise do coágulo. O crescente interesse por compostos que possam ser alternativas a heparina tem intensificado os estudos de atividade anticoagulante e antitrombótica *in vivo* e *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo a identificação e caracterização estrutural dos glicosaminoglicanos extraídos de diferentes tecidos de lula (*Doryteuthis (Loligo) plei*) bem como a avaliação da atividade anticoagulante destes compostos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extração e identificação de GAGs presentes nos diferentes tecidos de lula *D. plei*;
- Identificar os GAGs constituintes utilizando liases específicas;
- Análise química dos GAGs obtidos de *D. plei*;
- Determinação da composição dissacarídica do GAG constituinte dos tecidos analisados utilizando a técnica de FACE;
- Executar análises espectroscópicas (RAMAN e RMN) para caracterização dos GAGs isolados do tecidos de lula;
- Realizar testes anticoagulantes, *in vitro*, de aPTT, PT e TT com condroitim sulfato de lula;
- Avaliar a influência do condroitim sulfato de lula sobre os fatores de coagulação (Xa e IIa).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 LULAS



Filo: Mollusca;

Classe: Cephalopoda;

Subclasse: Coleoidea;

Ordem: Teuthida;

Subordem: Myopsina;

Família: Loliginidae,

Espécie: *Doryteuthis plei*

FIGURA 7. *Doryteuthis plei*

Espécimes de lulas foram obtidos em diferentes distribuidoras de pescados das cidades de Juiz de Fora e de Ubá. Os animais foram identificados e classificados taxonomicamente pelos professores MSc. Gilson Alexandre de Castro (Depto. Zoologia, UFJF) e prof. Dr. Manuel Haimovici (Depto. de Oceanografia, UFRGS). Após a confirmação taxonômica, os animais foram segregados nas seguintes regiões anatômicas: manto, nadadeira, tentáculos e pele. Após pesagem, os tecidos foram mantidos a -20°C até serem utilizados para extração de GAGs analisados nesse trabalho.

- **Glicosaminoglicanos:** condroitim 4-sulfato de traquéia bovina, ácido D-glucurônico, N-acetil-D-glucosamina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Condroitin 6-sulfato de cartilagem de tubarão foi obtido da Seikagaku Kogyo Co. Ltd. (Tóquio, Japão). Dissacarídeos insaturados de condroitim sulfato/dermatam sulfato $\Delta\text{Di}0\text{S}$, $\Delta\text{Di}4\text{S}$, $\Delta\text{Di}6\text{S}$, foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Dissacarídeos insaturados de condroitim sulfato/dermatam sulfato $\Delta\text{Di}4,6\text{S}$ 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.

•**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 obtidas 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 ISO FAR Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda. (Duque de Caxias, RJ, Brasil).

•**Condroitinases:** *Flavobacterium heparinum* (ATCC nº 13.125), *American Type Culture Collection* (Rockville, MD, EUA). Desruptor de célula ultra-sônico, Unique (Indaiatuba, SP, Brasil). Caldo tripton de soja sem dextrose e Bacto Agar foram obtidos 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). As condroitinases AC de *Arthrobacter aureescens* e ABC de *Proteus vulgaris* (Sigma-Aldrich Co.; St. Louis, MO, EUA), AC de *Flavobacterium heparinum* e Extrato bruto de *Flavobacterium heparinum* foram gentilmente cedidos pelo Prof^a. Dr^a. Yara Maria Corrêa da Silva Michelacci da Universidade Federal de São Paulo.

•**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'*-tetrametiletlenodiamina (TEMED), glicina foram adquiridas de 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).

- **Outros reagentes:** Resina *Q-Sepharose High Performance* e *Sephadex G50* foram adquiridas da GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Suécia). Outros reagentes utilizados de uso comum no laboratório foram de grau analítico.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 EXTRAÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS DOS TECIDOS DE LULA

Para a extração de glicosaminoglicanos, os tecidos de lula selecionados (nadadeira, manto, tentáculos e pele), foram picotados em pequenos fragmentos de aproximadamente 1 mm e submetidos à proteólise com maxatase (E.C. 3.4.21.62) (2 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 9), na proporção de 1 mL de solução da enzima para 5g de tecido ou papaína (E.C. 3.4.22. 2) (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 24 horas a 60°C, ácido nucléicos e proteínas foram precipitados pela adição de ácido tricloroacético (TCA 10%), em presença de NaCl 1 M. Após 10 minutos em banho de gelo, o precipitado formado foi removido por centrifugação (3.000 X g, 15 minutos). Ao sobrenadante foram adicionados, lentamente e sob agitação, 2,5 volumes de etanol para precipitação de glicosaminoglicanos. Após 24 horas a -20°C, o precipitado foi coletado por centrifugação (3.000 X g, 15 minutos) e seco à vácuo.

3.2.2 PURIFICAÇÃO DOS GLICOSAMINOGLICANOS DE TECIDOS DE LULA

3.2.2.1 Purificação dos Glicosaminoglicanos com Cromatografia de Troca-Iônica (Q-Sepharose)

Foi realizada purificação dos extratos obtidos por cromatografia de troca-iônica (*Ion Exchange Chromatography – IEC*) em resina de *Q-Sepharose Fast Flow (FF)* em escala analítica e preparativa.

- **Escala analítica:** Amostras (10 mg) foram solubilizados em água destilada (1 mg/mL). As soluções foram aplicadas na coluna de *Q-Sepharose* (1 mL de resina) previamente equilibrada. A coluna foi lavada com 3 volumes de água destilada e a eluição foi realizada em “*step wise*” com 3 volumes de soluções de NaCl em concentrações crescentes (0,5 a 2 M - com incrementos de 0,1M), em um total de 16 frações de 3 mL. Essas frações foram precipitadas com 2,5 volumes de etanol em NaCl 1 M. Após 24 horas a -20°C, o precipitado de cada fração foi coletado por centrifugação (3.000 X g, 15 minutos) e seco à vácuo, sendo ressuspenso em 100 µL de água e analisado por eletroforese em gel de agarose tampão PDA, como descrito em método 3.2.3.1.1.
- **Escala preparativa:** Amostras (200 mg) foram solubilizadas em água destilada (1 mg/mL). As soluções foram aplicadas na coluna de *Q-Sepharose* (20 mL de resina) previamente equilibrada. A coluna foi lavada com 3 volumes de água destilada e a eluição realizada com 3 volumes de soluções de NaCl 0,5 e 2 M em um total de 2 frações de 60 mL. Essas frações foram precipitadas com 2,5 volumes de etanol em NaCl 1 M. Após 24 horas a -20°C, o precipitado de cada fração foi coletado por centrifugação (3.000 X g, 15 minutos) e seco à vácuo.

3.2.2.2 β -eliminação de Frações Purificadas em coluna de Q-Sepharose

Alíquotas das frações NaCl 2 M (1mg/mL) de amostras de lula purificadas em coluna de *Q-Sepharose* foram incubadas com solução de Hidróxido de sódio 0,15 M a 37°C por 48 horas. Após este período as amostras foram neutralizadas (pH 7,0), com HCl 1 M e precipitadas com 2,5 volumes de metanol em NaCl 1M. O material precipitado foi centrifugado a 3000 rpm, seco a vácuo, sendo analisado em Eletroforese em Gel de Agarose em tampão PDA e Eletroforese de Peso Molecular como descrito abaixo.

3.2.2.3 Dessalinização de Frações Purificadas por Cromatografia de Gel Filtração em Sephadex G-50

Alíquotas das frações NaCl 2 M (10 mg/mL) de amostras de lula purificadas em por cromatografia de troca-iônica em *Q-Sepharose* foram dessalinizadas por cromatografia de gel filtração em Sephadex G-50 (10 mL). Após aplicação das alíquotas na coluna, estas foram eluídas com 10 mL de solução de ácido acético 5%, posteriormente a fração recolhida foi liofilizada.

3.2.3 ANÁLISE DOS GLICOSAMINOGLICANOS DE TECIDOS DE LULA

3.2.3.1 Eletroforese

3.2.3.1.1 Eletroforese em Gel de Agarose em Tampão PDA

Glicosaminoglicanos extraídos dos tecidos de lula foram analisados por eletroforese em gel de agarose (0,5%) em tampão 1,3-diaminopropano (PDA)

0,05 M, pH 9,0 (DIETRICH & DIETRICH, 1976). Uma mistura padrão de glicosaminoglicanos (5 μ L), contendo condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, na concentração de 1 mg/mL cada, foi aplicada às lâminas como controle. A corrida eletroforética foi realizada em câmara refrigerada, submetida a uma diferença de potencial 100 V, por aproximadamente 1 hora. Após a corrida, o gel foi submerso em solução de brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON) 0,1%, por 2 horas. Após esse período o gel foi seco em 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%. O gel foi digitalizado e os glicosaminoglicanos quantificados por densitometria usando o programa TotalLab TL120 1D v 2009 (Nonlinear Dynamics Ltd.).

3.2.3.1.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Análise do peso molecular em amostras de glicosaminoglicanos extraídos de tecidos de lula foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida adaptado como por Hilborn & Anastassiadis (1971) e modificado por Dietrich & Nader (1974).

Alíquotas (20 μ g) serão ressuspensas em 10 μ L 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 digitalizado e submetido à análise densitométrica pelo programa TotalLab TL120 1D v 2009 (Nonlinear Dynamics Ltd.)

3.2.3.1.3 Eletroforese de Carboidratos Assistidas por Fluoróforo – FACE

FACE foi realizada em sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN Tetra Cell com lâminas de 7,2 cm com espaçadores de 0,75. A corrida eletroforética foi realizada em gel de acrilamida-bisacrilamida 25%, preparados em sistema-tampão de Tris-glicina. Nesse sistema tampão o gel foi preparado em tampão Tris-HCl, e como tampão de corrida foi usado Tris-glicina (OONUKI, 2005).

Gel 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%; 1,5 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 preparado 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.

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. 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. O sistema foi submetido a uma diferença de potencial de 100 V, que após cerca de 20 minutos foi aumentada para 220 V. A migração dos sacarídeos derivatizados foi acompanhada durante a corrida usando luz UV_{320-400nm} (luz negra). Após a corrida, as placas foram lavadas com água destilada e as imagens digitalizadas em *GelDoc-It Imaging System* (transluminador UV com filtro em 365 nm e Câmera *scientific grade* CCD GelCam 310), em diferentes tempos de exposição.

3.2.3.2 Caracterização Química

3.2.3.2.1 Dosagem de Ácido Urônico

Para dosagem de ácido urônico nas amostras foi realizado o método de Di Ferrante (1971). Em tubo contendo 50 µg de amostra (volume final de 250 µL) foram adicionados 2,5 mL do reagente de borato (tetraborato de sódio 0,4% em ácido sulfúrico), seguido de 100 µL de solução de carbazol 0,1% em etanol. Os tubos foram agitados cuidadosamente em vórtex e aquecidos em banho fervente por 15 minutos. A leitura da absorbância das amostras foi realizada em 525 nm e os valores de ácido urônico foram calculados.

3.2.3.2.2 Dosagem de Hexosamina

A dosagem de hexosamina foi conduzida conforme método modificado por Rondle & Morgan (1955). A hidrólise do material foi realizada com HCl 6M em estufa a 100°C por 4 horas com posterior secagem e neutralização à vácuo em presença de NaOH. As amostras foram ressuspensas em água e foi adicionado o reagente de acetilacetona. Após incubação (100°C, 20 min.) sob pressão, o reagente de Ehrlich foi adicionado. A leitura da absorbância das amostras foi realizada a 530 nm e os valores de hexosamina foram calculados por meio de curva padrão com *N*-acetilglucosamina.

3.2.3.2.3 Dosagem de Sulfato Inorgânico

A dosagem de sulfato ocorreu como proposto por Dodgson (1961). Foi realizada a hidrólise do material com HCl 8M em estufa a 100°C por 6 horas. Posteriormente o material foi evaporado em tubos de 5 mL e secos à vácuo sob

NaOH para neutralização. Às amostras foram adicionados 1,4 mL de água e 0,5 mL do reagente de gelatina-BaCl₂ (0,5% gelatina, 0,5% BaCl₂). As leituras de absorvância das amostras foram realizadas a 500 nm e os valores de sulfato calculados por meio da curva padrão de sulfato de sódio.

3.2.3.3 Caracterização Enzimática

3.2.3.3.1 Degradação Enzimática

Degradações enzimáticas com condroitinases AC e B de *Flavobacterium heparinum*, AC de *Arthrobacter auresens* e ABC de *Proteus vulgaris* foram realizadas como descrito (YAGAMATA *et al.*, 1968; MICHELACCI & DIETRICH, 1975; CÁSSARO E DIETRICH 1977; JANDIK *et al.*, 1994; AGUIAR *et al.*, 2003).

Alíquotas de 10 µL (10 mg/mL) de cada amostra de lula foram incubadas com 10 MIL condroitinase AC e B de *Flavobacterium heparinum* à 37 °C e com 10 mUE condroitinases AC de *Arthrobacter aurescens* e ABC de *Proteus vulgaris* à 37 °C nos períodos de 24 h e 48 h. Após o período de incubação, as enzimas foram inativadas em banho fervente (100 °C) por 10 minutos. Alternativamente, misturas de incubação contendo combinações de enzimas foram realizadas.

Alíquotas das incubações com Chase AC e B de *Flavobacterium heparinum* contendo 20 µg de GAG foram secas a vácuo, ressuspensas em água destilada (2 mg/mL) e analisadas por eletroforese em gel de agarose em tampão PDA com já descrito. Incubação controle com os volumes específicos de cada amostra e 10 µL de água também foi realizada.

Outras análises das digestões enzimáticas e da composição dissacarídica do GAG obtido e de CS padrão foram avaliados pelos métodos descritos abaixo.

3.2.3.3.2 Análise da Digestão Enzimática

3.2.3.3.2.1 Método 1- Monitoramento de Digestão Enzimática por Absorção em UV₂₃₂

Misturas de incubação contendo 100 µg de substrato, 10 µL de Chase AC de *Flavobacterium Heparinum* e tampão Tris-acetato 0,05 M, pH 8,0, para volume final de 1 mL, foram preparadas e transferidas para cubetas de quartzo. A variação de absorbância a 232 nm foi monitorada em espectrofotômetro com câmara de temperatura controlada (30°C) (Evolution 160 UV-Vis, da Thermo Fisher Scientific), por 15 minutos em intervalo de 3 segundos.

A atividade da Chase AC, 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 µmol de dissacarídeo insaturado por minuto.

3.2.3.3.2.2 Método 2- FACE de Produtos de Degradação de Glicosaminoglicanos por Condroitinase AC

Diferentes misturas de incubação contendo 100 µg de substrato e Condroitinases AC (20 µL), B (20 µL) e extrato bruto (5 µL) de *F. Heparinum* e também com Chases AC (5 µL) de *A. aurescens* e ABC (5 µL) de *P. vulgaris* foram preparadas. Após período de 24 h e 48 h de incubação à temperatura ambiente ou a 37° C, as enzimas foram inativadas em banho fervente por 10 minutos. Alíquotas contendo 20 µg das amostras foram secas à vácuo e derivatizadas com AMAC. O procedimento geral para derivatização de amostras e padrões submetidas à degradação com condroitinases foi realizado como descrito a seguir: alíquotas contendo 20 µg de CS (40 nmol) foram secas a vácuo e derivatizados com 5 µL de solução de AMAC 20 mM (100 nmol). Após 15 minutos em temperatura ambiente foram adicionados 5 µL de solução recém-preparada de cianoborohidreto de sódio

1 M. Essa mistura de derivatização foi mantida em banho a 37 °C por 16 horas, quando então foram adicionados 5 µL de glicerol 60%. Alíquotas das amostras derivatizadas (2 µL) foram então analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) ou congeladas a -80°C para posterior análise.

3.2.3.4 Caracterização Espectroscópica e Espectrofotométrica

3.2.3.4.1 Espectroscopia Raman

Espectros de Raman foram obtidos utilizando o instrumento Bruker RFS 100 operando a 1064nm, em 100 mW de potência de laser e realizando leituras de 3500-200 número de onda/cm. A execução dos experimentos foi realizada no Núcleo de Espectroscopia do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora sob orientação do Prof. Luiz Fernando Cappa de Oliveira e da Dr^a Lenize Fernandes Maia.

3.2.3.4.2 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de GAG de lula, C4S e C6S padrões foram realizados a 25 °C utilizando espectrômetro Bruker (¹H 500 MHz, ¹³C 125 MHz). As amostras (50 mg) utilizadas nas análises foram previamente submetidas à liofilização e posteriormente solubilizadas em 0,5 mL de óxido de deutério. Os deslocamentos químicos em ppm dos espectros ¹H foram mensurados para D₂O como padrão (δ = 4.79 ppm). Os Espectros de ¹³C foram obtidos com uma configuração 30000 scans e 1,4-dioxano foi usado como padrão (δ = 67.40). Espectros de duas dimensões foram registrados usando a programação Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC) e a programação Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC). Os experimentos foram executados no Núcleo de Química Orgânica do Instituto de

Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora sob orientação do Prof. Giovanni Wilson Amarante e do mestrando Pedro Pôssa de Castro.

3.2.3.4.3 Espectro de Absorção em Ultravioleta

Espectro de varredura no ultravioleta (190-400 nm, 600 nm/s) foi realizado em espectrofotômetro (Evolution 160 UV-Vis, da Thermo Fisher Scientific) equipado com células termoestabilizadas, com soluções 1 mg/mL de cada material. O gráfico de absorvância (Abs) vs comprimento de onda de cada amostra será comparado com o padrão de referência.

3.2.4 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DO CONDRITIM SULFATO

3.2.4.1 Carboxi-redução do Condroitím Sulfato

A redução dos grupamentos carboxílicos dos ácidos urônicos de CS foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Taylor e colaboradores (1972). O método consiste em converter os ácidos urônicos a lactonas ou ésteres intramoleculares por meio da adição de carbodiimida para formação de lactonas e adição de borohidreto de sódio (NaBH₄) para redução a álcool, a reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄, e o material dializado e liofilizado.

3.2.4.2 Dessulfatação do Condroitím Sulfato

A molécula de Condroitím Sulfato (CS) foi dessulfatada por técnica descrita por Kantor & Schubert (1956). Nessa reação condroitim sulfato é dessulfatado por adição de HCl-Metanol. O resíduo obtido é coletado por centrifugação, dissolvido em

água e dialisado contra água corrente. Posteriormente o material dialisado foi liofilizado.

3.2.5 TESTES ANTIGOAGULANTES *IN VITRO*

3.2.5.1 Atividade Anticoagulante - Método USP ,1965

As amostras utilizadas para o teste foram secas a vácuo e ressuspensas em solução de cloreto de sódio (NaCl 0,9%). Posteriormente foram incubadas com plasma de carneiro a 37 °C por 3 minutos, após este período adicionou-se cloreto de cálcio 1%, permanecendo por mais 1 hora em banho a 37°C. Transcorrido o período de incubação a atividade anticoagulante foi avaliada pelo aspecto do plasma.

3.2.5.2 Atividade Anticoagulante – Ensaios aTPP, TP e TT

Os ensaios de tempo de tromboplastina parcial ativada (aTPP), tempo de protrombina (TP) e o tempo de trombina (TT) foram realizados seguindo o protocolo fornecido pelos “kits” comerciais adquiridos (Labtest) utilizando o plasma citratado de carneiro. Foi verificada, através desses ensaios, a massa de cada fração de GAGs necessária para prolongar duas vezes o tempo normal de coagulação. A heparina (165UI) foi utilizada como anticoagulante padrão. O tempo de coagulação foi determinado utilizando um coagulômetro Cascade–M (**Helena Laboratories, Company**).

3.2.5.3 Análise da Atividade Anti-Fator Xa e Anti-Fator IIa

Atividade anti-Xa e anti-IIa foi realizada através de métodos cromogênicos, utilizando “kits” da empresa American Diagnostica (Actichrome® Heparin anti-fXa e Actichrome® Heparin anti-fIIa, Greenwich, CT, USA) com pequenas adaptações. A heparina (165UI) foi utilizada como padrão.

4 RESULTADOS

4.1 PARTE I- EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS DE DIFERENTES TECIDOS DE LULA

Espécimes (10) de lula (*Doryteuthis (Loligo) plei*) (Figura 8), obtidas em diferentes casas de pescados da cidade de Juiz de Fora e de Ubá (MG) e submetidas à confirmação taxonômica pelos professores MSc. Gilson Alexandre de Castro (Depto. Zoologia,UFJF) e Dr. Manuel Haimovici (Depto. de Oceanografia, UFRGS) foram selecionados para extração e caracterização de glicosaminoglicanos em seus diferentes tecidos. Para isso, os animais foram lavados com água destilada para remoção de sujidades e dissecados em quatro regiões anatômicas distintas: manto, nadadeira, tentáculos e pele (Figura 8-A e 8-B). Vísceras, cabeça e quilha foram descartadas.

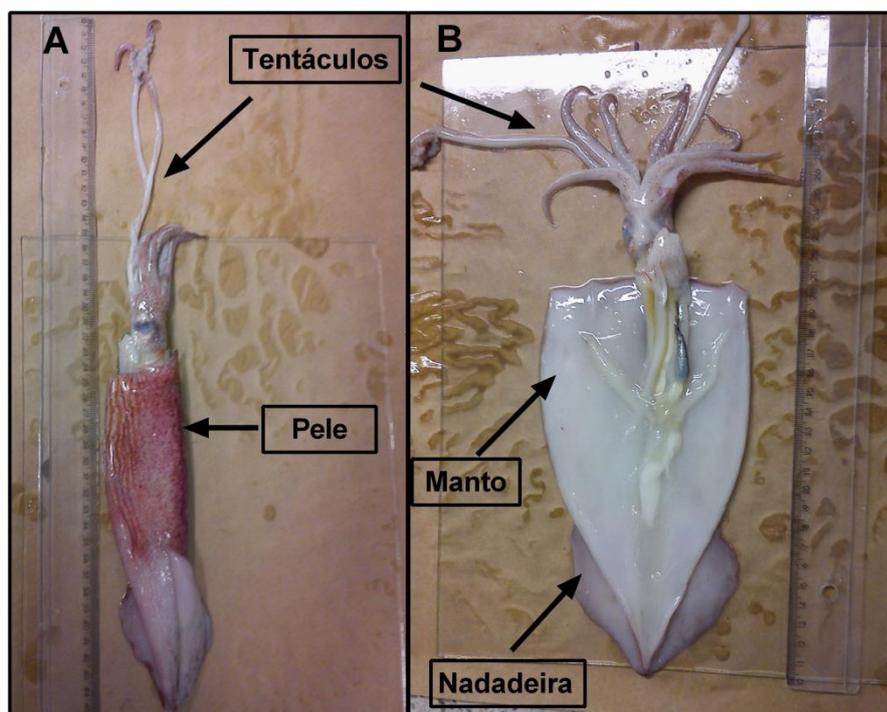


FIGURA 8. LULA *DORYTEUTHIS (LOLIGO) PLEI* E SUAS REGIÕES ANATÔMICAS (A) Tentáculos e Pele ;(B) Manto e Nadadeira. Espécime representativo íntegro e após corte longitudinal com exposição das vísceras. Indivíduos desta espécie possuem em média de 30 a 45 cm de tamanho.

4.1.1 EXTRAÇÃO DE GAGS DE DIFERENTES TECIDOS DE LULA

Os diferentes tecidos foram submetidos à proteólise com maxatase por 24 horas, como descrito em (Métodos 3.2.1). Após remoção proteica, os GAGs foram precipitados com etanol e mantidos a -20°C , por 18 horas. O material obtido foi ressuspensão em água destilada ($100\mu\text{L}$) (soluções 10 mg/mL) e analisados por eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3 propilenodiamino-acetato, $0,05\text{ M}$, pH $9,0$ (PDA). A Figura 9 apresenta os resultados obtidos.

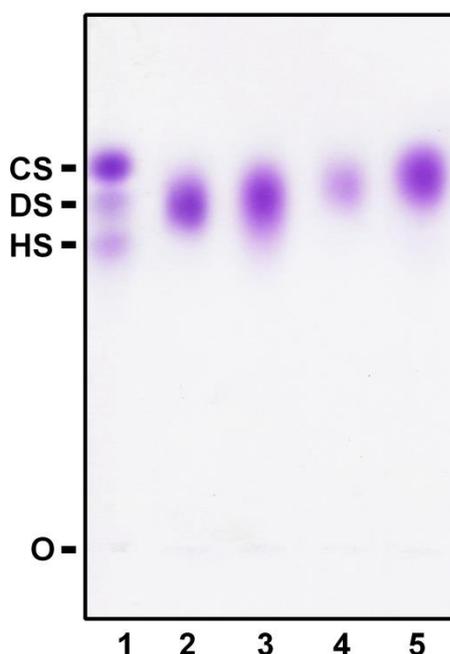


FIGURA 9. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE EM TAMPÃO 1,3-DIAMINOPROPANO-ACETATO (PDA) $0,05\text{ M}$, pH $9,0$ DE GLICOSAMINOGLICANOS (GAG) EXTRAÍDOS DE TECIDOS DE LULA. Aliquotas ($5\ \mu\text{L}$) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, tampão 1,3-diaminopropano-acetato (PDA) e os GAGs corados com azul de toluidina, como descrito em Métodos. 1 - Mistura padrão de condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparam sulfato (HS), contendo $5\ \mu\text{g}$ de cada GAG; 2 - Nadadeira; 3 - Manto; 4 - Tentáculos; 5 - Pele. O: origem.

O método de eletroforese em gel de agarose utilizado neste trabalho, desenvolvido por Dietrich & Dietrich (1976), é utilizado para a separação de diferentes GAGs, baseando-se na interação entre a diamina presente no tampão e as cargas negativas dos GAGs. Neste método, GAGs mais sulfatados (contendo maior densidade de cargas negativas), como heparam sulfato e heparina, interagem mais com a diamina do tampão e migram menos. Já condroitim sulfato (CS) e dermatam sulfato (DS), por apresentar menor densidade de carga, apresentam

maior migração eletroforética. A diferença na migração entre estes dois GAGs se deve principalmente à conformação espacial do ácido urônico (β -D-glucurônico para CS e α -L-idurônico para DS). Após a corrida eletroforética, os GAGs são corados por azul de toluidina, um corante que se complexa com os grupamentos sulfato destes compostos produzindo metacromasia, corando-os em roxo.

Na Figura 9 podemos notar bandas metacromáticas difusas para todos os tecidos analisados. Em nadadeira e manto, as bandas apresentam migração eletroforética semelhante ao DS padrão e para tentáculos e pele migração ligeiramente maior, próxima de CS padrão. Os géis foram digitalizados e os GAGs quantificados por densitometria utilizando-se CS Sigma (5 ug) como padrão. A Tabela 1 apresenta os dados de massa de cada tecido submetida à extração, bem como a quantificação dos GAGs em cada tecido.

TABELA 1 – RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS EM DIFERENTES TECIDOS DE LULA *Doryteuthis plei*

Amostra	Peso úmido do tecido (g)	Precipitado obtido na extração (g)	Total de GAGs obtidos (mg)	% de GAGs no precipitado	Total de GAGs/tecido (peso úmido) (%)
Nadadeira	180	1,3	200	15,4	0,11
Manto	181	0,5	100	20,0	0,05
Tentáculos	151	1,9	190	10,0	0,13
Pele	43	1,1	220	20,0	0,51

Podemos observar que a pele foi o tecido em que se obteve a maior razão GAG/tecido. Nadadeira e tentáculos apresentaram valores próximos, porém menores que os da pele (~4 vezes). A menor razão GAG/tecido foi observada para manto. Entretanto, a porcentagem de GAGs totais presentes foi próximos para todos os tecidos (10 a 20%).

A partir destes resultados, resolvemos submeter o material obtido à cromatografia de troca-iônica em *Q-sepharose* para remoção de compostos contaminantes e obtermos um maior teor de GAGs para as análises posteriores.

4.1.2 PURIFICAÇÃO DE GAGS EXTRAÍDOS DE TECIDOS DE LULA POR CROMATOLOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM Q-SEPHAROSE (FF)

4.1.2.1 Escala Analítica

Cromatografia de troca iônica se fundamenta na interação entre cargas contrárias presentes em um composto de interesse e uma resina cromatográfica. Posteriormente, estes compostos são eluídos da resina com soluções salinas de força iônica crescente. Desta forma, quanto maior a densidade de cargas negativas de uma molécula, maior será a força iônica da solução salina necessária para eluição do mesmo. A resina *Q-Sepharose FF* apresenta um grupamento amônio quaternário com carga positiva capaz de interagir com as cargas negativas dos GAGs.

Inicialmente, para estabelecermos o padrão de eluição dos GAGs extraídos de tecidos de lula, realizamos a cromatografia de troca iônica em *Q-Sepharose FF* escala analítica. Amostras dos precipitados (10 mg) foram solubilizados em água destilada (1 mg/mL) e foram aplicadas na coluna (contendo 1 mL de resina) previamente equilibrada (3 X). A coluna foi lavada com água destilada e a eluição foi realizada em *step wise* com soluções de NaCl em concentrações crescentes (0,5 a 2 M - com variação de 0,1 M), obtendo-se um total de 16 frações de 3 mL. Cada fração foi posteriormente submetida à precipitação por etanol e analisada por eletroforese em gel de agarose em tampão PDA, pH 9,0 (Figuras 10 e 11).

Os GAGs dos tecidos de lula foram eluídos com concentrações de NaCl que variaram entre 0,8 a 1,8 M. Entretanto, padrões de eluição diferentes foram observadas entre os tecidos. Para nadadeira (Figura 10 A, B e C), a eluição dos GAGs foi entre 0,9 a 1,6 M de NaCl, sendo um pico verificado na fração 8 (NaCl 1,2 M). GAGs de manto foram detectados (Figura 10 D, E e F) entre 1,0 e 1,8 M de NaCl, com o pico em NaCl 1,3 M. Esses resultados mostram que os GAGs de nadadeira e manto são eluídos em uma faixa de concentração de NaCl mais ampla, indicando a presença de populações de GAGs que apresentam diferenças em relação a densidade de carga. Para pele assim como tentáculos (Figura 11), a eluição dos GAGs ocorreu em faixa de concentração de NaCl mais estreita (1,3 e

1,4 M) sugerindo que os GAGs desses tecidos são mais homogêneos. No tecido de pele (Figura 11-E), pudemos visualizar uma segunda banda com migração eletroforética semelhante à migração de heparam sulfato.

Com base nesses resultados, verificamos que os GAGs de lula são eluídos entre concentrações de NaCl superiores a 0,8 M e inferiores a 2 M.

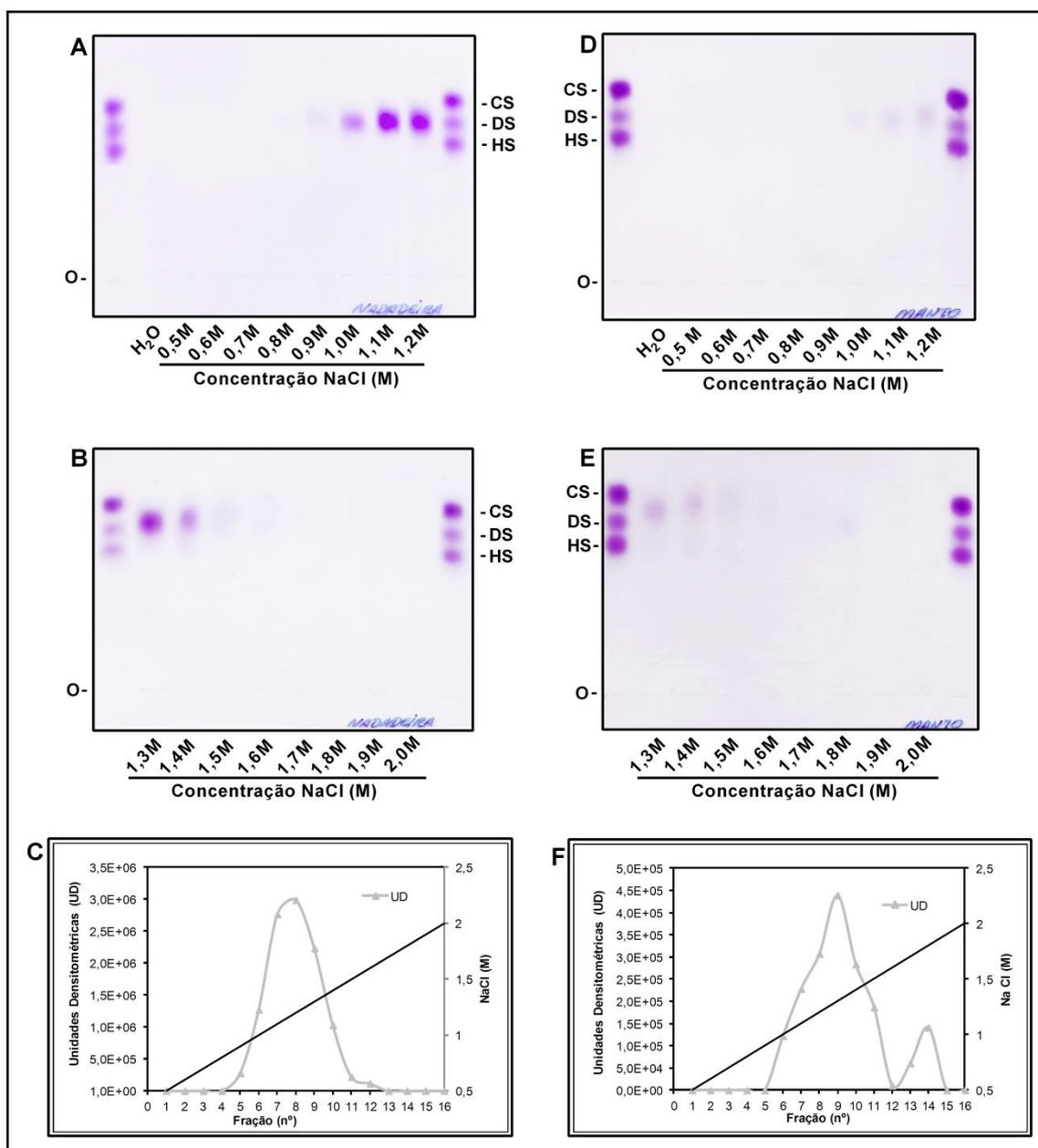


FIGURA 10. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE EM TAMPÃO PDA 0,05 M (pH 9,0) DE FRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA (Q-SEPHAROSE FF) DE MANTO E NADADEIRA EM ESCALA ANALÍTICA. Alíquotas (5 μ L) foram submetidas a eletroforese em gel de agarose, tampão PDA. Os GAGs foram corados com azul de toluidina, como descrito em Métodos. Mistura padrão de CS, DS e HS, contendo 5 μ g de cada GAG foi utilizada. 3.A: Frações de 0,5 a 1,2 M NaCl de Nadadeira. 3.B: Frações 1,3 a 2 M NaCl de Nadadeira. 3.C: Perfil de eluição de GAGs de nadadeira. 3.D: Frações de 0,5 a 1,2 M NaCl de Manto. 3.E: Frações de 1,3 a 2 M NaCl de Manto. 3.F: Perfil de eluição de manto. O: origem.

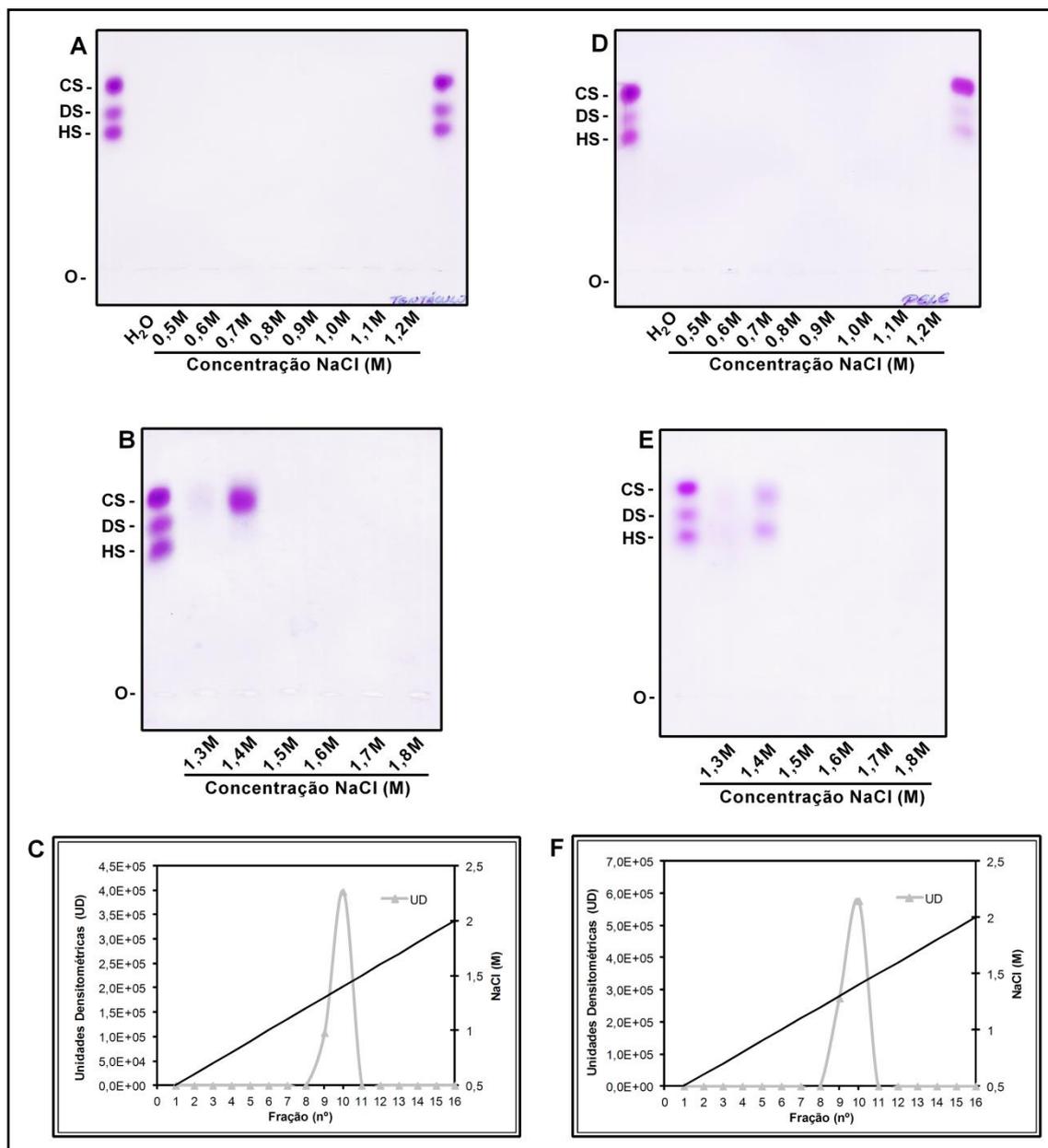


FIGURA 11. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE EM TAMPÃO PDA 0,05 M (pH 9,0) DE FRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA (Q-SEPHAROSE FF) DE TENTÁCULOS E PELE EM ESCALA ANALÍTICA. Alíquotas (5 μ L) foram submetidas a eletroforese em gel de agarose, tampão PDA. Os GAGs foram corados com azul de toluidina, como descrito em métodos. Mistura padrão de CS, DS e HS, contendo 5 μ g de cada GAG foi utilizada. 3.A: Frações de 0,5 a 1,2 M NaCl de Tentáculos. 3.B: Frações 1,3 a 1,8 M NaCl de Tentáculos. 3.C: Perfil de eluição de tentáculos. 3.D: Frações de 0,5 a 1,2 M NaCl de pele. 3.E: Frações de 1,3 a 2 M NaCl de pele. 3.F: Perfil de eluição de pele. O: origem.

