

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**VIABILIZAÇÃO DA HEPARINA COMO SUPORTE
PARA CARREAR GENTAMICINA**

Givanildo Bezerra de Oliveira

Orientadora: Dr^a. Maria da Paz Carvalho da Silva

Co-orientador: Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Recife, 2002

Givanildo Bezerra de Oliveira

**VIABILIZAÇÃO DA HEPARINA COMO SUPORTE
PARA CARREAR GENTAMICINA**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das
exigências para obtenção do título
de Mestre em Bioquímica pela
Universidade Federal de
Pernambuco

Aprovado por: _____

Data: ____/____/____

ÍNDICE ANALÍTICO

	Página
AGRADECIMENTOS	3
RESUMO	4
ABSTRACT	5
1- INTRODUÇÃO	6
1.1- SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE DROGAS E DROGAS POLIMÉRICAS	6
1.1.1- Drogas Poliméricas Conjugadas ou Carreadores de Drogas	7
1.2- GLICOSAMINOGLICANOS	8
1.2.1- Heparina, um Potente Glicosaminoglicano	9
1.3- GLICOSAMINOGLICANOS COMO CARREADORES DE DROGAS	12
EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA	
1.4- OUTROS EMPREGOS BIOTECNOLÓGICOS DOS	13
GLICOSAMINOGLICANOS	
1.5- AMINOGLICOSÍDEOS	14
1.6- CARBODIIMIDA	17
2- JUSTIFICATIVA	19
3- OBJETIVOS	19
3.1- GERAL	19
3.2- ESPECÍFICOS	19
4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
HEPARIN AS A CARRIER FOR GENTAMICIN	29
PROPERTIES OF CARBODIIMIDE TREATED HEPARIN	41
5- CONCLUSÃO	56

AGRADECIMENTOS

A Deus, que de sua forma, me ajuda a superar as dificuldades e acreditar em dias melhores.

A minha orientadora, Professora Maria da Paz Carvalho da Silva, pela acolhida e confiança que proporcionaram a realização deste trabalho.

Ao Professor Luiz Bezerra de Carvalho Jr, pela colaboração nos trabalhos desta tese como co-orientador.

À Professora Helena Bonciani Nader, da Universidade Federal de São Paulo/EPM, por ter me recebido em seu laboratório e dessa forma contribuído de maneira singular para realização deste trabalho.

Ao Professor Walter Mendes de Azevedo, Departamento de Química Fundamental, pelo auxílio na interpretação dos espectros de infravermelho.

Às professoras Maria Elizabeth Cavalcanti Chaves, do Departamento de Bioquímica, e Professora Glícia Maria Torres Calazans, do Departamento de Antibióticos, pela amizade, respeito e exemplo de profissionalismo.

Ao Professor José Luiz de Lima Filho, Diretor do LIKA, por disponibilizar as instalações da referida instituição.

Aos funcionários do LIKA, peças-chaves para o bom andamento das atividades experimentais, em especial, Vera, Cleide, Otaviano, Moisés, Conceição, Ilma e Paulina.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo/EPM, pela atenção e carinho dispensados, especialmente a Aline Mendes, pela colaboração indispensável.

A todos os colegas e amigos do LIKA, particularmente aqueles do Laboratório de Bioquímica, que compartilharam comigo cada dia.

Aos amigos Raquel, Jaqueline, César, Noemia e Roseane, pela colaboração e paciência com as minhas lamentações.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica, pela colaboração nas diversas etapas desse trabalho.

Aos colegas e amigos do mestrado, especialmente, Yáskara, Dayseanne, Alexandre, Marson e Roberto, que dividiram comigo as frustrações e as esperanças do dia a dia.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro fornecido na última metade deste curso.

A minha família, pelo apoio, carinho, amor, enfim por tudo.

A Luciana Alves de Oliveira, minha companheira de todas as horas, pelo carinho, amor, respeito e acima de tudo por me trazer felicidade e esperança.

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente.

RESUMO

Muitos polímeros usados como carreadores de drogas em sistemas de liberação controlada são polissacarídeos. O presente trabalho propõe o uso do glicosaminoglicano heparina, como carreador para o antibiótico aminoglicosídico gentamicina. Devido à natureza química, estes compostos possuem uma afinidade iônica intrínseca, entretanto, utilizou-se uma carbodiimida para promover uma ligação covalente (amida) entre estas moléculas. O conjugado heparina-gentamicina após a diálise apresentou atividade antimicrobiana *in vitro*. Este conjugado ainda apresentou menor migração eletroforética, quando comparado à heparina sozinha. Quando submetido a degradação enzimática pelas liases da heparina, mostrou-se estável. O espectro de infravermelho deste conjugado apresentou bandas características de ligação amida, sugerindo que a ligação covalente está presente. Em uma segunda etapa do trabalho, observou-se o efeito de concentrações crescentes de carbodiimida, sobre as atividades físico-químicas e biológicas da heparina. Os resultados demonstram que a ativação afeta a atividade de fixação aos corantes, azul de metileno e azul de toluidina, sendo este efeito dependente da concentração do agente ativante. Estas heparinas ativadas quando submetidas à eletroforese no sistema descontínuo acetato de bário/acetato de diaminopropano, não apresentaram o componente de migração lenta, o qual na heparina nativa, corresponde a fração de maior peso molecular e carga elétrica. Este resultado está em acordo com aqueles obtidos nos ensaios anticoagulantes, onde as heparinas modificadas tiveram suas atividades anticoagulantes reduzidas. Os testes de degradação, feitos com as liases da heparina, mostraram que as heparinas modificadas são menos degradadas à medida que a concentração do agente ativante aumenta. Então pode-se observar que, a heparina ativada pela carbodiimida não possui as mesmas propriedades físico-químicas e biológicas da heparina nativa. Além disso, a atividade de fixação ao corante pode ser uma ferramenta útil para avaliar a atividade biológica das heparinas modificadas. De posse destas informações acredita-se que, aperfeiçoando-se as condições de ativação e imobilização, é possível obter conjugados que podem apresentar a atividade anticoagulante e/ou antitrombótica da heparina e antimicrobiana da gentamicina.

ABSTRACT

Many polymers used as drug carriers in controlled delivery systems are polysaccharides. This work propose the use of glycosaminoglycan heparin as carrier for the aminoglycosidic antibiotic gentamicin. Due to their chemical feature, these compounds possess an intrinsic ionic affinity, nevertheless, a carbodiimide was used to promote covalent binding (amide bond) between these molecules. The heparin-gentamicin conjugate after dialysis presented antimicrobial activity *in vitro*. This conjugate presented electrophoretic migration slower than single heparin. It was stable when submitted to enzymatic degradation by heparin lyases. The infrared spectra of this conjugate showed characteristic amide bands, suggesting the presence of covalent binding. Furthermore, the effect of increasing carbodiimide concentrations upon physicochemical and biological properties of the heparin was observed. The results showed that the activation affect the toluidine blue and methylene blue dyes fixation activity. However, this effect was dependent on the activating agent concentration. These activated heparins did not present the slow moving component, which in native heparin correspond to the highest molecular weight and electric charge fraction, when submitted to electrophoresis in a barium acetate/diaminopropane acetate discontinuous system. This observation was in accordance with the anticoagulant activity assays, where the modified heparins had its anticoagulant activities reduced. The degradation tests performed with heparin lyases showed that modified heparins were less degraded with increasing activating agent concentration. Thus it could be observed that carbodiimide activated heparin does not possess the same physicochemical and biological properties as native heparin. In addition, the dye fixation activity can be a useful tool to evaluate the biological activity of the modified heparins. Based on these information one can assume that, under perfect activation and immobilization conditions, it is possible to obtain heparin conjugates which can present the anticoagulant and/or antithrombotic activities and the antimicrobial activity of gentamicin.

1- INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, houve um grande aumento na pesquisa objetivando a criação de um novo sistema de liberação de drogas. Esta pesquisa tem sido estimulada por vários fatores: (1) Muitas drogas, produtos farmacêuticos antigos e novas entidades moleculares, podem ser administradas de modo que não somente melhoram a segurança e eficácia mas, em alguns casos, permitem novas terapias; (2) Novas e complexas drogas, tais como proteínas, estão se tornando disponíveis através da engenharia genética; a entrega destas drogas é frequentemente mais complicada do que aquelas das drogas convencionais, necessitando de novos sistemas de liberação; (3) Relatos crescentes mostram que os padrões de liberação das drogas (contínuo versus pulsátil), significativamente afetam a resposta terapêutica; (4) O gasto total necessário para criar um fármaco, como uma nova entidade molecular, é de pelo menos 150 milhões de dólares; custos menores para melhorar a entrega de uma droga já existente são algumas vezes vistos como um investimento melhor. Este custo é exacerbado pelo fato que as patentes de drogas expiram após 17 anos, e um novo sistema de liberação de drogas pode permitir contínuos benefícios para a companhia produtora do fármaco; (5) Avanços nas ciências dos materiais e biotecnologia estão permitindo o desenvolvimento de novos métodos físicos para liberação de drogas (Langer, 1990).

1.1- SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE DROGAS E DROGAS POLIMÉRICAS

A terapia farmacológica convencional, consistindo de um número de administrações não específicas de uma droga, introduzida a intervalos regulares, pode ter contra-indicações tais como, concentrações variáveis da droga no sangue e excessiva presença da droga em tecidos saudáveis, causando efeitos secundários e tóxicos. Com frequência, altas doses são necessárias, devido às propriedades físicas e químicas desfavoráveis da droga, como a excessiva ou insuficiente solubilidade em água, a qual restringe a biodisponibilidade da droga, e também devido à baixa especificidade da droga em relação aos órgãos afetados. Para superar estes problemas duas abordagens são possíveis: o uso de substâncias terapêuticas novas ou o uso mais efetivo das drogas conhecidas através de novos sistemas terapêuticos. Nos últimos anos, a segunda abordagem tem sido amplamente seguida, devido às dificuldades na síntese e purificação de novas moléculas ativas e aos recentes avanços da tecnologia farmacêutica. Há alguns novos sistemas de entrega de drogas, que melhoram o desempenho da droga, pela modificação de sua taxa de liberação e prolongamento da ação terapêutica (Giammona *et al.*, 1998).

Além dos sistemas nos quais a liberação da droga é controlada por um simples processo de difusão e/ou pela entrada de água dentro da matriz polimérica, muitos dispositivos têm sido propostos nos quais a liberação da droga é dependente da hidrólise de ligações químicas. Dentre estes, grande interesse tem sido despertado pelas pró-drogas macromoleculares (Giammona *et al.*, 1998).