4.1.2.2 Escala Preparativa

Cromatografia de troca-iônica em escala preparativa foi, então, utilizada para purificação de maiores quantidades de GAGs de lula. Amostras (200 mg; solução 1 mg/mL) foram aplicados em coluna de Q-Sepharose FF contendo 20 mL de resina. A eluição dos compostos foi realizada em *step wise* com duas concentrações de NaCl (0,5 M e NaCl 2 M), como descrito em Métodos 3.2.2.1. A Figura 12, apresenta os resultados obtidos para as frações 0,5 e 2M de GAGs de nadadeira após precipitação com etanol.

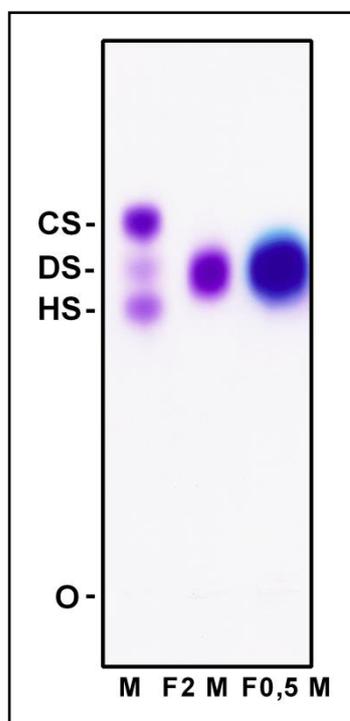


FIGURA 12. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE EM TAMPÃO PDA 0,05 M (pH 9,0) DE CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA (Q-SEPHAROSE) DE NADADEIRA EM ESCALA PREPARATIVA. Alíquotas (5 μ L) foram submetidas a eletroforese em gel de agarose, tampão PDA. Os GAGs foram corados com azul de toluidina, como descrito em Métodos. M: Padrão de GAGs (CS; DS; HS); F 2M: Fração 2 M; F 0,5M: Fração 0,5 M.

Podemos observar que a fração F2M (diluída 20 vezes) apresenta banda única com metacromasia (corado em roxo) com migração semelhante ao DS. A fração F0,5M apresentou também banda única com mobilidade semelhante porém corada em azul (não metacromática), tratando-se provavelmente de outras macromoléculas de carga negativa que não sulfatadas (DNA). A Figura 13, mostra a

eletroforese em gel de agarose em tampão PDA das frações F2M obtidas de todos os tecidos.

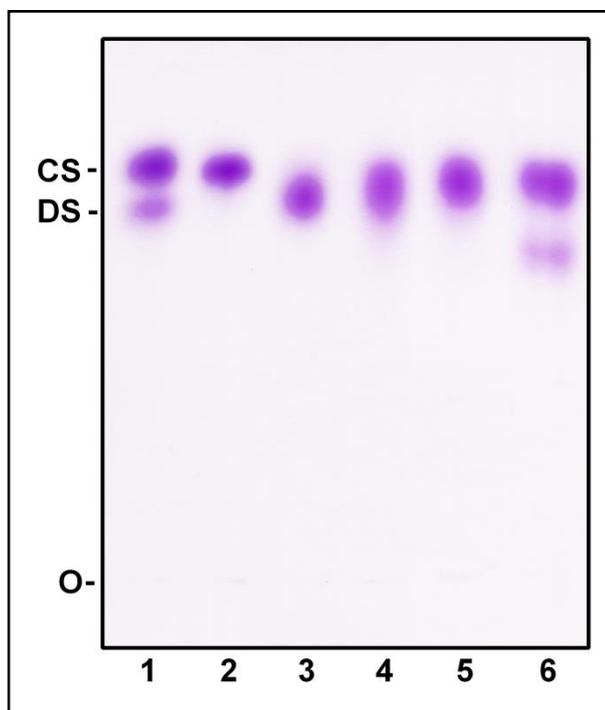


FIGURA 13. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE EM TAMPÃO PDA 0,05 M (pH 9,0) DE GLICOSAMINOGLICANOS (GAG) DE TECIDOS DE LULA PURIFICADOS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA (Q-SEPHAROSE FF). Alíquotas (5 μ L) foram submetidas a eletroforese em gel de agarose, tampão PDA. Os GAGs foram corados com azul de toluidina, como descrito em Métodos. 1- Padrão de Glicosaminoglicanos (CS; DS); 2- C4S; 3- Nadadeira; 4- Manto; 5- Tentáculos; 6- Pele. O: origem.

Na Figura 13 verificamos a presença de GAGs em todas as frações F2M analisadas. Observamos que para nadadeira, manto e tentáculos o padrão de migração se mantém em relação ao verificado com as amostras não purificadas. Após a purificação dos GAGs da pele foi possível visualizar outra banda com menor migração que DS além da banda com mobilidade próxima a de CS.

Os GAGs purificados e concentrados por cromatografia preparativa foram submetidos a caracterização estrutural por diferentes metodologias.

4.1.3 CARACTERIZAÇÃO DO GLICOSAMINOGLICANOS DE LULA

4.1.3.1 Identificação por Degradação Enzimática

Liases bacterianas são importantes ferramentas na identificação e análise estrutural de GAGs. Condroitinases (ou condroitim liases) de *Flavobacterium heparinum* são endoglicosidases que reconhecem ligações glicosídicas presentes em condroitim sulfato, dermatam sulfato e ainda ácido hialurônico. De acordo com sua especificidade são denominadas como: condroitinase AC (*N*-acetilgalactosamina ou *N*-acetilglucosamina e ácido D-glucurônico), condroitinase B (*N*-acetilgalactosamina e ácido L-idurônico), condroitinase C (*N*-acetilgalactosamina 6S ou não sulfatada e ácido D-glucurônico). Condroitinase ABC quebra ligações β -glicosídicas em CS, DS e HA.

Alíquotas contendo 20 μ g das amostras purificadas foram submetidas à degradação por condroitinase AC ou condroitinase B por 24h. Após o período de incubação, as enzimas foram inativadas em banho fervente por 10 minutos, as amostras foram secas a vácuo, ressuspensas em água destilada (2 mg/mL) e analisadas por eletroforese em gel de agarose tampão PDA (Figura 14).

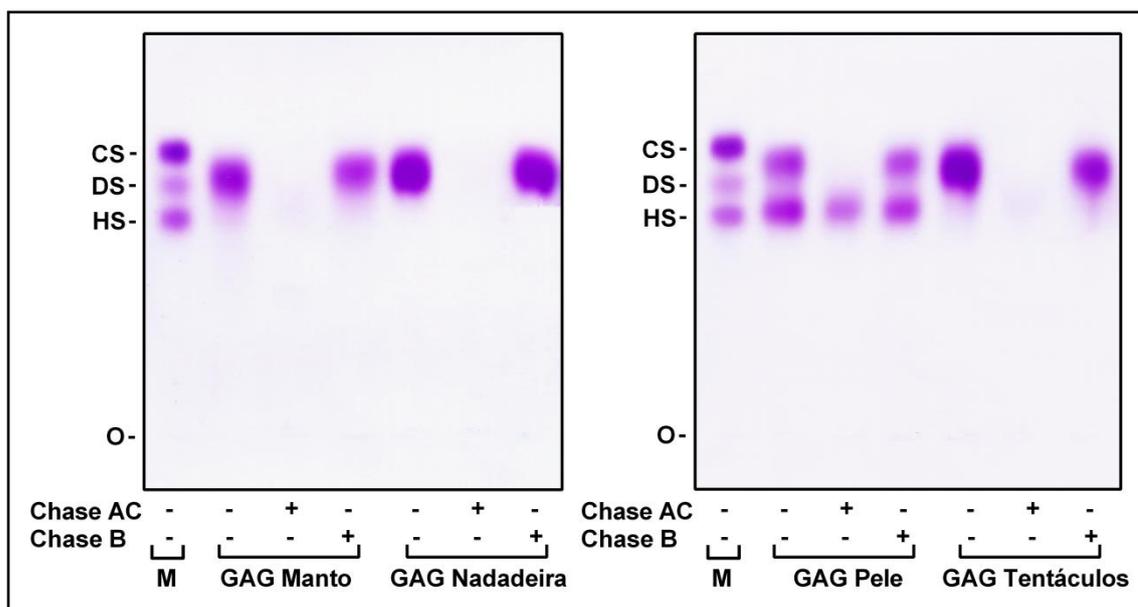


FIGURA 14. ELETROFORESE DA DEGRADAÇÃO DE GAGs DE LULA INCUBADOS COM CONDROITINASES AC E B. Alíquotas de mistura de incubação(5 μ L) foram submetidas a eletroforese e corados, como descrito em Métodos. M: Padrão de GAGs (CS; DS; HS). Chase AC: Condroitinaase AC. Chase B: Condroitinaase B. GAG Manto: GAGs de Manto. GAG Nadadeira: GAGs de Nadadeira. GAG Pele: GAGs de Pele. GAG Tentáculos: GAGs de Tentáculos. O: Origem.

Após degradação com chase AC, houve o desaparecimento da banda com migração semelhantes ao DS ou CS, em todos os tecidos analisados (manto, nadadeira, pele e tentáculos). Entretanto, nenhuma alteração foi verificada após ação da chase B. Somente para pele, uma banda co-migrando com HS, permaneceu intacta após a incubação com ambas as enzimas. Esses resultados sugerem, de acordo com a especificidade das enzimas utilizadas, que o GAG presente nos tecidos de lula é condroitim sulfato.

4.1.3.2 Determinação de Peso Molecular por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

O peso molecular dos GAGs extraídos dos diferentes tecidos de lula foi estimado por eletroforese de poliacrilamida, e para isso, alíquotas de 20 μ g de CS de nadadeira, manto e tentáculos foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida como descrito em (Métodos 3.2.3.1.2) (Figura 15).

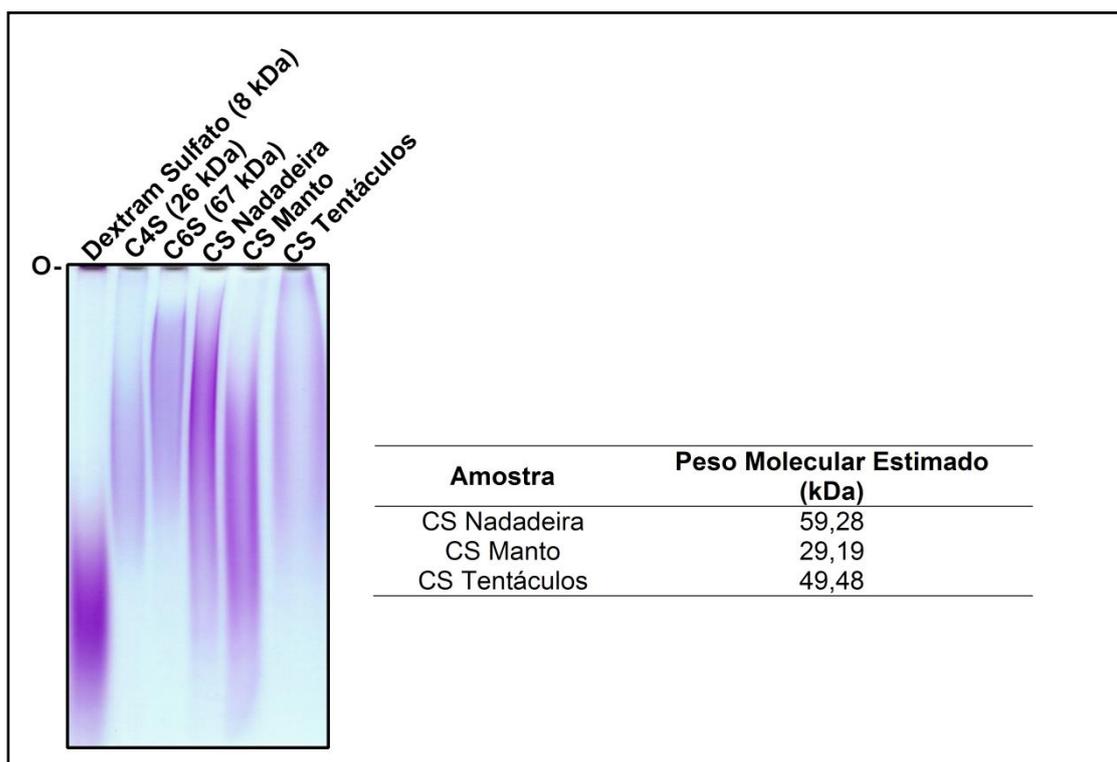


FIGURA 15. GEL DE POLIACRILAMIDA PARA PESO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE CS DE LULA. Amostras analisadas em gel de poliacrilamida 7,5% corado com azul de toluidina 0,1%. A origem está representada por (O).

O peso molecular modal das amostras foi estimado por meio de regressão logarítmica, comparando-se a distância de migração das amostras testadas com os valores obtidos das amostras de peso molecular já estabelecido (Dextran, C4S, C6S). CS de nadadeira apresentou o maior peso molecular enquanto CS de manto foi o de menor peso. Já o CS de tentáculos apresentou peso intermediário. Observamos, também, na Figura 15 que as bandas referentes aos tecidos são polidispersas, tendo nadadeira e tentáculos pesos moleculares elevados quando comparado a manto.

Para confirmação dos valores de peso molecular obtidos, amostras de CS de nadadeira, manto e tentáculos foram submetidas a β -eliminação (ver em Métodos 3.2.2.2). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 16.

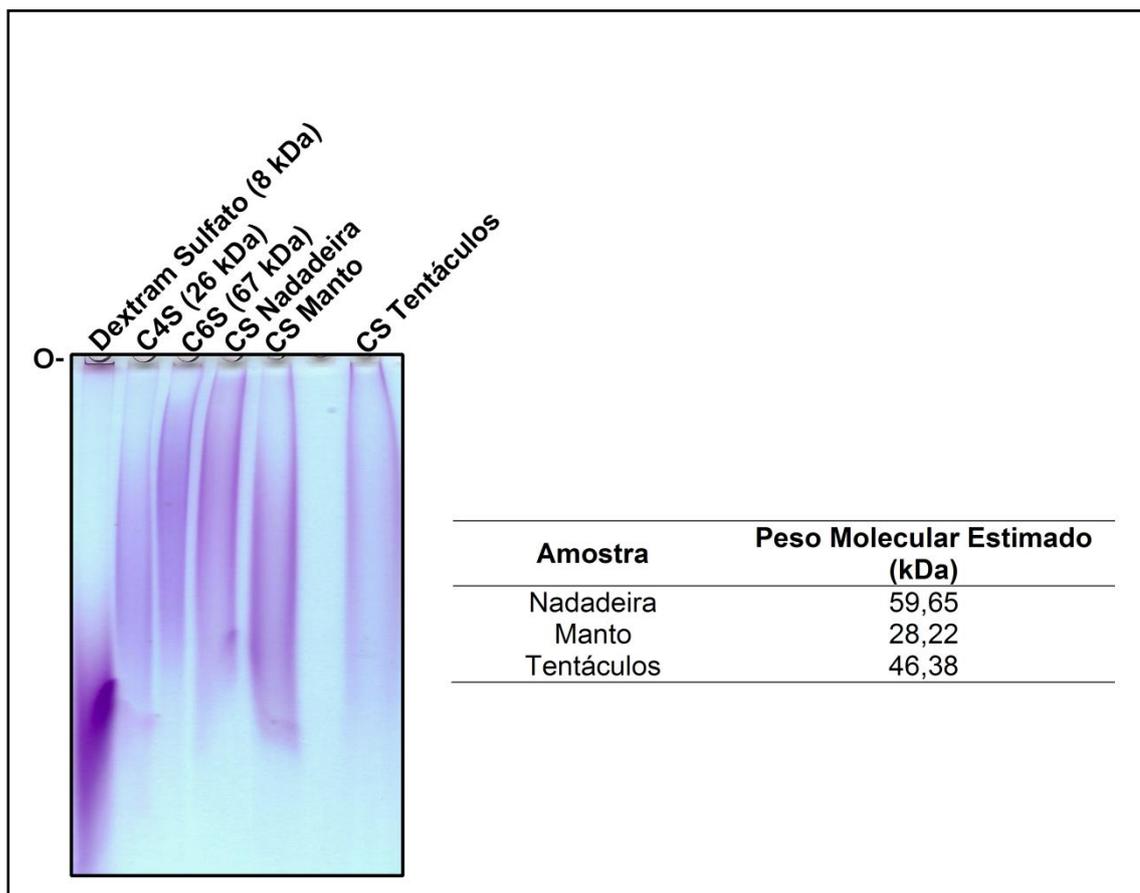


FIGURA 16. GEL DE POLIACRILAMIDA PARA PESO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE CS DE LULA β -ELIMINADAS. Amostras analisadas em gel de poliacrilamida 7,5% corado com azul de toluidina 0,1%. A origem está representada por (O).

Após a reação de β -eliminação (quebra da ligação entre açúcar-proteína), não observamos alterações significativas no peso molecular e em sua polidispersão.

Nenhuma alteração na migração na eletroforese em gel de agarose em tampão PDA foi observada entre amostras de CS (5 μ g) de Lula β -eliminadas e controle (Figura 17).

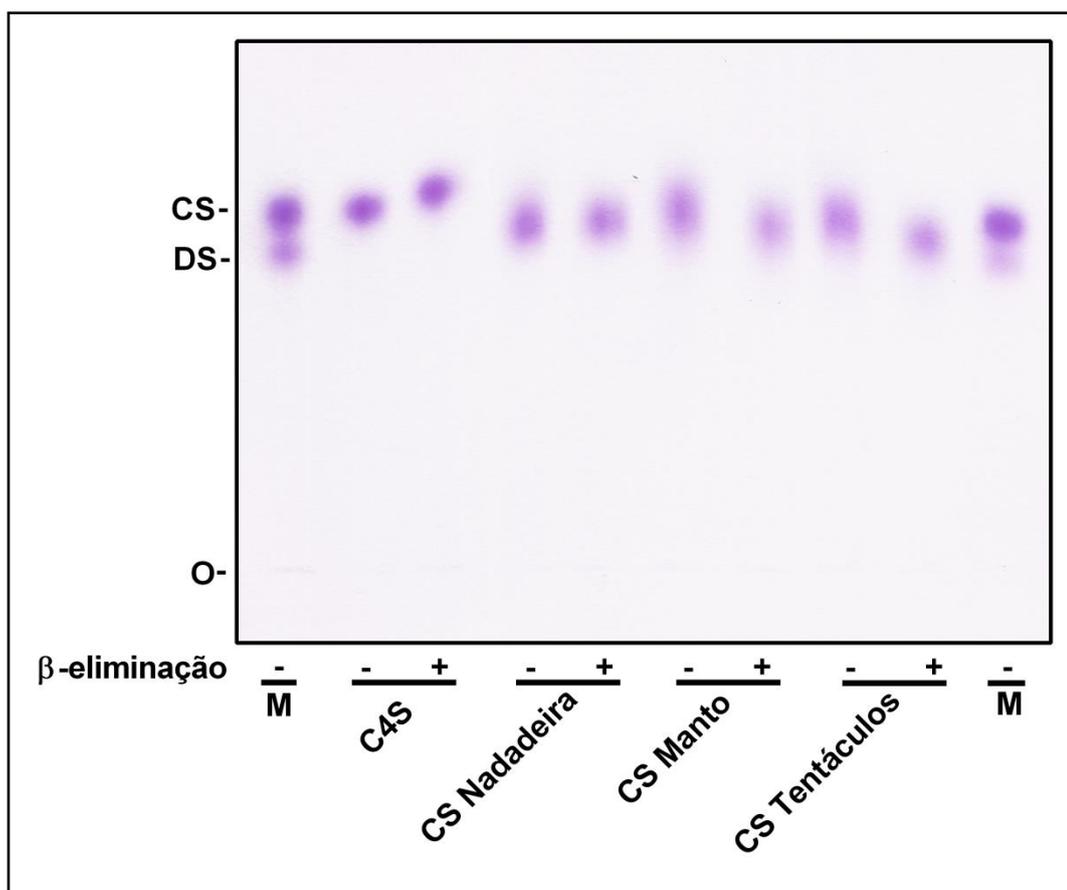


FIGURA 17. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE EM TAMPÃO PDA 0,05 M (pH 9,0) CONDRITIM SULFATO (CS) EXTRAÍDO DE TECIDOS DE LULA, ELUÍDOS COM NaCl 2 M EM COLUNA DE TROCA-IÔNICA (Q-SEPHAROSE). M (mistura de padrões CS e DS); (-) Controle; (+) β -Eliminados. A origem está representada por (O).

4.1.3.3 Dosagens Químicas

Dosagens de hexosamina, ácido urônico e sulfato foram realizadas nos CS de nadadeira, manto, tentáculos. Os resultados e a relação sulfato dissacarídeo são apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 – DOSAGENS QUÍMICAS DE CS DE LULA.

Amostra	Hexosamina	Ácido Urônico	Proporção Sulfato Total/Dissacarídeo
Nadadeira	1	1	1,6
Manto	1	1	1,4
Tentáculos	1	1	1,3

Podemos observar que a relação de sulfato presente no CS de nadadeira (1,6/hexosamina) é maior do que a dos outros dois tecidos (manto 1,4/hexosamina e tentáculos 1,3/hexosamina). Observando a relação sulfato/dissacarídeo dos CS de lula, confirmamos que a maior densidade de cargas negativas destes compostos é a responsável pela migração diferenciada na eletroforese em gel de agarose em tampão PDA, verificada na região de DS.

4.1.3.4 Espectro de Absorção no Ultravioleta

Soluções (1 mg/mL) das amostras purificadas e de padrão de CS foram submetidas à varredura em espectrofotômetro em região UV (190 a 400 nm), onde obtivemos os espectros apresentados na Figura 18.

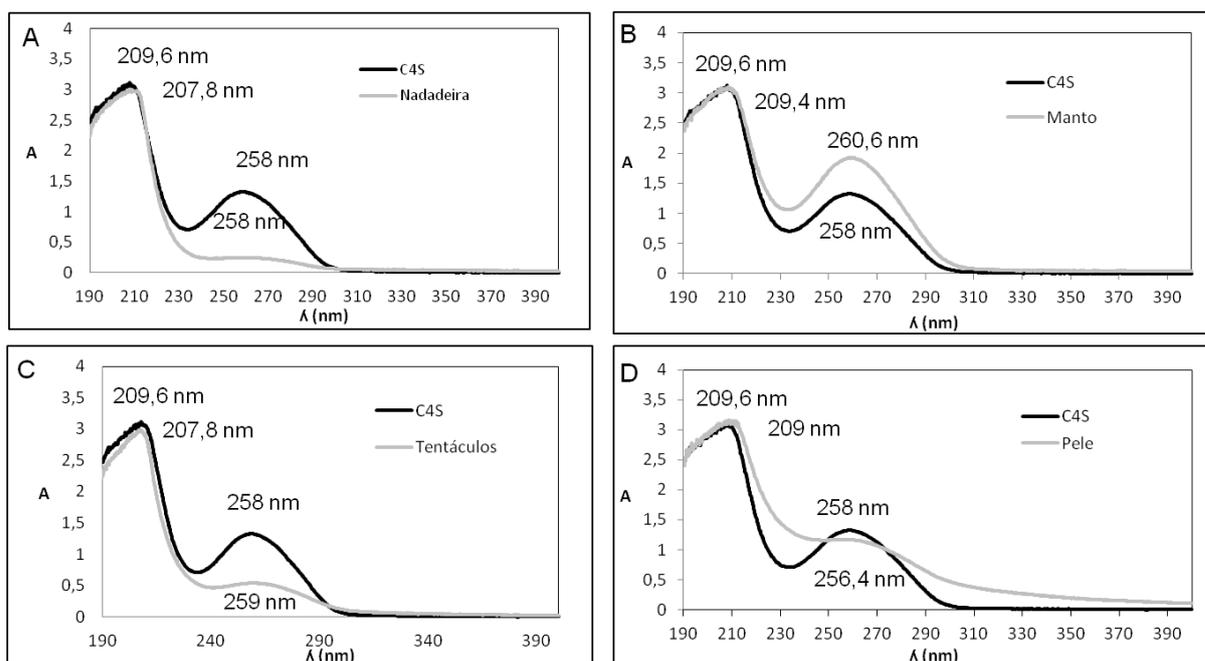


FIGURA 18. ESPECTRO DE ABSORÇÃO EM ULTRAVIOLETA DAS QUATRO AMOSTRAS DE TECIDOS DE LULA. VARREDURA REALIZADA EM FAIXA DE COMPRIMENTO DE 190 A 400 nm (600 nm/s). Os números representam os picos de cada um dos espectros. A: Espectro UV nadadeira; B: Espectro UV manto; C Espectro UV tentáculos; D Espectro UV pele.

Na Figura 18, podemos observar nos quatro espectros um pico principal característico das amostras de CS próximo a 210 nm, sendo resultante do somatório das absorbâncias dos seus constituintes (ácido D-glucurônico e *N*-acetilgalactosamina). Observamos também em todas as amostras um segundo pico próximo a 260 nm que coincide com a região de absorção de DNA ainda presentes nas amostras.

4.1.3.5 Análise dos Produtos da Degradação de Condroitim Sulfato por Condroitinase AC

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 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. Por esse método também é

possível determinar o tipo de dissacarídeo comparando a migração dos produtos de degradação das amostras com os de padrões conhecidos, que em nosso experimento foram $\Delta\text{Di}0\text{S}$, $\Delta\text{Di}4\text{S}$, $\Delta\text{Di}6\text{S}$, $\Delta\text{Di}4,6\text{S}$.

Inicialmente os CS de lula (20 μg) foram incubados com 2 mUE de chase AC de *F. heparinum* a 37°C por 24h. Após o tempo de incubação a enzima foi inativada em banho fervente por 10 minutos. As misturas foram secas a vácuo e submetidas à derivatização com 100 nmol de AMAC, na presença de cianoborohidreto de sódio 1M, a 37°C por 16 horas. Após este tempo, 30 μL de glicerol 30% foram adicionados à cada mistura. Alíquotas (2 μL) foram submetidas à análise por FACE no sistema Tris-glicina (Figura 19).

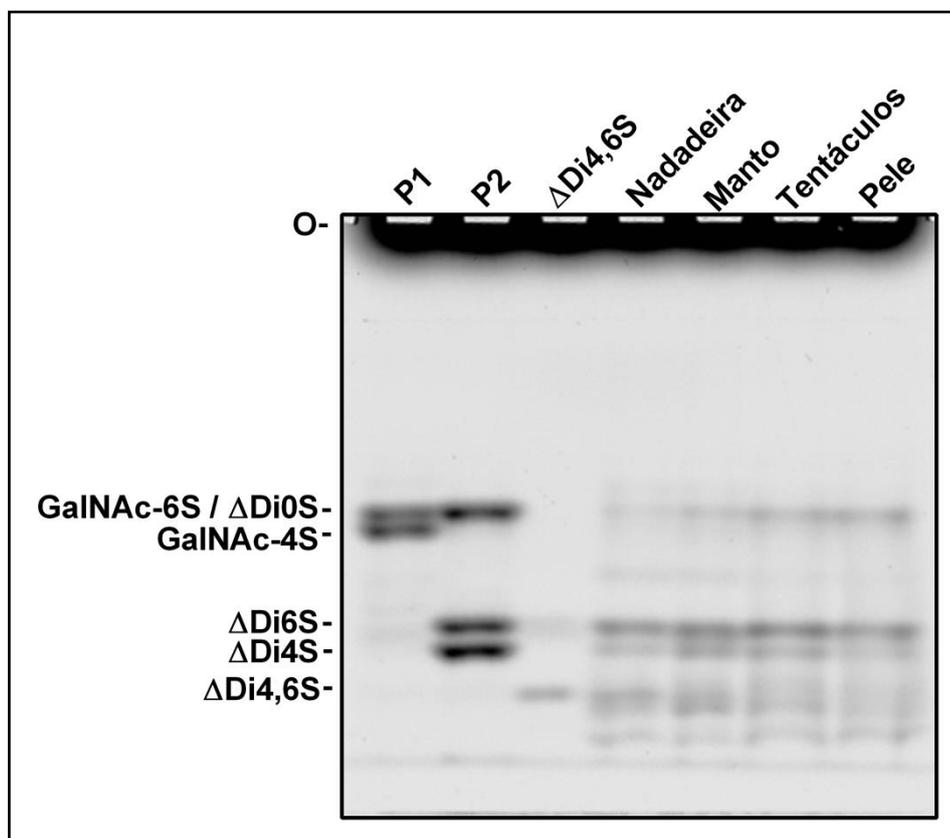


FIGURA 19. ELETROFLUOROGRAMA NO SISTEMA TRIS-GLICINA (pH 8,8) DE PRODUTOS DE DIGESTÃO DE CS DE AMOSTRAS DE LULA POR CONDRITINASE AC DE *F. heparinum*. P1: mistura padrão contendo GalNAc-6S e GalNAc-4S. P2: mistura padrão $\Delta\text{Di}0\text{S}$, $\Delta\text{Di}4\text{S}$, $\Delta\text{Di}6\text{S}$. O: Origem.

Podemos observar que todas as amostras apresentaram dissacarídeos com migração nas regiões de $\Delta\text{Di}0\text{S}$, $\Delta\text{Di}4\text{S}$, $\Delta\text{Di}6\text{S}$, $\Delta\text{Di}4,6\text{S}$. Observamos que $\Delta\text{Di}6\text{S}$ foi o dissacarídeo predominante, tendo também quantidades menores de $\Delta\text{Di}4\text{S}$ e $\Delta\text{Di}4,6\text{S}$ e quantidades muito pequenas de $\Delta\text{Di}0\text{S}$. Além disso, foi visualizado

arraste em todas as amostras indicando degradação incompleta dos CS, com provável presença de oligossacarídeos e tetrassacarídeos.

4.1.3.6 Monitoramento de Digestão Enzimática por Absorção em Ultravioleta (232nm)

Devido à presença de arraste na FACE dos CS de lula, resolvemos analisar a atividade da chase AC sobre esses compostos por absorção em UV 232nm. Alíquotas de chase AC (2 mUE) de *F. heparinum* foram incubadas com 100 µg de substrato, em tampão Tris-acetato 0,05 M pH 8,0, em volume final de 1 mL a 30°C por 15 min. A chase AC foi testada para os padrões de C6S, C4SS1, C4SS2 e para os CS de nadadeira, manto, tentáculo (Figura 20). Para o experimento, a atividade enzimática controle foi estabelecida com C4SS2 em 0,001 abs/min.

Observamos na Figura 20, que a velocidade enzimática da chase AC de *F. heparinum* na degradação dos CS de lula é próxima de 0,001 abs/min sendo muito inferior em relação aos CS padrão: C6S (0,0144 abs/min); C4SS1 (0,0056 abs/min); C4SS2 (0,0095 abs/min), isso indica que os CS de lula não são bons substratos para chase AC e explica a presença de poucos dissacarídeos e muitos oligos- e tetrassacarídeos visualizados na FACE (Figura 19). A Tabela 3 resume os valores de velocidade de formação de produtos insaturados para os seis substratos, em abs/min e Unidades/mL de chase AC.

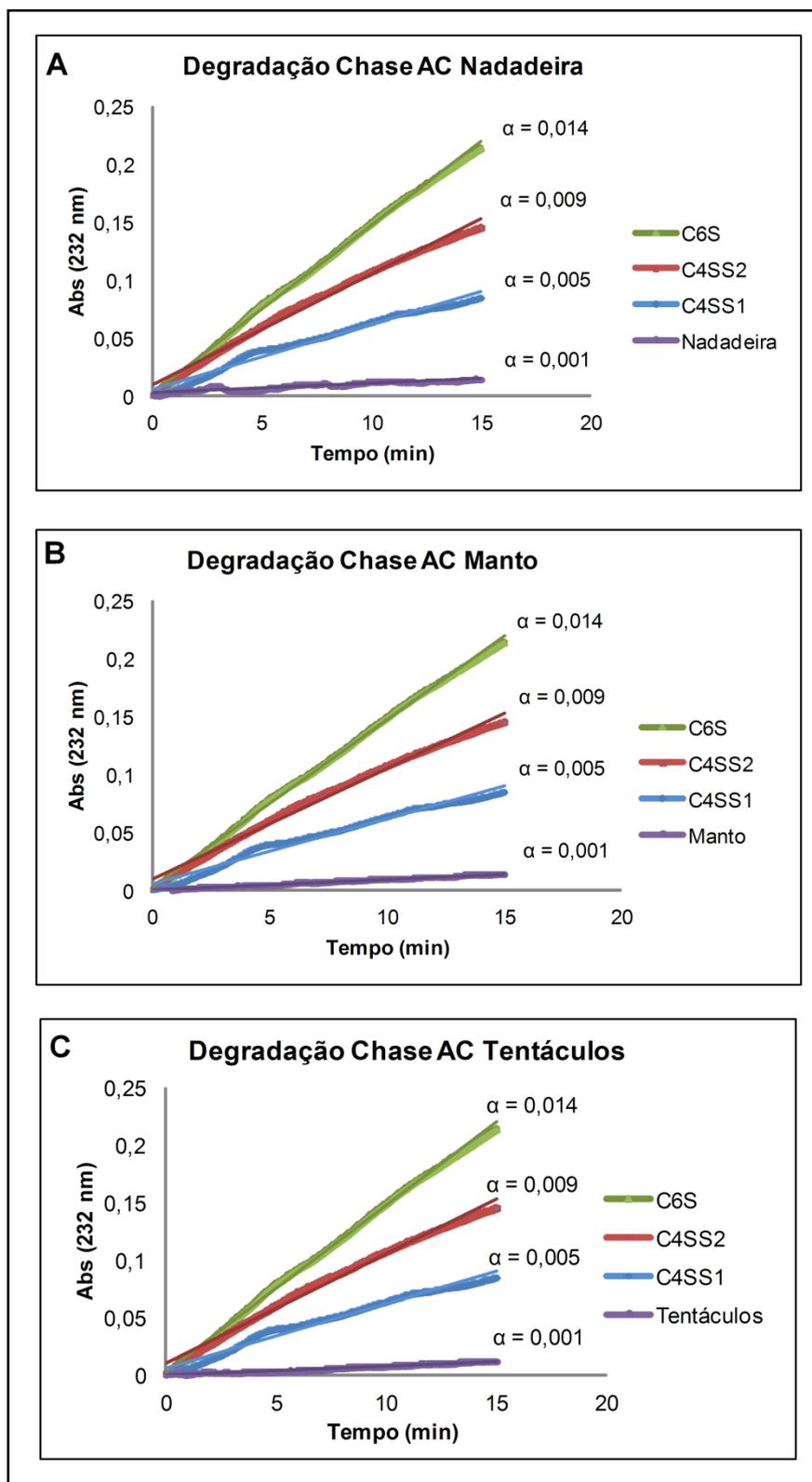


FIGURA 20. CURVA DE VELOCIDADE DE CONDRITINASE AC *F. HEPARINUM* INCUBADA COM CONDRITIM SULFATO PADRÃO E CONDRITIM SULFATO DE AMOSTRAS DE LULA. Os valores de velocidade ($\alpha = \text{abs}/\text{min}$) sobre cada substrato são apresentados. A: nadadeira; B: manto; C: tentáculos.

TABELA 3 – ATIVIDADE DE CONDROITINASE AC SOBRE DIFERENTES SUBSTRATOS

	Atividade	
	Abs/min	(U/mL)
C6S	0,0144	0.189
C4SS2	0,0095	0,125
C4SS1	0,0056	0,073
Nadadeira	0,0008	0,010
Manto	0,001	0,013
Tentáculos	0,0008	0,010

4.2 PARTE II- EXTRAÇÃO EM LARGA ESCALA E DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE CONDROITIM SULFATO DE NADADEIRA E MANTO

4.2.1 PREPARAÇÃO EM LARGA ESCALA

A partir dos resultados iniciais obtidos e visando trabalhar com uma quantidade de material que proporcionasse análises mais detalhadas das estruturas e atividades biológicas das moléculas de condroitim sulfato de lula, decidimos realizar uma nova extração e utilizar como material de partida somente os tecidos de nadadeira e manto dos quais se dispunha de maior quantidade de massa de tecido.

A partir de 50 espécimes (10 Kg) de *Doryteuthis* (Loligo) *plei* adquiridas em casa de pescados na cidade de Ubá, segregamos os tecidos de manto e nadadeira das demais partes e vísceras da lula, o que correspondeu à obtenção de CS partindo de 540 g de nadadeira e 3 Kg de manto.

Após processo de extração com a enzima proteolítica maxatase, como descrito em Métodos, realizamos a identificação dos CS de lula por análise em eletroforese em gel de agarose em tampão PDA (Figura 21).

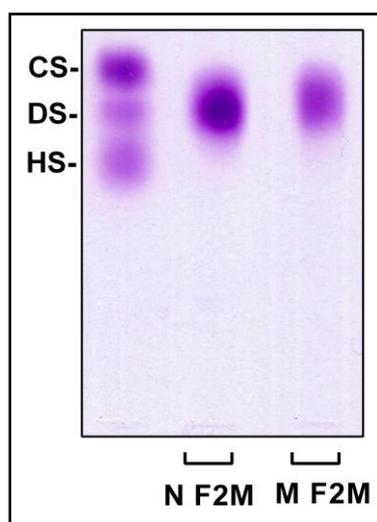


FIGURA 21. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE EM TAMPÃO PDA 0,05 M (pH 9,0) DE GAGs EXTRAÍDOS DE TECIDOS DE LULA APÓS PURIFICAÇÃO EM COLUNA DE Q-SEPHAROSE FF. Alíquotas (5 μ L) foram submetidas a eletroforese em gel de agarose, tampão PDA. Os GAGs foram corados com azul de toluidina, como descrito em métodos. Mistura padrão de CS, DS e HS, contendo 5 μ g de cada GAG foi utilizada. N F2M: Fração de eluição 2M de NaCl de nadadeira; M F2M: Fração de eluição 2M de NaCl de manto; O: origem.

Assim como observado anteriormente, obtivemos o mesmo padrão de bandas metacromáticas com migração próxima ao DS para ambos CS dos tecidos de nadadeira e manto analisados (Figura 21). Os dados de porcentagem de CS obtido após a extração e purificação realizadas são apresentados na Tabela 4.

TABELA 4 – PORCENTAGEM DE CONDRITIM SULFATO DE NADADEIRA E MANTO APÓS EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO

Amostra	Precipitado obtido na extração (g)	% de CS no precipitado	% de CS após purificação
Nadadeira (0,540 Kg)	0,77	47	70
Manto (3Kg)	0,93	24	58

Nos dados acima apresentados, verificamos uma maior porcentagem de CS no tecido de nadadeira sendo o valor duas vezes maior do que o obtido para o tecido de manto.

Após o processo de purificação realizado em escala preparativa em *Q-sepharose FF* (Métodos 3.2.2.1), observamos um significativo aumento do teor de CS no precipitado obtido da extração (Tabela 4). O material obtido ainda foi submetido à dessalinização por cromatografia de gel filtração em *Sephadex G50* antes de ser realizada as análises quanto ao peso molecular e composição química para confirmação de informações já obtidas.

Verificamos na Figura 22 bandas metacromáticas polidispersas para CS de manto e nadadeira, dados semelhantes aos já obtidos. Para análise de peso molecular, verificamos que os CS de lula apresentaram peso molecular próximos aos já estimados anteriormente, sendo para o tecido de nadadeira CS de peso de 52 kDa, superior ao CS de manto (30 kDa).

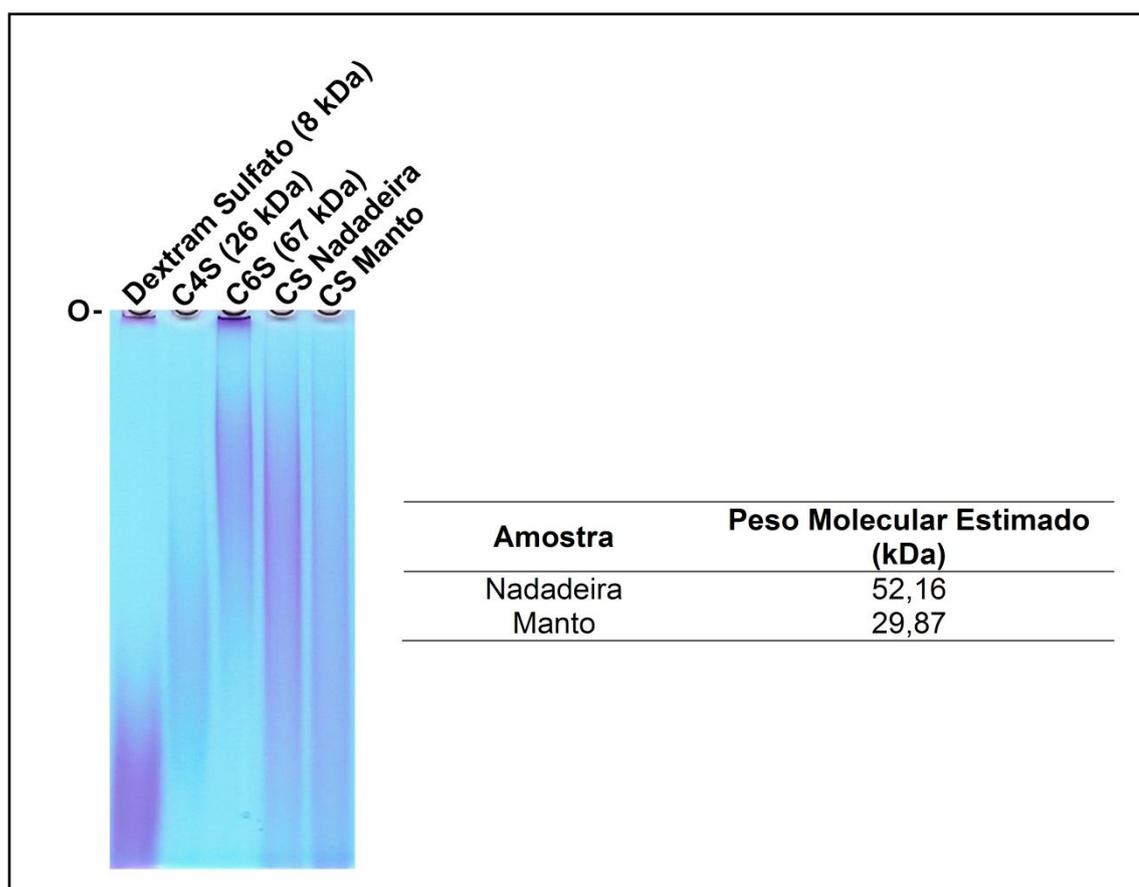


FIGURA 22. GEL DE POLIACRILAMIDA PARA PESO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE CS DE TECIDOS DE LULA. Amostras analisadas em gel de poliacrilamida 7,5% corado com azul de toluidina 0,1%. A origem está representada por (O).

Os dados das dosagens químicas e da proporção de sulfato/hexosamina para os CS de nadadeira e manto, além dos C4S e C6S padrão são apresentados na Tabela 5. Os dados obtidos são semelhantes aos já observados.

TABELA 5 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE CONDRITIM SULFATO DE DIFERENTES ORIGENS E MODIFICAÇÕES

Amostra	Hexosamina	Ácido Urônico	Proporção Sulfato Total/Dissacarídeo
Nadadeira	1	1,0	1,57
Manto	1	1,0	1,23
C4SS2	1	1,2	1,06
C4SS1	1	0,9	1,02
C6S	1	1,0	1,32

4.2.2 DEGRADAÇÕES ENZIMÁTICAS E ANÁLISE DISSACARÍDICA

Para um maior entendimento da composição dissacarídica destes CS de lula devido principalmente à elevada razão sulfato/hexosamina, realizamos degradações enzimáticas com quatro diferentes enzimas: condroitinases AC e B de *F. heparinum*, condroitinase AC-II de *Arthrobacter aurescens* e condroitinase ABC de *Proteus vulgaris*. Também foi utilizado Extrato Bruto Induzido de *F. heparinum*. As incubações foram realizadas por 24 ou 48 horas, nas condições ideais de cada enzima. Os produtos de degradação das incubações foram visualizados por FACE, como descrito em Métodos 3.2.3.1.3. As imagens dos géis e as densitometrias obtidas estão demonstradas a seguir.

A condroitinase AC-II *Arthrobacter aurescens* é uma enzima que age exolíticamente em C4S, C6S (JANDIK *et al.*, 1994), esta enzima não age em dermatam sulfato. Os resultados obtidos após digestão de CS de nadadeira, CS de manto e C4S padrão estão demonstrados abaixo.

Para ambos CS de lula, a degradação com Condroitinase AC de *Arthrobacter aurescens* gerou valores próximos a 60% de dissacarídeos 4,6-disulfatados ($\Delta\text{Di } 4,6$), em torno de 35% de dissacarídeos monosulfatados ($\Delta\text{Di}4\text{S}$ e $\Delta\text{Di}6\text{S}$), 1% de dissacarídeos não sulfatados ($\Delta\text{Di}0\text{S}$) e 2 % de oligossacarídeos. Podemos perceber também que C4S padrão foi totalmente digerido, formando dissacarídeos não sulfatados e monosulfatados. As porcentagens obtidas na densitometria estão detalhadas na Tabela 6.

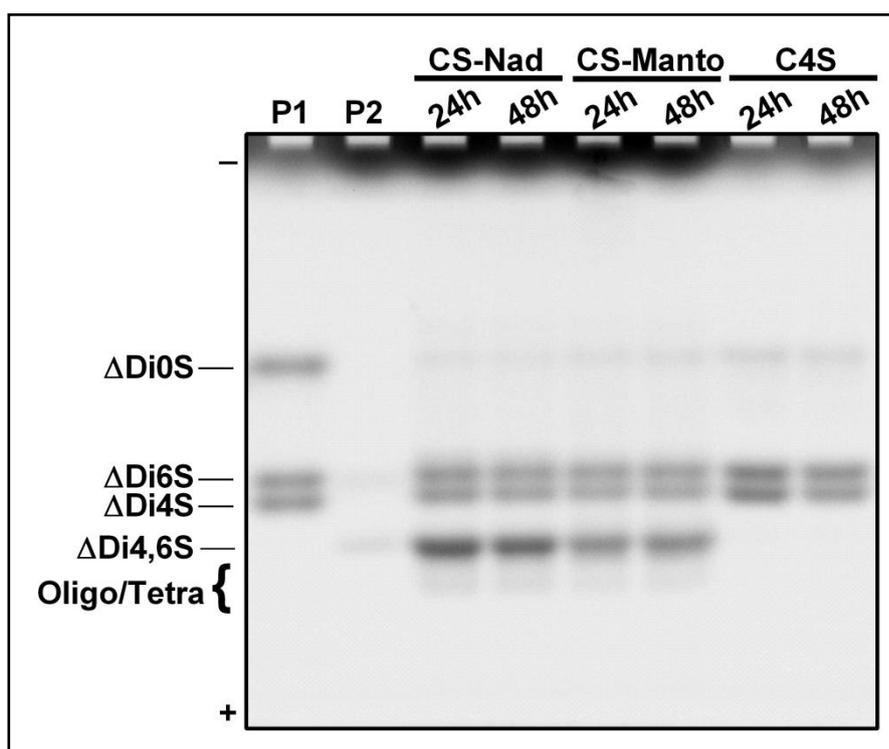


FIGURA 23. ELETROFLUOROGRAMAS NO SISTEMA TRIS-GLICINA DE PRODUTOS DE DIGESTÃO DE CONDRÓITIM SULFATO DE DIFERENTES ORIGENS POR CONDRÓITINASE AC DE *ARTHROBACTER AURESCENS*. Alíquotas (100 µg) de cada amostra foram incubadas por 24h e 48h com condroitinase AC-II e o correspondente a 20 µg destes materiais, derivatizados com AMAC(100 nmol). P1: mistura padrão contendo ΔDi0S, ΔDi6S, ΔDi4S. P2: Padrão de ΔDi4,6S. Oligo/Tetra: Oligossacarídeos e Tetrassacarídeo. CS-Nad: Condroitim Sulfato Nadadeira. CS-Manto: Condroitim Sulfato Manto. C4S: Condroitim 4-sulfato de traquéia bovina.

TABELA 6 - PORCENTAGEM RELATIVA DE PRODUTOS DE DIGESTÃO DE CS DE DIFERENTES ORIGENS POR CONDRÓITINASE AC-II DE *ARTHROBACTER AURESCENS*, DETERMINADA POR FACE TRIS-GLICINA.

Origem CS/Tempo de Incubação	% Relativa dos Produtos Identificados				
	ΔDi0S	ΔDi6S	ΔDi4S	ΔDi4,6S	Oligo/Tetra
Nadadeira de Lula (24h)	0,9	21,8	17,7	57,1	2,6
Nadadeira de Lula (48h)	0,8	21,8	18,9	55,7	2,7
Manto de Lula (24h)	2,6	24,6	19,5	51,2	2,1
Manto de Lula (48h)	2,9	21,5	21,3	52,1	2,2
Traquéia Bovina (Sigma) (24h)	5,4	46,6	48	-	-
Traquéia Bovina (Sigma) (48h)	6	46	48	-	-

Tetra: tetrassacarídeo; Oligo: oligossacarídeos

Podemos observar que a porcentagem dos produtos gerados após ação enzimática não apresentou alteração significativa entre os períodos de incubação de

24h e 48h. CS de nadadeira apresenta maior proporção de dissacarídeos sulfatados, tendo destaque para a maior proporção de dissacarídeos di-sulfatados. Já CS de manto apresenta maiores porcentagens de dissacarídeos não sulfatados.

A chase AC de *Flavobacterium heparinum* é uma liase que age endolíticamente em C4S e C6S (JANDIK *et al.*, 1994), assim como a chase AC de *Arthrobacter aurescens*, essa enzima não atua em dematam sulfato. Os resultados obtidos da digestão com chase AC de *Flavobacterium heparinum* são demonstrados na Figura 24.

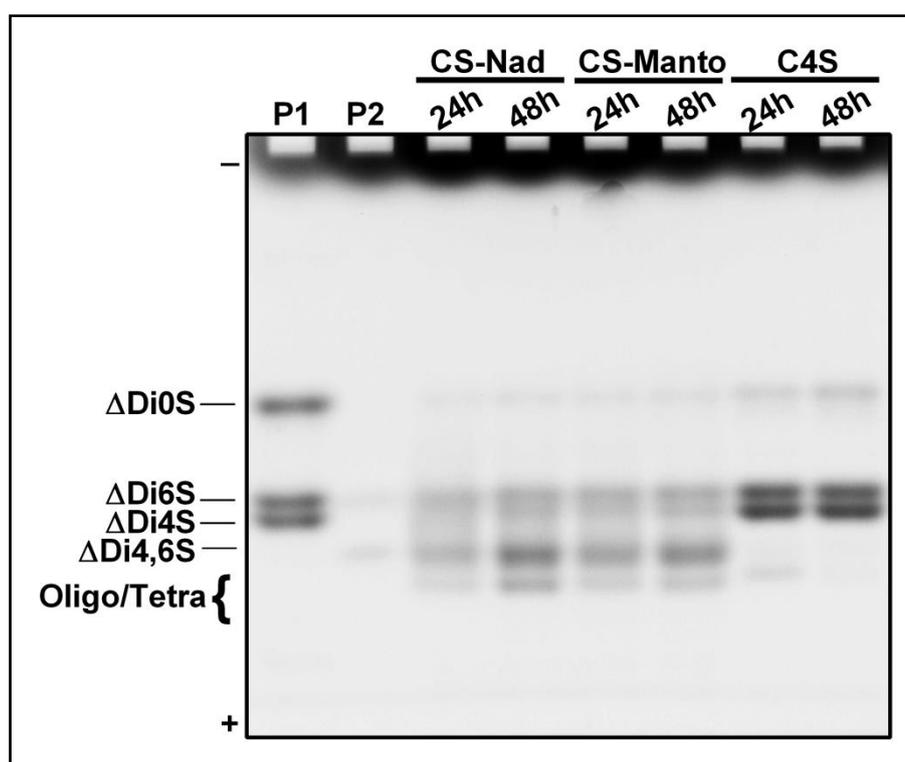


FIGURA 24. ELETROFLUOROGRAMAS NO SISTEMA TRIS-GLICINA DE PRODUTOS DE DIGESTÃO DE CONDRITIM SULFATO DE DIFERENTES ORIGENS POR CONDRITINASE AC DE *FLAVOBACTERIUM HEPARINUM*. Alíquotas (100 µg) de cada amostra foram incubadas por 24h e 48h com condroitinase AC e o correspondente a 20 µg destes materiais, derivatizados com AMAC (100 nmol). P1: mistura padrão contendo ΔDi0S, ΔDi6S, ΔDi4S. P2: Padrão de ΔDi4,6S. Oligo/Tetra: Oligossacarídeos e Tetrassacarídeo. CS-Nad: Condroitim Sulfato Nadadeira. CS-Manto: Condroitim Sulfato Manto. C4S: Condroitim 4-sulfato de traquéia bovina.

Para ambos CS de lula, a degradação com chase AC de *Flavobacterium heparinum* levou a formação de 40 a 45% de ΔDi4,6S, em torno de 40% de ΔDi4S e ΔDi6S, de 3 a 4% de ΔDi0S e 10 % de oligossacarídeos. CS de nadadeira e manto apresentaram proporções semelhantes de dissacarídeos sulfatados e CS manto apresentou uma proporção um pouco maior de dissacarídeos di-sulfatados. Essa variação se deve aos diferentes tempos de incubação (24 e 48 h) utilizados, com

maior formação de produtos após 48 horas. Percebemos ainda, a presença de arraste entre as bandas dos diferentes dissacarídeos dos CS de lula o que indica digestão incompleta destes. As porcentagens detalhadas dos resíduos gerados estão na Tabela 7.

TABELA 7 - PORCENTAGEM RELATIVA DE PRODUTOS DE DIGESTÃO DE CS DE DIFERENTES ORIGENS POR CONDRITINASE AC DE *FLAVOBACTERIUM HEPARINUM*, DETERMINADA POR FACE TRIS-GLICINA.

Origem CS/Tempo de Incubação	% Relativa dos Produtos Identificados				
	Δ Di0S	Δ Di6S	Δ Di4S	Δ Di4,6S	Oligo/Tetra
Nadadeira de Lula (24h)	2,9	33,2	18,5	38,3	7,2
Nadadeira de Lula (48h)	4,1	21,4	18,4	43,5	12,6
Manto de Lula (24h)	4,0	26,4	19,2	39,9	10,5
Manto de Lula (48h)	3,8	22,26	17,94	45,1	10,9
Traquéia Bovina (Sigma) (24h)	5,2	42,0	48,6	-	4,3
Traquéia Bovina (Sigma) (48h)	7,0	39,5	53,4	-	-

Tetra: tetrassacarídeo; Oligo: oligossacarídeos

Na Tabela 7 verificamos que as porcentagens dos diferentes dissacarídeos formados a partir da digestão dos CS de lula aumentam no período de 48h em relação ao período de 24h.

A condroitinase ABC de *Proteus vulgaris* age endoliticamente em C4S e C6S. Essa enzima reconhece também resíduos de glucuronatos de ácido idurônico encontrados em dermatam sulfato (JANDIK *et al.*, 1994). O resultado da digestão dos CS de lula e C4S padrão é apresentado a seguir.

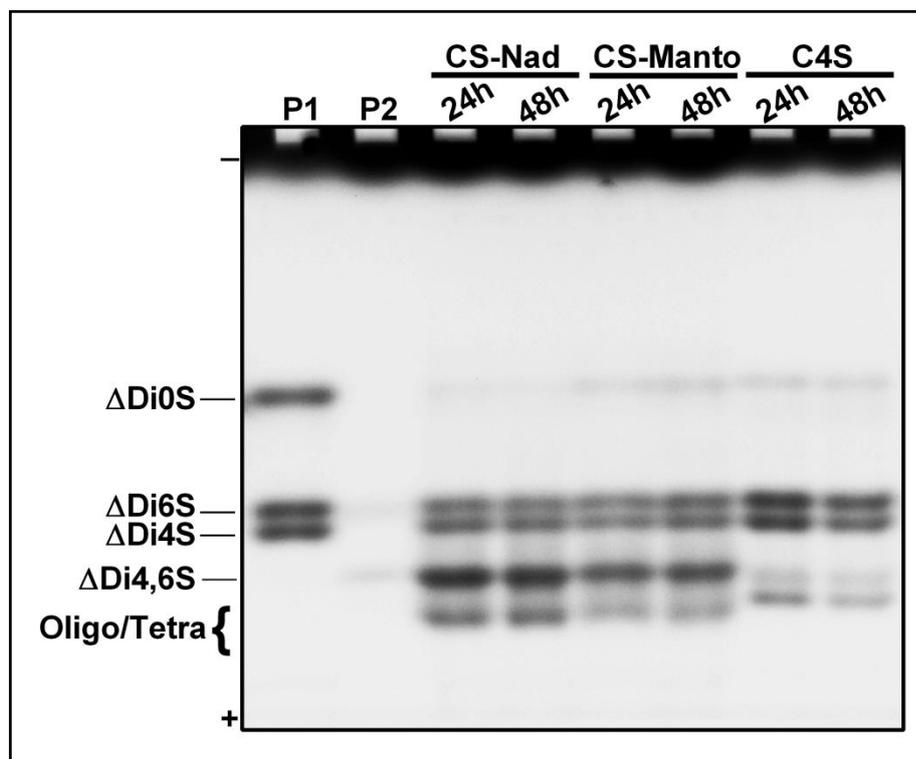


FIGURA 25. ELETROFLUOROGRAMAS NO SISTEMA TRIS-GLICINA DE PRODUTOS DE DIGESTÃO DE CONDRITIM SULFATO DE DIFERENTES ORIGENS POR CONDRITINASE ABC DE *PROTEUS VULGARIS*. Alíquotas (100 μg) de cada amostra foram incubadas por 24h e 48h com condroitinase ABC e o correspondente a 20 μg destes materiais, derivatizados com AMAC (100 nmol). P1: mistura padrão contendo $\Delta\text{Di}0\text{S}$, $\Delta\text{Di}6\text{S}$, $\Delta\text{Di}4\text{S}$. P2: Padrão de $\Delta\text{Di}4,6\text{S}$. Oligo/Tetra: Oligossacarídeos e Tetrassacarídeo. CS-Nad: Condroitím Sulfato Nadadeira. CS-Manto: Condroitím Sulfato Manto. C4S: Condroitím 4-sulfato de traquéia bovina.

Observamos na Figura 25, que a digestão dos CS de nadadeira e manto por chase ABC além de formar os dissacarídeos $\Delta\text{Di}0\text{S}$, $\Delta\text{Di}4\text{S}$, $\Delta\text{Di}6\text{S}$, $\Delta\text{Di}4,6\text{S}$ e oligossacarídeos, formam os mesmos arrastes visualizados na degradação por chase AC de *F. heparinum*, indicando também digestão incompleta destes compostos. A análise densitométrica permitiu verificar que nessa digestão a proporção dissacarídeos $\Delta\text{Di}4,6\text{S}$ foi duas vezes maior do que a de $\Delta\text{Di}4\text{S}$ e de $\Delta\text{Di}6\text{S}$, além disso, percebemos que essas incubações geraram uma alta porcentagem de oligossacarídeos, superior a 15% inclusive para o C4S padrão (Tabela 8).

TABELA 8 - PORCENTAGEM RELATIVA DE PRODUTOS DE DIGESTÃO DE CS DE DIFERENTES ORIGENS POR CONDRITINASE ABC DE *PROTEUS VULGARIS*, DETERMINADA POR FACE TRIS-GLICINA.

Origem CS/Tempo de Incubação	% Relativa dos Produtos Identificados				
	Δ Di0S	Δ Di6S	Δ Di4S	Δ Di4,6S	Oligo/Tetra
Nadadeira de Lula (24h)	1,4	20,3	20,9	41,6	15,8
Nadadeira de Lula (48h)	0,9	18,6	21,1	41,2	18,2
Manto de Lula (24h)	3,1	22,9	23,9	34,7	15,4
Manto de Lula (48h)	4,2	19,9	20,8	38,2	16,9
Traquéia Bovina (Sigma) (24h)	5,2	38,7	37,1	-	19,1
Traquéia Bovina (Sigma) (48h)	7,0	39,5	53,4	-	18,5

Tetra: tetrassacarídeo; Oligo: oligossacarídeos

As porcentagens dos dissacarídeos para os CS de lula e C4S padrão não apresentaram alterações significativas entre os tempos de incubação de 24h e 48h.

Uma vez verificada a alta porcentagem de oligossacarídeos e a presença de arrastes nas incubações com chase AC de *F. Heparinum* e chase ABC de *P. vulgaris*, decidimos realizar misturas de incubação contendo combinação dessas duas enzimas na tentativa de aumentar a digestão e conseqüentemente reduzir os oligossacarídeos formados. Esses experimentos foram conduzidos no período de 24h com uma única enzima e por mais um período de 24h após adição da segunda enzima (Métodos 3.2.3.3.1).

O resultado de digestão combinando-se inicialmente a chase AC de *F. Heparinum* e após 24h, adição a chase ABC de *P. vulgaris* está apresentado na Figura 26.

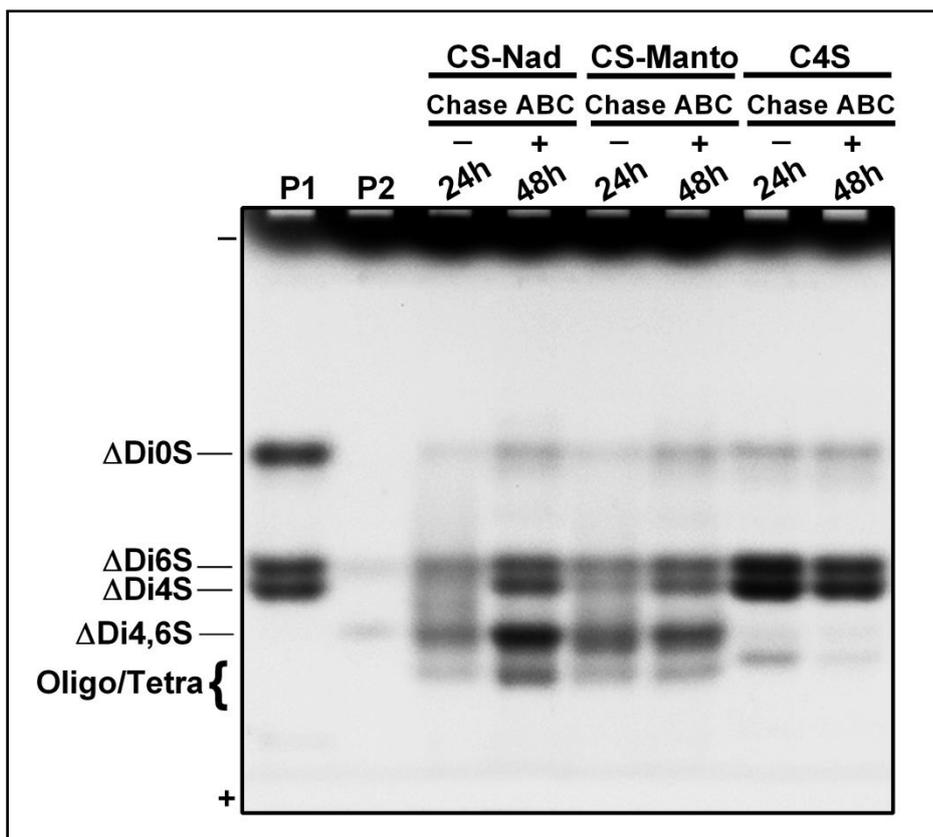


FIGURA 26. ELETROFLUOROGRAMAS NO SISTEMA TRIS-GLICINA DE PRODUTOS DE DIGESTÃO DE CONDRÓITIM SULFATO DE DIFERENTES ORIGENS POR CONDRÓITINASE AC DE *FLAVOBACTERIUM HEPARINUM* (24H E 48H) E ADIÇÃO DE CONDRÓITINASE ABC DE *PROTEUS VULGARIS* APÓS PERÍODO DE 24H. Alíquotas (100 µg) de cada amostra foram incubadas por 24h e 48h com condroitinase AC e 24h com ABC e o correspondente a 20 µg destes materiais, derivatizados com AMAC (100 nmol). P1: mistura padrão contendo Δ Di0S, Δ Di6S, Δ Di4S. P2: Padrão de Δ Di4,6S. Oligo/Tetra: Oligossacarídeos e Tetrassacarídeo. CS-Nad: Condroitím Sulfato Nadadeira. CS-Manto: Condroitím Sulfato Manto. C4S: Condroitím 4-sulfato de traquéia bovina.

Como podemos observar na Figura 26, a adição de chase ABC de *Proteus vulgaris* após o período de digestão com chase AC de *F. Heparinum* favoreceu a quebra dos CS de lula, com a diminuição do arraste e aumento na produção dos dissacarídeos di-sulfatados e monosulfatados. Porém, algumas regiões desses compostos continuam a ser resistentes à ação enzimática, devido à alta porcentagem de oligos/tetras formados.

A Tabela 9 descreve as porcentagens encontradas dos dissacarídeos e oligossacarídeos quantificados pela análise densitométrica.

TABELA 9 - PORCENTAGEM RELATIVA DE PRODUTOS DE DIGESTÃO DE CS DE DIFERENTES ORIGENS POR DIGESTÃO COM CONDRITINASE AC DE *FLAVOBACTERIUM HEPARINUM* E CONDRITINASE ABC DE *PROTEUS VULGARIS*, DETERMINADA POR FACE TRIS-GLICINA.

Origem CS/Tempo de Incubação	% Relativa dos Produtos Identificados				
	Δ Di0S	Δ Di6S	Δ Di4S	Δ Di4,6S	Oligo/Tetra
Nadadeira de Lula (24h)	1,9	44,3		44,8	9
Nadadeira de Lula (48h)	4,8	17,2	19,9	43,7	14,5
Manto de Lula (24h)	3,6	23,5	16,7	47,2	9,1
Manto de Lula (48h)	6,6	20,3	21,2	41,3	10,6
Traquéia Bovina (Sigma) (24h)	4,4	40,4	49,7	-	5,5
Traquéia Bovina (Sigma) (48h)	6,2	40,6	53,2	-	-

Tetra: tetrassacarídeo; Oligo:Oligossacarídeo

Apesar de verificar o aumento da intensidade da banda de todos sacarídeos após a incubação no período 48h, notamos que na digestão de CS de nadadeira e CS de manto a porcentagem relativa de dissacarídeos monosulfatados e di-sulfatados diminui e de dissacarídeos não sulfatados e Oligo/Tetrassacarídeos aumentam após adição de chase ABC.

A Figura 27 apresenta os produtos de digestão dos CS de lula formados após incubação com chase ABC de *P. vulgaris* e adição de chase AC de *F. Heparinum* após 24h.

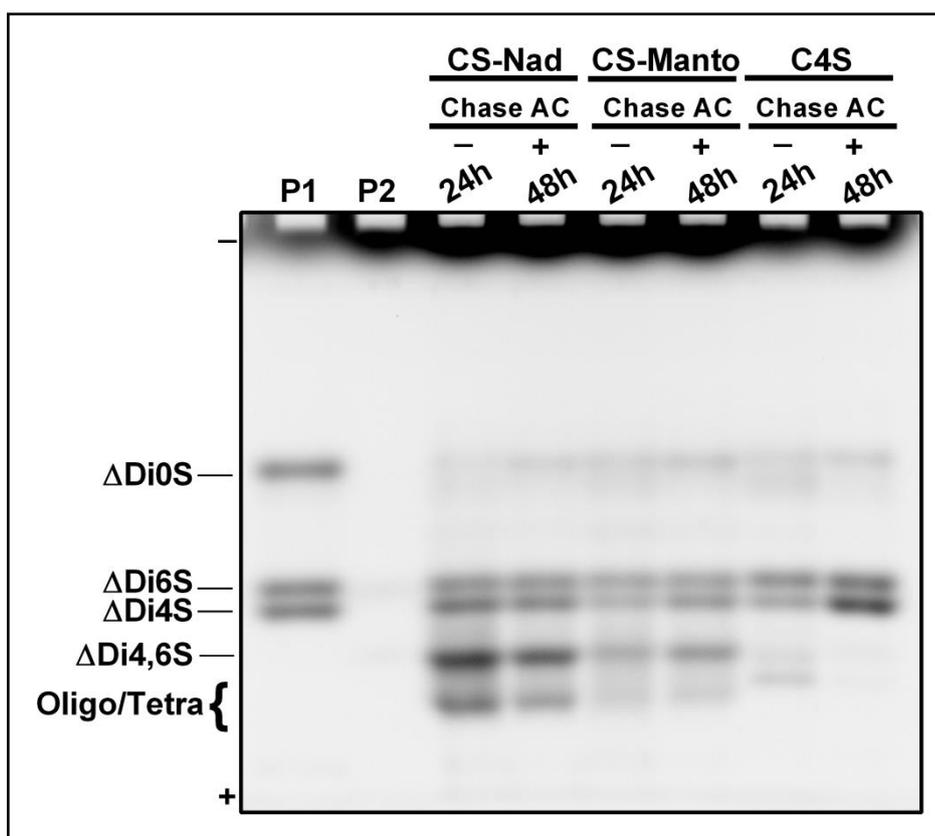


FIGURA 27. ELETROFLUOROGRAMAS NO SISTEMA TRIS-GLICINA DE PRODUTOS DE DIGESTÃO DE CONDRITIM SULFATO DE DIFERENTES ORIGENS POR CONDRITINASE ABC DE *PROTEUS VULGARIS* (24H E 48H) E ADIÇÃO DE CONDRITINASE AC *FLAVOBACTERIUM HEPARINUM* APÓS PERÍODO DE 24H. Aliquotas (100 µg) de cada amostra foram incubadas por 24h e 48h com condroitinase AC e 24h com ABC e o correspondente a 20 µg destes materiais, derivatizados com AMAC (100 nmol). P1: mistura padrão contendo Δ Di0S, Δ Di6S, Δ Di4S. P2: Padrão de Δ Di4,6S. Oligo/Tetra: Oligossacarídeos e Tetrassacarídeo. CS-Nad: Condroitim Sulfato Nadadeira. CS-Manto: Condroitim Sulfato Manto. C4S: Condroitim 4-sulfato de traquéia bovina.

TABELA 10 - PORCENTAGEM RELATIVA DE PRODUTOS DE DIGESTÃO DE CS DE DIFERENTES ORIGENS POR DIGESTÃO COM CONDRITINASE ABC DE *PROTEUS VULGARIS* E CONDRITINASE AC DE *FLAVOBACTERIUM HEPARINUM* E, DETERMINADA POR FACE TRIS-GLICINA.

Origem CS/Tempo de Incubação	% Relativa dos Produtos Identificados				
	Δ Di0S	Δ Di6S	Δ Di4S	Δ Di4,6S	Oligo/Tetra
Nadadeira de Lula (24h)	0,9	13,6	19,8	39,9	25,8
Nadadeira de Lula (48h)	3,2	16,2	22,3	38,8	19,54
Manto de Lula (24h)	7,5	25,4	25,1	33,3	8,7
Manto de Lula (48h)	6,7	22	27,4	32,2	11,7
Traquéia Bovina (Sigma) (24h)	6,4	45,5	30,6	-	17,5
Traquéia Bovina (Sigma) (48h)	7,3	37,7	55,1	-	-

Tetra: tetrassacarídeo; Oligo: oligossacarídeos

Resultados semelhantes ao já obtidos foram observados com a inversão das condroitinases (Figura 27), ou seja, aumento dos dissacarídeos formados com a diminuição do arraste. A porcentagem relativa dos dissacarídeos foi apresentada na Tabela 10.

Na tentativa de levar os CS de *Doryteuthis plei* a somente dissacarídeos, executamos a incubação utilizando o Extrato Bruto de *F. heparinum*, Figura 28.

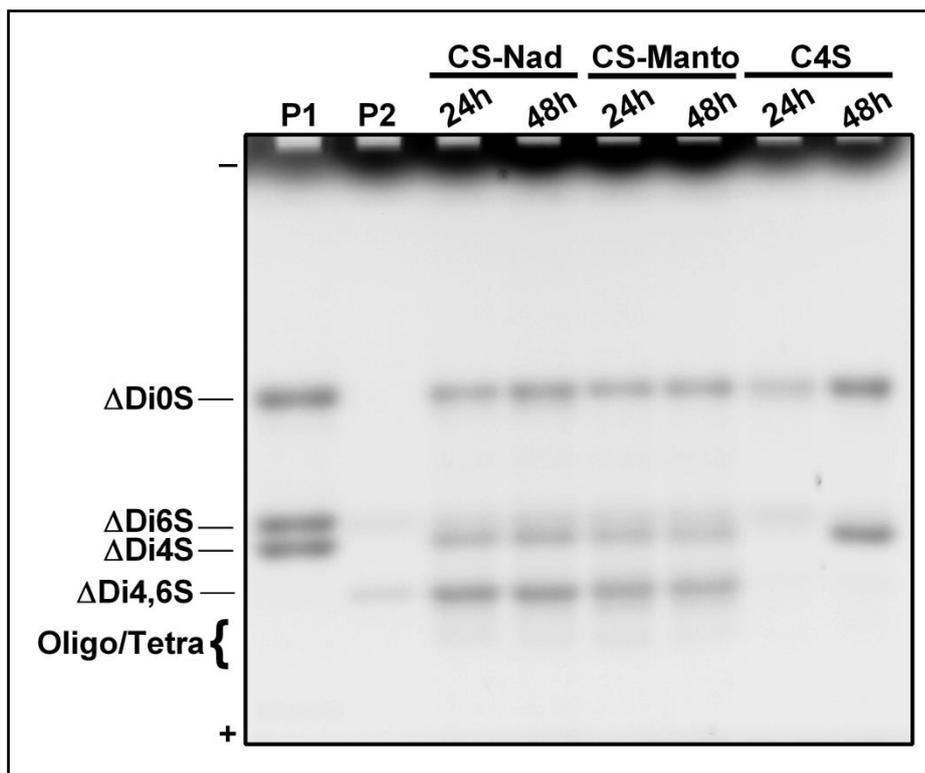


FIGURA 28. ELETROFLUOROGRAMAS NO SISTEMA TRIS-GLICINA DE PRODUTOS DE DIGESTÃO DE CONDRITIM SULFATO DE DIFERENTES ORIGENS POR EXTRATO BRUTO DE *FLAVOBACTERIUM HEPARINUM*. Aliquotas (100 μ g) de cada amostra foram incubadas por 24h e 48h com extrato bruto de *Flavobacterium heparinum* e o correspondente a 20 μ g destes materiais, derivatizados com amac (100 nmol). P1: mistura padrão contendo Δ Di0S, Δ Di6S, Δ Di4S. P2: Padrão de Δ Di4,6S. Oligo/Tetra: Oligossacarídeos e Tetrassacarídeo. CS-Nad: Condroitim Sulfato Nadadeira. CS-Manto: Condroitim Sulfato Manto. C4S: Condroitim 4-sulfato de traquéia bovina.

Notamos na Figura 28 que houve a formação principalmente de resíduos de Δ Di0S e Δ Di4,6S em ambos CS de lula e menor formação de dissacarídeos monosulfatados tanto no período de 24h quanto no de 48h de incubação. Ao avaliar a incubação com C4S não possível visualizar as bandas de Δ Di4S e Δ Di6S no período de 24h. Esse fato se deve à presença de enzimas envolvidas na despolimerização completa dos GAGs, tais como sulfatases e glucuronidases, presentes no extrato bruto de *F. Heparinum*. Dessa forma esses resultados não foram considerados representativos na caracterização desses compostos.

Realizamos ainda, digestão dos CS de *Doryteuthis plei* com chase B de *F. heparinum* (Figuras 29 e 30).

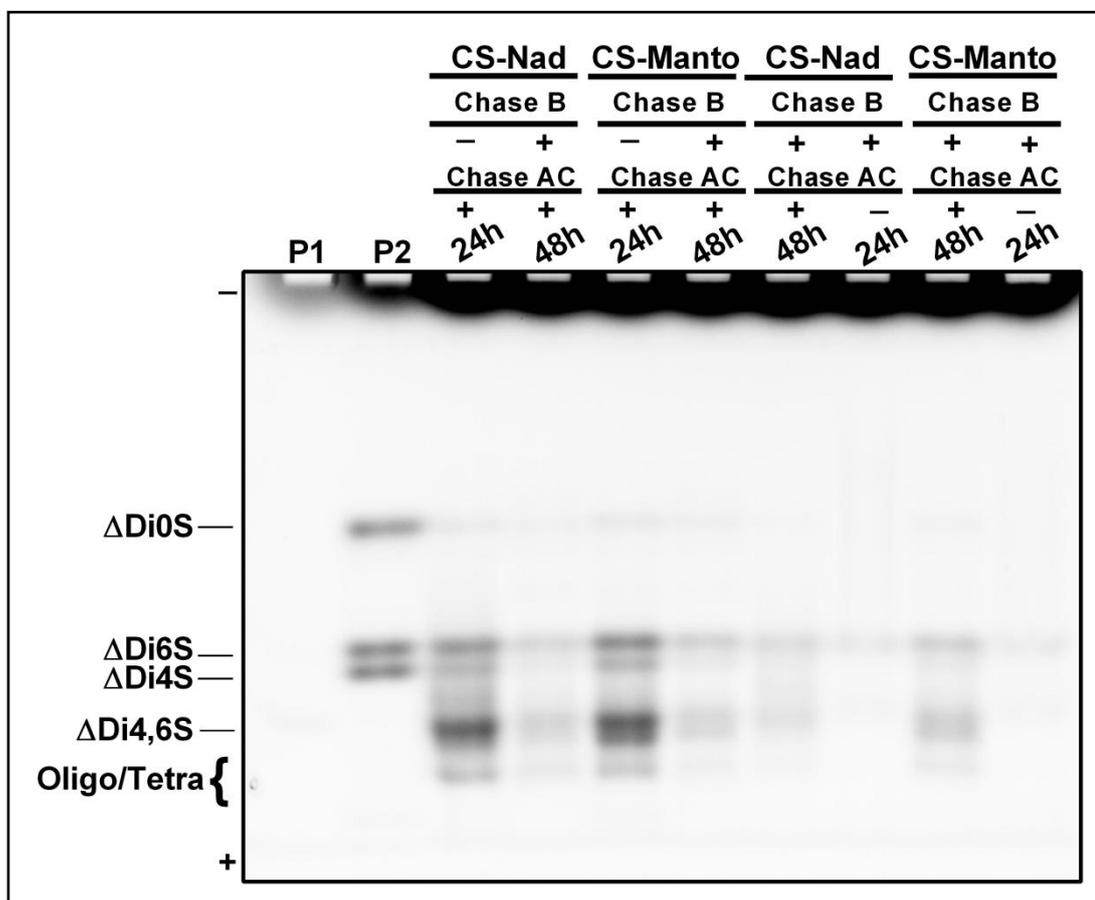


FIGURA 29. ELETROFLUOROGRAMAS NO SISTEMA TRIS-GLICINA DE PRODUTOS DE DIGESTÃO DE CONDRÓITIM SULFATO DE LULA POR CONDRÓITINASE AC *FLAVOBACTERIUM HEPARINUM* (24H E 48H) ADIÇÃO DE CONDRÓITINASE B DE *FLAVOBACTERIUM HEPARINUM* APÓS 24H. PRODUTOS DE DIGESTÃO DE CONDRÓITIM SULFATO DE LULA POR CONDRÓITINASE B *FLAVOBACTERIUM HEPARINUM* (24H E 48H) ADIÇÃO DE CONDRÓITINASE AC DE *FLAVOBACTERIUM HEPARINUM* APÓS 24H. Alíquotas (100 μ g) de cada amostra foram incubadas por 24h e 48h com condroitinase AC e B de *Flavobacterium heparinum* o correspondente a 20 μ g destes materiais, derivatizados com AMAC (100 nmol). P1: Padrão de Δ Di4,6S. P2: mistura padrão contendo Δ Di0S, Δ Di6S, Δ Di4S. Oligo/Tetra: Oligossacarídeos e Tetrassacarídeo. CS-Nad: Condroitím Sulfato Nadadeira. CS-Manto: Condroitím Sulfato Manto.