A entrega de drogas através da tecnologia de liberação controlada começou na década de 70 e tem continuado a se expandir, tão rapidamente que existem numerosos produtos no mercado e em desenvolvimento. Estes produtos de liberação controlada têm dado nova vida a fármacos velhos, que não foram patenteados ou têm propriedades que os impedem de serem utilizados eficazmente no tratamento de várias doenças. Além de estimular a utilização desses velhos medicamentos, a tecnologia de liberação controlada está sendo direcionada para os mais novos biofármacos produzidos pela pesquisa genética (Dunn & Ottenbrite, 1990).

Os polímeros têm disputado um papel importante no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada e como esperado, os primeiros sistemas poliméricos para liberação de drogas incorporaram polímeros que eram comercialmente disponíveis e aprovados pelo órgão de fiscalização de drogas e alimentos dos Estados Unidos (FDA - Food and Drug Administration). Existem muitos polímeros que satisfazem essas necessidades, e eles têm sido incorporados com sucesso em produtos comerciais para administração oral, injetável, implantada, tópica e transdérmica. Esses materiais incluem novos polímeros biodegradáveis, polímeros com características anfífilas e hidrogéis que respondem a mudanças na temperatura ou pH (Dunn & Ottenbrite, 1990).

1.1.1- Drogas Poliméricas Conjugadas ou Carreadores de Drogas

Dentre as várias estratégias para entrega de drogas sítio-específicas, o uso de polímeros torna-se uma ferramenta formidável, devido a sua alta diversidade e múltiplas funções no corpo. Aplicações bem sucedidas de um polímero como um carreador de drogas, ou como um agente terapêutico, requer a compreensão da farmacocinética do polímero em todo o corpo, órgão, e a nível celular, em relação as suas características físicoquímicas e biológicas (Hashida *et al.*, 1999).

A idéia de carreadores de drogas macromoleculares solúveis foi um produto secundário dos estudos da farmacocinética de polímeros. Polímeros inertes fisiologicamente exibem tempo residencial, o qual foi mais uma inspiração para os farmacologistas a procura de efeitos longos e duradouros para as drogas. A plausibilidade deste método foi demonstrada pela ligação da

“mescalina” ao copolímero carreador, vinilpirrolidona co-ácido metacrílico. Desde então, a idéia tem se desenvolvido em um ramo bem popular da ciência macromolecular (Drobnik, 1991).

Muitas drogas potencialmente eficazes não podem ser utilizadas devido a sua rápida eliminação e metabolização. Em alguns casos, isto pode ser corrigido pela utilização do conjugado polímero-droga. A droga é covalentemente ligada a um carreador polimérico apropriado. Estas moléculas grandes difundem-se mais vagarosamente e são adsorvidas em distintas interfaces farmacológicas. Conseqüentemente, o conjugado polímero-droga pode prolongar a terapia com dosagens sustentadas. Os principais atributos de carreadores poliméricos de drogas são seus efeitos de depósito, farmacocinética única, distribuição no corpo e eficácia farmacológica (Dunn & Ottenbrite, 1990).

A maioria dos medicamentos são micromoléculas, sendo relativamente livres para difundir-se através do sistema biológico. Conseqüentemente, as drogas em sua essência são difíceis de serem administradas de forma localizada, concentrada dentro de tecidos ou órgãos alvos. Os polímeros, entretanto, difundem-se vagarosamente e são geralmente absorvidos nas interfaces. A ligação de fármacos pode produzir um biopolímero com distintos comportamentos farmacológicos (Dunn & Ottenbrite, 1990).

1.2- GLICOSAMINOGLICANOS

Um glicosaminoglicano (GAG) é um heteropolissacarídeo linear, que possui uma seqüência dissacarídica repetitiva, que é característica. Um monossacarídeo da unidade dissacarídica repetitiva é um dos aminoaçúcares D-glicosamina ou galactosamina, e a outra unidade é tipicamente, mas não sempre, um dos resíduos de ácido urônico, ácido D-glicurônico ou ácido idurônico. Ambas as unidades são variavelmente N- e O-sulfatadas, as quais conferem a heterogeneidade destas macromoléculas complexas. Os GAGs mais comuns são o condroitim sulfato, o dermatam sulfato, o heparam sulfato, o queratam sulfato, o ácido hialurônico e a heparina. Com a exceção do ácido hialurônico, as cadeias dos GAGs são covalentemente ligadas por sua extremidade redutora, através de uma ligação O-glicosídica, a um resíduo de serina ou N-ligadas a asparagina de uma proteína central; a macromolécula resultante é chamada de proteoglicano (Jackson *et al.*, 1991).

Uma das principais funções dos proteoglicanos de superfície das células é a adesão e migração celular, processos dinâmicos que são mediados por interações entre as cadeias dos proteoglicanos e os componentes da matriz extracelular, tais como a laminina, o colágeno e a fibronectina. Os proteoglicanos ocorrem também como componentes integrantes das membranas

basais, em provavelmente todos os tecidos de mamíferos. As interações destas macromoléculas com outros constituintes da matriz extracelular contribuem para a arquitetura geral e propriedades de permeabilidade da membrana basal, então estes GAGs desenvolvem um papel estrutural. Os proteoglicanos e os GAGs desenvolvem um papel crítico na patofisiologia de distúrbios relacionados à membrana basal, incluindo diabetes, aterosclerose e metástases. Além disso, fatores de crescimento célula-específicos e enzimas que estão imobilizadas na matriz extracelular e na superfície celular, são ligados aos GAGs. Como tais, os GAGs localizam proteínas e enzimas no seu sítio de ação para facilitar sua função fisiológica e em alguns casos, prevenir sua degradação proteolítica. Tem sido mostrado que, os proteoglicanos e os GAGs regulam a secreção de proteínas e a expressão gênica em certos tecidos, por mecanismos envolvendo eventos de membrana e nucleares, incluindo a ligação de GAGs a fatores de transcrição (Jackson *et al.*, 1991).

Informações limitadas são disponíveis sobre fatores que regulam a expressão de proteoglicanos e seus GAGs associados. Sabe-se que, no desenvolvimento dos vertebrados, marcadas mudanças na expressão de proteoglicanos ocorrem, sugerindo que estas macromoléculas desenvolvem um papel na diferenciação celular. Embora os GAGs tenham uma composição heterogênea, descobertas indicam que determinantes estruturais específicos das unidades do polissacarídeo, medeiam sua interação com proteínas que ligam GAGs. Além disso, várias destas proteínas contêm uma sequência de aminoácidos única, que reconhece e interage com os GAGs. A implicação destas descobertas é que, certos processos fisiológicos podem ser regulados pela interação de estruturas únicas de GAGs com proteínas específicas (Jackson *et al.*, 1991).

1.2.1- Heparina, um Potente Glicosaminoglicano

A heparina é um copolímero com elevada carga negativa, com ligações 1→4, de ácido idurônico ou glicurônico e D-glucosamina. A estrutura da heparina é formada principalmente pela sequência repetitiva do dissacarídeo trissulfatado [→4)-IdoA(2S)-(1→4)-GlcNS(6S)-(1→], onde IdoA(2S) e GlcNS(6S) representam 2-O-sulfo- α -L-ácido idurônico e 2-deoxi-2-sulfamido-6-O-sulfo- α -D-glicopirranose, respectivamente. Este dissacarídeo repetitivo representa pelo menos 85% das heparinas de pulmão bovino e aproximadamente 75% das heparinas de mucosa intestinal do porco (Chuang *et al.*, 2000).

Usualmente, a heparina está presente nos tecidos que estão em contato direto com o ambiente, como o pulmão, pele e intestino. Os tecidos de outros vertebrados contêm pequenas

quantidades de heparina, quando comparados aos de mamíferos. Exceção a esta regra foi a descoberta que tecidos de coelho não contém heparina (Gomes & Dietrich, 1982).

A heparina foi encontrada apenas em algumas espécies de invertebrados, por exemplo, moluscos e crustáceos. O estudo da distribuição de heparina, nos diferentes tecidos do molusco *Anomalocardia brasiliiana*, revelou que a mais alta concentração de heparina encontra-se em tecidos que estão em contato direto com o ambiente, semelhante a distribuição encontrada nos vertebrados. A examinação histológica destes tecidos mostrou que a heparina está presente em células especiais formando grânulos, sugerindo que os moluscos também contêm mastócitos (Santos, 1997).

Usando a heparinase e a heparitinase II de *Flavobacterium heparinum*, foi possível traçar uma estrutura geral da heparina. A heparina parece ser composta por duas regiões diferentes, uma susceptível a heparinase, cuja ação sobre o composto produz dissacarídeos trissulfatados e tetrassacarídeos sulfatados, e outra região menos sulfatada, a qual é susceptível a ação da heparitinase II. Esta última região parece conter dissacarídeos com resíduos de ácido glicurônico, como observado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13. O tamanho e a abundância dessas duas regiões variam de acordo com a origem da heparina. Assim a heparina de pulmão bovino é extremamente rica em regiões susceptíveis a heparinase (Silva & Dietrich, 1975), enquanto que, a heparina de intestino bovino e de molusco contém quantidades significantes de regiões susceptíveis a heparitinase II (Dietrich *et al.*, 1989; Paiva *et al.*, 1995).

A heparina possui muitos grupos quimicamente distintos de ligação a cátions, suas disposições estereoquímicas permitem a quelação coordenada complexa de uma ampla variedade de cátions orgânicos e inorgânicos. Possíveis modulações das atividades da heparina por íons metálicos *in vitro* e *in vivo* incluem os efeitos do Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Zn^{+2} e Cu^{+2} . Os resultados de estudos das interações da heparina com seus cátions, em soluções diluídas, têm sido interpretados em termos de interações puramente eletrostáticas ou em termos de interações químicas adicionais, resultando na ligação dos cátions a sítios específicos sobre o polímero (Grant *et al.*, 1987).

A heparina pode também se ligar a certas citocinas, quimocinas e fatores de crescimento, muitos dos quais são produzidos por mastócitos. Dependendo das circunstâncias, ela pode promover ou suprimir a proliferação e migração de células envolvidas no desenvolvimento vascular, aterosclerose, cicatrização e remodelagem de tecidos. Ela também regula a distribuição e a atividade enzimática de certas proteases de mastócitos (Zehnder & Galli, 1999).

A heparina é um glicosaminoglicano que tem sido amplamente usado como uma droga anticoagulante. Ela interage com um grande número de proteínas plasmáticas, incluindo 3

inibidores de protease plasmáticas: antitrombina, cofator II da heparina, inibidor da proteína C e inibidor da via do fator tecidual (TFPI). Estas proteínas são membros da família de inibidores das serinoproteases, das quais o inibidor $\alpha 1$ -protease é o protótipo (Huber & Carrel, 1989). A antitrombina III inibe sua protease alvo por formar um complexo equimolar estável, o qual envolve uma interação entre uma ligação peptídica reativa do inibidor e o sítio ativo da enzima. Um aspecto único exibido pela antitrombina e certos outros inibidores das serinoproteases é que, suas reações são altamente aceleradas por glicosaminoglicanos sulfatados. No caso da antitrombina, o mecanismo do efeito acelerante de seu glicosaminoglicano ativador, a heparina, é de interesse particular, pois esta propriedade é responsável pelo potente efeito anticoagulante do polissacarídeo (Olson *et al.*, 1992).

Um aspecto importante do mecanismo anticoagulante da heparina, é a ligação da antitrombina a uma região específica da molécula de heparina (Jordan *et al.*, 1980), identificada como um único pentassacarídeo (Thunberg *et al.*, 1982; Choay *et al.*, 1983). Esta ligação induz uma mudança conformacional na antitrombina (Olson *et al.*, 1981), a qual tem sido proposta ativá-la por aumentar a acessibilidade de sua ligação reativa, localizada em um laço do peptídeo exposto a protease (Jordan *et al.*, 1980; Beresford & Owen, 1990).

Mesmo com seu uso como anticoagulante bem estabelecido há décadas, muitos e novos relatos sobre o mecanismo de ação da heparina têm surgido. A heparina de baixo peso molecular tem agora ganhado maior campo no tratamento dos distúrbios e doenças vasculares. Assim, os estudos sobre a heparina e moléculas semelhantes, tem crescido e mais novas moléculas tem sido apontadas como alternativas ao uso da heparina (Nader *et al.*, 2001).

Recentemente, foi relatada a presença de uma heparina no crustáceo *Penaeus brasiliensis* (camarão). De particular interesse foram as descobertas que esta heparina tem um baixo peso molecular, é rica em resíduos de ácido urônico não sulfatado e exibe uma atividade antitrombótica potente (Dietrich *et al.*, 1999). Outras descobertas têm demonstrado que a atividade antitrombótica da heparina, *in vivo*, pode estar relacionada ao menos em parte, ao aumento da produção de proteoglicanos de heparam sulfato pelas células endoteliais (Pinhal *et al.*, 1995; Pinhal *et al.*, 2001).

1.3- GLICOSAMINOGLICANOS COMO CARREADORES DE DROGAS EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

Recentemente, em uma revisão sobre o uso de polissacarídeos em sistemas de liberação aplicados a componentes vasculares, uma menção especial foi feita a heparina, compostos semelhantes à heparina e as proteínas que interagem com estes compostos. (Blondin *et al.*, 2000).

A afinidade dos fatores de crescimento de fibroblastos pela heparina, tem sido usada para desenvolver um sistema de entrega de droga, para liberação controlada de fatores de crescimento que se ligam à heparina. Estes sistemas de liberação, baseados na heparina, podem servir como reservatórios para estocar fatores de crescimento de maneira semelhante a matriz extracelular, permitindo a liberação ativa de fatores de crescimento, controlada pela degradação do reservatório mediada por células (Sakiyama-Elbert & Hubbell, 2000). Também a viabilidade de um novo sistema para liberação de enzimas, usando o ativador de plasminogênio como modelo, formado de heparina e protamina tem sido reportado; os estudos mostraram que este sistema não está associado a riscos hemorrágicos (Byun & Yang, 1998; Liang *et al.*, 2000).

Há um interesse na utilização do ácido hialurônico em combinação com outros polímeros, tal como a quitosana, para fabricação de microesferas para sistemas de liberação de drogas (Lim *et al.*, 2000; Lim *et al.*, 2002). Em alguns destes sistemas a gentamicina foi usada como droga modelo, devido às suas propriedades físicoquímicas, detecção relativamente fácil e porque tem sido usada como droga modelo para estudos intranasais em ratos e ovelhas (Illum *et al.*, 1988). Interessantemente, a combinação de hialuronato de sódio e gentamicina tem sido usada no tratamento de doenças relacionadas ao nervo vestibular, como uma opção terapêutica ao procedimento cirúrgico intracraniano. Portanto, devido a ototoxicidade da gentamicina, ela tem sido usada para promover a ruptura da função vestibular (Kelly *et al.*, 1999).

O condroitim sulfato, o qual é degradado por bactérias que habitam o cólon, tem sido usado como uma matriz para liberação de indometacina. Para este propósito, o condroitim sulfato foi tratado com dicicloexil-carbodiimida e 1,12-diaminododecano em várias proporções molares. Foi observada uma correlação linear, entre o grau de ligações cruzadas e a quantidade de droga liberada, sugerindo que a liberação da droga no cólon pode ser controlada pelo ajuste da quantidade relativa das ligações cruzadas, na formulação da matriz de condroitim sulfato (Rubinstein *et al.*, 1992; Sintov *et al.*, 1995).

A introdução de grupos sulfatos em ciclodextrinas confere-lhes atividades similares e algumas vezes superiores aquelas da heparina, tais como a atividade antiinflamatória e anti-lipêmica. Estudos têm mostrado que as ciclodextrinas sulfatadas protegem ratos da

nefrotoxicidade induzida pela gentamicina. Então a co-administração de ciclodextrinas sulfatadas com aminoglicosídeos, parece ser um caminho promissor na prevenção da falência renal associada ao tratamento com estes antibióticos (Shiotani *et al.*, 1995). Em outro trabalho semelhante, observou-se o efeito da dextrana sulfato sobre a toxicidade da gentamicina a nível renal. O complexo dextrana sulfato-gentamicina não influenciou a eliminação da gentamicina do sangue, mas a concentração da gentamicina no córtex renal mostrou decréscimo significativo, diminuindo a acumulação renal, bem como a enzimúria causada por este acúmulo. Portanto, a ligação da gentamicina à dextrana sulfato, dentro do lúmen dos túbulos proximais, pode reduzir a reabsorção renal e possivelmente a toxicidade da gentamicina (Kikuchi *et al.*, 1990; 1991).

Um conjugado de heparina e prostaglandina E₁ (PGE₁) foi sintetizado para propiciar um duplo papel farmacológico; diminuir a agregação plaquetária e inibir a formação de fibrina durante a trombogênese. Os testes de bioatividade destes conjugados confirmaram que, a atividade anticoagulante da heparina e o efeito inibitório da PGE₁ sobre a agregação plaquetária foram mantidos (Jacobs & Kim, 1986).

Uma utilidade promissora para a heparina é a sua incorporação como parte hidrofílica de copolímeros anfifílicos capazes de formar nanoesferas. A heparina é conhecida por inibir várias etapas da cascata do complemento e realmente, nanopartículas revestidas com heparina não ativaram esta cascata em um sistema *in vitro*. Elas evitaram a captação por macrófagos *in vitro* e circularam por longo tempo *in vivo*, quando comparadas às nanoesferas sem heparina (Passirani *et al.*, 1998).

1.4- OUTROS EMPREGOS BIOTECNOLÓGICOS DOS GLICOSAMINOGLICANOS

O uso de heparina ou heparina ligada a proteínas da matriz extracelular, para revestimento de superfícies de dispositivos médicos e seu uso em cirurgia cardiovascular, com o objetivo de conseguir materiais antitrombogênicos, baixo grau de ativação do complemento e redução da adesão bacteriana, têm sido relatados (Bolzon *et al.*, 1995; Appelgren *et al.*, 1996). Assim, a heparina é freqüentemente imobilizada a superfície de enxertos vasculares para promover uma melhor biocompatibilidade (Kim *et al.*, 2000; Tsai *et al.*, 2001; van Wachen *et al.*, 2001; Wissink *et al.*, 2001). Os implantes de biomateriais nos vários tecidos do corpo humano são altamente susceptíveis a colonização bacteriana. O revestimento de biomateriais heparinizados, com proteínas da matriz extracelular, e à adsorção eficiente de antibióticos, tais como a rifampicina e o ácido fusídico, obteve duração e eficácia suficientes para testes em modelos animais (Fallgren *et al.*, 1998).

Durante os últimos anos, a técnica de “stenting” coronário tem melhorado acentuadamente os resultados a longo prazo das angioplastias coronarianas. Estudos usando um modelo *in vitro*, baseado no uso do sangue humano, têm demonstrado que os “stents” modificados com heparina possuem compatibilidade sangüínea superior, quando comparados aos “stents” não modificados (Christensen *et al.*, 2001). Outros estudos têm demonstrado a efetividade desta técnica em pacientes (Serruys *et al.*, 1998). Circuitos extracorporais usados em cirurgias cardíacas, quando revestidos com heparina, diminuíram a reposta neutrofílica e os níveis de malondialdeído. Assim, o revestimento com heparina melhorou a biocompatibilidade, e foi associado com menor dano por isquemia oculta do miocárdio em pacientes durante a cirurgia cardíaca (Belboul *et al.*, 2000).

Outra aplicação dos glicosaminoglicanos está na engenharia de tecidos. Eles são usados para suportar tecidos e células, e assim promover o melhor desenvolvimento destes. Assim, tem havido um interesse crescente pelas técnicas de engenharia de tecidos, onde materiais biocompatíveis e biodegradáveis são usados como uma matriz suporte ou como um substrato para entrega de células cultivadas. Pois, tem sido bem estabelecido que as interações específicas de células com sua matriz extracelular é responsável pela promoção e regulação das funções celulares. Dessa forma, os glicosaminoglicanos têm sido utilizados em diversos estudos de síntese de biomateriais (Barbucci *et al.*, 2000; Ito, 2000; Park *et al.*, 2002).

Devido à ligação da heparina a diversas proteínas e outras moléculas, ela tem sido usada em processos de purificação por afinidade. Tem sido demonstrado que colunas de afinidade de heparina em combinação com a quantificação de dienos, são um caminho simples e reprodutível para isolar e avaliar a oxidação de β -lipoproteína. Assim esta abordagem inicial pode oferecer uma alternativa simples, para medir a susceptibilidade oxidativa ou a resistência das β -lipoproteínas em estudos clínicos tais como, a investigação da oxidação como marcador para doenças da artéria coronariana e monitoramento de níveis sorológicos de antioxidantes ingeridos (Kaplan *et al.*, 1999). Outros relatos do uso da heparina em sistemas de purificação de enzimas, fatores de transcrição e separação de enantiômeros são freqüentes (Gadgil & Jarret, 1999; Safni *et al.*, 1999; Wilflingseder & Schwelberger, 2000).