Não houve formação de dissacarídeos na presença de chase B de *F. heparinum*.

O eletrofluorograma da digestão de C4S padrão com chase AC e B de *F. heparinum* está representado na Figura 30.

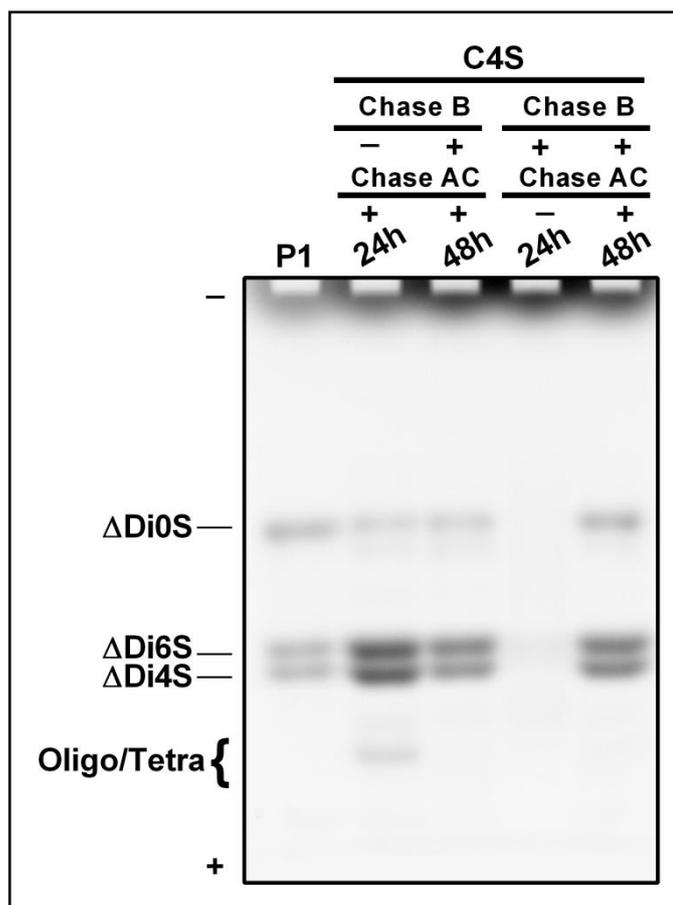


FIGURA 30. ELETROFLUOROGRAMAS NO SISTEMA TRIS-GLICINA DE PRODUTOS DE DIGESTÃO DE CONDRITIM 4-SULFATO DE TRAQUÉIA BOVINA POR CONDRITINASE AC *FLAVOBACTERIUM HEPARINUM* (24H E 48H) ADIÇÃO DE CONDRITINASE B DE *FLAVOBACTERIUM HEPARINUM* APÓS 24H. PRODUTOS DE DIGESTÃO DE CONDRITIM 4-SULFATO DE TRAQUÉIA BOVINA POR CONDRITINASE B *FLAVOBACTERIUM HEPARINUM* (24H E 48H) ADIÇÃO DE CONDRITINASE AC DE *FLAVOBACTERIUM HEPARINUM* APÓS 24H. Alíquotas (100 µg) de cada amostra foram incubadas por 24h e 48h com condroitinase AC e B de *Flavobacterium heparinum* o correspondente a 20 µg destes materiais, derivatizados com AMAC (100 nmol). P1: mistura padrão contendo ΔDi0S, ΔDi6S, ΔDi4S. Oligo/Tetra: Oligossacarídeos e Tetrassacarídeo. C4S: Condroitim 4-sulfato de traquéia bovina.

4.2.3 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS

Análises estruturais utilizando-se espectroscopia de Raman e ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas nos CS de tecidos de manto e nadadeira de lula.

4.2.3.1 Espectroscopia de Raman

A espectroscopia de Raman é um método em que se obtêm uma completa impressão digital molecular da amostra em estudo. Esse método espectroscópico é rápido, não destrutivo e não necessita de marcadores externos, tornando-se uma importante técnica para análise de substâncias.

Para a identificação das bandas características de CS, realizamos a análise espectroscópica de um C4S (comercial) e desse mesmo GAG após ser submetido a processos de modificação estrutural incluindo carboxirredução e dessulfatação como descrito em métodos 3.2.4.2, usamos também informações da literatura para auxiliar na identificação das bandas espectroscópicas.

O C4S (comercial) foi analisado quanto ao teor de sulfato e ácido urônico por dosagens químicas, antes e após os processos de dessulfatação e carboxirredução (Tabela 11).

TABELA 11. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE CONDROITIM 4-SULFATO COMERCIAL E SUAS MODIFICAÇÕES.

Amostra	Hexosamina	Ácido Urônico	Proporção Sulfato Total/Dissacarídeo
C4S Comercial	1	1,0	0,96
C4S Comercial Carboxirreduzido	1	0,8	1,07
C4S Comercial Dessulfatado (24h)	1	1,3	0,70
C4S Comercial Dessulfatado (48h)	1	1,2	0,12

Como podemos visualizar na Tabela 11 os processos de carboxi-redução e dessulfatação foram eficientes quanto a sua execução, reduzindo respectivamente o número de carboxilas e grupos sulfato por dissacarídeo na molécula de C4S.

A análise espectroscópica de Raman de C4S e seus análogos modificados está apresentada na Figura 31.

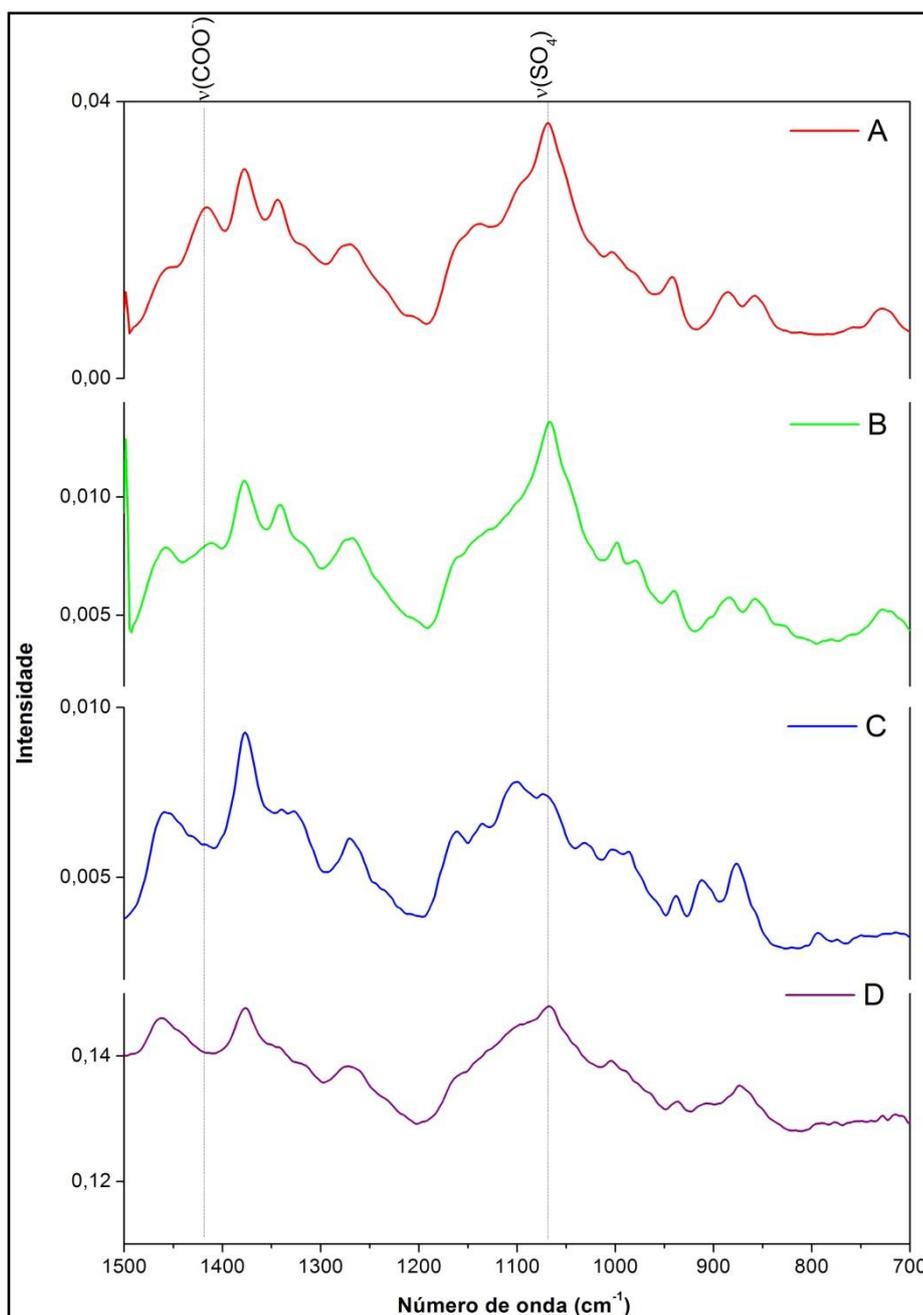


FIGURA 31. ESPECTRO RAMAN DE C4S COMERCIAL E SUAS MODIFICAÇÕES. (A) C4S COMERCIAL, (B) C4S COMERCIAL CARBOXI-REDUZIDO, (C) C4S COMERCIAL DESSULFATADO 24H, (D) C4S DESSULFATADO 48H.

Notamos que C4S (Figura 31-A) possui uma banda principal, com maior intensidade em 1070 cm^{-1} descrita na literatura (BANSIL *et al.*, 1978) como vibrações de ligações de grupamentos sulfato $\nu(\text{SO}_4)$. Verificamos que as linhas do espectro de C4S submetido ao processo de dessulfatação em diferentes tempos ficaram mais largas o que indica que modificações aconteceram na molécula, entre elas o alargamento da banda em 1070 cm^{-1} associada à diminuição do espalhamento da luz

pela perda dos grupos sulfato. Além disso, verificamos o desaparecimento da banda de COO^- descrita na literatura em 1415 cm^{-1} (BANSIL *et al.*, 1978), fato provavelmente relacionado à metilação deste grupamento que ocorre neste processo levando a um desaparecimento dessa banda (Figura 31-C e 31-D). Esses efeitos verificados reforçam que o Raman é assinatura digital da molécula, já que as modificações químicas realizadas alteraram o espectro característico de C4S. O processo de carboxi-redução executado não levou ao desaparecimento da banda da carboxila (Figura 31-B), o que confirma a dosagem química realizada, uma vez que carboxilas de ácido glucurônico foram detectadas mesmo após a modificação. Os efeitos gerados no espectro desse processo parecem estar mais associados ao menor espalhamento da luz o que levou ao alargamento da banda de COO^- , já que não houve alteração do espectro característico de C4S.

A análise de condroitim monossulfatado como C4S e C6S está bem estabelecida, tendo espectros característicos para cada molécula (BANSIL *et al.*, 1978). Ainda não há relatos de estudos de espectroscopia de Raman de CS de lula. Desta forma, realizamos a análise espectroscópica dos CS de nadadeira e manto e identificamos as bandas características utilizando as informações obtidas do estudo das modificações químicas e dos dados da literatura.

Os principais números de onda vibracionais em espectroscopia Raman de C4S, C6S e CS de lula foram analisados (Figura 32).

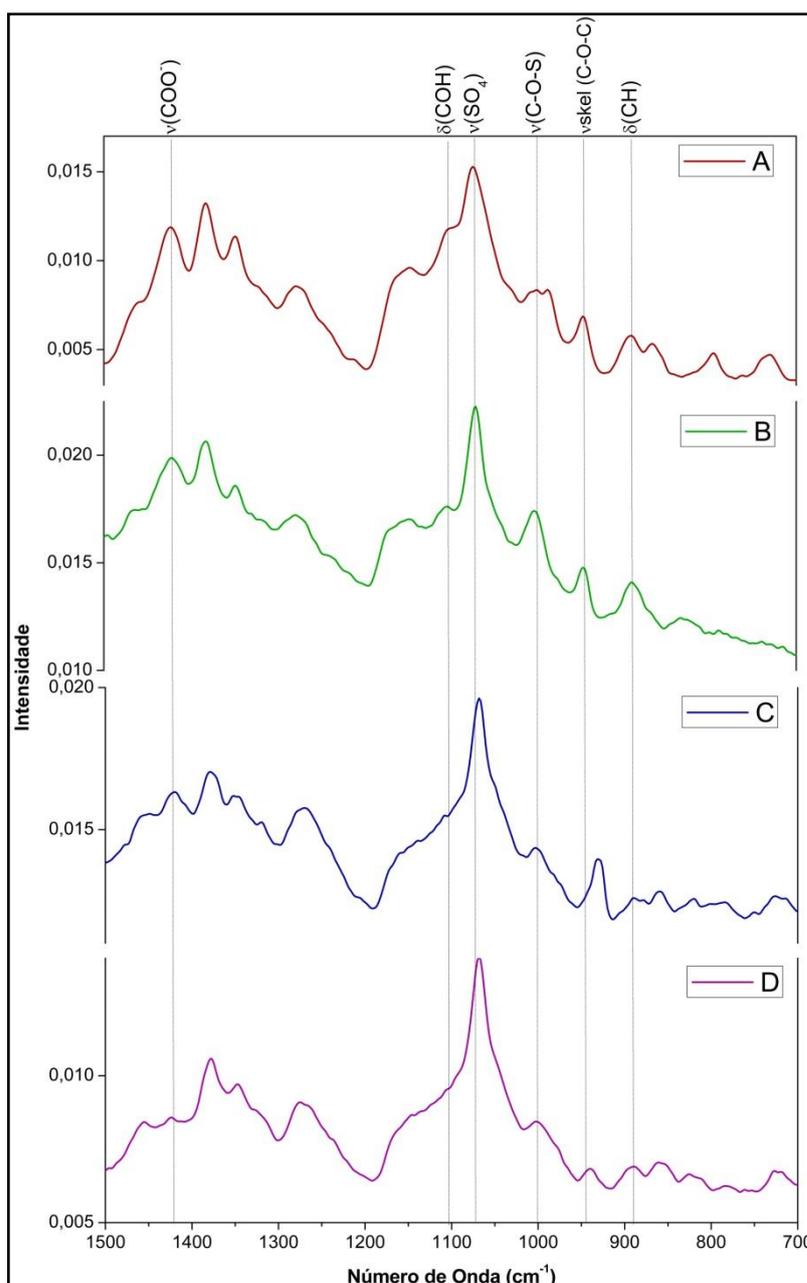


FIGURA 32. ESPECTRO RAMAN DE CS PADRÃO E CS DE LULA. (A) C4S, (B) C6S, (C) CS DE MANTO, (D) CS DE NADADEIRA.

A bandas intensas de CS em 1070 cm^{-1} foram designadas para vibração do grupo sulfato $\nu(\text{SO}_4)$. Outras vibrações referentes a grupos sulfato têm sido identificadas para ligações de C-O-S em 993 cm^{-1} . Deformações de hidrogênio de C1 foram caracterizadas para números de onda próximos a 890 cm^{-1} . As vibrações em 940 cm^{-1} são designadas para vibração de esqueleto C-O-C de ligações $\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow4)$ de GAGs. Modos de deformação de C-OH foram identificados a 1100 cm^{-1} , geralmente esta banda fica mascarada em função das vibrações de grupos sulfato.

Bandas de grupos carboxilas $\nu(\text{COO}^-)$ de resíduos de glucuronatos foram identificadas em 1415 cm^{-1} . As diferentes bandas identificadas para os diferentes CS estão descritos na Tabela 12.

TABELA 12. BANDAS RAMAN E ATRIBUIÇÕES VIBRACIONAIS DE C4S, C6S, CS MANTO, CS NADADEIRA.

Bandas/Amostras	C4S	C6S	CS	CS
			Manto	Nadadeira
$\nu(\text{COO}^-)$	1417m	1415m	1421	1426
δCOH	1099o	1096m	-	-
$\nu(\text{SO}_4)$	1068i	1068i	1068i	1068i
$\nu(\text{C-O-S})$	995m/981o	997i	1003m/971o	1003m/977o
$(\text{C-O-C}) \nu_{\text{skel}}$	941m	940m	930m	939m
$\delta(\text{CH})$	887m	884m	890m	890m

m:médio; i:intenso; o:ombro;

Os espectros dos CS de lula foram mais semelhantes aos dados espectrais C4S. Não conseguimos visualizar as bandas de δCOH nos CS de lula. Não conseguimos distinguir bandas de grupos sulfato que diferenciem os CS de manto e nadadeira em relação aos padrões.

4.2.3.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros ^1H de condroitim sulfato (CS-A, CS-C and CS obtido de manto e nadadeira) estão ilustrados na Figura 33.

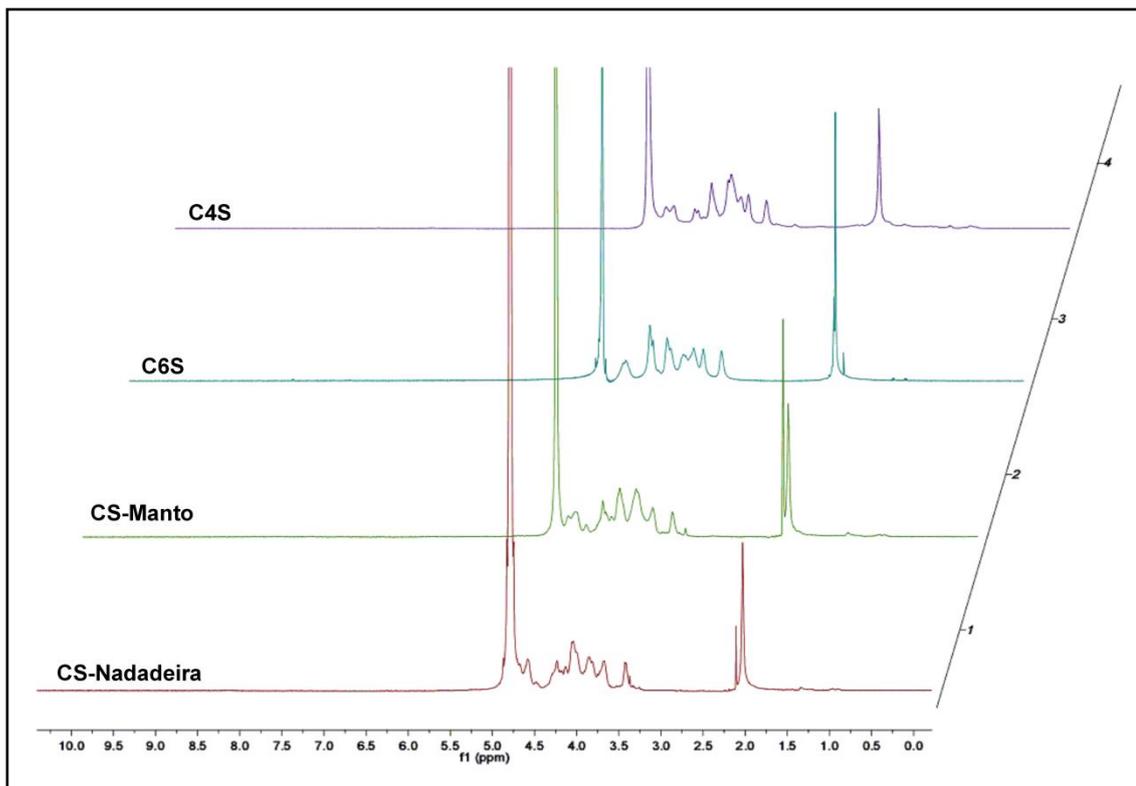


FIGURA 33. ESPECTRO DE ^1H RMN DE C4S, C6S, CS MANTO, CS NADADEIRA.

Na Figura 33, como previamente descrito para outras amostras de CS (MUCCI, SCHENETTI & VOLPI, 2000), sinais de ^1H RMN são encontrados em duas regiões espectrais, os sinais de metil acetamida (1.9 e 2.1 ppm) e entre 3.0 e 5.0 ppm, relativo a todos os outros sinais de hidrogênio. Os sinais dos espectros de ^1H de carboidratos ficam muito sobrepostos e dessa forma torna-se difícil de tirar informações a respeito dos mesmos.

Os espectros ^{13}C dos CS padrões e CS lula estão apresentados na Figura 34.

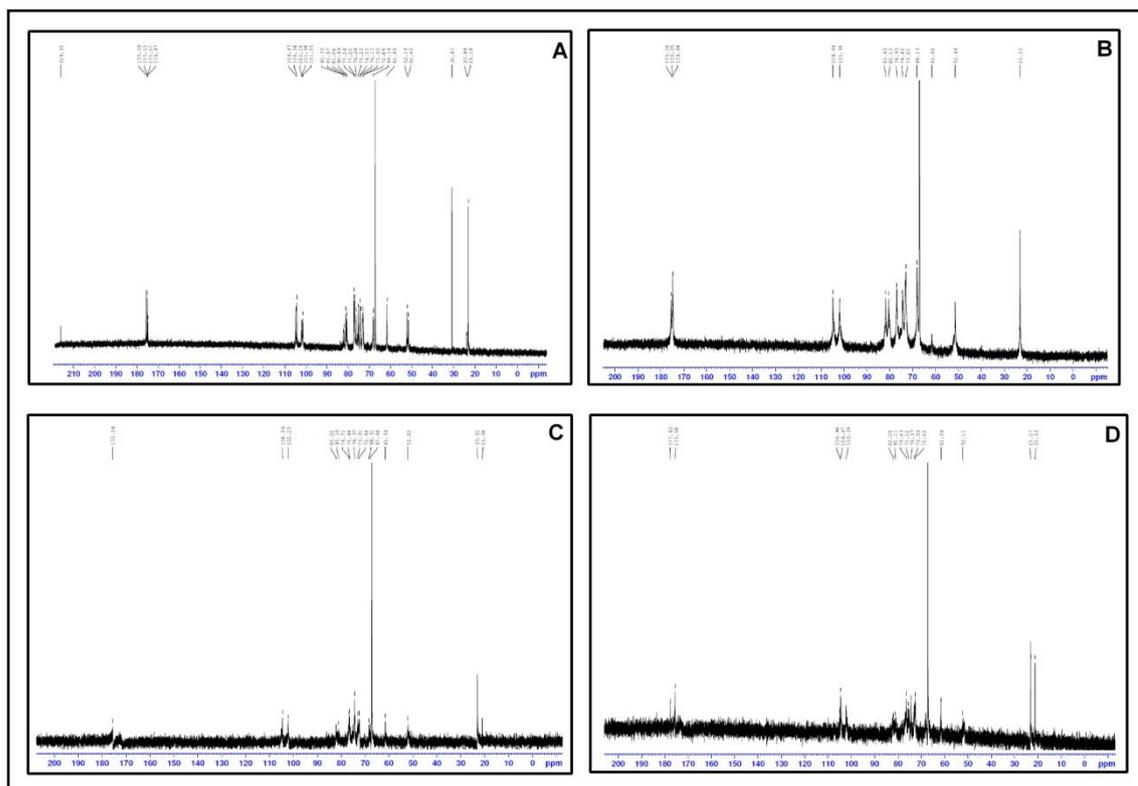


FIGURA 34. ESPECTRO DE ^{13}C RMN DE C4S (A), C6S (B), CS NADADEIRA (C), CS MANTO (D).

Na figura 34, visualizamos que com exceção das carbonilas (175-178 ppm) e os carbonos da metil acetamida (21-23 ppm), todos outros sinais encontrados na análise do espectro ^{13}C das amostras analisadas estão entre as regiões de 50-110 ppm.

Tanto nas análises do espectro de ^1H quanto na de ^{13}C a atribuição dos sinais é difícil de realizada isoladamente, com isso o acoplamento dos dois tipos de núcleos pode ser uma interação muito útil. Essa notável diferença entre ordens de acoplamento nos oferece uma maneira sensível de identificar carbonos e prótons que estejam ligados diretamente um ao outro, desta forma executamos experimentos 2D com as programações HSQC e HMBC a fim estabelecer correlações que nos pudessem conduzir à atribuições das moléculas de CS de lula. Para isso utilizamos os dados da literatura e realizamos a comparação com os espectros 2D de C4S e C6S, visando principalmente definir os sinais que seriam equivalentes a presença ou não de sulfatação nas posições 4 e 6 da GalNAc e 2 do GlcA.

A análise de HSQC de C4S e C6S permitiu a distinção de alguns sinais que não tinham sido atribuídos ainda (Figuras 35 e 36).

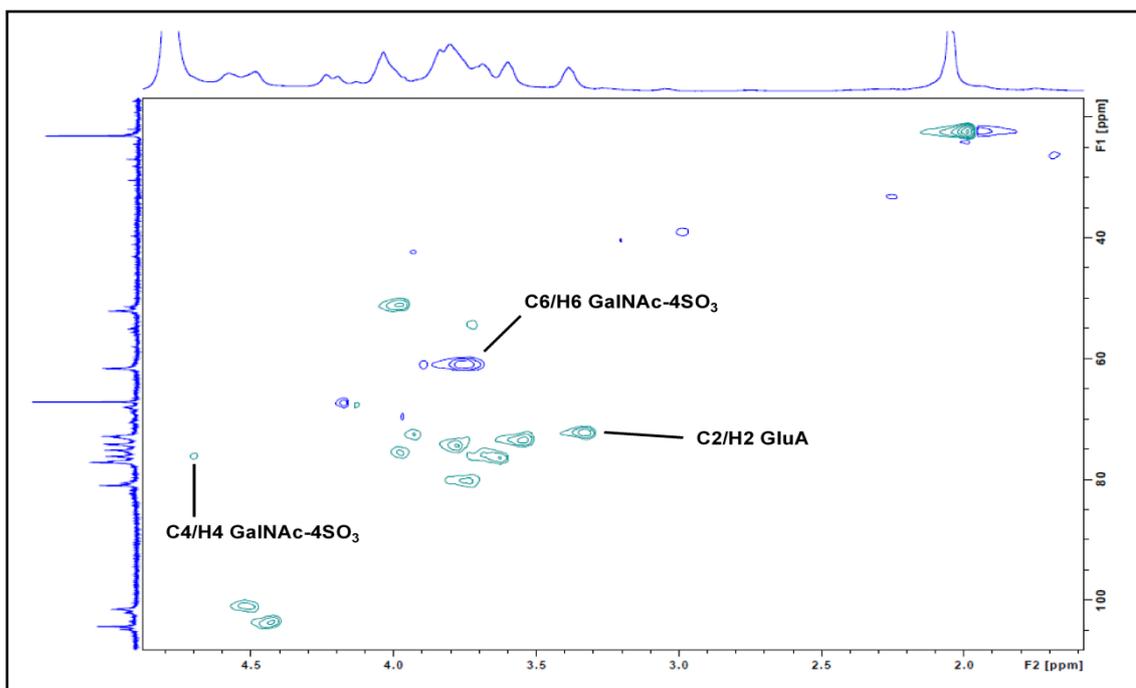


FIGURA 35. EXPANSÃO DE ESPECTRO 2D ^1H ^{13}C DE C4S PADRÃO.

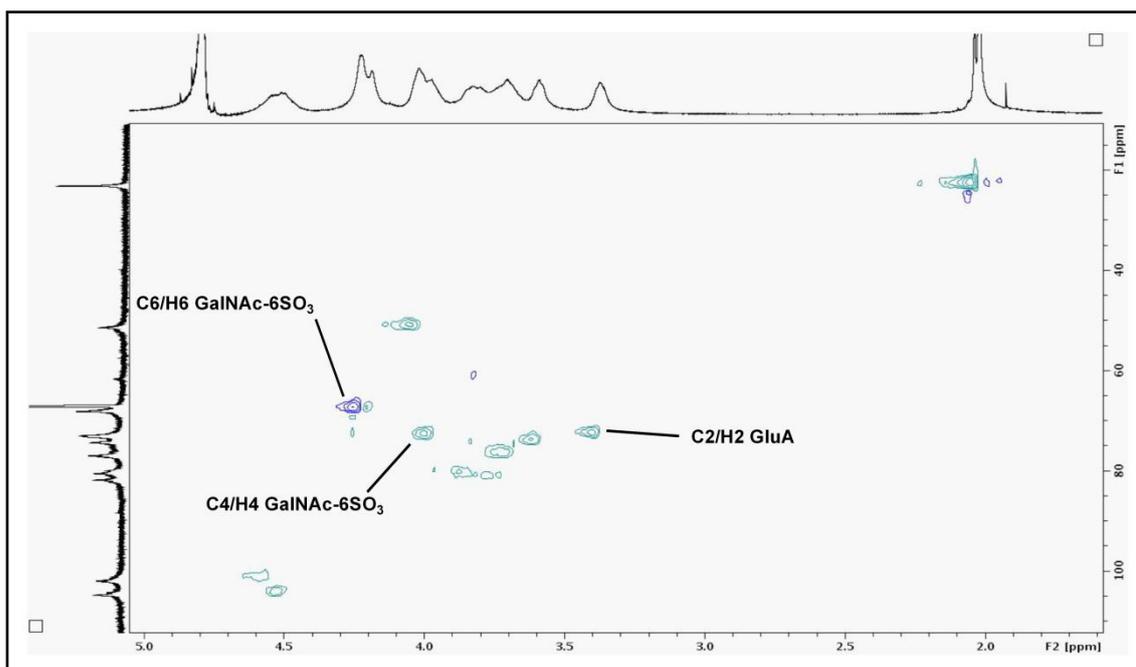


FIGURA 36. EXPANSÃO DE ESPECTRO 2D ^1H ^{13}C DE C6S PADRÃO.

É possível observar nos espectros acima a correlação (4.7 – 77.0 ppm) que corresponde a C4/H4 de GalNAc-4SO₄ para C4S padrão e está ausente em C6S padrão, esta correlação também existe nas amostras de CS de manto e nadadeira (Figuras 37 e 38). Além disso, outra correlação (3.7 – 60.3 ppm) relativa a C6/H6 de GalNAc-4SO₄ foi encontrada em C4S padrão, esta correlação apareceu também nas amostras de CS de lula. No C6S padrão, a correlação (4.2 – 67.4 ppm)

correspondente a C6/H6 GalNAc-6SO₄ foi observada e mais uma vez, esta correlação existe em CS de *Doryteuthis plei*. Finalmente, a correlação (3.3 -72.0 ppm) foi encontrada e corresponde a C2/H2 de resíduos de ácido glucurônico (GlcA) não sulfatados nesta posição. Os sinais químicos observados nestas correlações são consistentes com dados encontrados na literatura (GUI *et al.*, 2015; PANAGOS *et al.*, 2014).

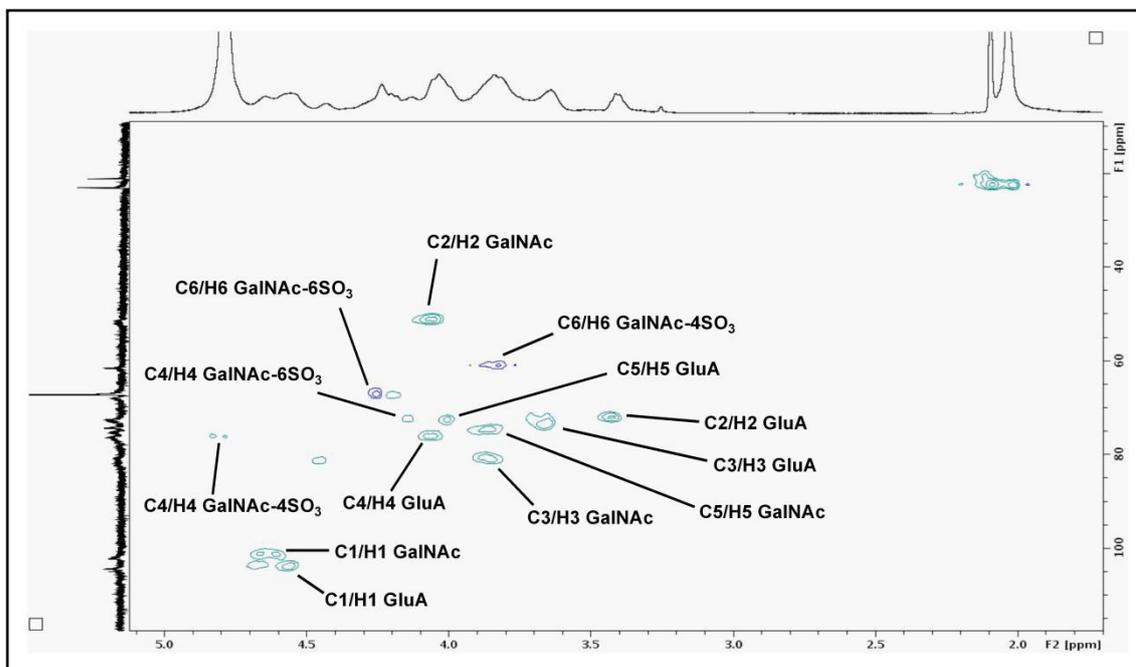


FIGURA 37. EXPANSÃO DE ESPECTRO 2D ¹H ¹³C DE CS MANTO.

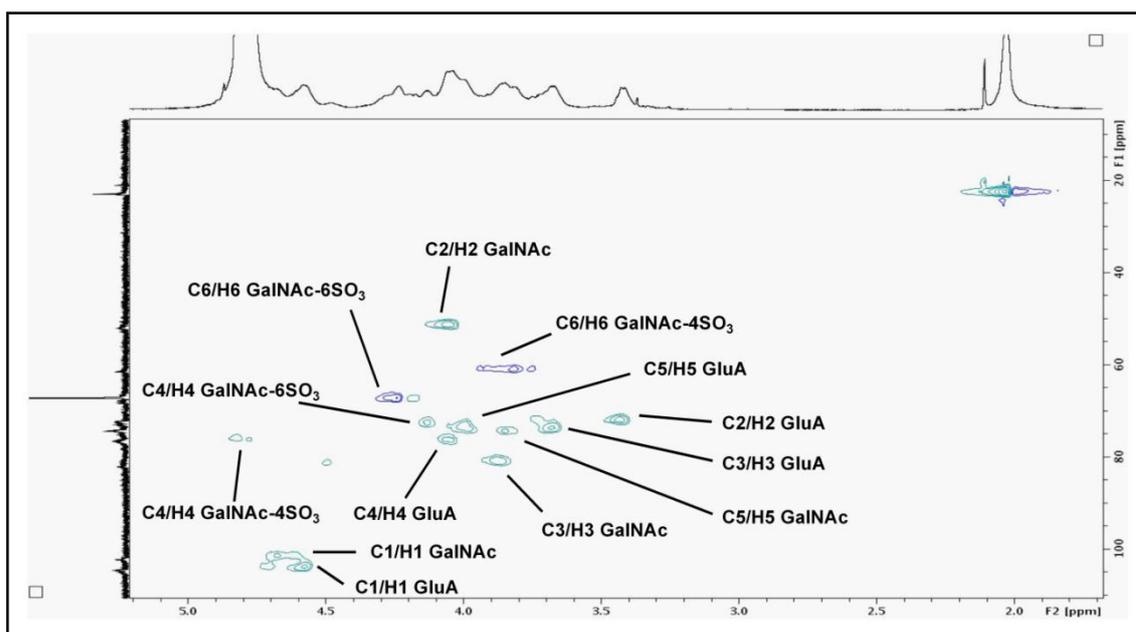


FIGURA 38. EXPANSÃO DE ESPECTRO 2D 1H 13C DE CS NADADEIRA.

Estes resultados confirmam a existência de sulfatação de resíduos de GalNAc na posição 4 e 6 e, e de não sulfatação na posição 2 do GlcA dos CS de lula. A Tabela 13 resume as correlações encontradas para os CS de manto e nadadeira sendo os dados confrontados com os da literatura.

TABELA 13 - DESLOCAMENTO QUÍMICO ^1H E ^{13}C (PPM) DE MANTO E NADADEIRA E COMPARATIVO COM OS VALORES CORRESPONDENTES AOS DE CONDRÓITIM SULFATO PADRÃO DA LITERATURA.

	Manta		Nadadeira	
	GlcA	GalNAc	GlcA	GalNAc
H1/C1	4.55/104.28	4.60/101.14	4.57/104.04	4.63/101.51
H2/C2	3.41/72.23	4.04/51.38	3.42/72.23	4.05/51.86
H3/C3	3.64/73.70	3.83/81.13	3.67/74.06	3.86/81.26
H4/C4	4.05/76.27	4.12/72.48	4.03/76.18	4.11/72.73
		4.80/76.12		4.79/76.19
H5/C5	3.99/72.98	3.84/74.94	3.97/74.22	3.84/74.60
H6/C6	-	3.81/61.73	-	3.81/61.31
	/175.58	4.23/67.25	/175.58	4.23/67.52

Dados da Literatura				
	GlcA-GalNAc 4S ^a		GlcA-GalNAc 6S ^a	
	GlcA	GalNAc	GlcA	GalNAc
H1/C1	4.63/105.94	4.67/103.59	4.55/105.56	4.66/104.28
H2/C2	3.47/75.86	4.08/54.94	3.45/75.85	4.03/53.93
H3/C3	3.64/76.78	4.16/78.62	3.63/77.08	3.95/82.68
H4/C4	3.80/83.07	4.63/79.12	3.76/84.26	4.19/70.17
H5/C5	3.78/79.09	3.87/77.69	3.76/78.83	4.01/75.70
H6/C6	-	3.80/63.98	-	4.24/70.36

Huckerby *et al.* (2001).

Desta forma, a análise de RMN não mostrou significantes diferenças entre CS de nadadeira e manto (Tabela 13), indicando que a posição da sulfatação e composição dos resíduos são similares nestas amostras.

4.3 PARTE III- ATIVIDADE ANTICOAGULANTE

A atividade anticoagulante dos CS de lula foi verificada após recalcificação do plasma segundo método da USP, 1965 (Método 3.2.5.1). A Tabela 14 mostra esses resultados.

TABELA 14. ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DOS CS DE MANTO E NADADEIRA DE *DORYTEUTHIS PLEI*

Amostras	UI
CS Nadadeira (20 µg)	16,1
CS Manto (20 µg)	16,1

UI - Unidades Internacionais

Os CS de manto e nadadeira apresentaram 9% da atividade da heparina que é o anticoagulante de maior uso medicinal. O potencial anticoagulante das moléculas de CS de lula posteriormente também foi avaliado para os testes de tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) que avalia a via intrínseca da coagulação, tempo de protrombina (PT) que avalia a via extrínseca e o tempo de trombina (TT) que está envolvida com a via comum. Estes testes são denominados de testes funcionais, pois monitoram a formação do coágulo de fibrina. Essa análise mais detalhada das vias de coagulação permite identificar a via envolvida com a o processo de coagulação das moléculas testadas. Na realização destes ensaios, a heparina (165 UI) foi utilizada como padrão.

Os resultados obtidos com o teste de aPTT estão resumidos na Tabela 15.

TABELA 15 – TESTE aPTT.

Amostras	Tempo Médio
Controle Negativo	28 segundos
Heparina (1,2 µg)	≥ 60 segundos
CS Nadadeira (3 µg)	143 segundos
CS Manto (5 µg)	138 segundos

CS de Nadadeira e Manto apresentaram atividade anticoagulantes em baixas quantidades de material utilizadas, 3 µg e 5 µg respectivamente. no teste de aPTT,

quando acusaram para o aumento do tempo de coagulação duas vezes em relação ao plasma

Para o teste de PT (Tabela 16), verificamos que para atividade anticoagulante as massas utilizadas tiveram que ser de 50 µg de CS de nadadeira e 20 µg de CS de manto muito superiores ao do teste de aPTT.

TABELA 16 - TESTE PT.

Amostras	Tempo Médio
Controle Negativo	10 segundos
Heparina (1,2 µg)	58 segundos
CS Nadadeira (50 µg)	38 segundos
CS Manto (20 µg)	21 segundos

No teste de tempo de trombina (TT) também realizado, o controle negativo está dentro do tempo de referência de 20 segundos, a heparina (1,2 µg), anticoagulante padrão, foi caracterizada como não coagulável e CS Nadadeira e CS Manto, ambos na quantidade de 3 ug, o tempo de coagulação foi determinado como superior a 180 segundos.

A partir dos resultados obtidos, podemos inferir que os CS de lula possuem uma atividade anticoagulante principalmente associada à inibição da via intrínseca e comum, uma vez que o prolongamento do tempo de coagulação foi observado quando utilizamos uma massa 10x menor em relação à avaliação da via extrínseca. Podemos afirmar também que o CS de nadadeira possui uma resposta melhor que a de CS de manto já que necessitamos de uma quantidade 1,7x menor para detectar aumento no tempo de coagulação no teste de aPTT.

O teste de aPTT está diretamente relacionada a via intrínseca da coagulação, na qual diferentes fatores estão associados (XII, XI, IX e VIII) e via comum (X, V, II e fibrinogênio). Já o teste TT está associado a comum mais especificamente ao fator IIa (trombina). Com base nessas informações e nos dados verificados acima, realizamos ensaios enzimáticos cromogênicos específicos para os fatores IIa e Xa que estão nas vias da coagulação nas quais verificou-se resposta significativa para os CS-E de nadadeira e manto. Para estes testes a heparina de 165 UI foi utilizada como anticoagulante padrão.

Os resultados encontrados para os testes demonstraram que CS de nadadeira inibe o fator IIa e Xa em 60% e 31% respectivamente para 1 ug de amostra utilizada. Já CS de manto inibe 55% do fator IIa e 47% fator Xa para 1 ug de amostra testada. Para essa quantidade de amostra a heparina inibe 22% do fator IIa e 13% do fator Xa.

5 DISCUSSÃO

PGs são componentes ubíquos de superfície celular e matrizes extracelulares, sendo encontrados em vários tecidos de animais vertebrados e invertebrados. Sabe-se que as cadeias de GAGs ligadas ao núcleo proteico dos PGs possuem várias atividades biológicas associadas a interação com proteínas, incluindo os fatores de crescimento, enzimas, citocinas, quimiocinas, lipoproteínas, e moléculas de adesão. Estas ações têm sido relacionadas às suas características estruturais relativas ao elevado teor de grupos sulfato e carboxila encontrados nestas macromoléculas (KAWASHIMA *et al.*, 2002).

CS possui muitos tipos de domínios estruturais que são conhecidos por participar de funções fisiológicas específicas (KINOSHITA *et al.*, 2001). Estudos tem sido conduzidos para investigar a interação de GAGs com colágeno e glicoproteínas da matriz extracelular. Takagaki e colaboradores (2002) utilizando oligossacarídeos de CS-E demonstrou que esses possuem afinidade por colágeno tipo V, e que sequências características, provavelmente, desempenham papéis fundamentais na adesão celular e montagem de matriz extracelular. O padrão de sulfatação de CS é sugerido como um mediador chave da vários eventos biológicos. Tem sido proposto que a variação da proporção entre dissacarídeos 6-sulfatados e 4-sulfatados em CS representa um fenômeno generalizado que ocorre em tecidos imaturos, contendo células em proliferação e diferenciação, esse processo influencia eventos significativos, tais como adesão e migração celular (MOURAO, MICHELACCI & TOLEDO, 1979; THEOCHARIS *et al.*, 2006).

Estudos demonstraram que o CS é capaz de interagir com diversos fatores de crescimento que determinam vários processos biológicos durante o crescimento e propagação de tumores. Cadeias de CS interagem com fatores de crescimento que podem se ligar à heparina (*heparin binding growth factors*) e estas interações são especificamente inibidas pelo CS ou DS contendo E-unidades dissacarídicas constituídas por GalNAc-GlcA (4S, 6S) ou o dissacarídeo correspondente de DS, IdoA-GalNAc (4S, 6S) (SUGAHARA *et al.*, 2003). CS-E isolado a partir de cartilagem de lula se liga a vários fatores de crescimento, incluindo FGF-2, FGF-10, FGF-16, FGF-18 *midkine* (MK), pleiotrofina (PTN). (SUGAHARA *et al.*, 2003). MK e PTN,

possuem atividades neuroregulatórias bem estabelecidas, promovendo a adesão e migração neuronal (KADOMATSU & MURAMATSU, 2004). As interações de CS-E com MK e PTN, bem como com FGF-18, exibem alta afinidade comparável para com as da heparina. Contudo, a relação entre a função biológica e estrutura de domínios de CS ainda não está totalmente compreendida (THEOCHARIS *et al.*, 2006).

Desde 1962 MATHEWS e colaboradores tem reportado a presença de polissacarídeos sulfatados em cartilagens de lulas do gênero *Loligo*. A identificação de GAGs em tecidos de lula da espécie *Loligo brasiliensis* também denominada *Doryteuthis plei*, encontrada na costa brasileira, foi realizada inicialmente por CÁSSARO & DIETRICH em 1976. Esses pesquisadores observaram que na espécie *Loligo brasiliensis* condroitim sulfato era o principal glicosaminoglicano encontrado (91%) e havia também heparim sulfato em menores quantidades (9%). Resultados semelhantes foram encontrados nos diferentes tecidos analisados de *Doryteuthis plei* em nosso trabalho. A presença de CS no material extraído dos tecidos de manto, nadadeira, tentáculos e pele de *D. plei* foi confirmada por degradação enzimática com chases AC e B onde esse composto é o glicosaminoglicano majoritário nos tecidos analisados (Figura 14).

Em um trabalho pioneiro de Kawai e colaboradores (1966) foi detectada a presença de CS polisulfatado na espécie de lula *Ommastrephes sloani pacificu*. Este condroitim isolado possuía alta relação sulfato por hexosamina (1,55), sugerindo que era um CS supersulfatado e ainda ficou evidenciado por método de espectroscopia de infravermelho que ele possuía substituições de grupos sulfato nas posições 4- e 6- do resíduo de GalNAc. Cássaro & Dietrich também demonstraram que os GAGs identificados em *Loligo brasiliensis* possuíam um elevado valor de sulfato por dissacarídeo (1,6), porém o dado encontrado não pode ser atribuído somente ao CS pois havia HS na amostra analisada. Em nossos estudos realizamos a análise da composição química dos CS obtidos que demonstraram uma relação superior a 1,2 Sulfato/Hexosamina o que nos forneceu um indicativo que estes compostos também eram supersulfatados (Tabelas 2 e 5). Dentre eles, o CS de nadadeira foi aquele que demonstrou maior proporção (1,6) tendo CS de manto e tentáculos valores próximos. Essa maior densidade de cargas negativas justifica a migração eletroforética próxima à região de DS verificada para o CS de *D. plei* no sistema de eletroforese em gel de agarose em tampão PDA (Figuras 9, 13,21). O perfil de eluição de CS na cromatografia de troca-iônica em escala analítica também nos

indicou que os GAGs encontrados possuíam uma alta densidade de cargas negativas, já que populações eluíram em concentração salinas superiores a 1M (Figuras 10 e 11). Em nossos experimentos as dosagens químicas e a análise de peso molecular não foram executadas para pele uma vez que esta possuía mais de um GAG constituinte.

O CS de Nadadeira possui um peso molecular (PM) médio em torno de 55kDa, CS de tentáculos 46 kDa e CS de manto 30 kDa, cabe ressaltar que apesar de definidos os PM médios, a alta polidispersividade verificada nos géis de PAGE indica grande heterogeneidade no tamanho das cadeias de CS de lula (Figuras 15 e 22). Pesos moleculares maiores foram encontrados em CS supersulfatado obtido de proteoglicanos de pele de *Illex illecebrosus coidentii* possuindo cadeias de até 110 kDa (KARAMANOS,1992).

A análise dissacarídica foi conduzida por degradação dos CS de lula com condroitinase AC de *Arthrobacter aurescens* e posterior análise por eletroforese de carboidratos assistida por fluoróforo (FACE). Dessa forma estabelecemos a porcentagem de 56% de dissacarídeos GlcA-GalNAc-4,6S (Δ Di4,6S) no CS de nadadeira e 51% no CS de manto. Para ambos, a proporção total de dissacarídeos monosulfatados (GlcA-GalNAc-4S, GlcA-GalNAc-6S) foi semelhante e próximo a 40%, ainda foram detectadas poucas unidades dissacarídicas não-sulfatadas com valores inferiores a 3%. A degradação destes polissacarídeos atingiu 97% de digestão nos períodos de incubação realizados (Figura 23, Tabela 6). A partir dos dados obtidos podemos afirmar que CS encontrado nos tecidos de manto e nadadeira de *D. plei* possuem resíduos de Δ Di4,6S predominantes. Os resultados detectados por nosso grupo de pesquisa vêm de encontro aos já descritos na literatura em que diferentes trabalhos já destacavam tais informações: proteoglicanos de condroitim supersulfatado degradados com condroitinase AC, condro-4-sulfatase e condro-6-sulfatase, apresentaram dissacarídeos monosulfatados, di-sulfatados e tri-sulfatados em tecido de pele da lula *Illex illecebrosus coidentii* (KARAMANOS *et al.*, 1992). Outros estudos assim como o nosso procuraram determinar a presença de condroitim supersulfatado obtido a partir de diferentes tecidos de lula, porém nem sempre E-unidades foram predominantes. Em lulas da espécie *Nototodarus gouldi* foi encontrado condroitim não sulfatado em tecidos de pele e condroitim mais sulfatado com a maioria de Δ Di4,6S unidades em cartilagem de cabeça (FALSHAW *et al.*, 2000). A análise

dissacarídica de glicosaminoglicanos extraídos da espécie de lula *Thysanoteuthis rhombus*, após degradação com condroitinase ABC, revelou a presença de diferentes tipos de unidades dissacarídicas ($\Delta\text{Di}4\text{S}$, $\Delta\text{Di}6\text{S}$ e $\Delta\text{Di}4,6\text{S}$) em diferentes proporções nos vários tecidos analisados (cabeça, tentáculos, olhos, manto, nadadeira e pele), sendo as E-unidades predominantes somente nos tecido de nadadeira e pele (TAMURA *et al.*, 2009). Dessa forma, a segregação em regiões anatômicas se torna essencial para os estudos realizados devido às distintas composições dissacarídicas demonstradas nos CS dos diferentes tecidos e espécies de lula. Podemos verificar também que nem sempre existe correspondência da proporção dissacarídica do CS supersulfatado em regiões anatômicas quando comparamos nosso trabalho com o de Tamura e colaboradores.

Além da análise da digestão de Condroitim sulfato de *D. plei* com chase AC de *A. aurescens* também executamos o estudo da digestão enzimática deste condroitim com chase AC de *Flavobacterium heparinum* (chase AC) e chase ABC de *Proteus vulgaris*. Apesar de verificarmos a unidade $\Delta\text{Di}4,6\text{S}$ como majoritária, havendo também uma menor proporção de resíduos monosulfatados ($\Delta\text{Di}4\text{S}$ e $\Delta\text{Di}6\text{S}$) e uma quantidade ainda menor de resíduos não sulfatados ($\Delta\text{Di}0\text{S}$) como já verificado nos experimentos com chase AC-II (*A. aurescens*), a digestão de CS de lula com chase AC (*F. heparinum*) e chase ABC levou a uma maior formação de oligossacarídeos 10% e 15% respectivamente demonstrando uma resistência desse substrato à ação dessas enzimas (Figuras 24 e 25; Tabelas 7 e 8). É importante destacar que a pouca definição das bandas dos dissacarídeos monosulfatados pode fazer com que haja uma discrepância das proporções entre estes, na degradação de 24h com chase AC (*F. heparinum*) após densitometria (Figura 24). A partir da análise da degradação de C4S padrão verificamos que as digestões com chase AC de *F. heparinum* geram um pouco de oligossacarídeos, sendo uma proporção muito maior destes visualizada na degradação com chase ABC de *P. vulgaris* tanto no período de 24 h quanto no período de 48 h de incubação, isso pode estar associado ao modo de ação diferente sobre o substrato, apesar de mecanismo endolítico ser descrito para ambas enzimas. Na degradação de C4S com chase AC de *A. aurescens* não foram verificados resíduos de oligossacarídeos (Figura 23).

No monitoramento da digestão dos CS de lula com chase AC (*F. heparinum*) por UV (232 nm) (Figura 20) comprovamos que esses compostos não são bons substratos para essa enzima, pela baixa atividade enzimática verificada tendo sido

constatadas atividades superiores quando os substratos eram C6S e C4S o que sugere que o tipo de sulfatação pode interferir na ação enzimática. Em estudo conduzido por Karamanos (1992), um CS obtido de pele de lula contendo apreciáveis quantidades de dissacarídeos di- e tri- sulfatados demonstrou uma degradação de 40% quando incubado com chase AC. A influência da supersulfatação na ação das chases AC e ABC foi detectada na digestão de condroitim supersulfatado obtido de pele de lula, em que chase ABC não foi capaz de degradar esse composto e chase AC o degradou em torno de 20% tendo sido ampliada para 40% após adicionar a mistura de incubação condro-4 e 6-sulfatases (TSEGENIDIS, 1992).

Dessa forma acreditamos que a maior sulfatação dos CS de lula foi determinante para a resistência identificada nas digestões com chase AC (*F. heparinum*) e chase ABC em nosso trabalho. Cabe ressaltar ainda que na degradação de CS de *D. plei* com chase AC-II (*A. aurescens*) também houve a formação de oligossacarídeos, porém, em menor extensão (3%). Avaliando esse dado e os obtidos com chase AC (*F. heparinum*) e chase ABC e tendo em vista a especificidade dos substratos e mecanismos de ação das diferentes condroinases (JANDIK, GU & LINHARDT, 1994; GU *et al.*, 1995), podemos afirmar que a ação exolítica da chase AC-II detém uma melhor atividade sobre CS de lula do que a chase AC e chase ABC que possuem mecanismo endolítico. Com isso constatamos que a contribuição feita pelos grupos sulfato para a energia total de ligação de substrato foi maior para o mecanismo endolítico do que o exolítico realizado pela chase AC-II. Consequentemente podemos inferir a partir das observações que para a degradação de CS é mais adequada à utilização das chases AC de *Arthrobacter aurescens* e AC de *Flavobacterium heparinum*, sendo a ABC de *Proteus vulgaris* não recomendada devido a sua atividade inespecífica e formação de muitos oligossacarídeos mesmo em C4S.

Para confirmar a composição estrutural dos CS de *D. plei* utilizamos técnicas espectroscópicas. A sulfatação na posição 4- e 6- da GalNAc foi detectada nos espectros de RMN em duas dimensões (HSQC) tanto na amostra de manto quanto de nadadeira de lula (Figuras 37 e 38) a partir da comparação com as correlações verificadas nos condroitins monosulfatados C4S e C6S (Figuras 35 e 36) e juntamente com as informações da literatura (HUCKERBY *et al.*, 2001), porém não foi possível distinguir atribuições dos resíduos monosulfatados (Δ Di4S e Δ Di6S) do

di-sulfatado ($\Delta\text{Di4,6S}$), detectados na *FACE*. Esperávamos que a proximidade dos grupos sulfato em $\Delta\text{Di4,6S}$ causasse uma mudança na conformação do anel da *N*-acetilgalactosamina fornecendo significantes deslocamentos nos espectros de RMN, o que não foi observado. Trabalhos recentes tem utilizado a técnica de RMN para a detecção de CS supersulfatado como contaminante em preparações de heparina, o que tem sido identificado como grande problema e risco na eficácia da terapêutica clínica empregada (GUERRINI *et al.*, 2008).

A análise de diferentes GAGs por espectroscopia de Raman tem sido utilizada com sucesso para diferenciar isoformas destas moléculas. A interpretação dos espectros Raman de macromoléculas biológicas pode ser complexa, com sinais resultantes de muitas sobreposições. Porém o espectro de monossacarídeos e polissacarídeos tem sido registrado e as características atribuídas (RUDD *et al.*, 2010). Esta técnica de análise foi utilizada em nosso trabalho, em que visualizamos o espectro característico de condroitim sulfato no material obtido de manto e nadadeira (Figura 32), porém nessa análise não conseguimos atribuir bandas ou deslocamento de bandas referentes à $\nu_{\text{as}}\text{SO}_4$ e νCOS que permitissem distinguir CS de lula de C4S e C6S quanto ao padrão de sulfatação. O que notamos nesses espectros foi a ausência da banda de δCOH em 1100 cm^{-1} nos CS de lula, o que provavelmente está associada a maior substituição de grupamentos sulfato nas posições 4- e 6- da GalNAc nesta molécula. Muitas informações de bandas referentes às vibrações das ligações presentes em CS já estão descritas (BANSIL *et al.*, 1978; ELLIS *et al.*, 2009) porém ainda não existem dados espectrais para CS de lula na literatura. Esperávamos que a maior sulfatação das moléculas de CS de *D. plei* gerasse alterações no espectro que permitissem fazer distinções das informações espectrais em relação C4S e C6S, uma vez que diferenças das atribuições de bandas para grupamentos sulfato dessas moléculas foram associadas à configuração espacial (BANSIL *et al.*, 1978).

Em nosso trabalho a atividade anticoagulante de CS de nadadeira e manto foi detectada por método USP, 1965 (Tabela 14). Posteriormente realizamos a determinação da via da coagulação que esta sendo inibida por essas macromoléculas e ficou demonstrada a atividade anticoagulante pela inibição das vias intrínseca e comum da coagulação ao aumentarem o tempo de tromboplastina parcial ativada aPTT e o tempo de trombina (TT) (Tabela 15). Diferenças na quantidade de amostra utilizada no ensaio aPTT para o aumento do tempo de

coagulação foram verificadas entre CS de manto e nadadeira e possivelmente se justificam pelas características estruturais associadas ao grau de sulfatação da molécula observada na dosagem de sulfato e caracterização dissacarídica. A partir dos ensaios anti-IIa e anti-Xa conduzidos, confirmamos a resposta dos testes de coagulação que indicavam que as vias intrínseca e comum da coagulação poderiam estar sendo inibidas pelos CS de lula, uma vez que esses dois fatores estão presentes nessas vias. Dessa forma podemos inferir que estas moléculas apresentam atividade anticoagulante podendo atuar de forma semelhante à heparina ao se ligar à ATIII, acelerando a taxa com que estes inibidores de serino proteases formam complexos com enzimas da cascata de coagulação, principalmente trombina (IIa) e fator Xa, inativando-as.

A atividade anticoagulante *in vitro* de CS isolado de cartilagens de lula tem sido relatada (AKIYAMA, SENO & YOSHIDA, 1982). Esta propriedade foi descrita como mediada principalmente pela aceleração da interação cofator II da heparina com trombina (SCULLY *et al.*, 1986). Porém Scully e colaboradores também relataram atividade anticoagulante de CS-E na ausência de ATIII e fator II da heparina este efeito foi relacionado a interferência na interação trombina:fibrinogênio. As E-unidades presentes em CS-E parecem estar diretamente associadas à atividade anticoagulante. Em trabalho de McGee e col. (1995), diferentes CS foram testados como anticoagulantes, porém somente CS-E demonstrou essa atividade que foi relacionada à inibição de fatores da via intrínseca (Fatores VIIIa/IXa). Estudos recentes em que modificações químicas foram realizadas em CS, demonstrou-se que a supersulfatação está ligada a atividade anticoagulante dessa molécula (NUMAKURA *et al.*, 2010). Em moléculas de condroitim fucosilado que possui estrutura semelhante ao CS, a sulfatação da molécula possui importante relação com a atividade anticoagulante (CHEN *et al.*, 2013). Outros polissacarídeos sulfatados como as fucanas obtidas de algas, também demonstram atividade anticoagulante diretamente dependente da sulfatação (DORE *et al.*, 2013; CAMARA *et al.*, 2011; MEDEIROS *et al.*, 2008.). A partir das informações obtidas verificamos que a busca por compostos com distintos mecanismos de ação anticoagulante para atender a multiplicidade de situações clínicas que requerem esse tipo de terapia vem crescendo e CS-E tem mostrado potencial terapêutico, contudo estudos *in vivo* são necessários para confirmação da efetividade clínica.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho concluímos que:

- O principal GAG presente nos tecidos de nadadeira, manto, tentáculos e pele de lula (*Doryteuthis plei*) é condroitim sulfato, sendo outro GAG sulfatado, com mobilidade eletroforética semelhante a heparam sulfato, também detectado em pele;
- O condroitim sulfato isolados de manto e nadadeira pode ser classificado como CS-E por apresentar maior proporção de unidades dissacarídicas GlucA-GalNAc-4,6S;
- O CS de nadadeira apresenta diferenças significativas quanto ao peso molecular (52 kDa) e densidade de cargas negativas (1,6 sulfato/hexosamina) quando comparado com o de manto (30 kDa, 1,2 sulfato/hexosamina);
- As análises espectroscópicas corroboram os resultados obtidos;
- Ambos CS (manto e nadadeira) apresentam atividade anticoagulante, pois foram capazes de inibir a via intrínseca da cascata de coagulação, provavelmente associada com a formação de complexo com ATIII, ocasionando a inibição de enzimas que atuam nessa via como os fatores IIa e Xa.

REFERÊNCIAS

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.

AKIYAMA, F.; SENO, N.; YOSHIDA, K. Anticoagulant activity of dermatan polysulfates. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 136, p. 359-365.

AMBROSIUS, M.; KLEESIEK, K.; GOTTING, C. Quantitative determination of the glycosaminoglycan Δ -disaccharide composition of serum, platelets and granulocytes by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1201, p. 54-60, 2008.

BAENZINGER, J.U. Glycoprotein hormone GalNAc-4-sulphotransferase. **Biochemical Society Transactions**. v. 31, p. 326,-330, 2003.

BANDTLOW, C.E.; ZIMMERMAN, D. R. Proteoglycans in the developing brain: New conceptual insights for old proteins. **Physiological Reviews**, n. 80, p. 1267-1290, 2000.

BANSIL, R.; YANNAS, I.V.; STANLEY, H.E. Raman spectroscopy: a structural probe of glycosaminoglycans. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 541, p. 535-542, 1978.

BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **Journal Pathology**, v. 214, p. 149-160, 2008.

BRIMACOMBE, J. S.; WEBBER J. M. M. **Mucopolysaccharides. Chemical structure, Distribution, and isolation**. 6^a e.d. B.B.A. LIBRARY, 1964.

CAMARA, R.B.; COSTA, L.S.; FIDELIS, G.P.; NOBRE, L.T.; DANTAS-SANTOS, N.; CORDEIRO, S.L.; COSTA, M.S.; ALVES, L.G.; ROCHA, H.A. Heterofucans from the Brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis* with anticoagulant and antioxidant activities. **Marine Drugs**, v. 9, p. 124-138, 2011.

CAMPO, G.M.; AVENOSO, A.; CAMPO, S.; D'ASCOLA, A.; TRAINA, P.; SAMÀ, D.; CALATRONI, A. Purified human plasma glycosaminoglycans reduced NF-kappaB activation, pro-inflammatory cytokine production and apoptosis in LPS-treated chondrocytes. **Innate Immunity**, v. 14, p. 233-246, 2008.

CÁSSARO, C. M. P.; DIETRICH. C. P. Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 7, p. 2254-2261, 1976.

CAÑAS, N.; GORINA, R; PLANAS, A. M.; VERGÉS, J.; MONTELL, E; GARCÍA, A. G.; LÓPEZ, M. G. Chondroitin sulfate inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in rat astrocytes by preventing nuclear factor kappa B activation. **Neuroscience**, v. 167, p. 872-879, 2010.

CHEN, S.; LI, G.; WU, N.; GUO, X.; LIAO, N.; YE, X.; LIU, D.; XUE, C.; CHAI, W. Sulfation pattern of the fucose branch is important for the anticoagulant and antithrombotic activities of fucosylated chondroitin sulfates. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3054-3066, 2013.

CINEL, I.; OPAL, S. M. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. **Critical Care Medicine**, v. 37, p. 291-304, 2009.

CRACIUNESCU, O.; MOLDOVAN, L.; MOISEI, M.; TRIF, M. Liposomal formulation of chondroitin sulfate enhances its antioxidant and anti-inflammatory potential in L929 fibroblast cell line. **Journal of Liposome Research**, v. 23, p. 145-153, 2013.

DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**, v. 145, p. 1310-1312, 1964.

DESAIRE, H.; LEARY, J.A. Detection and quantification of the sulfated disaccharides in chondroitin sulfate by electrospray tandem mass spectroscopy. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 11, p. 916-920, 2000.

DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Ed. Blücher, 2007.

DIETRICH, C.P.; SAMPAIO, L.O.; TOLEDO, O.M.S. Characteristic distribution of sulfated mucopolysaccharides in different tissues and in their respective mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 75, p. 329-336, 1977.

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

DIETRICH, C. P.; MONTES DE OCA, H. Surface sulfated mucopolysaccharides of primary and permanent mammalian cell lines. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 80, p. 805-812, 1978.

DIETRICH, C. P.; ARMELIN, H. A.; NOGUEIRA, Y. L.; NADER, H. B.; MICHELACCI, Y. M. Turnover, change of composition with rate of cell growth and effect of phenylxyloside on synthesis and structure of cell surface sulfated glycosaminoglycans of normal and transformed cells. **Biochim Biophys Acta**, V. 717, p. 387-397, 1982.

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.

DI FERRANTE, N.; NICHOLS, B. L.; DONELLY, P. V.; NERI, G.; HRGOVIC, 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**, v. 68, n. 2, 303-307, 1971.

DODGSON, K. S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. **Biochemical Journal**; v. 78, n. 2, 312-319, 1961.

DORE, C.M.; DAS C FAUSTINO ALVES, M.G.; WILL, L.S.; COSTA, T.G.; SABRY, D.A.; DE SOUZA RÊGO, L.A.; ACCARDO, C.M.; ROCHA, H.A.; FILGUEIRA, L.G., LEITE, E.L. A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 467-475, 2013.

ELLIS, R.; GREEN, E.; WINLOVE, C.P. Structural analysis of glycosaminoglycans and proteoglycans by means of raman microspectrometry. **Connective Tissue Research**, v. 50, p. 29-36, 2009.

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.

EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, n. 12, p 1145-1155, 2003.

FALSHAW, R.; HUBL, U.; OFMAN, D.; SLIM, G. C.; AMJAD TARIQ, M.; WATT, D. K.; YORK, S. C. Comparison of the glycosaminoglycans isolated from the skin and head cartilage of Gould's arrow squid (*Nototodarus gouldi*). **Carbohydrate Polymers**, v. 41, p. 357-364, 2000.

FRANCO, R.F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina**, v. 34, p. 229-237, 2001.

GEMBA, T.; VALBRACHT, J.; ALSALAMEH, S.; LOTZ, M. Focal adhesion kinase and mitogen-activated protein kinases are involved in chondrocyte activation by the 29-kDa amino-terminal fibronectin fragment. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 907-911.

GILMORE, T.D. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. **Oncogene**, v. 25, p. 6680-6684, 2006.

GOMES, P. B.; DIETRICH, C. P. Distribution of heparin and other sulfated glycosaminoglycans in vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology**; v. 73B, n. 4, p. 857-863, 1982.

GUEDES, Pedro Luis Guedes.R. **Atividade biológica do condroitim sulfato nos estágios iniciais de colestase extra-hepática**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

GU, K.; LINHARDT, R.J.; LALIBERTÉ, M.; GU, K; ZIMMERMANN, J. Purification, characterization and specificity of chondroitin lyases and glycuronidae from *Flavobacterium heparinum*. **Biochemical Journal**, v. 312, p. 569-577, 1995.

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.

HUCKERBY, T.N; LAUDER, R.M.; BROWN, G.M.; NIEDUSZYNSKI, I.A.; ANDERSON, K.; BOOCOCK, J. ; SANDALL, P.L.; WEEKS, S.D. Characterization of oligosaccharides from the chondroitin sulfates ¹H-NMR and ¹³C-NMR studies of reduced disaccharides and tetrasaccharides. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 1181-1189, 2001.

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

IOZZO, R. V.; COHEN, I. Altered proteoglycan gene expression and the tumor stroma. **Experientia**, v. 49, p. 447-455, 1993.

ITO, Y.; HABUCHI, O. Purification and characterization of *N*-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O-sulfotransferase from the squid cartilage. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, 34728-34736, 2000.

HAIMOVICI, M.; PEREZ, J. A. A. Coastal cephalopod fauna of Southern Brazil. **Bulletin of Marine Science**, v. 49, p. 221-230, 1991.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate techniques**. San Diego: Academic Press, 1995.

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

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

JANDIK, K.A.; GU, K.; LINHARDT, R.J. Action pattern of polysaccharide lyases on glycosaminoglycans. **Glycobiology**, v. 4, n.3, p. 289-296, 1994.

JEANLOZ, R. W. The nomenclature of mucopolysaccharides. **Arthritis Rheum.**, v. 3, p. 233-237, 1960.

JINNO-OUE, A.; TANAKA, A.; SHIMIZU, N.; MORI, T.; SUGIURA, N.; KIMATA, K.; ISOMURA, H.; HOSHIRO, H. Inhibitory effect of chondroitin sulfate type E on the binding step of human T-cell leukemia virus type 1. **Aids Research and Human Retroviruses**, v. 29, n. 3, 2013.

JOMPHE, C.; GABRIAC, M.; HALE, T. M.; HÉROX, L.; TRUDEAU, L. E.; DEBLOIS, D.; MONTELL, E.; VERGÉS, J.; DU SOUICH, P. Chondroitin sulfate inhibits the nuclear translocation of nuclear factor-kappaB in interleukin-1beta-stimulated chondrocytes. **Basic Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 102, p. 59-65, 2008.

JORDAN, K. M.; ARDEN, N. K.; DOHERTY, M.; BANNWARTH, B.; BIJLSMA J. W.; DIEPPE, P.; GUNTHER, K.; HAUSELMANN, H.; HERRERO-BEAUMONT, G.; KAKLAMANIS, P.; LOHMANDER, S.; LEEB, B.; LEQUESNE, M.; MAZIERES B.; MARTIN-MOLA, E.; PAVELKA, K.; PENDLETON, A.; PUNZI, L.; SERNI, U.; SWOBODA, B.; VERBRUGGEN, G.; ZIMMERMAN-GORSKA, I.; DOUGADOS, M. EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, n. 12, p 1145-1155, 2003.

KADOMATSU, K.; MURAMATSU, T. . Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. **Cancer Letters**, v. 204, 127–143, 2004.

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.

KANTOR, T. G.; SHUBERT, M. A method for desulfation of chondroitin sulfate. **Journal American Chemical Society**, v. 79, p. 152-153, 1957.

KARAMANOS, N.K. Two squid skin proteoglycans each containing chondroitin sulfates with different sulfation patterns. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 70, p. 629-635, 1992.

KARAMANOS, Y. K.; ALETRAS, A. J.; ANTONOPOULOS, C. A; HJERPE, A.; TSIGANOS, C. P. Chondroitin proteoglycans from squid skin: Isolation, characterization and immunological studies. **European Journal Biochemistry**, n. 192, p. 33-38, 1990.

KARAMANOS, N. K.; ALETRAS, A. J.; TSEGENIDIS, T.; TSIGANOS, C. P.; ANTONOPOULOS, C. A. Isolation, characterization and properties of the oversulphated chondroitin sulphate proteoglycan from squid skin with peculiar glycosaminoglycan sulphation pattern. **European Journal of Biochemistry**, v. 204, p 553-560, 1992.

KARAMANOS, N.K.; SYROKOU, A.; VANKY, P.; NURMINEN, M.; HJERPE, A. Determination of 24 variously sulfated galactosaminoglycan- and hyaluronan-derived disaccharides by high-performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 221, p. 189-199.

KAWAI, Y.; SENO, N.; ANNO, K. Chondroitin polysulfate of squid cartilage. **The Journal of Biochemistry**, v. 60, n. 3, 1966.

KAWASHIMA, H.; ATARASHI, K.; HIROSE, M.; HIROSE, J.; YAMADA, S.; SUGAHARA, K.; MIYASAKA, M. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 15, p. 12921-12930, 2002.

KJÉLLEN, L., LINDAHL, U. Proteoglycans: structure and interactions. **Annual Review of Biochemistry**; v. 60, p. 443–475, 1991.

KINOSHITA, A.; YAMADA, S.; HASLAM, S.M.; MORRIS, H.R.; DELL, A.; SUGAHARA, K. Isolation and structural determination of novel sulfated hexasaccharides from squid cartilage chondroitin sulfate E that exhibits neuroregulatory activities. **Biochemistry**, v. 40, p. 12654-12665, 2001.

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.

LESLEY, J.; HYMAN, R.; ENGLISH, N.; CATTERALL, J. B.; TURNER, G. A. CD44 in inflammation and metastasis. **Glycoconj J**, V. 14, P. 611-622, 1997.

LIMA, R.C.; JUNIOR, J.A.S.; NAZÁRIO, A.C.P.; MICHELACCI, Y.M. Changes in glycosaminoglycans and proteoglycans of normal breast and fibroadenoma during the menstrual cycle. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1820, p. 1009-1019, 2012.

LOTUFO, L. V. C.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico & perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009.

MACFARLANE, R. G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. **Nature**, v., 202, p. 498-499, 1964.

MAINRECK, N.; BRÉZILLON, S.; SOCKALINGUM, G.D; MAQUART, F.; MANFAINT, M.; WEGROWSKI, Y. Rapid characterization of glycosaminoglycans using a combined approach by infrared and raman microspectroscopies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 2, 2011.

MEDEIROS, V.P.; QUEIROZ, K.C.; CARDOSO, M.L.; MONTEIRO, G.R.; OLIVEIRA, F.W.; CHAVANTE S.F.; GUIMARAES, L.A.; ROCHA, H.A.; LEITE, E.L. Sulfated galactofucan from *Lobophora variegata*: anticoagulant and anti-inflammatory properties. **Biochemistry**, v. 73, p 1018-1024, 2008.

MITROPOULOU, T.N.; STRAGIANNIS, K. D. Variation in sulfation pattern of galactosaminoglycan containing proteoglycans is associated with the development of uterine leiomyoma. **Biomedical Chromatography**, v. 18, p. 411-413, 2004.

MATHEWS, M.B.; DUH, J.; PERSON, P. Acid mucopolysaccharides of invertebrate cartilage. **Nature**, v.193, p. 703-716, 1962.

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.

MEYER, K. The chemistry and biology of mucopolysaccharides and glycoproteins. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, v. 6, p. 91-102, 1938.

McGEE, M.P.; TEUSCHLER, H.; PARTHASARATHY, N.; WAGNER, W.D. Specific regulation of procoagulant activity on monocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 26109-26115, 1995.

MERLE, B.; DURUSSEL, L.; DELMAS, P. D.; CLEZARDIN, P. Decorin inhibits cell migration through a process requiring its glycosaminoglycan side chain. **J Cell Biochem**, v. 75, p. 538-546, 1999.

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.

MIKAMI, T.; KITAGAWA, H. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1830, p. 4719-4733, 2013.

MOURAO, P.A.S.; MICHELACCI, Y.M.; TOLEDO, O.M.S. Glycosaminoglycans and proteoglycans of normal and tumoral cartilages of humans and rats. **Cancer Research**, v. 39, p. 2802-2806, 1979.

MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. **Harper: bioquímica ilustrada**. 27 ed. São Paulo: Ed. McGraw-Hill, 2007.

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.

NAMAKURA, M.; KUSAKABE, N.; ISHIGE, K.; NIIMI, S.O.; HABUCHI, H.; HABUCHI, O. Preparation of chondroitin sulfate libraries containing disulfated disaccharide units and inhibition of thrombin by these chondroitin sulfates. **Glycoconj. J.**, v. 27, p. 479-489, 2010.

OLIVEIRA, L.G. **Avaliação do efeito de condroitim sulfato e/ou glucosamine em modelo experimental de colite ulcerativa em ratos**. 2012. Dissertação (Mestrado em Saúde)-Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

ONUKE, 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.

PEREZ, J.A.A.; GASALLA, M.A.; AGUIAR, D.C.; OLIVEIRA, U.C.; MARQUES, C.A.; TOMÁS A.R.G. 2005 *Loligo plei*. In: CERGOLE, M.C.; ÁVILA-DASILVA, A.O.; ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C.L.B. Análise das principais pescarias comerciais da região Sudeste-Sul do Brasil: dinâmica populacional das espécies em exploração. São Paulo: Instituto Oceanográfico-USP, Série documentos REVIZEE: Score Sul. p. 62-68, 2005.

PEREZ, J. A. A.; PEZZUTTO, P.R. Valuable shellfish species in the by catch of shrimp fisheries in southern Brazil: spatial and temporal patterns. **Journal of Shellfish Research**, v.1, p. 303-309, 1998.

PRYDZ, K.; DALEN, K.T. Synthesis and sorting of proteoglycans. **Journal of cell science**, v. 113, p. 193-205, 2000.

RAZIN, E.; STEVENS, R.L.; AKIYAMA, F.; SCHIMID, K.; AUSTEN, K.F. Culture from mouse bone marrow of a subclass of mast cells processing a distinct chondroitin sulfate proteoglycan with glycosaminoglycans rich in N-acetylgalactosamine-4,6-disulfate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 257, p. 7229-7236, 1982.

RODRIGUES, E.S.; CASTILHO-FERANDES, A.; COVAS, D.T.; FONTES, A.M. Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 1, p. 218-233, 2012.

RODRIGUES, A. R. **Caracterização da estrutura populacional e alimentação das lulas *Loligo plei* (Blainville, 1823) e *Loligo sanpaulensis* (Brakonieccki, 1984) (CEPHALOPODA: LOLIGINIDAE) capturadas pela pesca industrial do Estado de São Paulo, entre 23°S e 26°55'S**. 2007. Dissertação de mestrado (Aquicultura e Pesca)-Instituto de Pesca, São Paulo, SP, 2007.

RONDLE, C.J.M; MORGAN, W.T.J. The determination of glucosamine and galactosamine. **Biochemical Journal**, v.61, p. 586-589, 1955.

RUDD, T. R.; HUSSAIN, R.; SILIGARDI, G.; YATES, E.A. Raman and Raman optical activity of glycosaminoglycans. **Chemistry Communications**, v. 46, p. 4124-4126, 2010.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Invertebrate Zoology: a functional evolutionary approach**. 7^a e.d. Brooks Cole, p. 1-1008, 2003.

SAMPAIO, L. O.; DIETRICH, C. P.; FILHO, O. G. Changes in sulfated mucopolysaccharide composition of mammalian tissues during growth and in cancer tissues. **Biochim Biophys Acta**, V. 498, p. 123-131, 1977.

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.

SILBERT, J.E; SUGUMARAN, G. Biosynthesis of chondroitin/dermatan sulfate. **IUBMB Life**, v. 54, p. 177-186, 2002.

SCHONHERR, E.; SUNDERKOTTER, C.; IOZOO, R. V.; SCHAEFER, L. Decorin, a novel player in the insulin-like growth factor system. **J Biol Chem**, v. 280, p. 15767-15772, 2005.

SCOTT, J. Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues. **The Journal of the Federation of American Societies for Experiment Biology**, v. 6, n. 9, p. 2639-2645, 1992.

SCULLY, M. F.; ELLIS, V.; SENO, N.; KAKKAR, V.V. The anticoagulant properties of mast cell product, chondroitin sulphate E. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 137, n. 1, p. 15-22, 1986.

SEIBEL, M. J.; ROBINS, S. P.; BILEZIKIAN, J. P. **Dynamics of bone and cartilage metabolism**. 2^a e.d. Londres: Elsevier, 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.

STEVENS, R. L. Secretory granule proteoglycans of mast cells and natural killer cells. **Ciba Foudation Symposium**, v. 124, p. 272-285, 1986.

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.

SUGAHARA, K.; TANAKA, Y.; YAMADA, S.; SENO, N.; KITAGAWA, H.; HASLAM, S.M.; MORRIS, H.R.; DELL, A. Novel sulfated oligosaccharides containing 3-o-sulfated glucuronic acid from king crab cartilage chondroitin sulfate K. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 43, p. 26745-26754, 1996.

SUGAHARA, K.; YAMADA, S. Structure and function of oversulfated Chondroitin sulfate variants: unique sulfation patterns and neuroregulatory activities. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v. 12, n. 67, p. 321-349, 2000.

SUGAHARA, K.; MIKAMI, T.; UYAMA, T.; MIZUGUCHI, S.; NOMURA, K.; Kitagawa, H. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 13, 612–620. 2003.