1.5- AMINOGLICOSÍDEOS

Os aminoglicosídeos são uma classe grande e diversa de antibióticos, que caracteristicamente contêm dois ou mais aminoaçúcares, ligados por ligações glicosídicas a um componente aminociclitol. O ciclitol é a 2-deoxi-estreptamina na maioria dos casos, sendo uma exceção a estreptomicina, a qual possui estreptidina (Stead, 2000). O conhecimento da estrutura

dos aminoglicosídeos é importante para o entendimento de suas propriedades químicas. Eles são compostos básicos, fortemente polares, que são positivamente carregados (catiônicos). Eles são altamente solúveis em água, relativamente insolúveis em lipídeos, e têm sua atividade antimicrobiana aumentada em ambientes alcalinos. Devido a estas propriedades, os aminoglicosídeos são minimamente absorvidos pelo intestino e penetram mal a barreira hematoencefálica, mesmo na presença de inflamação. Além disso, sua penetração dentro das secreções bronquiais, fluido prostático, saliva, bile e fluido vítreo é pobre. Entretanto, altas concentrações são encontradas no fluido sinovial, osso e fluido peritonial. Excelentes concentrações urinárias, tipicamente 25 a 100 vezes aquelas do soro, também são encontradas. O uso de um novo emulsificante, “Labrasol”, tem demonstrado um aumento na absorção gastrointestinal de gentamicina. Este emulsificante aumentou a biodisponibilidade absoluta de gentamicina, como resultado do aumento da permeabilidade intestinal e inibição da secreção de gentamicina pelos enterócitos (Hu *et al.*, 2001).

Os aminoglicosídeos são compostos estáveis metabolicamente, que são excretados inalterados na urina, assim, sua meia vida é determinada primariamente pela eliminação renal. A natureza catiônica dos aminoglicosídeos contribui para sua atividade antimicrobiana. Através de sua carga positiva, eles são capazes de ligar-se aos lipopolissacarídeos carregados negativamente da parede das células bacterianas, bem como, a uma variedade de moléculas aniônicas intracelulares e de membrana, tal como ao DNA e fosfolipídeos. Infelizmente, sua carga positiva a pH fisiológico, também contribui para sua toxicidade (Zembower *et al.*, 1998).

Os aminoglicosídeos são antibióticos de amplo espectro, que possuem atividade bactericida contra alguns organismos Gram positivos e contra muitos Gram negativos. Seu uso clínico tem sido limitado pelos efeitos adversos e pela emergência de cepas de organismos resistentes que produzem enzimas que os modificam. Entretanto, apesar da introdução de antimicrobianos mais novos e menos tóxicos, os aminoglicosídeos continuam desenvolvendo um papel útil como agentes terapêuticos. Sua importância clínica está sendo repensada, devido ao aumento da resistência de organismos patogênicos a outros antimicrobianos. A gentamicina é correntemente o aminoglicosídeo de primeira escolha para o tratamento de infecções sérias, sendo uma alternativa a ampicilina, a netilmicina e a tobramicina. Todos eles são mal absorvidos pelo intestino, e são administrados através de injeções intramusculares ou intravenosas. A monoterapia é indicada para infecções menos sérias, por exemplo, aquelas dos tratos urinário e biliar. A terapia combinada com uma penicilina pode ser usada para tratar infecções mais sérias, por exemplo, endocardite bacteriana, pneumonia nosocomial e septicemia (Stead, 2000).

Os aminoglicosídeos são agentes bactericidas, que inibem a síntese protéica e perturbam a integridade da membrana da célula bacteriana. Embora seja aceito que a ligação dos aminoglicosídeos aos ribossomos diminui a síntese protéica e causam uma decodificação errada do RNA mensageiro, outras drogas que inibem a síntese protéica, como o cloranfenicol e a tetraciclina, são somente bacteriostáticas. Assim, o mecanismo de ação dos aminoglicosídeos é provavelmente mais complexo e pode envolver outros eventos ainda não esclarecidos, que contribuem para suas propriedades bactericidas. A resistência aos aminoglicosídeos pode ser natural ou adquirida. Porque os aminoglicosídeos são transportados através da membrana da célula bacteriana, por um processo dependente de energia e que requer oxigênio, as bactérias anaeróbicas são naturalmente resistentes aos aminoglicosídeos. A resistência mais comum resulta da modificação da droga por enzimas que são fosfotransferases, acetiltransferases ou adeniltransferases (Zembower *et al.*, 1998).

As toxicidades mais frequentemente relacionadas aos aminoglicosídeos incluem nefrotoxicidade e ototoxicidade. A nefrotoxicidade é dose dependente e geralmente reversível na maioria dos pacientes, quando a droga é descontinuada. A ototoxicidade pode manifestar-se através de dano vestibular ou coclear, sendo usualmente irreversível. A gentamicina, a tobramicina e a estreptomicina, predominantemente causam toxicidade vestibular, enquanto que, a amicanina e a canamicina causam toxicidade coclear (Zembower *et al.*, 1998). O mecanismo subjacente da toxicidade da gentamicina é postulado resultar da formação de radical livre induzida pela gentamicina, via um complexo com o ferro (Priuska & Shacht, 1995). Uma intervenção terapêutica altamente efetiva tem sido o uso de quelantes de ferro competitivos, para diminuir a complexação do ferro com a gentamicina *in vivo* (Song & Schacht, 1996). O uso de antioxidantes e sequestrantes de radicais livres com o mesmo propósito tem sido reportado na literatura (Gurnani *et al.*, 1995; Conlon *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2000; Sha & Schacht, 2000; Mazzon *et al.*, 2001).

A profilaxia antibiótica é usada em cirurgia cardíaca, para prevenir infecção da ferida externa no pós-operatório e endocardite em pacientes que requerem a inserção de próteses de válvulas cardíacas (Demmy *et al.*, 1990). No Reino Unido, uma combinação de uma penicilina estável à β -lactamase (usualmente flucloxacilina) e um aminoglicosídeo é comumente usada (Parry *et al.*, 1993). Um trabalho recente tem relatado a farmacocinética de uma simples dose de gentamicina (4mg/Kg) como profilaxia em cirurgia cardíaca com ponte de safena (Lewis *et al.*, 1999).

A incorporação de antibióticos em cimentos ósseos de poli-metilmetacrilato para tratamento e prevenção de infecções ortopédicas, tem tornado-se prática comum durante as duas

últimas décadas e quase 90% de todos os cirurgiões ortopédicos dos Estados Unidos, usam cimentos ósseos contendo antibióticos para fixação dos implantes (Heck *et al.*, 1995), contudo, polímeros biodegradáveis têm emergido como uma opção (Sánchez *et al.*, 2001). O aminoglicosídeo gentamicina é o antibiótico mais amplamente usado em cimentos ósseos, devido a sua atividade antimicrobiana de amplo espectro, excelente solubilidade e resistência a temperaturas elevadas, como durante a polimerização (Wahlig & Dingeldein, 1980). “Septacin”, um novo produto que está sendo desenvolvido para o tratamento de osteomielites, é um implante de liberação controlada que contém sulfato de gentamicina, disperso dentro de uma matriz polimérica biodegradável (Stephens *et al.*, 2000).

Esferas contendo gentamicina têm sido usadas predominantemente para tratar infecções de prática ortopédica, mas há relatos ocasionais de seu uso em cirurgia vascular. Elas fornecem uma alta concentração local de gentamicina por muitos dias, enquanto as concentrações do soro e urina permanecem bem abaixo dos níveis tóxicos (Benaerts *et al.*, 1999).

A gentamicina tem sido usada como droga modelo em um hidrogel sensível a temperatura, preparado por polimerização induzida por radiação, com destino a liberação controlada de drogas (Caliceti *et al.*, 2001). Com o mesmo intuito, formulações de lipossomas contendo gentamicina apresentaram relevância clínica em modelos de infecção bacteriana em ratos (Schiffelers *et al.*, 2001).

Os aminoglicosídeos têm mantido seu lugar no tratamento de várias doenças infecciosas, e seu uso apropriado no quadro hospitalar, tem realmente aumentado em importância. Isto é devido quase exclusivamente ao surgimento de resistência a drogas antimicrobianas e a necessidade reconhecida atualmente de terapias antimicrobianas combinadas, para o tratamento de muitas infecções nosocomiais sérias. Portanto, a utilidade clínica desta classe de agentes antimicrobianos provavelmente permanecerá proeminente por muitos anos (Zembower *et al.*, 1998).

1.6- CARBODIIMIDA

As carbodiimidas são usadas para mediar a formação de ligações amidas entre um carboxilato e uma amina ou ligações fosforamidas entre um fosfato e uma amina. Elas são provavelmente o tipo mais popular de agente ligante que não permanece na ligação, sendo eficiente na formação de conjugados entre duas moléculas de proteínas, entre um peptídeo e uma proteína, entre oligonucleotídeos e proteínas, ou alguma combinação destas com pequenas moléculas. Há dois tipos básicos de carbodiimidas: solúveis e insolúveis em água. As solúveis em

água são a escolha mais comum para as conjugações bioquímicas, porque muitas moléculas de origem biológica são solúveis em soluções aquosas (Hermanson, 1996).

1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.HCl (EDC ou EDAC) é talvez a carbodiimida mais popular para uso em conjugações de substâncias biológicas. Sua solubilidade em água permite a adição direta na reação sem antes solubilizá-la em solvente orgânico. O excesso de reagente e a isouréia formada como sub-produto da reação, são solúveis em água e podem ser facilmente removidos por diálise ou gel filtração (Hermanson, 1996).

As carbodiimidas podem reagir com ácidos carboxílicos para formar um intermediário O-acil-isouréia altamente reativo. Esta espécie ativa pode então reagir com um nucleófilo, tal como uma amina primária para formar uma ligação amida, porém outros nucleófilos são também reativos. Grupos sulfidrilas podem atacar as espécies ativas e formar uma ligação tio-éster, embora estes não sejam tão estáveis quanto à ligação formada com uma amina. Além disso, átomos de oxigênio podem agir como nucleófilos, como aqueles nas moléculas de água. Em soluções aquosas, a hidrólise pela água é a principal reação concorrente, clivando o éster intermediário ativado, formando isouréia e regenerando o grupo carboxílico (Gilles *et al.*, 1990). O potencial para hidrólise do éster ativo é refletido em velocidade constante a pH 4,7 para EDC de somente 2 a 3 s⁻¹. A maioria das referências para o uso de EDC descreve o meio de reação ótima a pH entre 4,7 e 6. Entretanto, a reação da carbodiimida ocorre efetivamente até pelo menos pH 7,5 sem significativa perda de produto (Hermanson, 1996).

As carbodiimidas têm sido utilizadas em diferentes áreas de pesquisa incluindo, por exemplo, síntese de peptídeos, conjugação de proteínas em estudos estruturais, quantificação de grupos carboxílicos em proteínas (Gratzer & Lee, 2001), carboxirredução e degradação de polissacarídeos ácidos (Taylor & Conrad, 1972; Needs *et al.*, 2001), conjugação da gentamicina com a fosfolipase C para uso em ensaios imunológicos de detecção deste antibiótico (Kim & Park, 1994) e conjugação de drogas com polímeros em sistemas de liberação controlada (Pouyani & Prestwich, 1994; Prestwich *et al.*, 1998; Vercruysse & Prestwich, 1998; Luo & Prestwich, 1999).

2- JUSTIFICATIVA

A liberação controlada de drogas é hoje uma das pesquisas mais excitantes no ramo da tecnologia farmacêutica. O uso terapêutico dos antibióticos aminoglicosídeos possui várias limitações como elevada toxicidade e rápida eliminação do organismo. A alta taxa de filtração renal induz a necessidade de várias aplicações diárias, e são justamente estas diversas aplicações que podem promover níveis tóxicos. Vários autores têm relatado a diminuição da toxicidade destes antibióticos quando em combinação com algumas drogas ou outros compostos. A conjugação da gentamicina com a heparina apresenta-se como uma opção para torná-la menos tóxica e melhorar suas propriedades farmacocinéticas e assim possibilitar o uso mais racional deste antibiótico.

3- OBJETIVOS

3.1- GERAL

Viabilizar a heparina como suporte para carrear a gentamicina.

3.2- ESPECÍFICOS

1. Ativar os grupos carboxilícos da heparina com carbodiimida.
2. Imobilizar a gentamicina à heparina ativada.
3. Caracterizar físico-quimicamente os derivados obtidos.
4. Avaliar as atividades farmacológicas dos derivados.
5. Avaliar a degradação dos derivados pela utilização das liases da heparina produzidas por *Flavobacterium heparinum*.

4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPELGREN, P.; RANSJÖ, U.; BINDSLEV, L.; ESPERSEN, F.; LARM, O. Surface heparinisation of central venous catheters reduce microbial colonization *in vitro* and *in vivo*. **Critical Care Medicine**, 24: 1-9, 1996.

BARBUCCI, R.; MAGNANI, A.; RAPPUOLI, R.; LAMPONI, S.; CONSUMI, M. Immobilisation of sulphated hyaluronan for improved biocompatibility. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 79: 119-125, 2000.

BELBOUL, A.; LOFGREN, C.; STORM, C.; JUNGBECK, M. Heparin-coated circuits reduce occult myocardial damage during CPB: a randomized, single blind clinical trial. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, 17: 580-586, 2000.

BENAERTS, P.J.; RIDLER, B.M.F.; VERCAERE, P.; THOMPSON, J.F.; CAMPBELL, W.B. Gentamicin beads in vascular surgery: long-term results of implantation. **Cardiovascular Surgery**, 7: 447-450, 1999.

BERESFORD, C.H.; OWEN, M.C. Antithrombin III. **International Journal Biochemistry**, 22: 121-128, 1990.

BLONDIN, C.; BATAILLE, I.; LETOURMEUR, D. Polysaccharide for vascular cell targeting. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, 17: 327-375, 2000.

BOLZON, N.; LEFEBRE, F.; FERRE, N.; DACULCI, G.; RABOUD, M. New bioactivation mode for vascular prostheses made of Dacron polyester. **Biomaterials**, 16: 747-751, 1995.

BYUN, Y.; YANG, V.C. Delivery system for targeted thrombolysis without the risk of hemorrhage. **ASAIO Journal**, 44: M638-M641, 1998.

CALICETI, P.; SALMASO, S.; LANTE, A.; YOSHIDA, M.; KATAKAI, R.; MARTELLINI, F.; MEI, L.H.I.; CARENZA, M. Controlled release of biomolecules from temperature-sensitive hydrogels prepared by radiation polymerization. **Journal of Controlled Release**, 75: 173-181, 2001.

CHOAY, J.; PETITOU, M.; LORMEAU, J.C.; SINAY, P.; CASU, B.; GATTI, G. Structure activity relationship in heparin – A synthetic pentasaccharide with high-affinity for antithrombin-

III and eliciting high anti-factor- XA activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 116: 492-499, 1983.

CHRISTENSEN, K.; LARSSON, R.; EMANUELSSON, H.; ELGUE, G.; LARSSON, A. Heparin coating of the stent graft – effects on platelets coagulation and complement activation. **Biomaterials**, 22: 349-355, 2001.

CHUANG, W.-L.; CHRIST, M.D.; PENG, J.; RABENSTEIN, D.L. An NMR and molecular modeling study of the site-specific binding of histamine by heparin, chemically modified heparin, and heparin-derived oligosaccharides. **Biochemistry**, 39: 3542-3555, 2000.

CONLON, B.J.; ARAN, J.-M.; ERRE, J.-P.; SMITH, D.W. Attenuation of aminoglycoside-induced cochlear damage with the metabolic antioxidant α -lipoic acid. **Hearing Research**, 128: 40-44, 1999.

DEMMY, T.L.; PARK, S.B.; LIEBLER, G.A.; BURKHOLDER, J.A.; MAHER, T.D.; BENCKART, D.H.; MAGOVERN, G.J.; MAGOVERN, G.J. Recent experience with major sternal wound complications. **Annals of Thoracic Surgery**, 49: 458-462, 1990.

DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; PAIVA, J.F.; TERSARIOL, I.L.S.; SANTOS, E.A.; HOLME, K.R.; PERLIN, A.S. Heparin in molluscs: chemical, enzymatic degradation and ^{13}C , ^1H NMR spectroscopical evidence for the maintenance of the structure through evolution. **International Journal of Biological Macromolecules**, 11: 361-366, 1989.

DIETRICH, C.P.; PAIVA, J.F.; CASTRO, R.A.B.; CHAVANTE, S.F.; JESKE, W.; FAREED, J.; GORIN, P.A.J.; MENDES, A.; NADER, H.B. Structural features and anticoagulant activities of a novel natural low molecular weight heparin from the shrimp *Penaeus brasiliensis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1428: 273-283, 1999.

DROBNIK, J. Hyaluronan in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 7: 295-308, 1991.

DUNN, R.L.; OTTENBRITE, R.M (Editores). **Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems**. ACS Symposium Series, Washington, 1990.

FALLGREN, C.; UTT, M.; PETERSSON, A.-C.; LJUNGH, Å.; WADSTRÖM, T. *In vitro* anti-staphylococcal activity of heparinized biomaterials bonded with combinations of rifampicin.

Zentralblatt fur Bakteriologie – International Journal of Medical Microbiology Virology Parasitology and Infectious Diseases, 287: 19-31, 1998.

GADGIL, H.; JARRET, H.W. Heparin elution of transcription factors from DNA-sepharose columns. **Journal of Chromatography A**, 848: 131-138, 1999.

GIAMMONA, G.; CAVALLARO, G.; FONTANA, G.; PITARRESI, G.; CARLISI, B. Coupling of the antiviral agent zidovudine to polyaspartamide and *in vitro* drug release studies. **Journal of Controlled Release**, 54: 321-331, 1998.

GILLES, M.A.; HUDSON, A.Q.; BORDERS Jr, C.L. Stability of water-soluble carbodiimides in aqueous solution. **Analytical Biochemistry**, 184: 244-248, 1990.

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

GRANT, D.; LONG, W.F.; WILLIAMSON, F.B. Infrared spectroscopy of heparin-cation complexes. **Biochemical Journal**, 244: 143-149, 1987.

GRATZER, P.F.; LEE, J.M. Control of pH alters the type of cross-linking produced by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) treatment of acellular matrix vascular grafts. **Journal of Biomedical Materials Research**, 58: 172-179, 2001.

GURNANI, K.; KHOURI, H.; COUTURE, M.; BERGERON, M.G.; BEAUCHAMP, D.; CARRIER, D. Molecular basis of the inhibition of gentamicin nephrotoxicity by daptomycin; an infrared spectroscopic investigation. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1237: 86-94, 1995.

HASHIDA, M.; AKAMATSU, K.; NISHIKAWA, M.; YAMASHITA, F.; TAKAKURA, Y. Design of polymeric prodrugs of prostaglandin E₁ having galactose residue for hepatocyte targeting. **Journal of Controlled Release**, 62: 253-262, 1999.

HECK, D.; ROSENBERG, A.; SCHINK-ASCANI, M.; GARBUS, S.; KIEWITT, T. Use of antibiotic-impregnated cement during hip and knee arthroplasty in the United States. **Journal of Arthroplasty**, 10: 470-475, 1995.

HERMANSON, G.T. Bioconjugate Techniques. **Academic Press**. Pierce Chemical Company. Rockford, Illinois, 1996.

HU, Z.; TAWA, R.; KONISHI, T.; SHIBATA, N.; TAKADA, K. A novel emulsifier, Labrasol, enhances gastrointestinal absorption of gentamicin. **Life Sciences**, 69: 2899-2910, 2001.

HUBER, R.; CARREL, R.W. Implications of the three-dimensional structure of α 1-antitrypsin for structure and function of serpins. **Biochemistry**, 28: 8951-8966, 1989.

ILLUM, L.; FARRAJ, N.F.; CRITCHLEY, H.; DAVIS, S.S. Nasal administration of gentamicin using a novel microsphere delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, 46: 261-265, 1988.

ITO, Y. Micropattern immobilization of polysaccharide. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 79: 77-81, 2000.

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

JACOBS, H.; KIM, S.W. *In vitro* bioactivity of a synthesized prostaglandin E₁ – heparin conjugate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 75: 172-175, 1986.

JORDAN, R.E.; OOSTA, G.M.; GARDNER, W.T.; ROSENBERG, R.D. The kinetics of hemostatic enzyme-antithrombin interactions in the presence of low-molecular weight heparin. **Journal of Biological Chemistry**, 255: 10081-10090, 1980.

KAPLAN, I.V.; HOBBS, G.A.; LEVINSON, S.S. Simpler technique for measuring oxidative susceptibility by heparin affinity column isolation of lipoproteins. **Clinica Chimica Acta**, 283: 89-103, 1999.