SUZUKI, S.; SAITO, H.; YAGAMATA, 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 and Chemistry**, v. 243, p. 1543-1550, 1968.

TAIPALE, J.; KESKI-OJA, J. Growth factors in the extracellular matrix. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 11, n.1, p. 51-59, 1997.

TAKAGAKI, K.; MUNAKATA, H.; KAKIZAKI, I.; IWAFUNE, M.; ITABASHI, T.; ENDO, M. Domain structure of chondroitin sulfate E octasaccharides binding to type V collagen. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 11, p. 8882-8889, 2002.

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.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. **Biochemistry**, v. 11, p. 1383-1388, 1972.

THEOCHARIS, A.D.; TSOLAKIS, I.; TZANAKAKIS, G.N.; KARAMANOS, N.K. Chondroitin sulfate as a key molecule in the development of atherosclerosis and cancer progression. In: VOLPI, N. (Ed.). **Chondroitin Sulfate: Structure, Role and Pharmacological Activity**. Advances in Pharmacology, Elsevier, v. 53, p. 1-568, 2006.

TOLEDO, O.M.S. & DIETRICH, C.P. Tissue specific distribution of sulfated mucopolysaccharides in mammals. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 498, p. 114-122, 1977.

TSEGENIDIS, T. Influence of oversulphation and neutral sugar presence on the chondroitinases ac and abc actions towards glycosaminoglycans from ray (*raja clavata*) and squid (*illex illecebrosus coindentii*) skin. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.103, n.1, p.275-279, 1992.

UEBELHART, D.; KNOLS, R.; DE BUIN, 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, p. S19-S21, 2008.

UEOKA, C.; KANEDA, N.; OKAZAKI, I.; NADANAKA, S.; MURAMATSU, T.; SUGAHARA, K. Neuronal cell adhesion, mediated by the heparin-binding neuroregulatory factor midkine, is specifically inhibited by chondroitin sulfate E. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 48, p. 37407-37413, 2000.

USP – The Pharmacopeia of the United States of America. 17^a Revisão. Easton: Mack Printing Company, p. 609-611, 1965

VALLIÈRES, M.; DU SOUICH, P. Modulation of inflammation by chondroitin sulfate. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 16, p. S1-S6, 2010.

VIEIRA FACB, R Y A; AGUIAR, J. A. K.; MICHELACCI, Y. M. Urinary excretion of glycosaminoglycans in horses: changes with age, training and osteoarthritis. **J Eq Vet Sci**, v. 25, 387-400, 2005.

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**, v. 685, n. 1, p. 27-34, 1996.

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. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulphate: new functions from an old natural macromolecule. **Inflammopharmacology**, v. 19, p. 299-306; 2011.

WILLIS, C. M.; KLUPPEL, M. Chondroitin Sulfate-E Is a Negative Regulator of a Pro-Tumorigenic Wnt/Beta-Catenin-Collagen 1 Axis in Breast Cancer. **Plos One**, v. 9, p. e103966, 2014.

WOLANSKA, M.; BANKOWSKI, E. An accumulation of insulin-like growth factor I (IGF-I) in human myometrium and uterine leiomyomas in various stages of tumour growth. **Eur Cytokine Netw**, v. 15, p. 359-363, 2004.

YAMADA, S.; SUGAHARA, K.; OZBEK, S. Evolution of glycosaminoglycans Comparative biochemical study. **Communicative & Integrative Biology**, v.4, p. 150-158, 2011.

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.

ZHONG, J.; KYRIAKIS, J. M. Dissection of a signaling pathway by which pathogen-associated molecular patterns recruit the JNK and p38MAPKs and trigger cytokine release. **Journal Biological Chemistry**, v. 282, p. 24246-24254, 2007.

APÊNDICE A - Espectro RMN ^1H , ^{13}C , HSQC E HMBC de condroitim sulfato de diferentes origens.

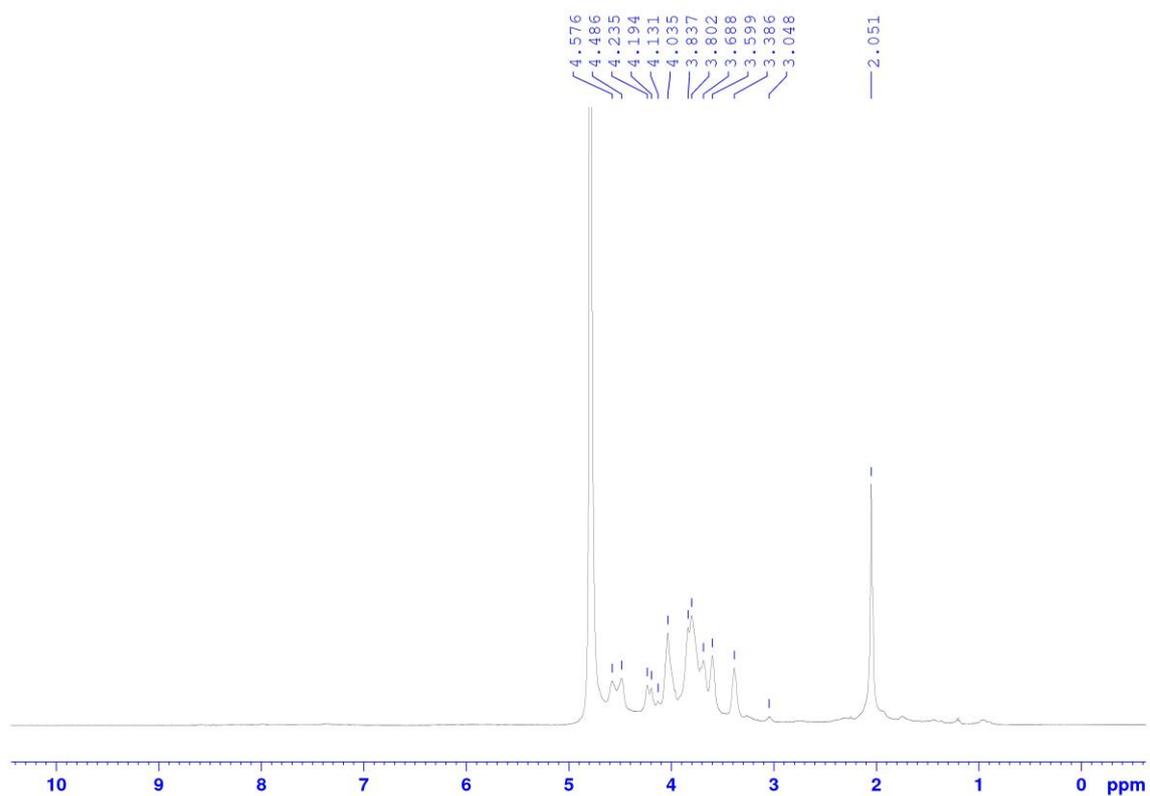


FIGURA 39. ESPECTRO DE ^1H DE CONDOITIM 4-SULFATO (1).

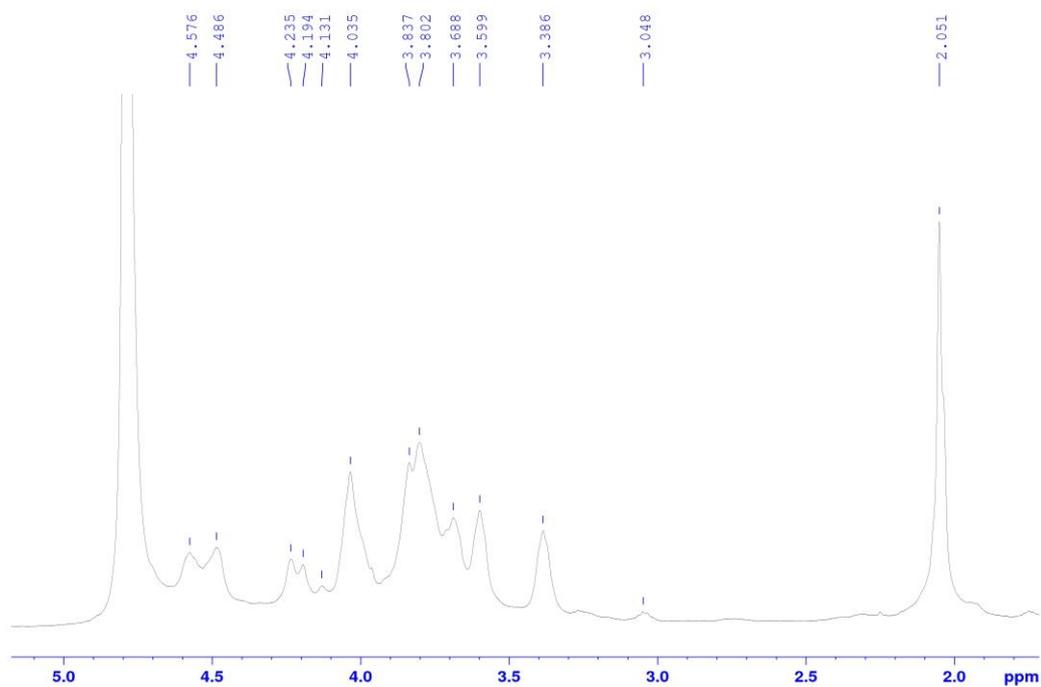


FIGURA 40. EXPANSÃO DO ESPECTRO ^1H (2.0-5.0 ppm) DE CONDOITIM 4-SULFATO (1).

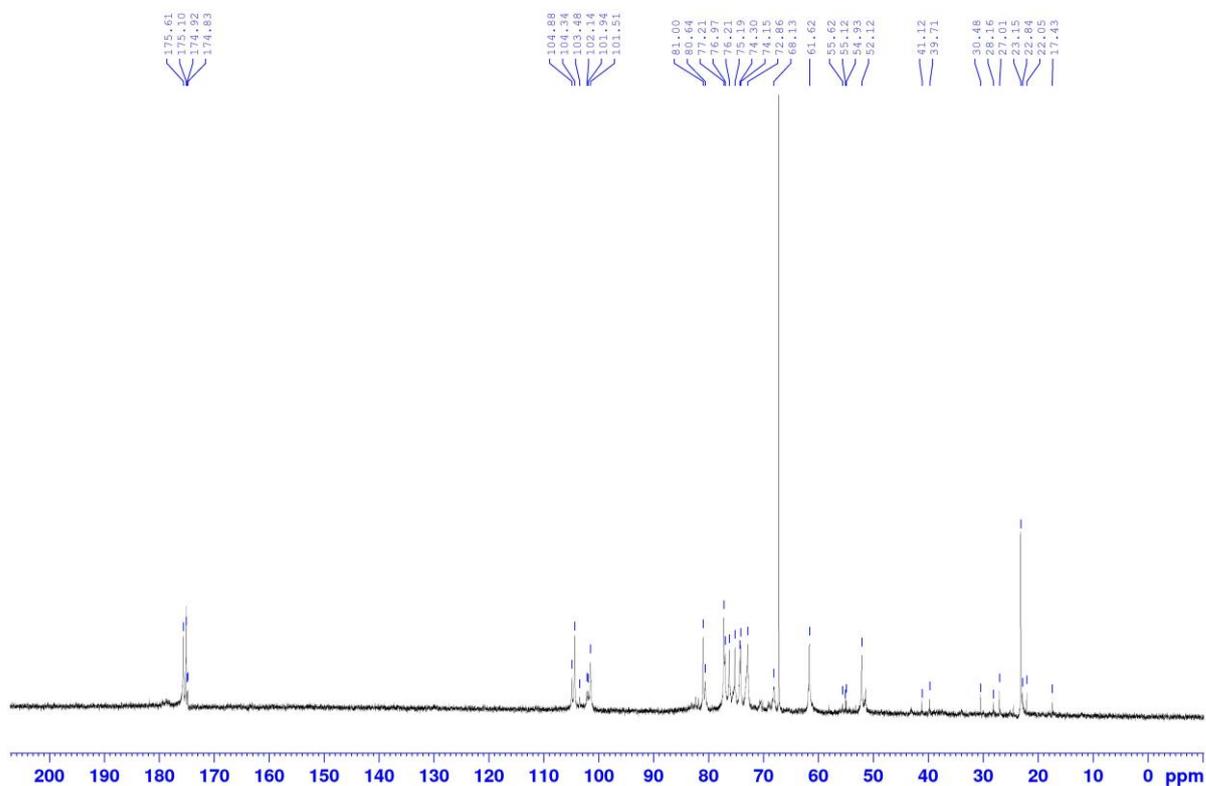


FIGURA 41. ESPECTRO DE ^{13}C CONDOITIM 4-SULFATO (1).

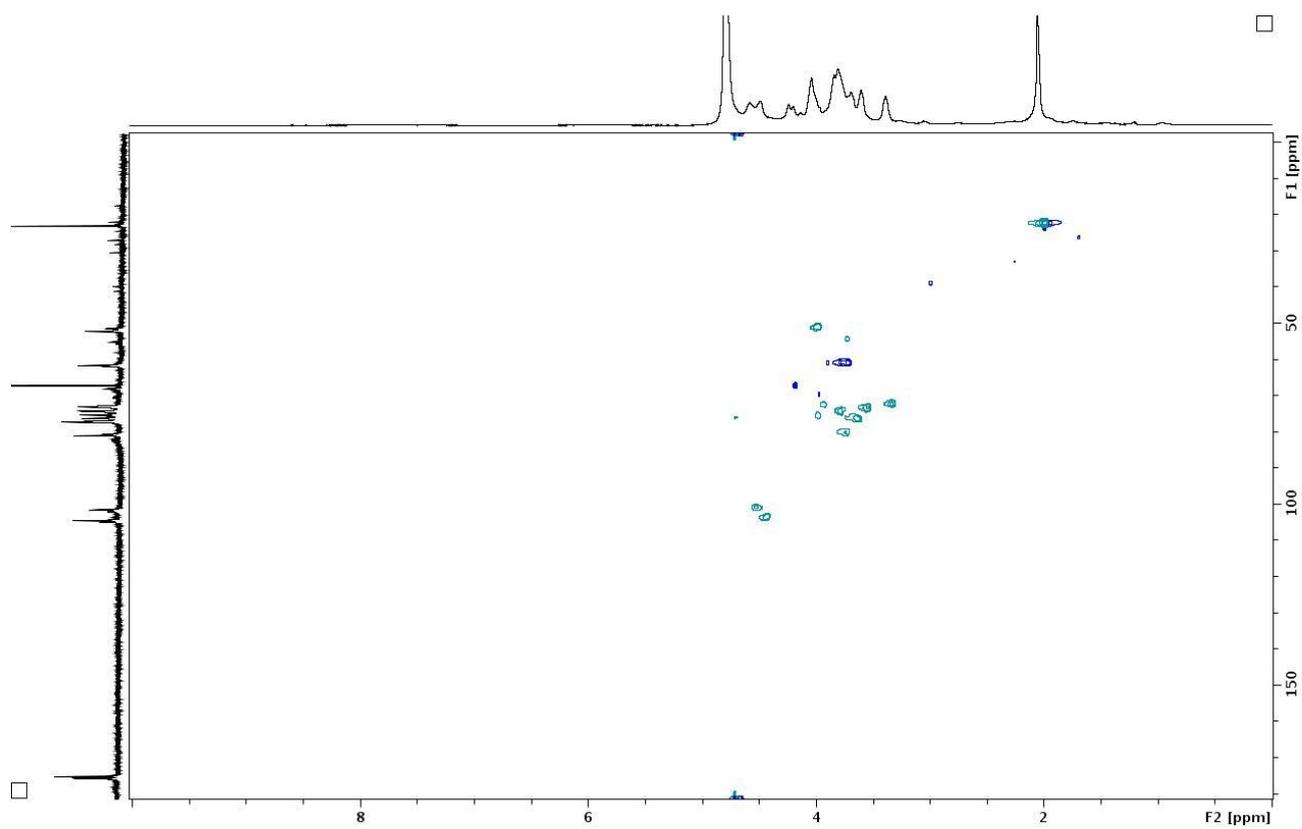


FIGURA 42. ESPECTRO HSQC DE CONDOITIM 4-SULFATO (1).

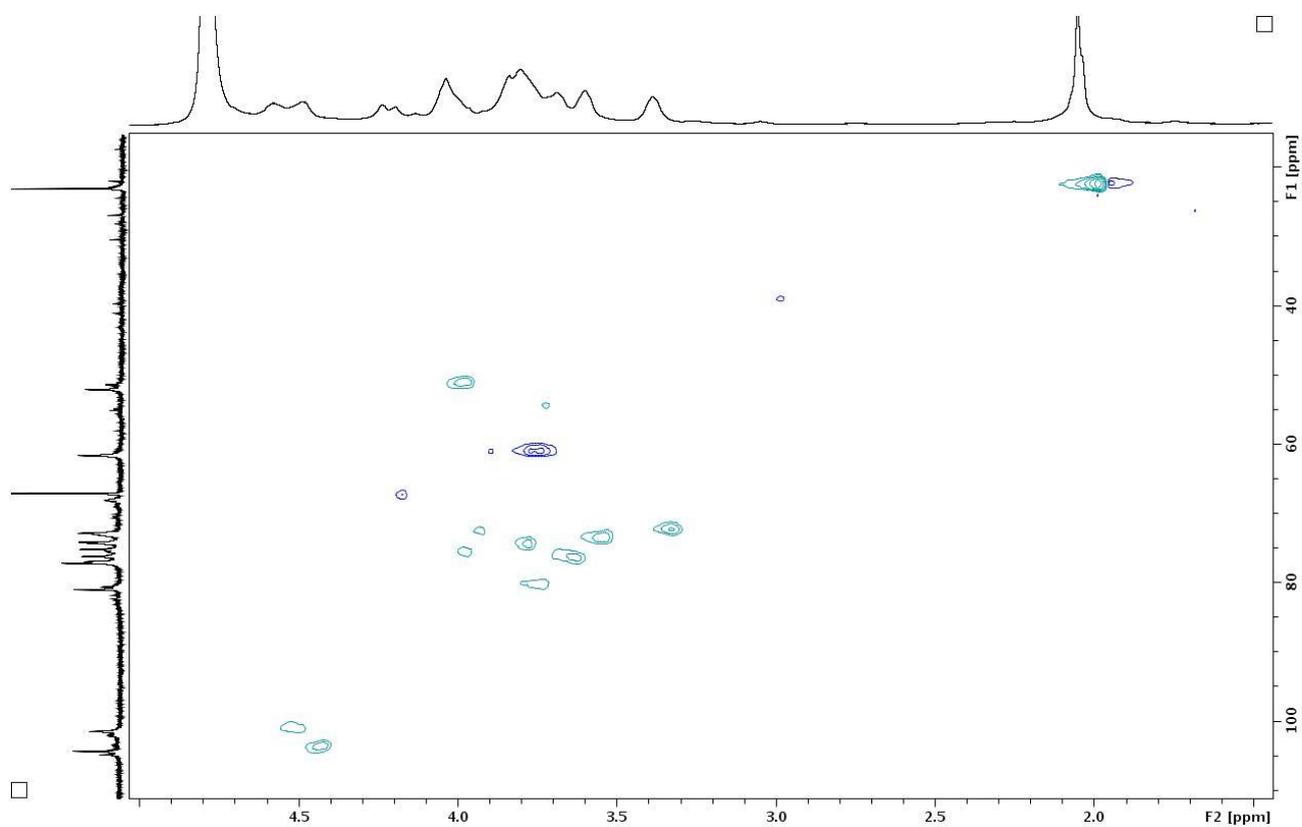


FIGURA 43. EXPANSÃO DO ESPECTRO HSQC DE CONDOITIM 4-SULFATO (1).

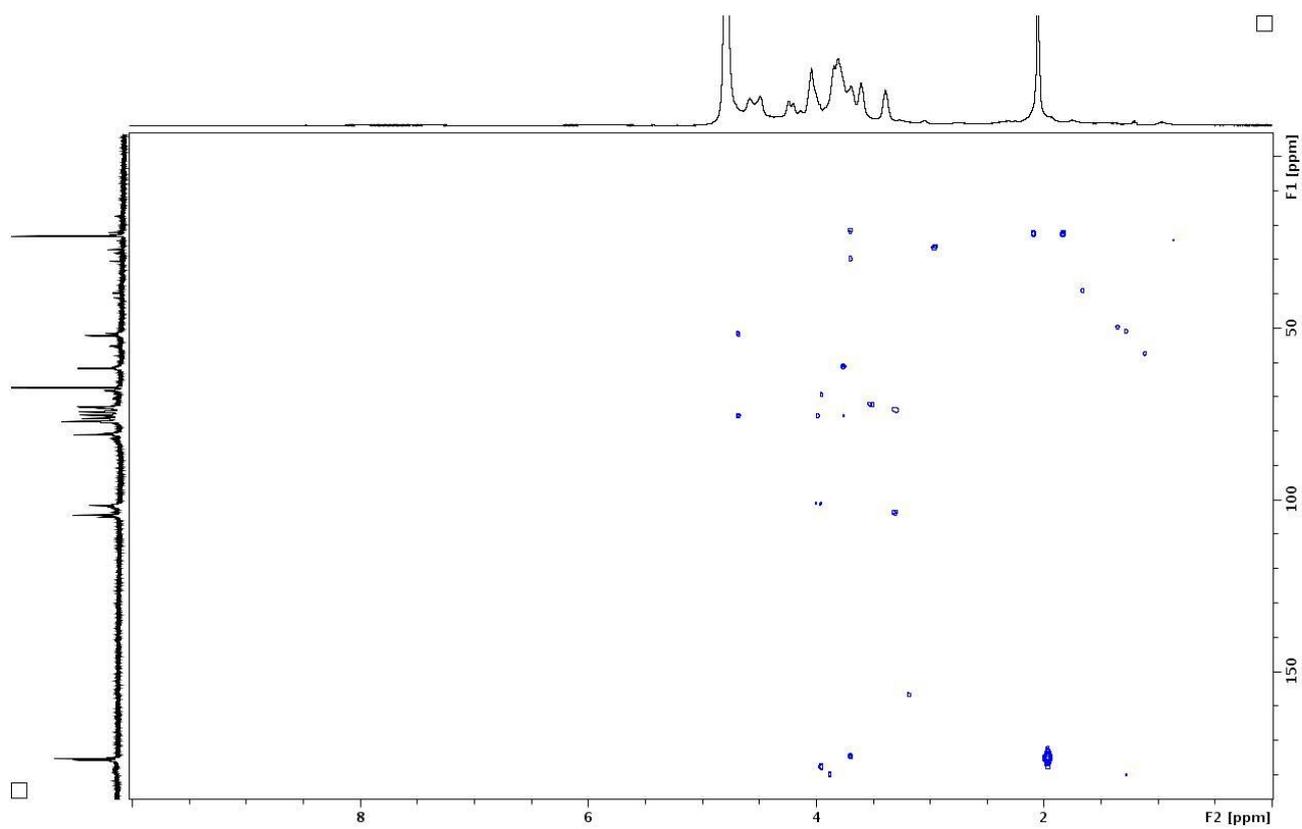


FIGURA 44. ESPECTRO HMBC DE CONDOITIM 4-SULFATO (1).

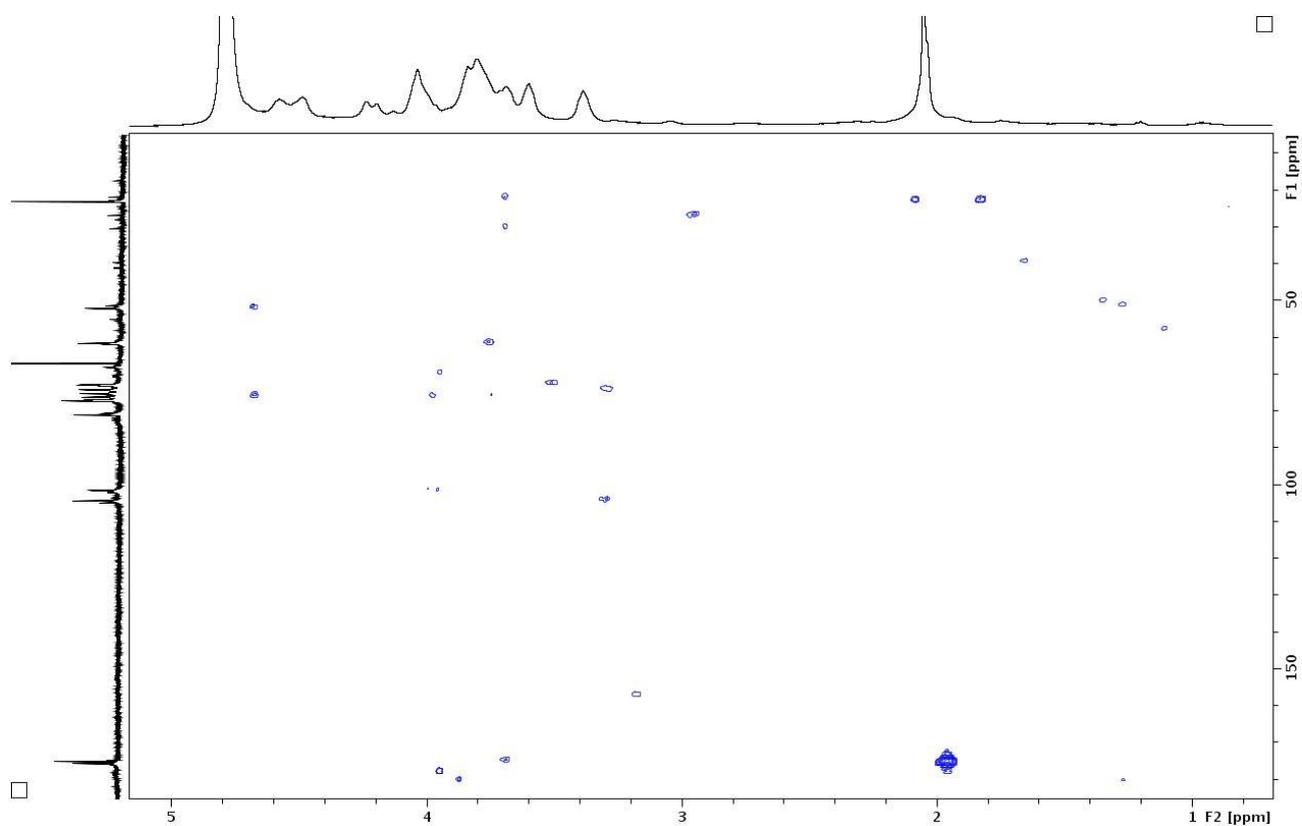


FIGURA 45. EXPANSÃO DO ESPECTRO HMBC DE CONDOITIM 4-SULFATO (1).

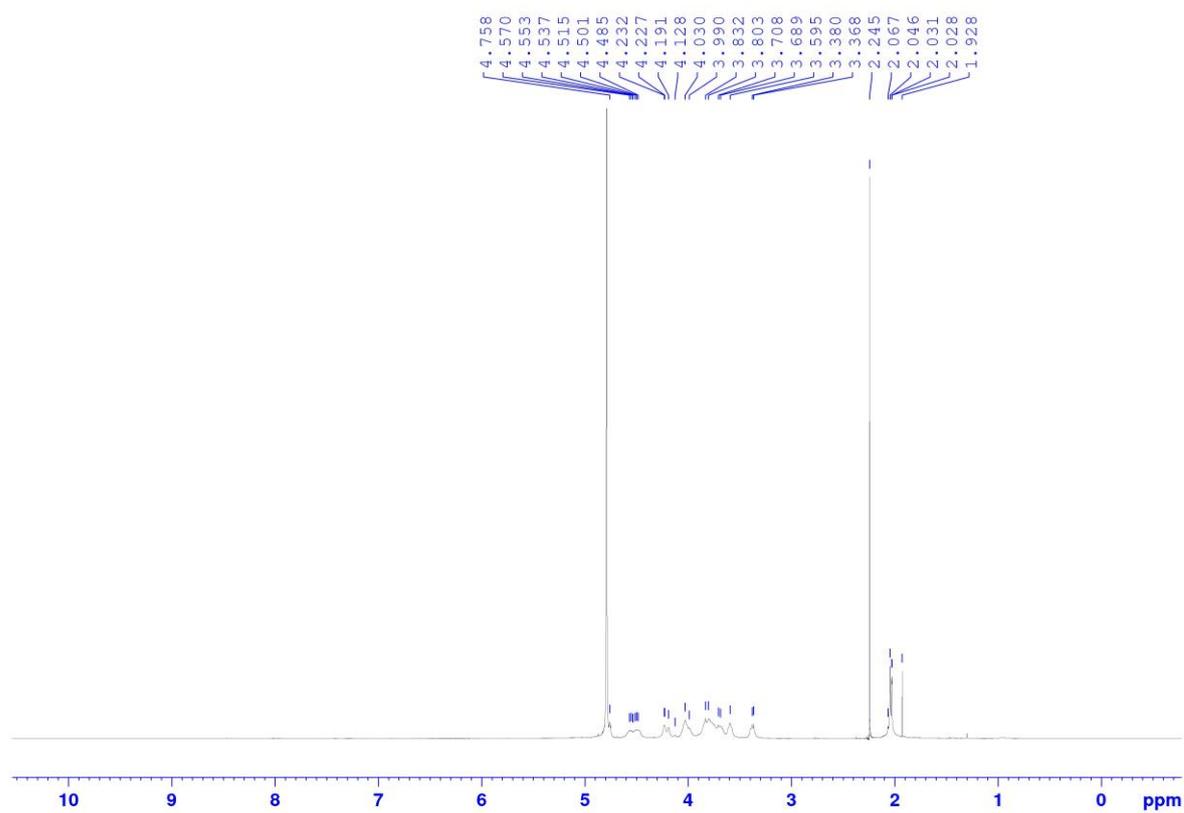


FIGURA 46. ESPECTRO DE ^1H DE CONDROITIM 4-SULFATO (2).

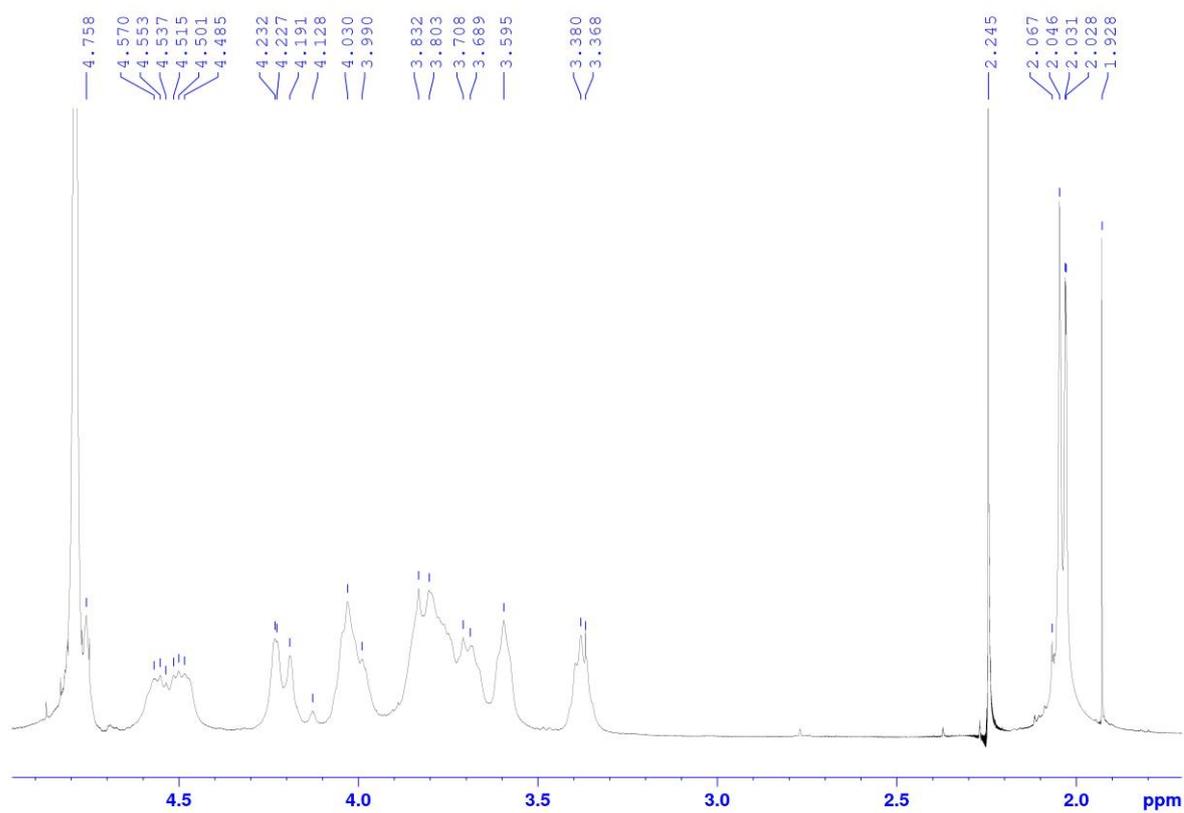


FIGURA 47. EXPANSÃO DO ESPECTRO DE ^1H (2.0-4.5 ppm) DE CHONDOITIM 4-SULFATO (2).

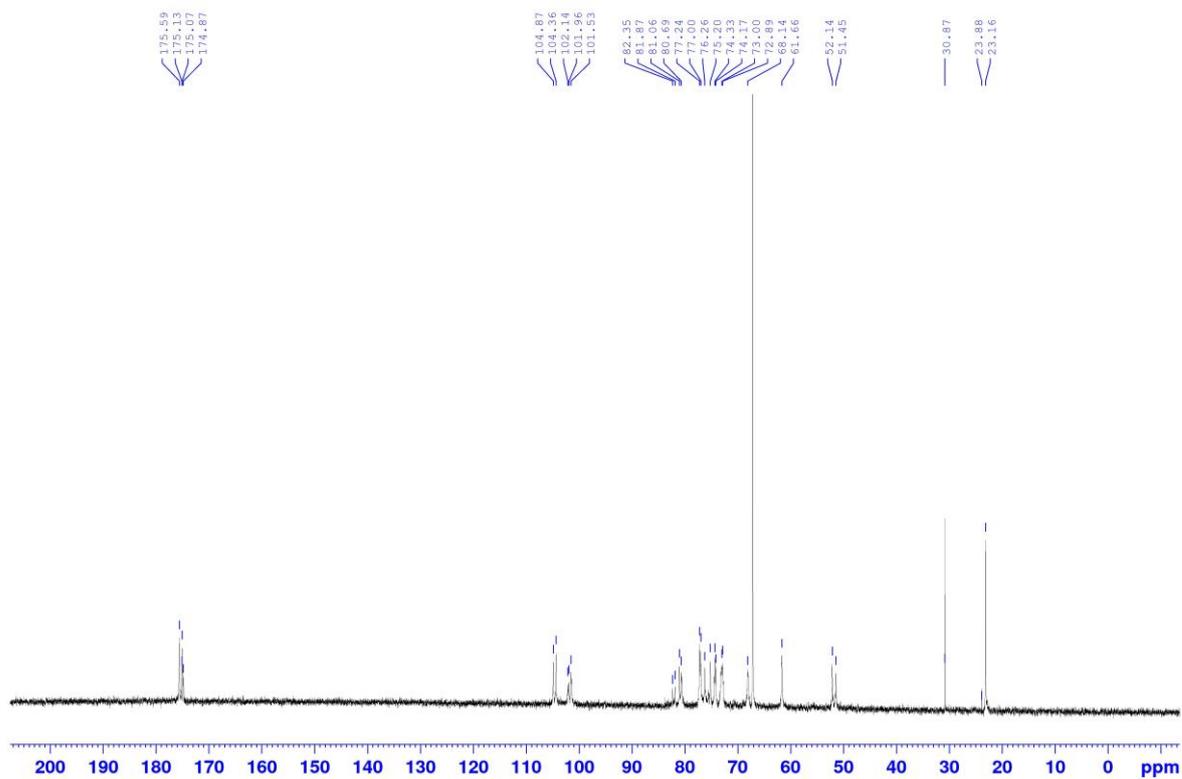


FIGURA 48. ESPECTRO ^{13}C DE CONDOITIM 4-SULFATO (2).

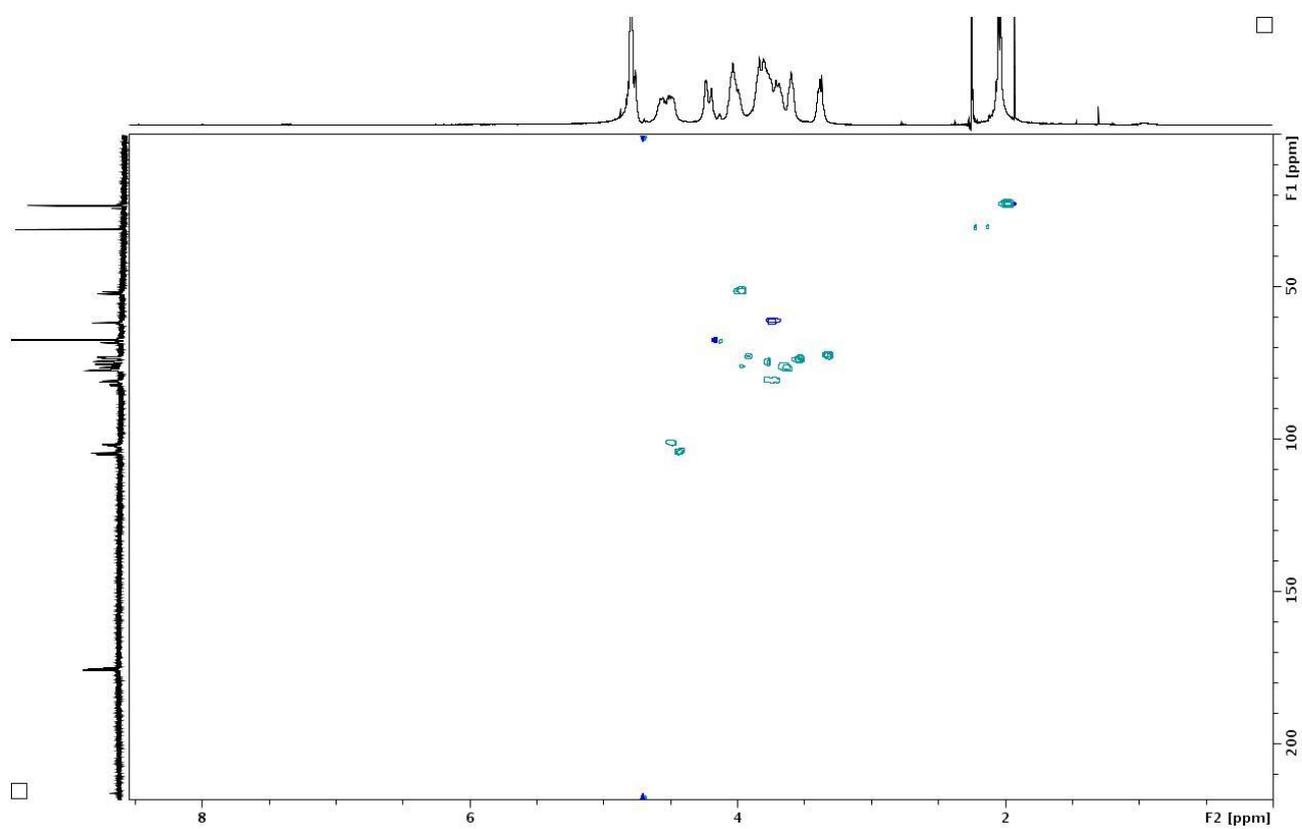


FIGURA 49. ESPECTRO HSQC DE CONDOITIM 4-SULFATO (2).