KELLY, R.M.; MEYER, J.D.; MATSUURA, J.E.; SHEFER, E.; HART, M.J.; MALONE, D.J.; MANNING, M.C. *In vitro* release kinetics of gentamicin from a sodium hyaluronate gel delivery system suitable for the treatment of peripheral vestibular disease. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 25: 15-20, 1999.

KIKUCHI, S.; ARAMAKI, Y.; NONAKA, H.; TSUCHIYA, S. Effect of dextran sulfate on renal accumulation of gentamicin. **Pharmaceutical Research**, 7: 644-647, 1990.

KIKUCHI, S.; ARAMAKI, Y.; NONAKA, H.; TSUCHIYA, S. Effect of dextran sulfate on renal dysfunctions induced by gentamicin as determined by the kidney perfusion technique in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 43: 292-293, 1991.

KIM, C.-K.; PARK, K.-M. Liposome immunoassay (LIA) for gentamicin using phospholipase C. **Journal of Immunological Methods**, 170: 225-231, 1994.

KIM, Y.J.; KANG, I.-K.; HUH, M.W.; YOON, S.C. Surface characterization and *in vitro* blood compatibility of poly(ethylene terephthalate) immobilized with insulin and/or heparin using plasma glow discharge. **Biomaterials**, 21: 121-130, 2000.

KUMAR, K.V.; SHIFOW, A.A.; NAIDU, M.U.R.; RATNAKAR, K.S. Carvedilol: a beta blocker with antioxidant property protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Life Sciences**, 66: 2603-2611, 2000.

LANGER, R. New methods of drug delivery. **Science**, 249: 1527-1533, 1990.

LEWIS, D.R.; LONGMAN, R.J.; WISHEART, J.D.; SPENCER, R.C.; BROWN, N.M. The pharmacokinetics of a single dose of gentamicin (4mg/kg) as prophylaxis in cardiac surgery requiring cardiopulmonary bypass. **Cardiovascular Surgery**, 7: 398-401, 1999.

LIANG, J.F.; SONG, H.; LI, Y.T.; YANG, V.C. A novel heparin/protamine-based pro-drug type delivery system for protease drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 89: 664-673, 2000.

LIM, S.T.; FORBES, B.; BERRY, D.J.; MARTIN, G.P.; BROWN, M.B. *In vivo* evaluation of novel hyaluronan/chitosan microparticulate delivery systems for the nasal delivery of gentamicin in rabbits. **International Journal of Pharmaceutics**, 231: 73-82, 2002.

LIM, S.T.; MARTIN, G.P.; BERRY, D.J.; BROWN, M.B. Preparation and evaluation of the *in vitro* drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and chitosan. **Journal of Controlled Release**, 66: 281-292, 2000.

LUO, Y.; PRESTWICH, G.D. Synthesis and selective cytotoxicity of a hyaluronic acid-antitumor bioconjugate. **Bioconjugate Chemistry**, 10: 755-763, 1999.

MAZZON, E.; BRITTI, D.; SARRO, A.D.; CAPUTI, A.P.; CUZZOCREA, S. Effect of N-acetylcysteine on gentamicin-mediated nephropathy in rats. **European Journal of Pharmacology**, 424: 75-83, 2001.

NADER, H.B.; PINHAL, M.A.S.; BAU, E.C.; CASTRO, R.A.B.; MEDEIROS, G.F.; CHAVANTE, S.F.; LEITE, E.L.; TRINDADE, E.S.; SHINJO, S.K.; ROCHA, H.A.O.; TERSARIOL, I.L.S.; MENDES, A.; DIETRICH, C.P. Development of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interaction with vascular endothelial cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 34: 699-709, 2001.

NEEDS, P.W.; RIGBY, N.M.; RING, S.T.; MacDOUGALL, A.J. Specific degradation of pectins via a carbodiimide-mediate Lossen rearrangement of methyl esterified galacturonic acid residues. **Carbohydrate Research**, 333: 47-58, 2001.

OLSON, S.T.; BJÖRK, I.; SHEFFER, R.; CRAIG, P.A.; SHORE, J.D.; CHOAY, J. Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions. **The Journal of Biological Chemistry**, 267: 12528-12538, 1992.

OLSON, S.T.; SRINIVASAN, K.R.; BJÖRK, I.; SHORE, J.D. Binding of high-affinity heparin to antithrombin III – Stopped flow kinetic – Studies of the binding interaction. **Journal of Biological Chemistry**, 256: 11073-11079, 1981.

PAIVA, J.F.; SANTOS, E.A.; JESKE, W.; FAREED, J.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. A comparative study on the mechanism of the anticoagulant action of mollusc and mammalian heparins. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 111: 495-499, 1995.

PARK, S.-N.; PARK, J.-C.; KIM, H.O.; SONG, M.J.; SUCH, H. Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide. **Biomaterials**, 23: 1205-1212, 2002.

PARRY, G.W.; HOLDEN, S.R.; SHABBO, F.P. Antibiotic prophylaxis for cardiac surgery: current practice. **British Heart Journal**, 70: 585-586, 1993.

PASSIRANI, C.; BARRATT, G.; DEVISSAGUET, J.P. Long-circulating nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate). **Pharmaceutical Research**, 15: 1046-1050, 1998.

PINHAL, M.A.S.; SANTOS, I.A.N.; SILVA, I.F.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. Stimulation of the synthesis of an antithrombotic heparin and its fragments. **Thrombosis Research**, 74: 1169-1174, 1995.

PINHAL, M.A.S.; TRINDADE, E.S.; FAREED, J.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. Heparin and a cyclic octaphenol-octasulfonic acid (GL-522-Y-1) bind with high affinity to a 47-KDa protein from vascular endothelial cell surface and stimulate the synthesis and structural changes of heparan sulfate proteoglycan. **Thrombosis Research**, 103: 35-45, 2001.

POUYANI, T.; PRESTWICH, G.D. Functionalized derivatives of hyaluronic acid oligosaccharides: drug carriers and novel biomaterials. **Bioconjugate Chemistry**, 5: 339-347, 1994.

PRESTWICH, G.D.; MARECAK, D.M.; MARECEK, J.F.; VERCROY, K.P.; ZIEBELL, M.R. Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. **Journal of Controlled Release**, 53: 93-103, 1998.

PRIUSKA, E.M.; SCHACHT, J. Formation of free radicals by gentamicin and iron and evidence for an iron gentamicin complex. **Biochemical Pharmacology**, 50: 1749-1752, 1995.

RUBINSTEIN, A.; NAKAR, D.; SINTOV, A. Chondroitin sulfate: a potential biodegradable carrier for colon-specific drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, 84: 141-150, 1992.

SAFNI, ITO, N.; TAKEUCHI, T.; MIWA, T. Separation of enantiomers on anion exchangers modified with heparin in liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 864: 25-30, 1999.

SAKIYAMA-ELBERT, S.E.; HUBBELL, J.A. Development of fibrin derivatives for controlled release of heparin-binding growth factors. **Journal of Controlled Release**, 65: 389-402, 2000.

SÁNCHEZ, E.; BARO, M.; SORIANO, I.; PERERA, A.; ÉVORA, C. *In vivo-in vitro* study of biodegradable and osteointegrable gentamicin bone implants. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 52: 151-158, 2001.

SANTOS, E.A. **Heparina do molusco *Anomalocardia brasiliensis*: A. natureza dos resíduos de ácidos urônicos. B. Distribuição em tecidos e correlação com mastócitos.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Estado de São Paulo, São Paulo, 1997.

SCHIFFELERS, R.M.; STORM, G.; BAKKER-WOUDENBERG, I.A.J.M. Therapeutic efficacy of liposomal gentamicin in clinically relevant rat models. **International Journal of Pharmaceutics**, 214: 103-105, 2001.

SERRUYS, P.W.; van HOUT, B.; BONNIER, H.; LEGRAND, V.; GARCIA, E.; MACAYA, C.; SOUSA, E.; van der GIESSEN, W.; COLOMBO, A.; SEABRA-GOMES, R.; KIEMENEIJ, F.; RUYGROK, P.; ORMISTON, J.; EMANUELSSON, H.; FAJADET, J.; HAUDE, M.; KLUGMANN, S.; MOREL, M.-A. Randomised comparison of implantation of heparin-coated stents with balloon angioplasty in selected patients with coronary artery disease (Benestent II). **The Lancet**, 352: 673-681, 1998.

SHA, S.-H.; SCHACHT, J. Antioxidants attenuate gentamicin-induced free radical formation *in vitro* and ototoxicity *in vivo*: D-methionine is a potential protectant. **Hearing Research**, 142: 34-40, 2000.

SHIOTANI, K.; IRIE, T.; UEKAMA, K.; ISHIMARU, Y. Cyclodextrin sulfates in parenteral use: protection against gentamicin nephrotoxicity in the rat. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 3: 139-151, 1995.

SILVA, M.E.; DIETRICH, C.P. The structure of heparin. Characterization of the products of the products formed from heparin by the action of a heparinase and a heparitinase from *Flavobacterium heparinum*. **Journal of Biological Chemistry**, 250: 6841-6846, 1975.

SINTOV, A.; DI-CAPUA, N.; RUBINSTEIN, A. Cross-linked chondroitin sulphate characterization for drug delivery purposes. **Biomaterials**, 16: 473-478, 1995.

SONG, B.B.; SCHACHT, J. Variable efficacy of radical scavengers and iron chelators to attenuate gentamicin ototoxicity in guinea pig *in vivo*. **Hearing Research**, 94: 87-93, 1996.

STEAD, D.A. Current methodologies for the analysis of aminoglycosides. **Journal of Chromatography B**, 747: 69-93, 2000.

STEPHENS, D.; LI, L.; ROBINSON, D.; CHEN, S.; CHANG, H.-C.; LIU, R.M.; TIAN, Y.; GINSBURG, E.J.; GOA, X.; STULTZ, T. Investigation of the *in vitro* release of gentamicin from a polyanhydride matrix. **Journal of Controlled Release**, 63: 305-317, 2000.

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

THUNBERG, L.; BÄCKSTRÖM, G.; LINDAHL, U. Further characterization of the antithrombin-binding sequence in heparin. **Carbohydrate Research**, 100: 393-410, 1982.

TSAI, C.-C.; CHANG, Y.; SUNG, H.-W.; HSU, J.-C.; CHEN, C.-N. Effects of heparin immobilization on the surface characteristics of a biological tissue with a naturally occurring crosslinking agent (genipin): an *in vitro* study. **Biomaterials**, 22: 523-533, 2001.

van WACHEN, P.B.; PLATINGA, J.A.; WISSINK, M.J.B.; BEERNINK, R.; POOT, A.A.; ENGBERS, G.H.M.; BEUGELING, T.; van AKEN, W.G.; FEIJEN, J.; van LUYN, M.J.A. *In vivo* biocompatibility of carbodiimide-crosslinked collagen matrices: effects of crosslink density, heparin immobilization, and bFGF loading. **Journal of Biomedical Materials Research**, 55: 368-378, 2001.

VERCRUYSSSE, K.P.; PRESTWICH, G.D. Hyaluronate derivatives in drug delivery. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, 15: 513-555, 1998.

WAHLIG, H.; DINGELDEIN, E. Antibiotics and bone cements; experimental and clinical long-term observations. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, 51: 49-56, 1980.

WILFLINGSSEDER, D.; SCHWELBERGER, H.G. Highly efficient purification of porcine diamine oxidase. **Journal of Chromatography B**, 737: 161-166, 2000.

WISSINK, M.J.B.; BEERNINK, R.; PIEPER, J.S.; POOT, A.A.; ENGBERS, G.H.M.; BEUGELING, T.; van AKEN, W.G.; FEIJEN, J. Immobilization of heparin to EDC/NHS-crosslinked collagen. Characterization and *in vitro* evaluation. **Biomaterials**, 22: 151-163, 2001.

ZEHNDER, J.L.; GALLI, S.J. Mast-cell heparin demystified. **Nature**, 400: 714-715, 1999.

ZEMBOWER, T.R.; NOSKIN, G.A.; POSTELNICK, M.J.; NGUYEN, C.; PETERSON, L.R. The utility of aminoglycosides in an era of emerging drug resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 10: 95-105, 1998.

HEPARIN AS A CARRIER FOR GENTAMICIN

GB. Oliveira, L.B. Carvalho Jr., M.P.C. Silva

Departamento de Bioquímica and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco. Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife, PE, Brazil.

Abstract

The synthesis of a macromolecular gentamicin conjugate is described based on the covalent linkage of this antibiotic on heparin, through activated carboxyl groups via 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC). This derivative showed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*. Furthermore, infrared spectra and electrophoresis promoted evidences that covalent linkage was established between gentamicin and heparin.

Keywords: heparin, carbodiimide, gentamicin, I.R. spectra, prodrug.

1. Introduction

Heparin, a sulfated glycosaminoglycan present in several mammalian and other vertebrate tissues (Nader et al., 1980; Gomes and Dietrich, 1982; Hovingh et al., 1986), has been widely used in medicine for more than 40 years in account of its anticoagulant, antithrombotic and antilipemic activities (Jaques, 1980). Recently, heparin-based delivery systems for proteins have been investigated (Sakiyama-Elbert and Hubbell, 2000; Liang et al., 2002). The heparin-binding affinity of fibroblast growth factors (FGFs) was used to develop drug delivery systems for the controlled release of heparin-binding growth factors. Then, heparin-based delivery systems can serve as reservoirs to store growth factors in a similar manner to the extracellular matrix, allowing for active release of growth factor controlled by cell-mediated degradation of the reservoir (Sakiyama-Elbert and Hubbell, 2000).

The use of biocompatible polymers in the treatment of various diseases has expanded rapidly in the last two decades (Duncan et al., 1996). Moreover, derivatization of such polymers with drugs has emerged as a powerful method for controlling delivery and release of a variety of compounds (Putnam and Kopecek, 1995). Small drug molecules can be linked to the polymer that allows controlled release of the free bioactive group (Luo and Prestwich, 1999). Covalent attachment of drugs to polymeric supports is known to retard drug release, and especially in the case of topical applications can provide highly improved therapeutic benefits (Langer, 1990). When a macromolecular prodrug is obtained, it shows particular properties determined by the macromolecule presence and manifested in the pharmacokinetic behaviour of the drug-polymer conjugate (Takakura et al., 1994; Takakura et al., 1996). A macromolecular system with a tailor-made distribution profile can then be achieved by suitable chemical modifications (Giammona et al., 1998).

Macromolecular prodrugs have been extensively investigated to improve the therapeutic effects and/or to reduce the toxic effects of drugs. Polymers used as macromolecular prodrug carriers must be biodegradable and biocompatible and should contain appropriate sites for chemical conjugation. Further, the polymer and its degradation products must be non-immunogenic and non-toxic and be effectively metabolized/excreted from the body (Zhu et al., 2001).

One of the simplest methods to obtain sustained release of drugs is to physically mix or blend it with a polymer. HealonTM, a commercial preparation of sodium hyaluronate gel, was impregnated with gentamicin and used as a biodegradable sustained-release gel delivery system of this antibiotic for treatment of unilateral vestibulopathy (Kelly et al., 1999).

The aminoglycosidic antibiotic gentamicin is widely used to treat infections caused by Gram-negative bacteria (Spelman et al., 1989). Unfortunately, aminoglycosides may also yield oto- and nephrotoxic reactions. Nevertheless, the reduction of aminoglycoside nephrotoxicity remains a concern among clinicians and various strategies are being explored to reduce it (Gurnani et al., 1995). The challenge is to find drugs or drug combinations that are suitable for a clinical application. Feasible suggestions were recently made based on the efficacy of antioxidants against gentamicin mediated toxicity (Conlon et al., 1999; Kumar et al., 2000; Sha and Schacht, 2000; Mazzon et al., 2001). Therefore, an expansion of the potential repertoire of protectants seems strongly indicated (Sha and Schacht, 2000).

The objective of this research was set out to study the viability of the heparin as potential macromolecular carrier for delivery of the aminoglycosidic antibiotic gentamicin.

2. Materials And Methods

2.1. Materials

Heparin (Liquemine) was obtained from Roche Laboratories, gentamicin from Gibco BRL, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC) was purchased from Sigma Chemical Company. Heparinase and heparitinase II were prepared as previously described (Nader et al., 1990). *Staphylococcus aureus* DA-UFPE 01 belonging to Departamento de Antibióticos collection (Universidade Federal de Pernambuco, Brazil). All other reagents were from analytical grade.

2.2. Synthesis of the Polymeric Gentamicin Derivatives (Heparin-Gentamicin Conjugates)

To 5 mL heparin solution (0.33% w/v), at pH previously adjusted to 4.7 with hydrochloric acid, was added 2 mL of EDAC solution to final concentrations of 1.43 or 2.86 mg/mL. The reaction mixtures were maintained at 25°C for 1 h keeping the pH between 4.5 - 5.0 by addition HCl. Afterwards the pH was adjusted to 8.0 with sodium hydroxide solution and gentamicin was added to final concentrations of 2.5, 5 and 10 mg/mL. These mixtures were kept under stirring overnight at 4°C. Then, the obtained derivatives were dialysed against distilled water at 4°C with four exchanges (2 liters each) every six hours.

2.3. Gentamicin Content

The estimation of gentamicin content in the heparin-gentamicin conjugate was determined by ninhydrin reaction in accordance with Frutos et al. (2000). Samples and standard gentamicin solutions were prepared in the pH 7.4 phosphate buffer and ninhydrin reagent in aqueous solution 1.25% (w/v). Then, to 5 mL gentamicin solution was added 1.5 mL ninhydrin reagent, heating 95°C for 15 minutes. After that the absorbance was recorded at 440 nm. The calibration curve (30 to 120 µg/mL of gentamicin) was constructed as above described.

2.4. Microbial Assay

Antimicrobial activity of heparin, carbodiimide activated heparin, heparin-gentamicin conjugate before and after dialysis, was carried out by using a microbial assay based on disk diffusion in accordance to Bauer et al. (1966). *Staphylococcus aureus* were suspended in BHI broth and poured over a Mueller-Hinton agar bed to form a background carpet of organisms. Aliquots (10 µL) of either standard or samples were pipetted onto the 5 mm disks, punched of filter paper sheets (ADVANTEC Tokyo Roshi International, Inc., Dublin, CA, USA), and placed on the bacterial lawn. The plates were incubated overnight at 37°C to allow growth of organisms. Then, the inhibition halos were measured in a view to detect the effect of antibiotic on the microorganism growth.

2.5. Enzymatic Degradation

The heparin-gentamicin conjugate was submitted to degradation by heparinase and heparitinase II as follows: mixtures of 0.1 U of enzymes, 100 µg of samples (heparin-gentamicin complex before and after dialyses) in 0.05M ethylenediamine-acetate buffer, pH 7.0 in a final volume of 30 µl were incubated for 18 h at 30°C. The incubation mixtures were then spotted in Whatman N° 1 paper and submitted to chromatography in isobutyric acid: 1M NH₃, 5/3 v/v, for 18h. The products formed were detected by silver nitrate and toluidine blue staining (Silva and Dietrich, 1975; Nader et al., 1990).

2.6. Electrophoresis

Heparin-gentamicin conjugate was applied in 0.6% agarose gel (7.5x10cm, 0.2cm thick) prepared with 0.05M 1,3-diaminopropane-acetate buffer, pH 9.0, as previously described (Dietrich et al., 1977). Electrophoresis was then carried out (2V/cm) for 60 min. The compounds were fixed in the gel with 0.01% cetyltrimethylammonium bromide for 4h. The gel was dried and stained for 30 min with 0.01% toluidine blue prepared in a solution of 1% acetic acid, 50% ethanol and 49% water. The gels were then destained with the same solution without toluidine blue.

2.7. FT-IR Spectroscopy

The fourier-transform infrared (FT-IR) spectra of samples were taken in a BRUKER instrument model IFS 66 in KBr pellets. Spectra were run at the region from 4000 to 400 cm^{-1} .

3. Results and Discussion

3.1. Synthesis of Heparin-Gentamicin Conjugate Mediated by Carbodiimide Coupling

Polymeric prodrugs of streptomycin and norfloxacin were prepared by coupling the drugs via spacers onto dextran (Coessens et al., 1996; Coessens et al., 1997). The hydrolytic stability of the polymer-antibiotics conjugates were studied at physiological and lysosomal pH. However, the antimicrobial activity of these conjugates were not determined.

The efficacious antibiotic gentamicin has remained a clinical necessity, despite its nephro- and ototoxicity. The underlying mechanism of this toxicity is postulated to result from gentamicin-induced free radical formation via an iron complex. A reported approach used competitive iron chelators to attenuate iron-gentamicin complexation *in vivo* (Song and Schacht, 1996). On the other hand, cyclodextrins sulfates may prevent the gentamicin-induced nephrotoxicity. Therefore, the use of cyclodextrins sulfates as parenteral drug carrier for aminoglycosides seems to be one of the promising ways to prevent the renal failure associated with the treatment with these antibiotics (Shiotani et al., 1995).