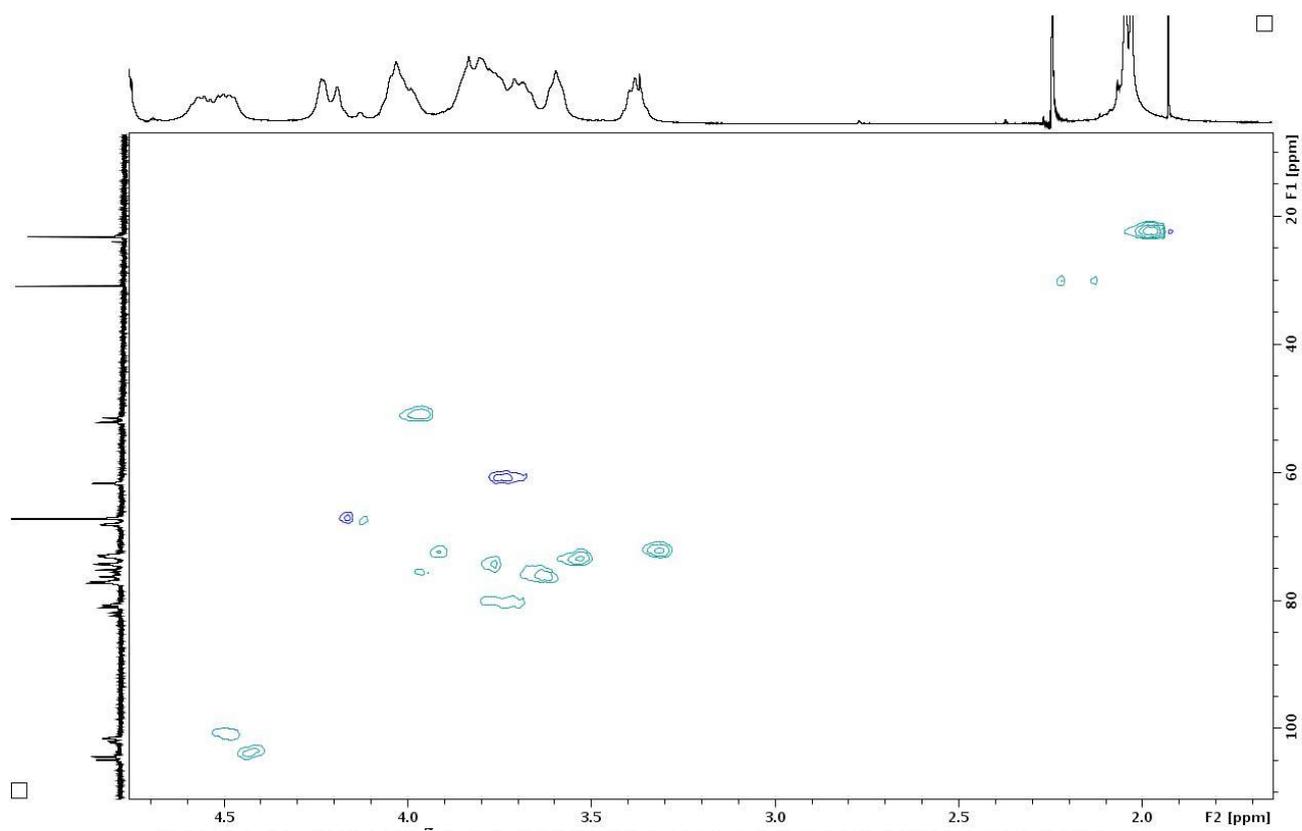


FIGURA 50. EXPANSÃO DO ESPECTRO HSQC DE CONDOITIM 4-SULFATO (2).

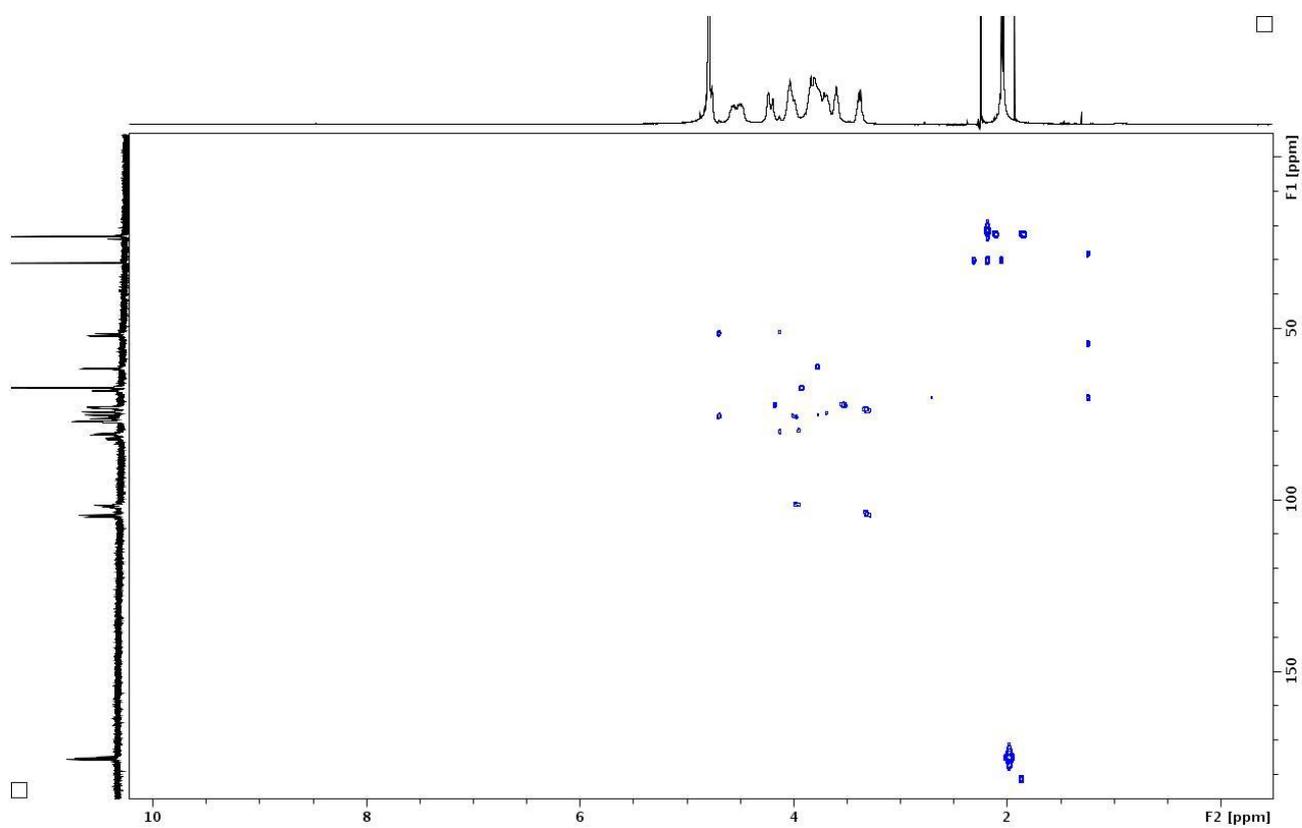


FIGURA 51. ESPECTRO HMBC DE CONDOITIM 4-SULFATO (2).

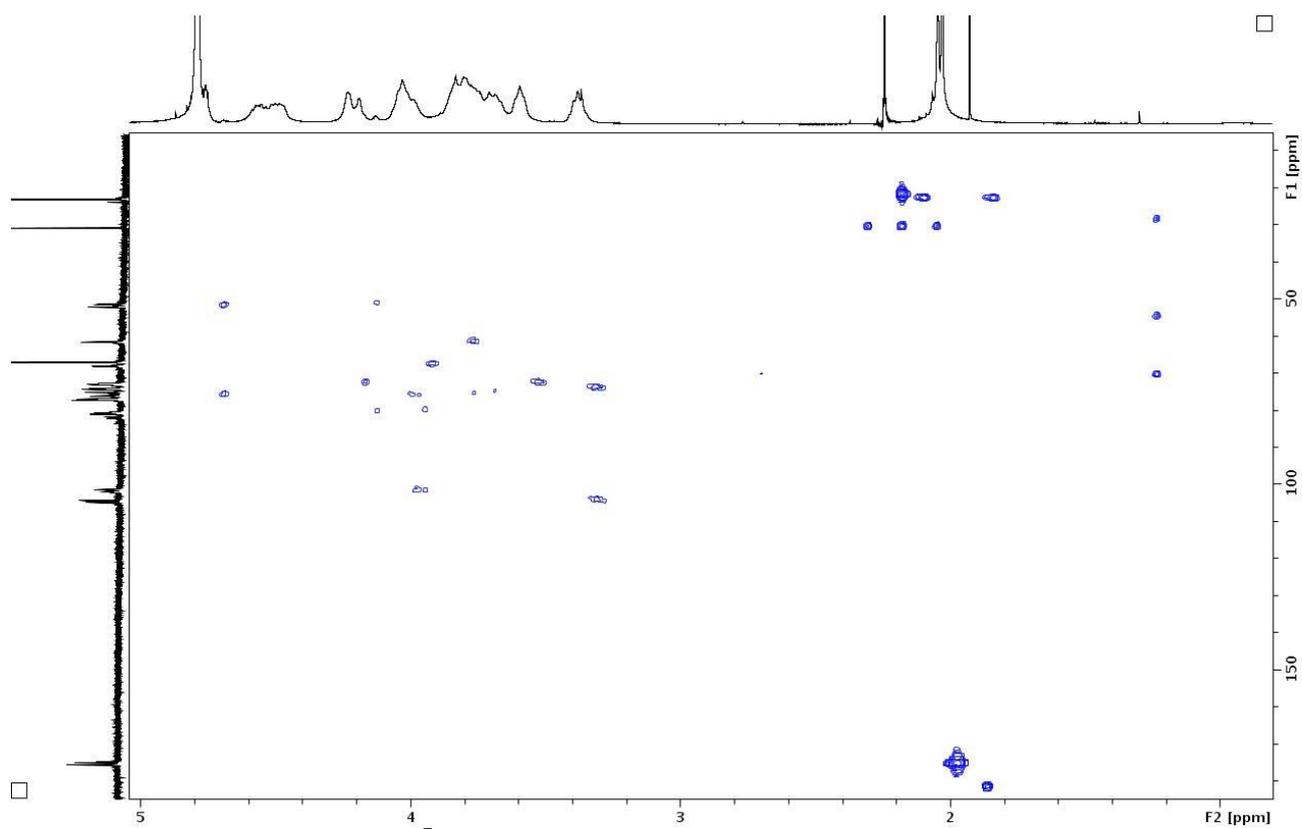


FIGURA 52. EXPANSÃO DO ESPECTRO HMBC DE CONDOITIM 4-SULFATO (2).

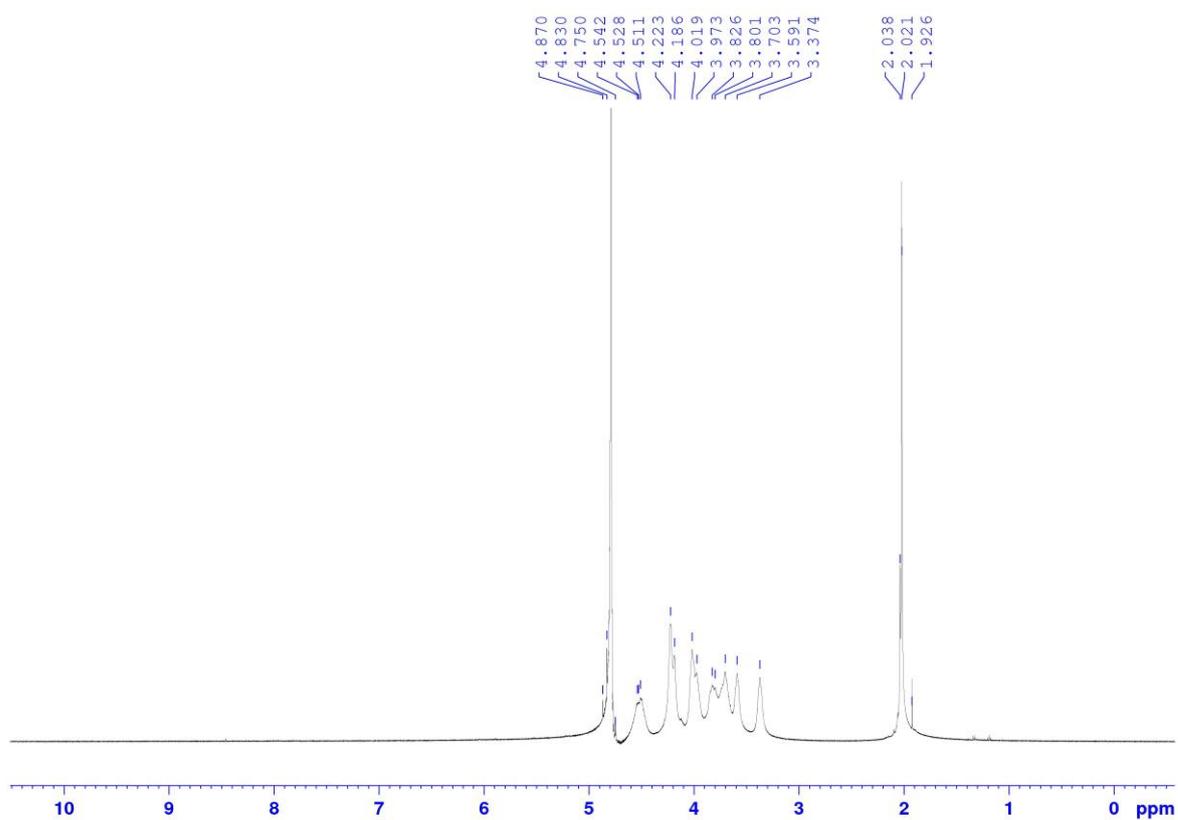


FIGURA 53. ESPECTRO ^1H DE CONDOITIM 6-SULFATO (3).

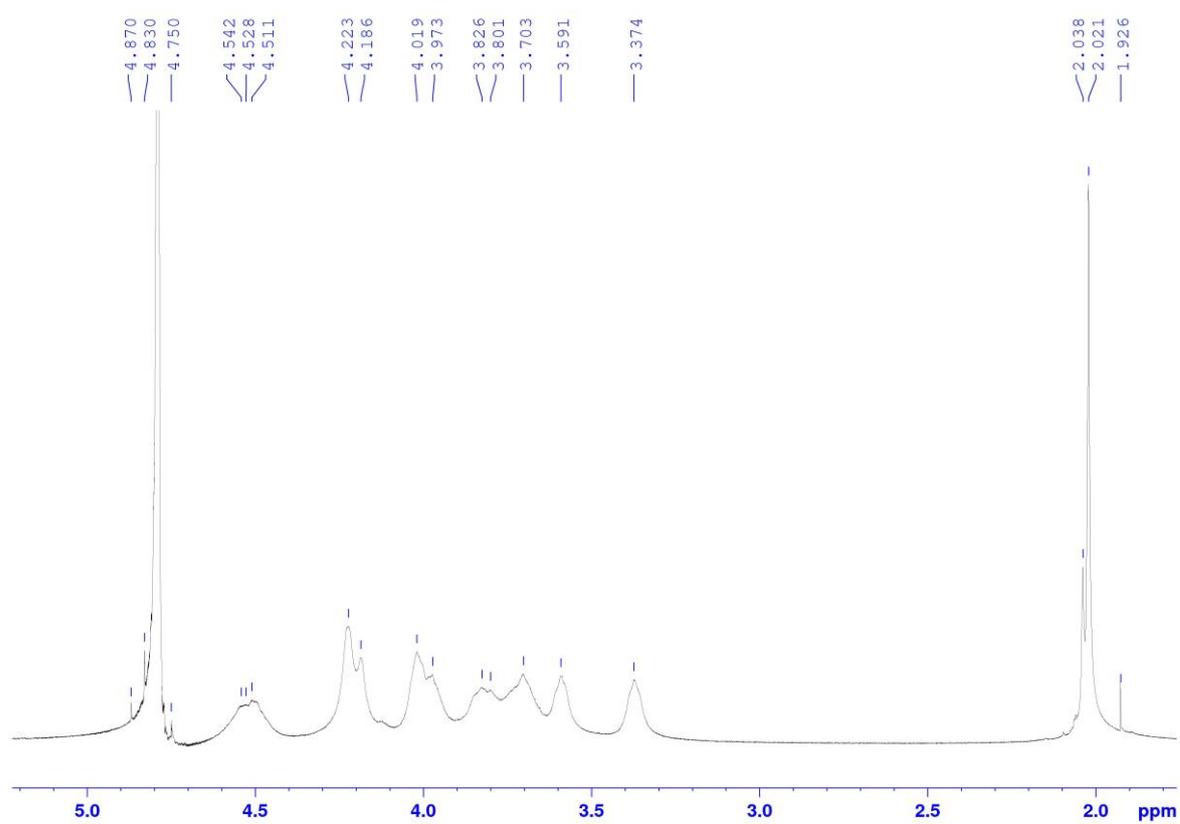


FIGURA 54. EXPANSÃO DO ESPECTRO ^1H (2.0-5.0 ppm) DE CONDOITIM 6-SULFATO (3).

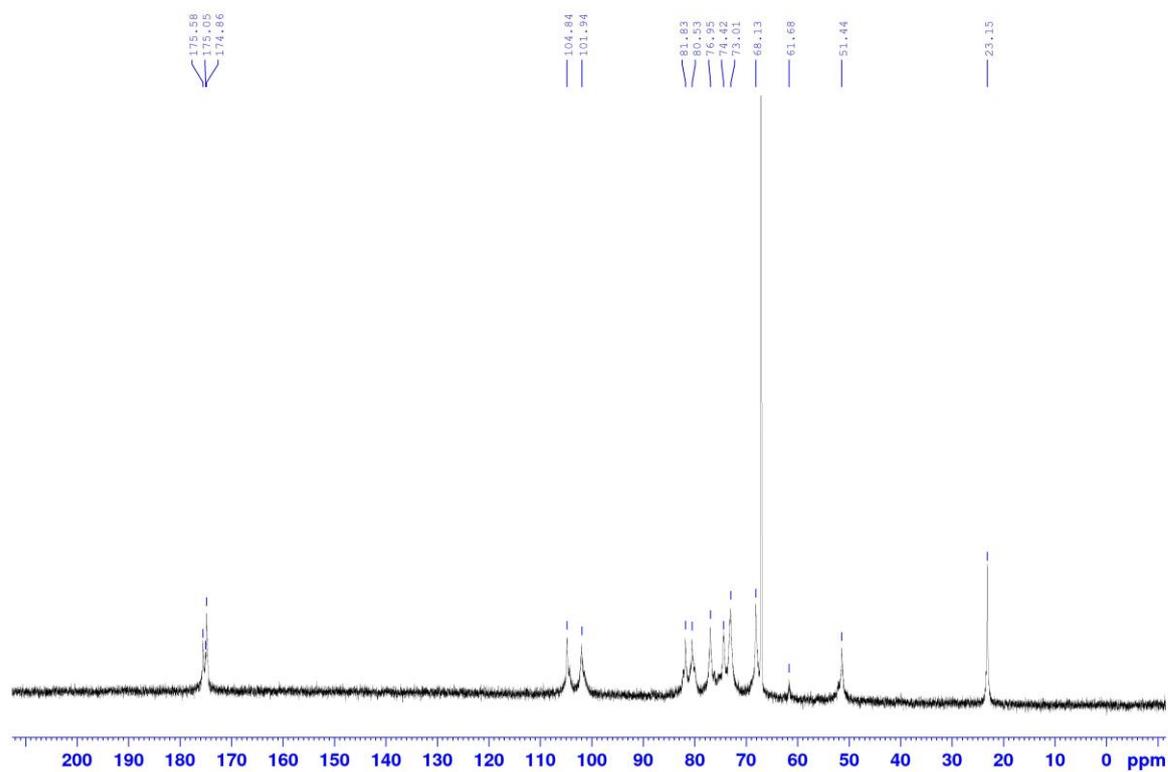
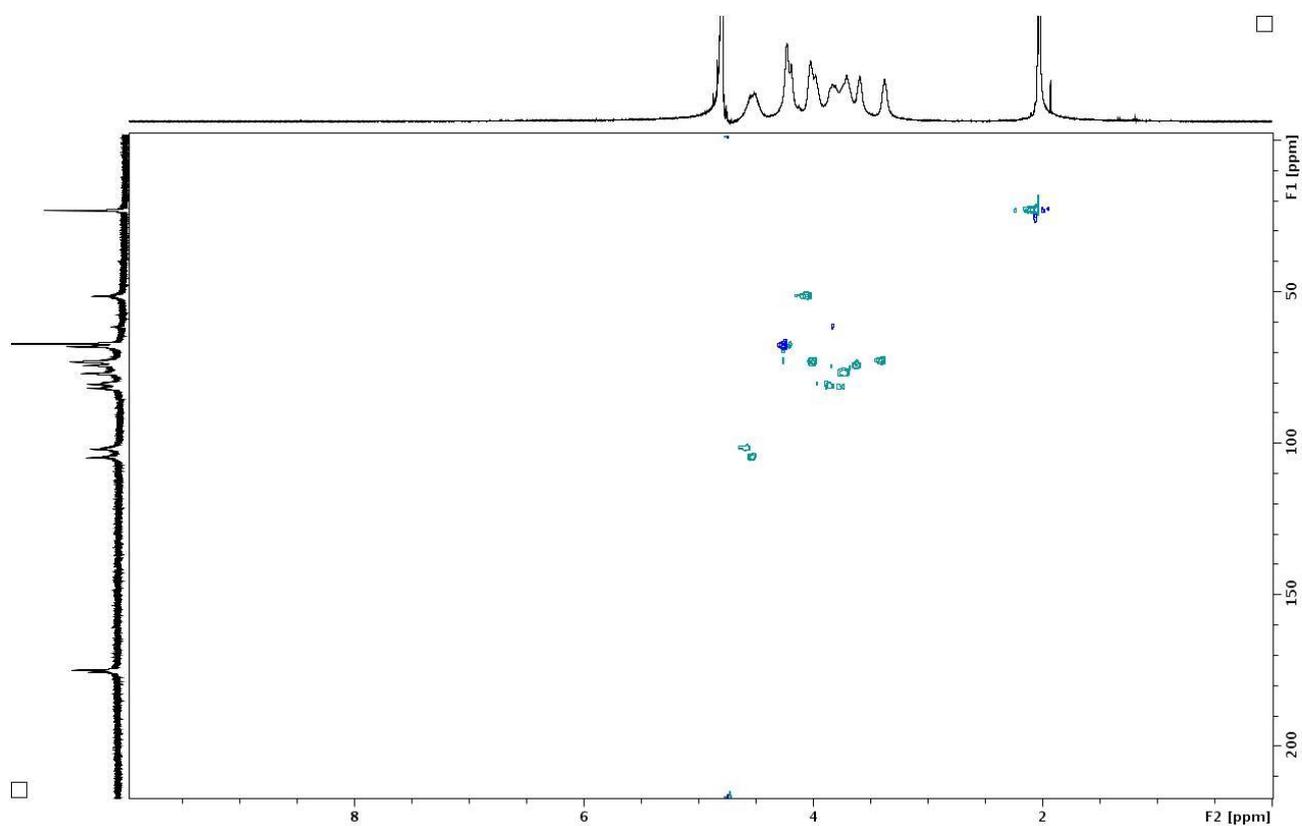
FIGURA 55. ESPECTRO ^{13}C DE CONDOITIM 6-SULFATO (3).

FIGURA 56. ESPECTRO HSQC DE CONDOITIM 6-SULFATO (3).

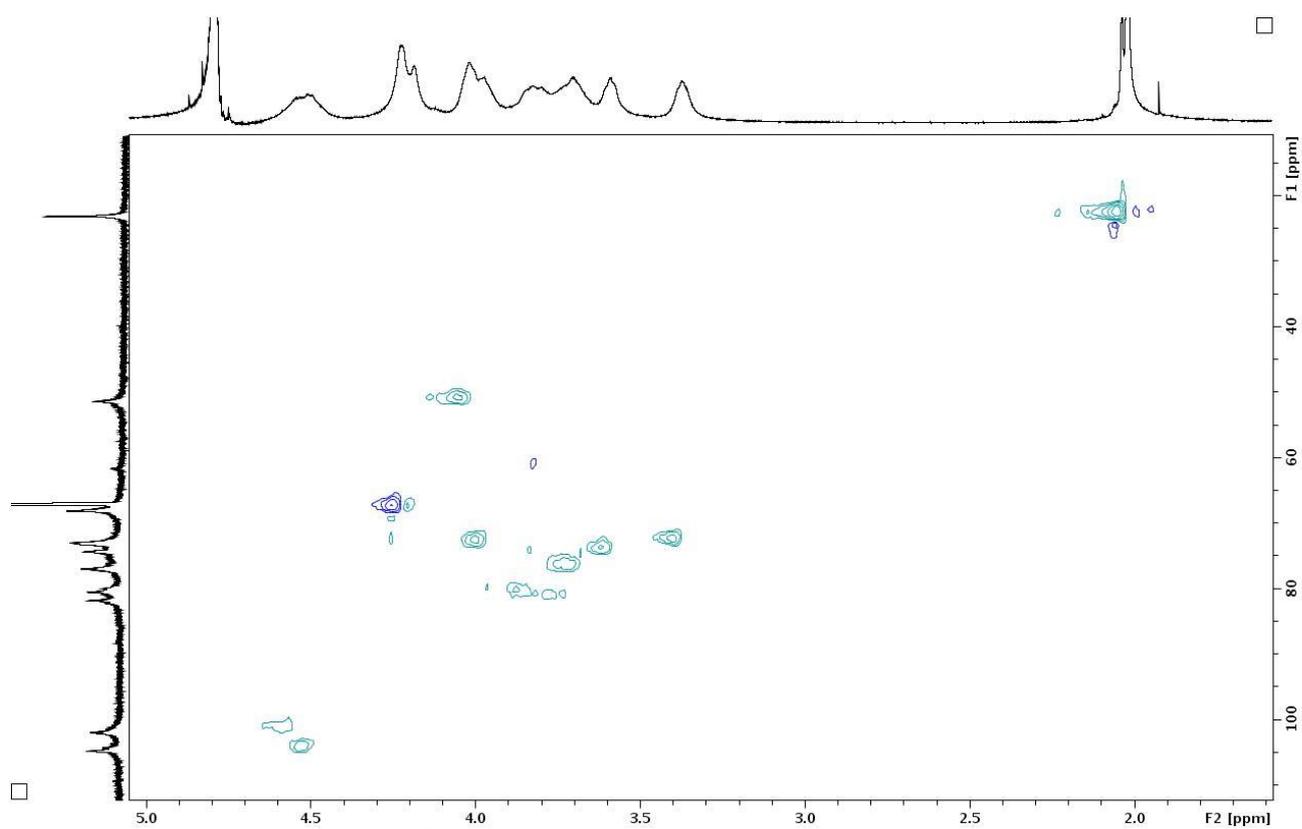


FIGURA 57. EXPANSÃO DO ESPECTRO HSQC DE CONDOITIM 6-SULFATO (3).

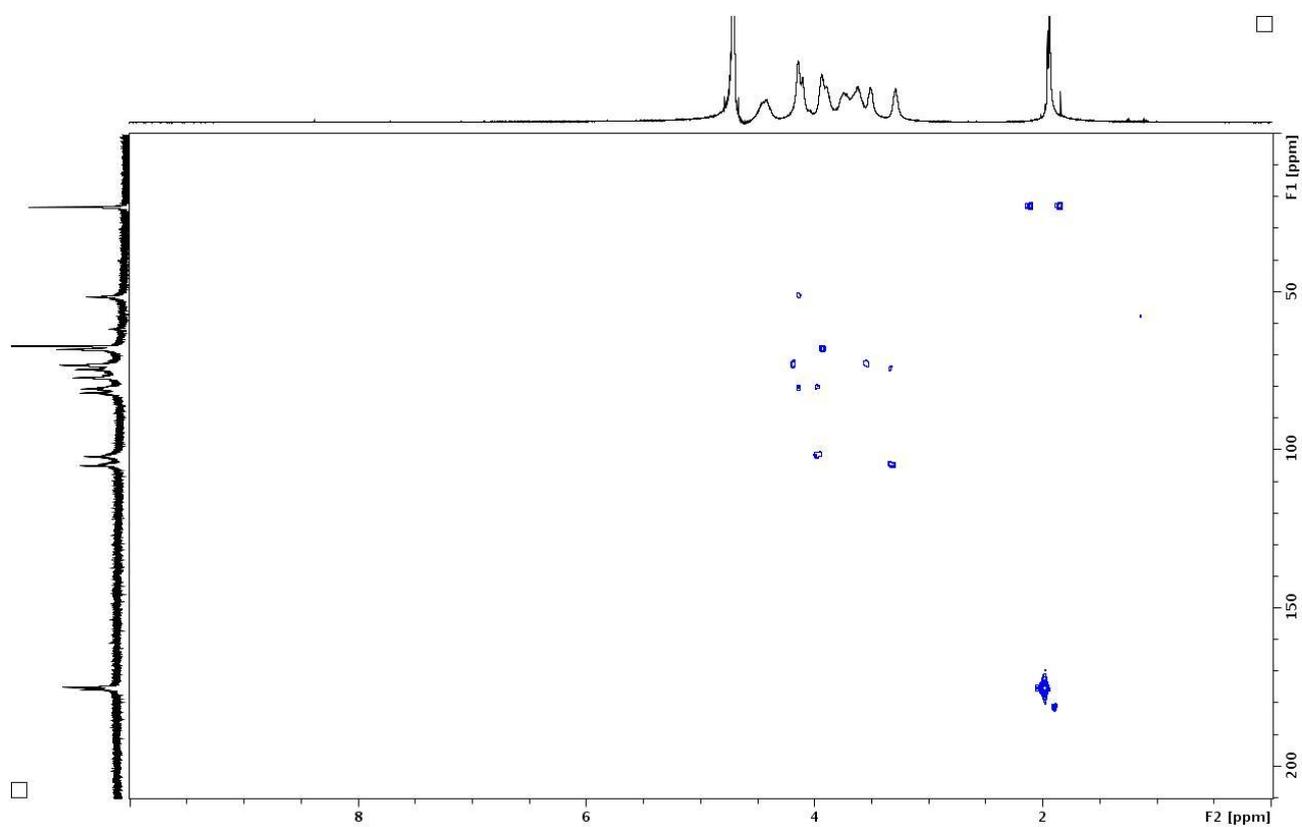
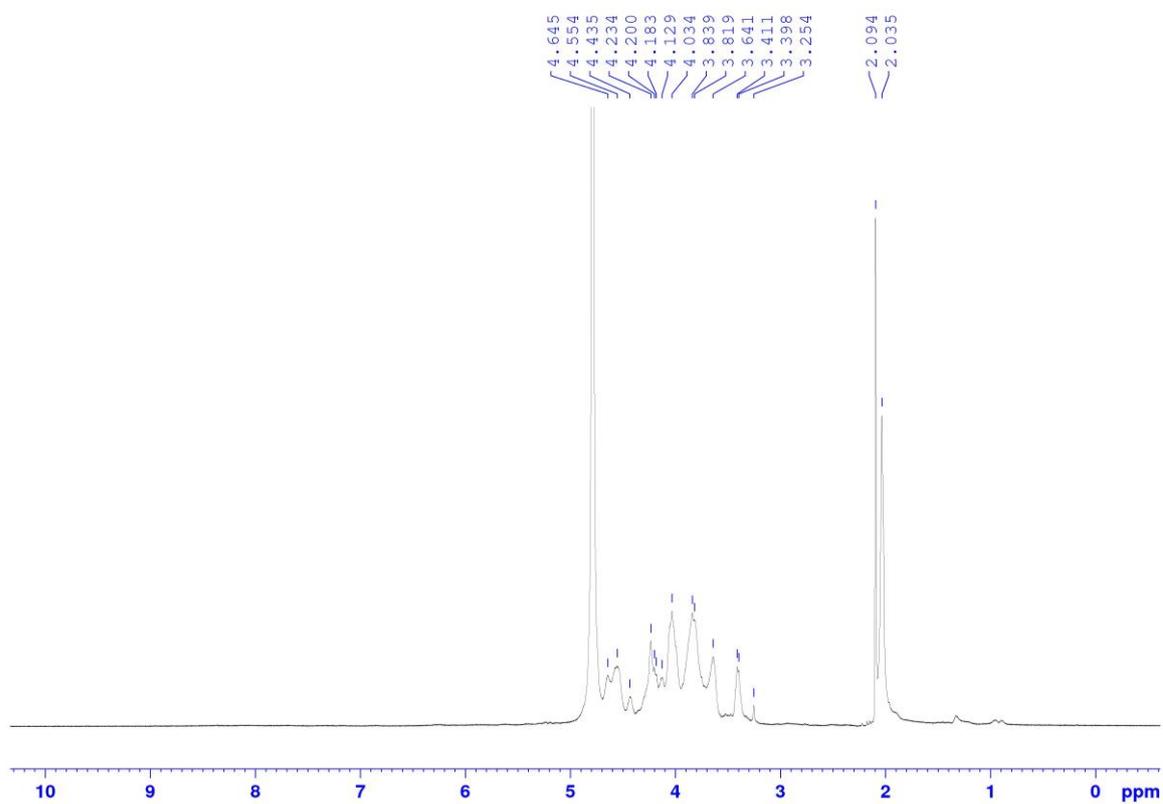
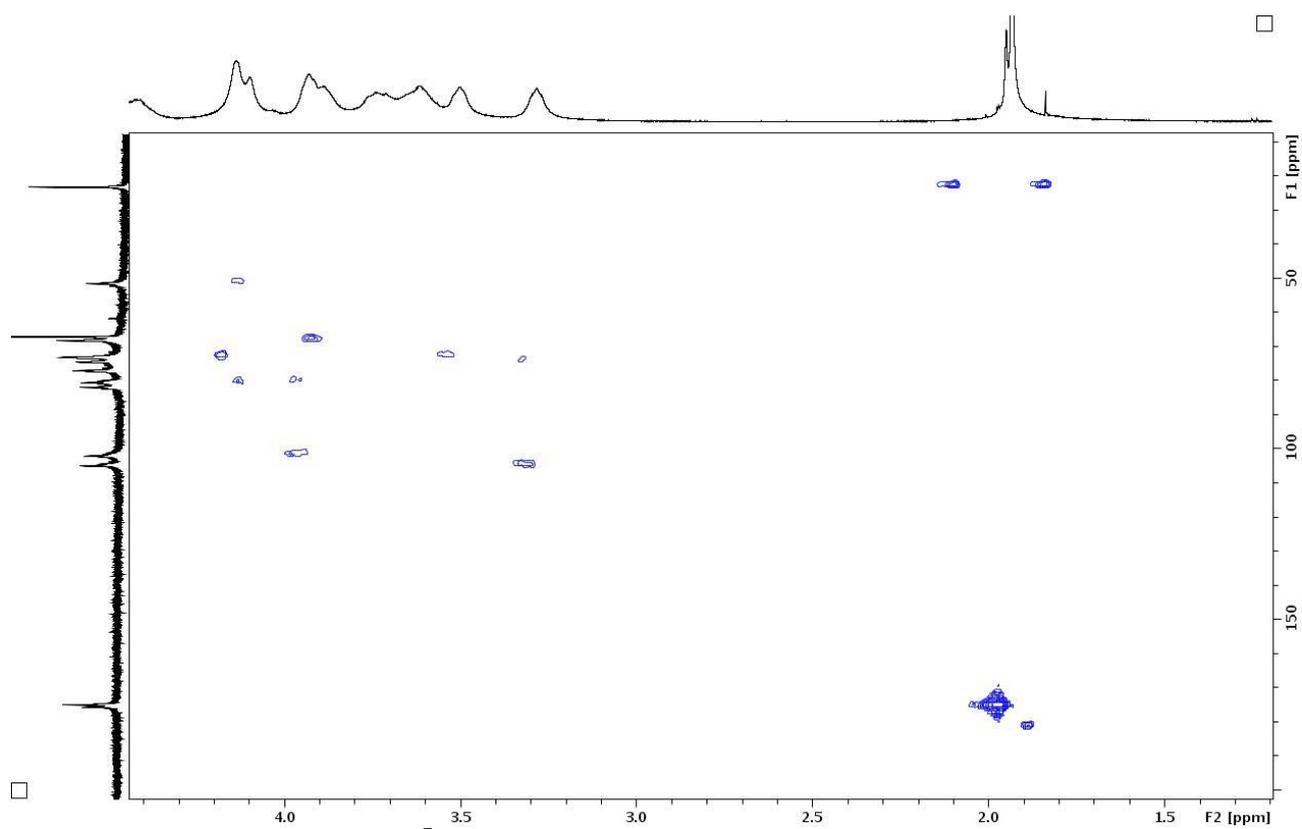


FIGURA 58. ESPECTRO HMBC DE CONDOITIM 6-SULFATO (3).



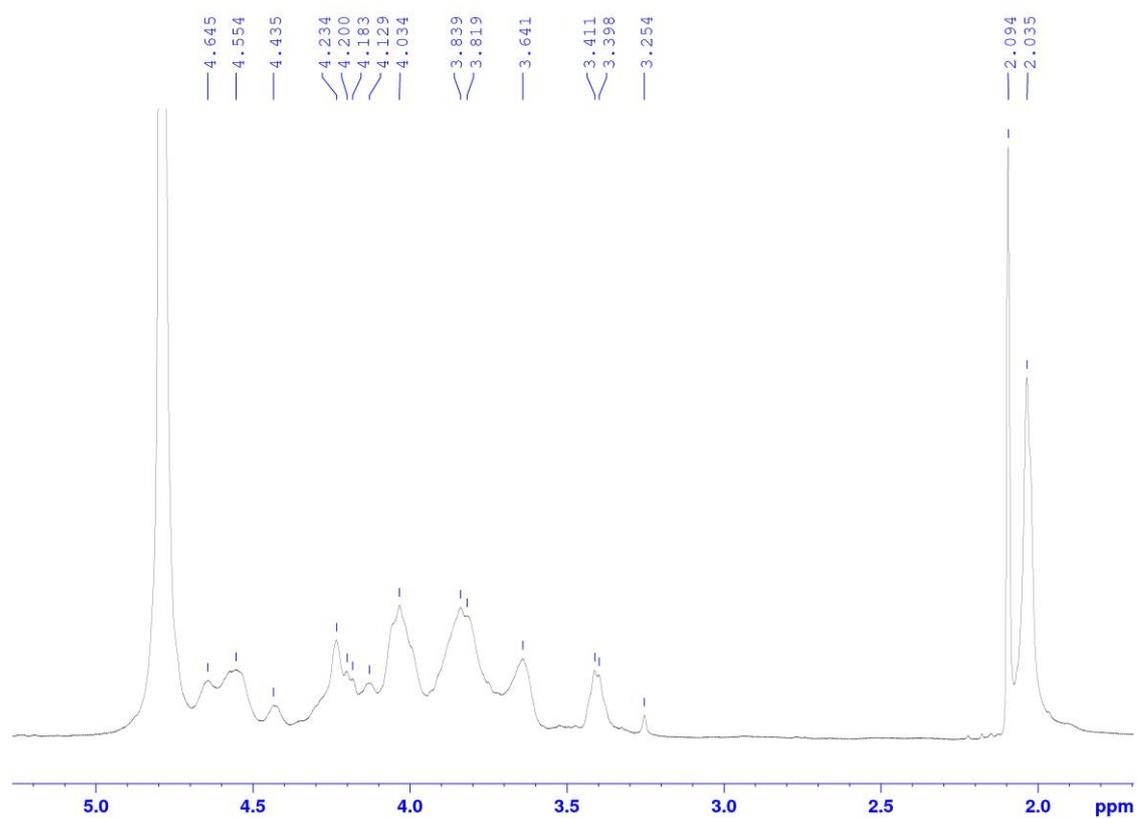


FIGURA 61. EXPANSÃO DO ESPECTRO ^1H (2.0-5.0 ppm) DE CONDROITIM SULFATO DE MANTO (4).

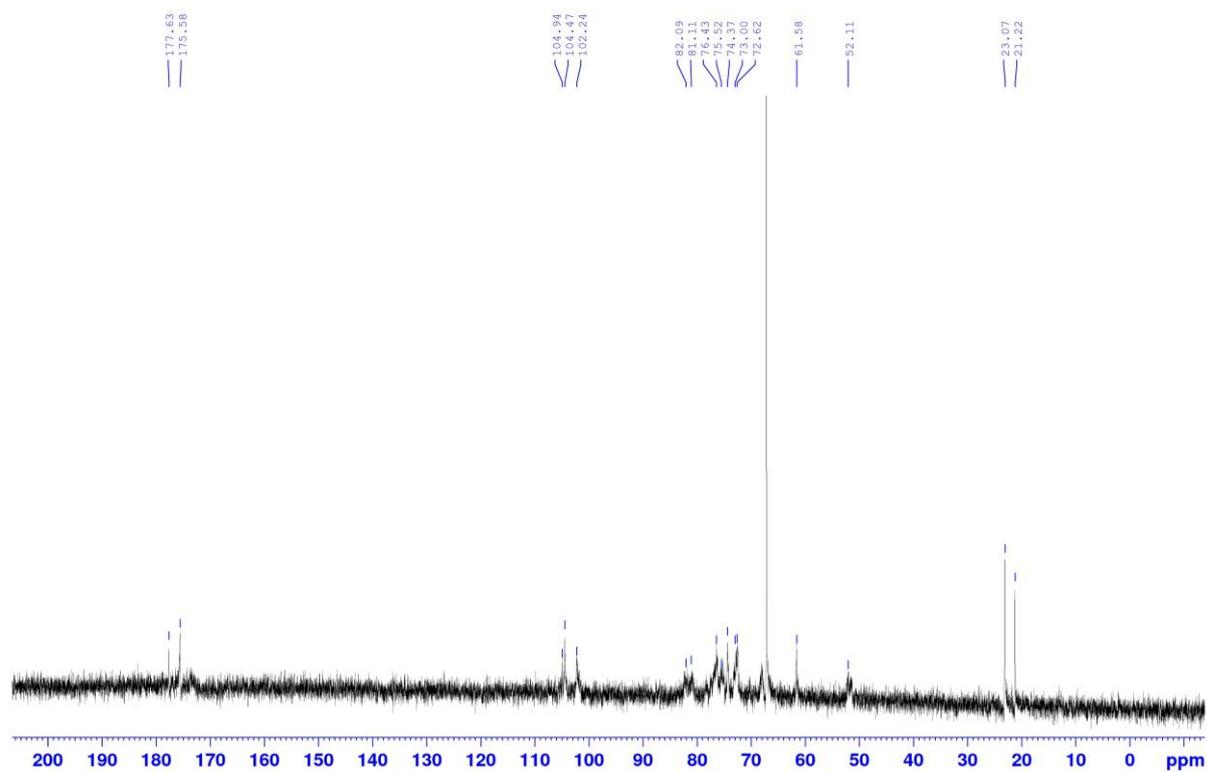


FIGURA 62. ESPECTRO ^{13}C DE CONDROITIM SULFATO DE MANTO (4).

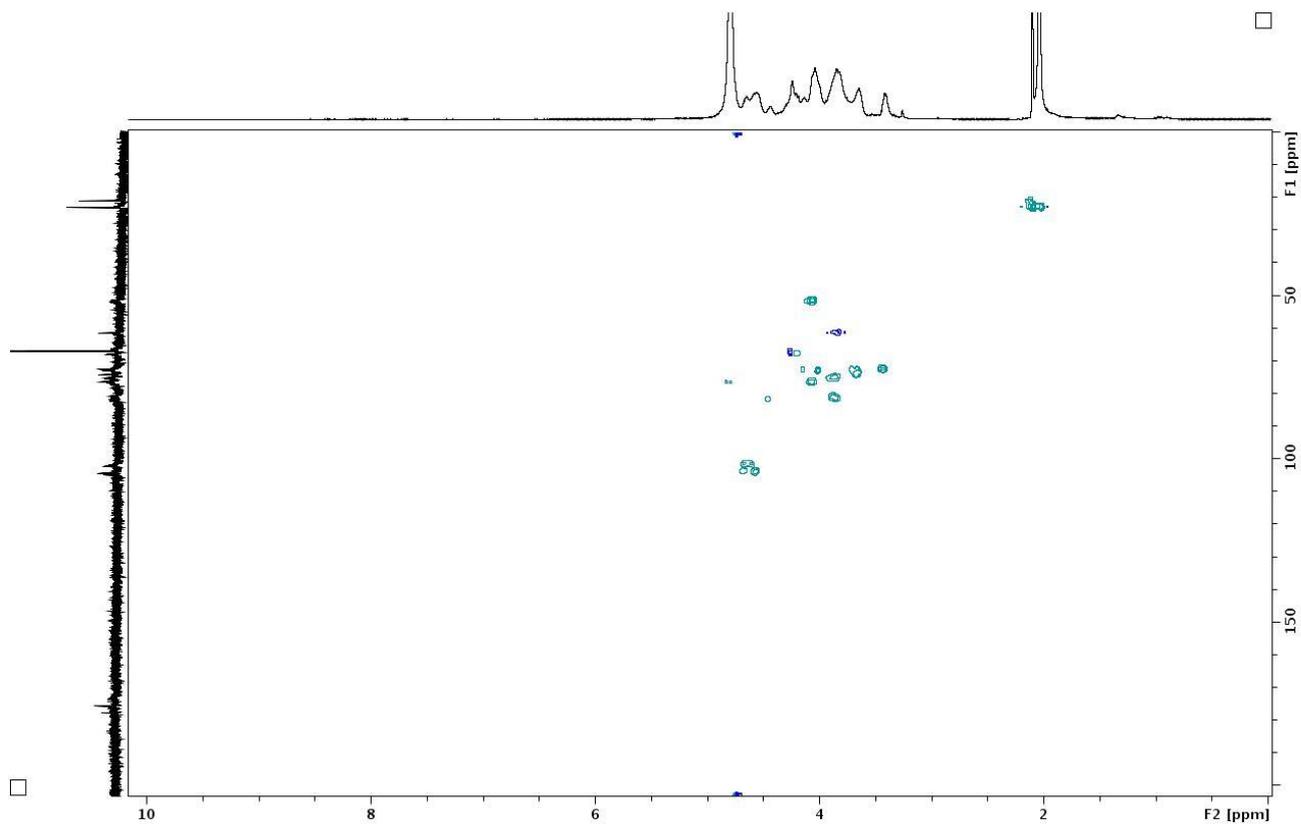


FIGURA 63. ESPECTRO HSQC DE CONDRITIM SULFATO DE MANTO (4).

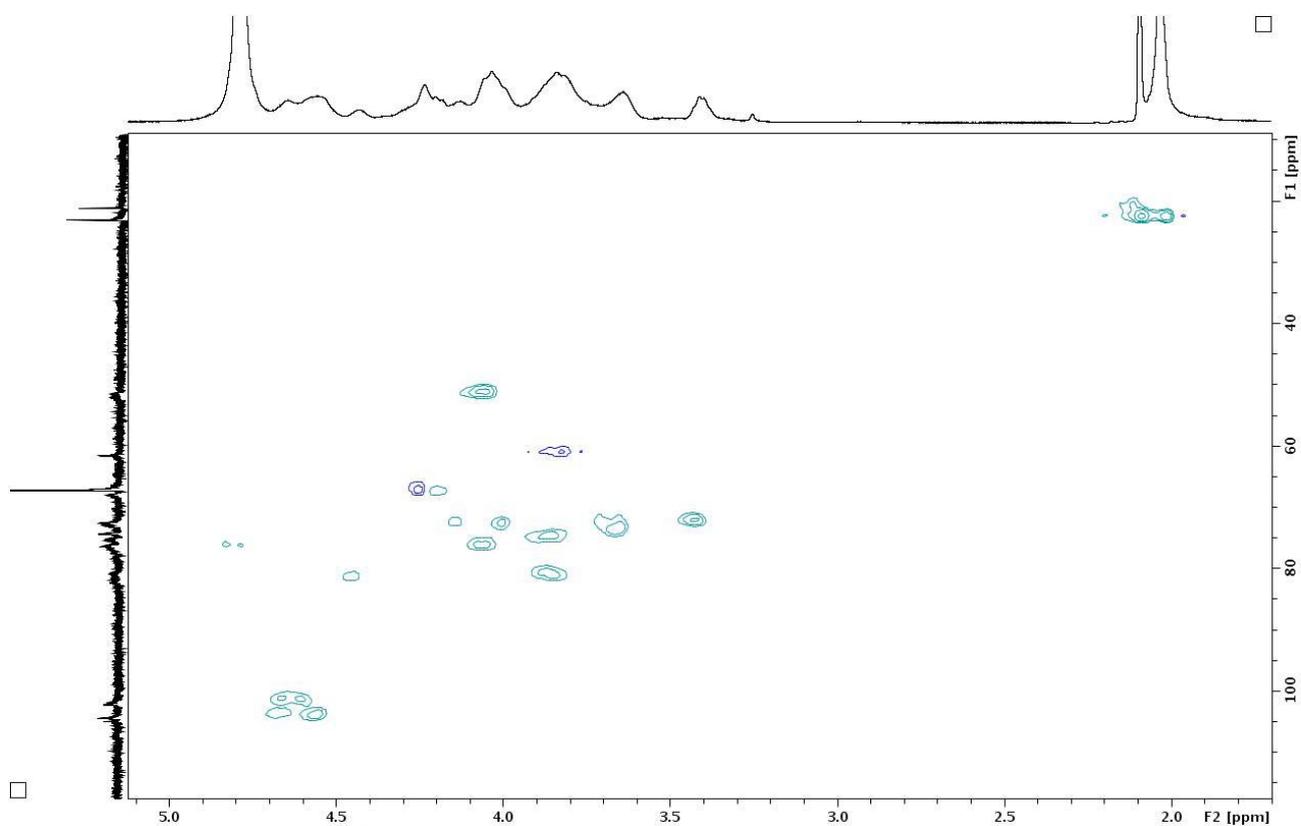


FIGURA 64. EXPANSÃO DO ESPECTRO HSQC DE CONDRITIM SULFATO DE MANTO (4).

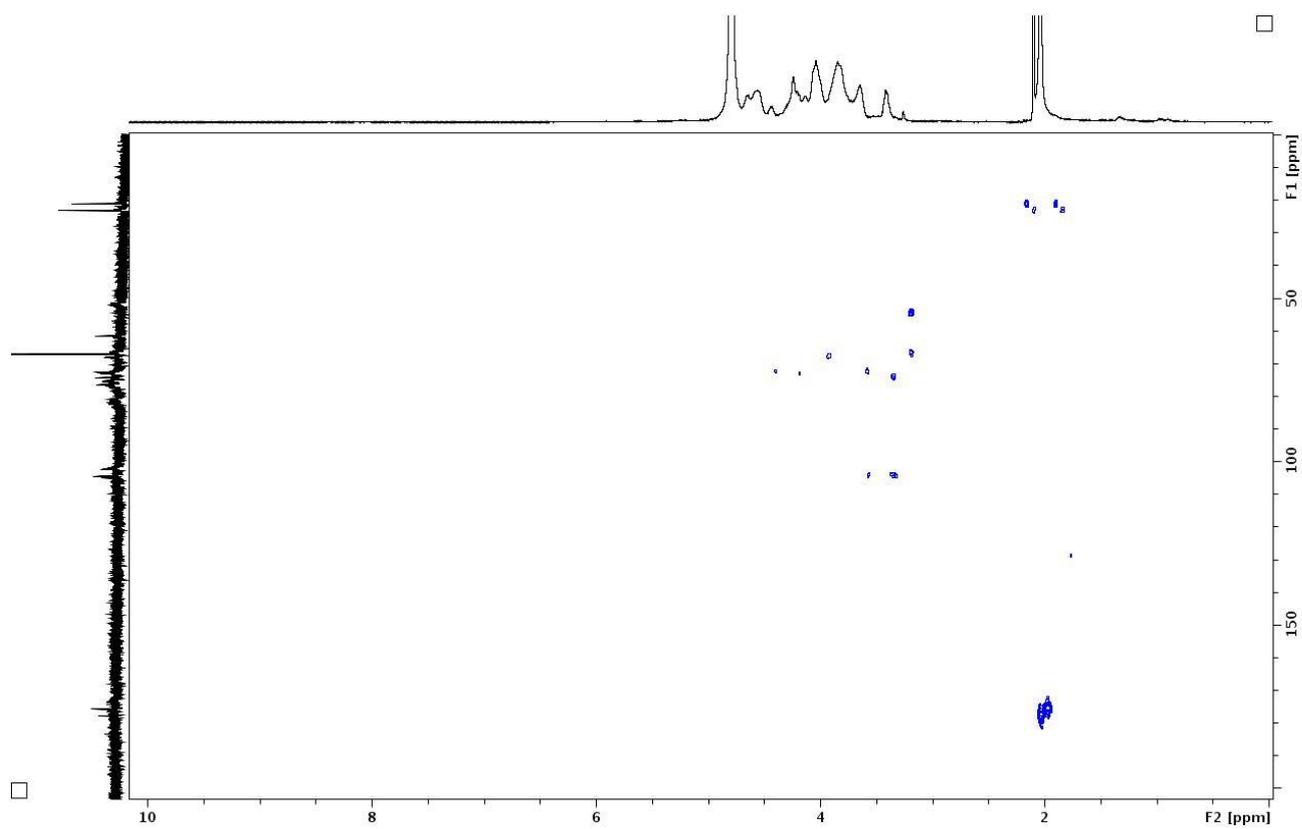


FIGURA 65. ESPECTRO HMBC DE CONDROITIM SULFATO DE MANTO (4).

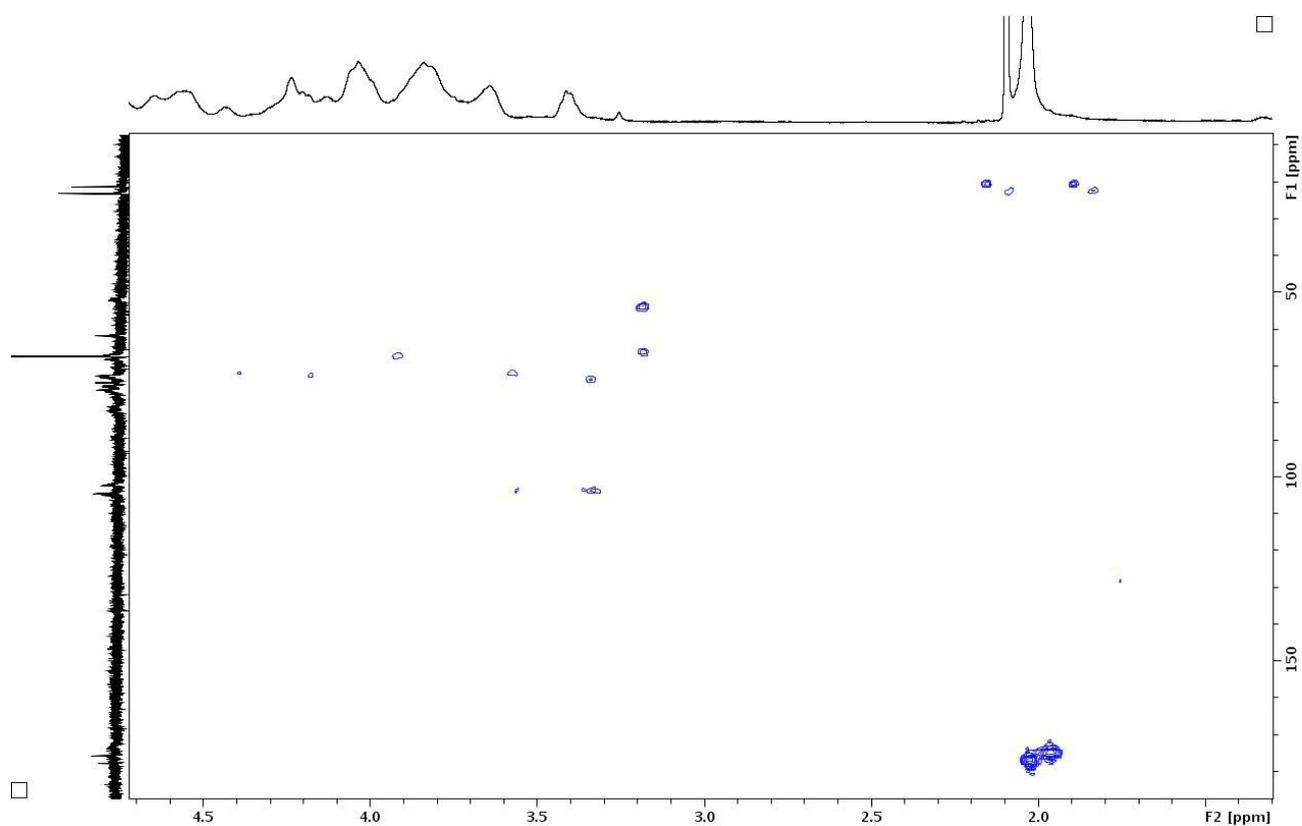


Figura 66. EXPANSÃO DO ESPECTRO HMBC DE CONDROITIM SULFATO DE MANTO (4).

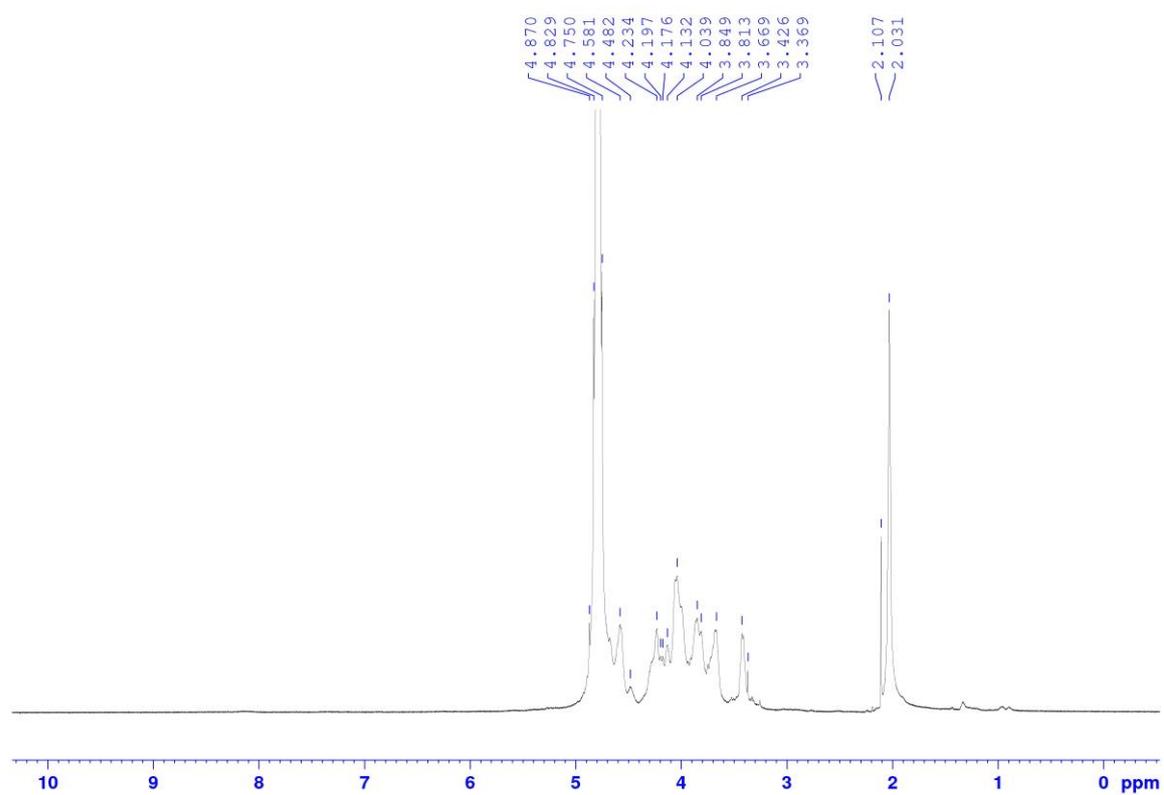


FIGURA 67. ESPECTRO ^1H DE CONDRITIM SULFATO DE NADADEIRA (5).

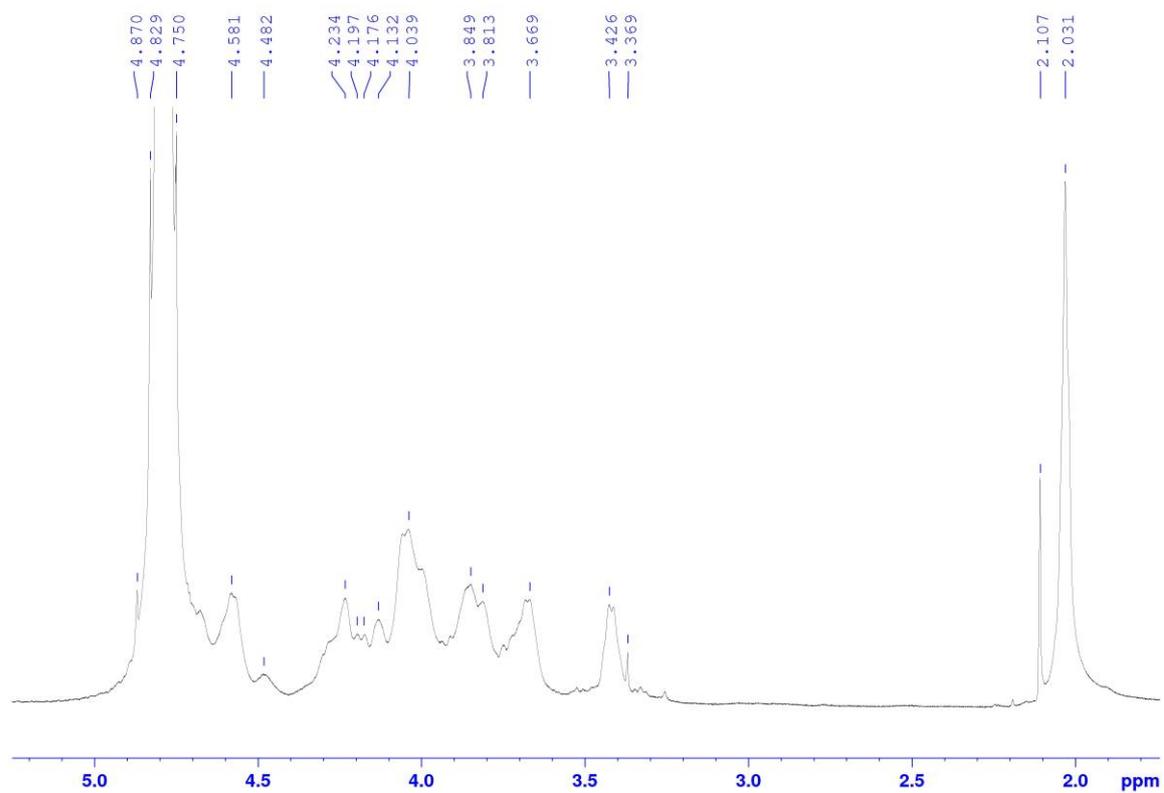


FIGURA 68. EXPANSÃO DO ESPECTRO ^1H (2.0-5.0 ppm) DE CONDROITIM SULFATO DE NADADEIRA (5).

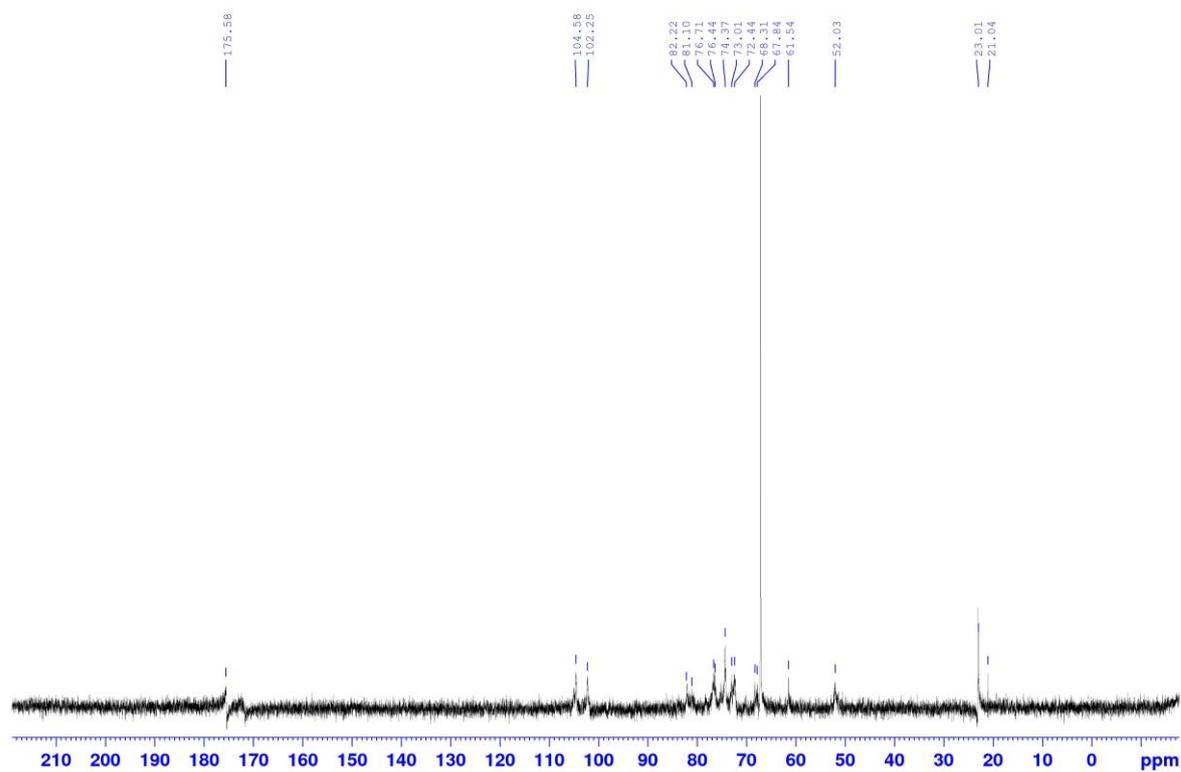


FIGURA 69. ESPECTRO ^{13}C DE CONDOITIM SULFATO DE NADADEIRA (5).

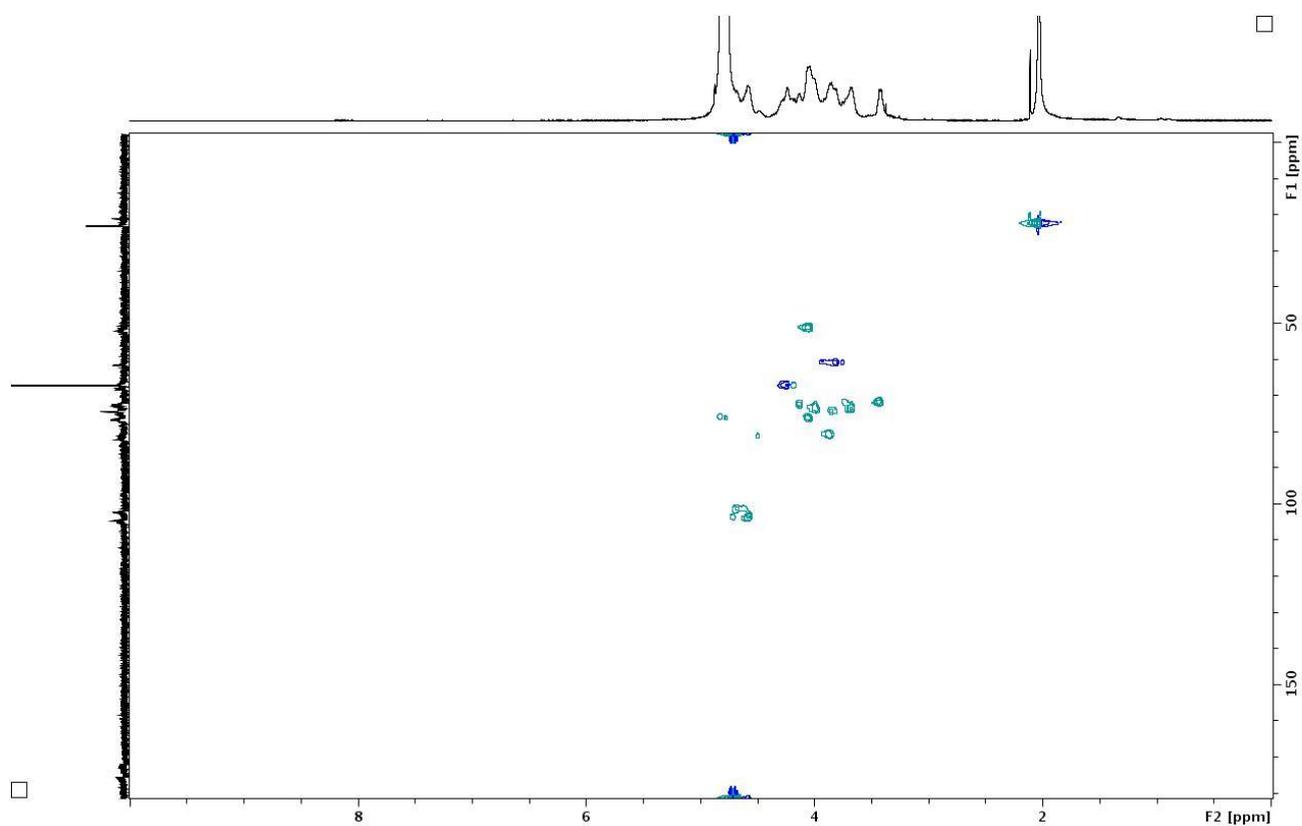


FIGURA 70. ESPECTRO HSQC DE CONDOITIM SULFATO DE NADADEIRA (5).

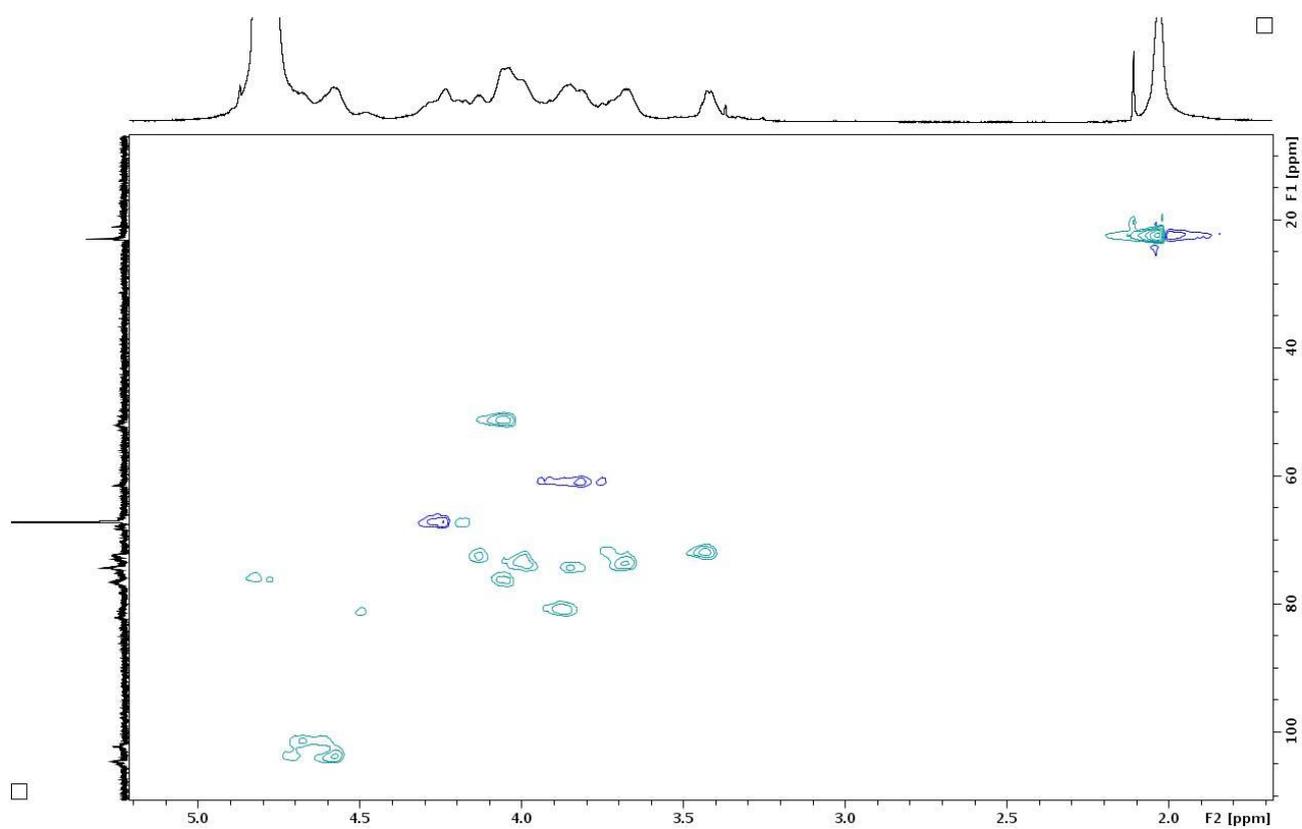


FIGURA 71. EXPANSÃO DO ESPECTRO HSQC DE CONDOITIM SULFATO DE NADADEIRA (5).

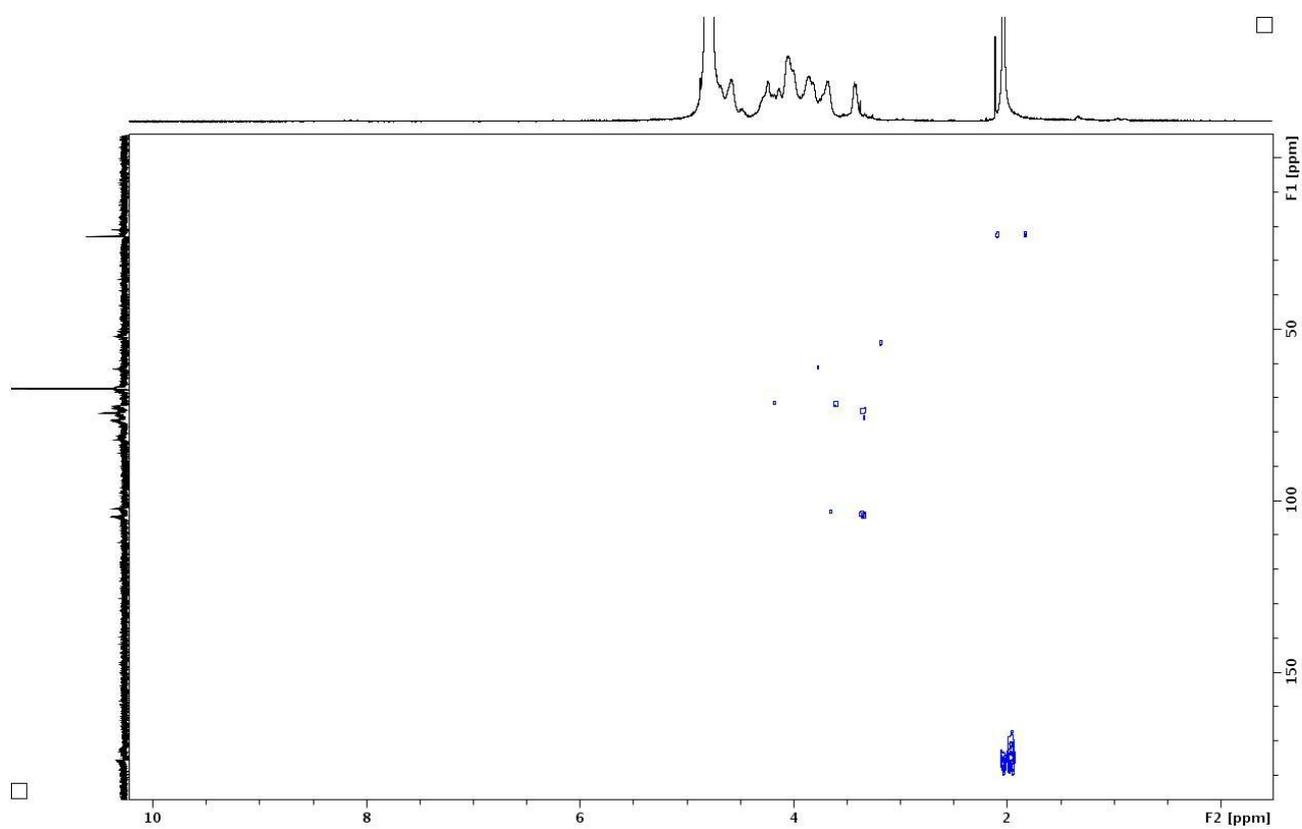


FIGURA 72. ESPECTRO HMBC DE CONDOITIM SULFATO DE NADADEIRA (5).

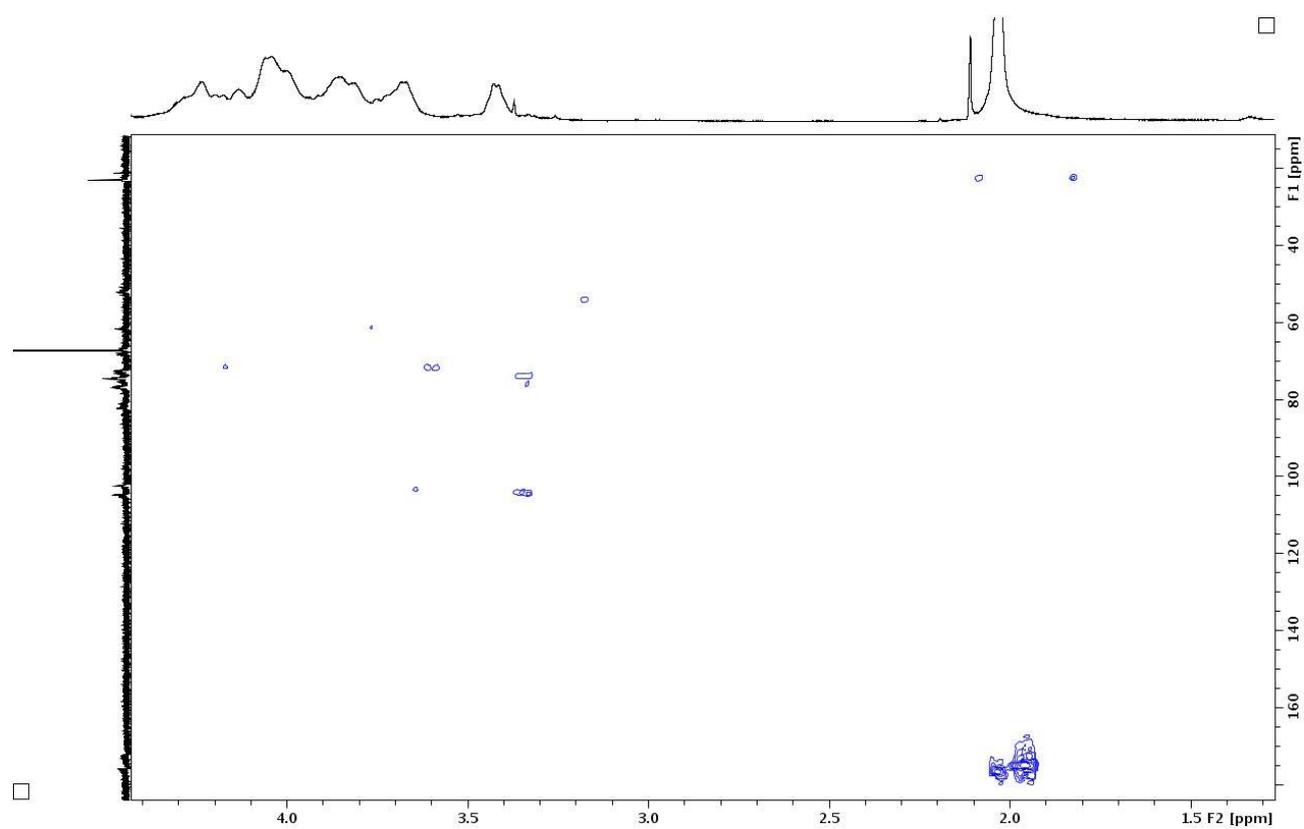


FIGURA 73. EXPANSÃO DO ESPECTRO HMBC DE CONDOITIM SULFATO DE NADADEIRA (5).