Other different approach developed by Jacobs et al. (1986) was a covalently bound conjugate of heparin and prostaglandin E_1 (PGE_1). Bioactivity tests on the conjugates confirmed that both the anticoagulant activity of heparin and the inhibitory effect of PGE_1 on platelet

aggregation were maintained. This dual pharmacological role perhaps could be reached by the heparin-gentamicin conjugate by tailor-made activation and conjugation.

In this work, the heparin carboxyl groups were converted to O-acyl esters, via EDAC, which was displaced by gentamicin amine groups, forming an amide linkage. The polymeric gentamicin derivative formed was submitted to dialysis to remove the unbound antibiotic. After that, the gentamicin content and the antimicrobial activity were determined. Table I presents the amount of fixed gentamicin and the *S. aureus* inhibition growth by this conjugated antibiotic after dialysis. Firstly, these results showed that the offered gentamicin under the used experimental conditions did not interfere with the fixed antibiotic, except for the concentration equal to 10 mg/mL. The decreased fixed antibiotic can be attributed to loss by precipitation together with heparin. The formation of heparin-gentamicin macromolecular complexes and following precipitation at high gentamicin concentration has been reported by Tyler et al. (1981). The *S. aureus* inhibition halo were not different for all conjugated preparations. Neither heparin nor carbodiimide activated heparin inhibited the *S. aureus* growing. Although the gentamicin-heparin derivatives presented antimicrobial activity *in vitro*, their activity *in vivo*, as well as its hydrolytic kinetics, should be evaluated. In addition, the ionic interaction between the drug and the carrier should be further studied.

Table I. Growth inhibition halo of *S. aureus* by heparin-gentamicin conjugates after dialysis

Conjugate preparation	Offered gentamicin (mg/mL)	¹ Fixed gentamicin (mg/mL)	² Inhibition Halo (mm)	n
I	10	0.473 ± 0.022	17.5 ± 0.4	4
II	5	0.541 ± 0.034	17.2 ± 0.4	2
III	2.5	0.539 ± 0.037	17.0 ± 1.0	2
Control	(gentamicin 10mg/mL)		25.0 ± 0.8	4

Conjugates produced by reaction of gentamicin and heparin (0.33% w/v) with carbodiimide (2.86 mg/mL). ¹Estimated by ninhydrin reaction (Section 2.3). ²Inhibition halo produced by 10 µL of either control or conjugates. n – number of synthesis.

3.2. Electrophoresis and Enzymatic Degradation of Heparin Moiety of the Conjugate

Figure 1 shows the electrophoretic behavior of the heparin-gentamicin conjugates in the 1,3 diamine-propane buffer, pH 9.0. It can be observed that the conjugates possess a different behavior than the native heparin. They migrated less and presented little affinity by toluidine blue

dye. Kikuchi et al. (1990) showed that a complex of gentamicin with dextran sulfate collected from rat urine had a different electrophoretic profile and it was attributed the strong binding between gentamicin and dextran sulfate. Then the behavior of the conjugate can be indicative of the covalente coupling or to same extent to ionic binding between these polyelectrolytes. Although Deguchi et al. (1978) observed that the ionic interaction of these molecules was dependent on either pH and ionic strength, being this interaction smaller as pH and ionic strength increasing.

The study of polyelectrolytes complexes between glycosaminoglycans and chitosan has been studied (Denuziere et al., 1996; Denuziere et al., 1998). The formation of these polyelectrolytes complexes was dependent on the pH and they were resistant to degradation by glycosaminoglycan lyases, but the pH influence also was observed. In the same form, the conjugate heparin-gentamicin was resistant to degradation by heparin lyases. However, this can be not only due to substitution of carboxyl groups of the heparin but also the presence of gentamicin, which can form a complex with heparin. Therefore, the *in vivo* degradability of the conjugates of heparin with gentamicin should not be assumed to be the same as the native polymer.

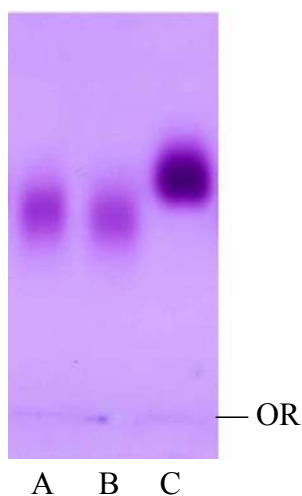


Figure 1. Agarose gel electrophoresis in 0.05 M 1,3 diaminopropane acetate buffer, pH 9.0. Heparin-gentamicin conjugate: A) before dialysis (11.8 μ g of heparin), B) after dialysis and C) heparin 5 μ g (Liquemine). OR- origin.

3.3. Assignment of Infrared Absorption Bands

Figure 2 shows the infrared spectra of sodium salt heparin, gentamicin sulfate and heparin-gentamicin conjugates. The spectra of heparin present a broad band above 3000 cm^{-1}

assigned to hydroxyl stretching vibrations. The presence of water was characterized by band centred at 1624 cm^{-1} , which representing the symmetric deformation mode of H_2O overlapped with the antisymmetric stretching of carboxylate groups. The carboxy-group symmetric stretching band at 1425 cm^{-1} and $\text{S}=\text{O}$ asymmetric stretching at about 1236 cm^{-1} are also present. The gentamicin sulfate spectra presented also a band at 3414 cm^{-1} of hydroxyl stretching vibrations as well as $\text{N}-\text{H}$ stretching vibrations. The bands at 2992 cm^{-1} and 2073 cm^{-1} are due $\text{N}-\text{H}$ stretching vibrations of amine salts. The bands 1625 cm^{-1} and 1527 cm^{-1} are assigned to $\text{N}-\text{H}$ antisymmetric and symmetric bending of NH_3^+ . However, the heparin-gentamicin conjugates not showed the bands assigned to amine salts. Probably due to reduction of primary amines after coupling of the gentamicin's amine groups with heparin's carboxyl group mediated by carbodiimide reaction forming amide linkages. This possible amide bond still can be suggested due the bands at about 1632 cm^{-1} and 1530 cm^{-1} , which correspond to $\text{C}=\text{O}$ (amide I) stretching and $\text{N}-\text{H}$ (amide II) bending vibrations, respectively. Recently, Zhu et al. (2001) described the reaction of 6-carboxycellulose with dicyclohexylcarbodiimide (DCC) for coupling of phenyl-propanolamine as a model drug. The FT-IR spectrum of this product exhibited amide I and amide II at 1663 and 1533 cm^{-1} , respectively. This statement is in accordance with our results.

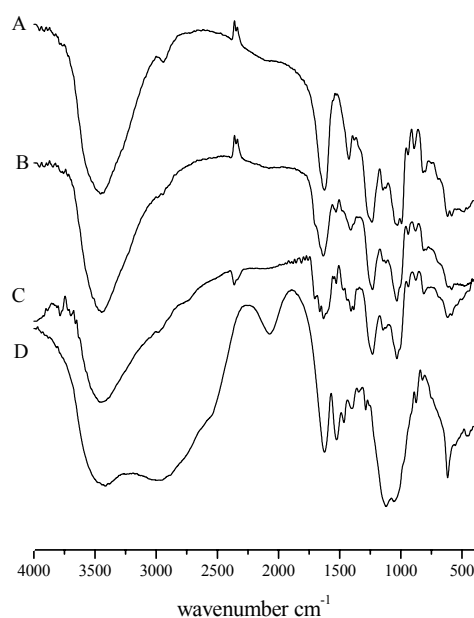


Figure 2. FT-IR spectra of sodium salt heparin (A), heparin-gentamicin conjugate produced by reaction of heparin and 10mg/mL gentamicin with carbodiimide concentrations of 1.43 mg/mL (B) and 2.86 mg/mL (C); gentamicin sulfate (D).

4. Conclusions

This paper describes a procedure for the preparation of a macromolecular gentamicin conjugate using a modified heparin as the carrier. Infrared spectra and electrophoresis data provided evidences that covalent linkage was established between the antibiotic and the glycosaminoglycan. The polymeric gentamicin derivatives presented antimicrobial activity *in vitro*.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Helena Bonciani Nader from the UNIFESP-EPM for critical reading of the manuscript and helpful suggestions.

References

- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45, 493-496.
- Coessens, V., Schacht, E.H., Domurado, D., 1996. Synthesis of polyglutamine and dextran conjugates of streptomycin with an acid-sensitive drug-carrier linkage. *J. Control. Rel.*, 38, 141-150.
- Coessens, V., Schacht, E.H., Domurado, D., 1997. Synthesis and *in vitro* stability of macromolecular prodrugs of norfloxacin. *J. Control. Rel.*, 47, 283-291.
- Conlon, B.J., Aran, J.-M., Erre, J.P., Smith, D.W., 1999. Attenuation of aminoglycoside-induced cochlear damage with the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Hearing Res.*, 128, 40-44.
- Deguchi, T., Ishii, A., Tanaka, M., 1978. Binding of aminoglycoside antibiotics to acidic mucopolysaccharides. *J. Antibiot.*, 31, 150-155.
- Denuziere, A., Ferrier, D., Damour, O., Domard, A., 1998. Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes: biological properties. *Biomaterials*, 19, 1275-1285.

- Denuziere, A., Ferrier, D., Domard, A., 1996. Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes. Physico-chemical aspects. Carbohydr. Polym., 29, 317-323.
- Dietrich, C.P., McDuffie, N.M., Sampaio, L.O., 1977. Identification of acidic mucopolysaccharides by agarose gel electrophoresis. J. Chromatogr., 130, 299-304.
- Duncan, R., Dimitrijevic, S., Evagorou, E.G., 1996. The role of polymer conjugates in the diagnosis and treatment of cancer. Stp. Pharma. Sci., 6, 237-263.
- Frutos, P., Torrado, S., Perez-Lorenzo, M.E., Frutos, G., 2000. A validated quantitative colorimetric assay for gentamicin. J. Pharmaceut. Biomed., 21, 1149-1159.
- Giammona, G., Cavallaro, G., Fontana, G., Pitarresi, G., Carlisi, B., 1998. Coupling of the antiviral agent zidovudine to polyaspartamide and *in vitro* drug release studies. J. Control. Release, 54, 321-331.
- Gomes, P.B., Dietrich, C.P., 1982. Distribution of heparin and other sulfated glycosaminoglycans in vertebrates. Comp. Biochem. Phys. B, 73, 857-863.
- Gurnani, K., Khouri, H., Couture, M., Bergeron, M.G., Beauchamp, D., Carrier, D., 1995. Molecular basis of the inhibition of gentamicin nephrotoxicity by daptomycin; an infrared spectroscopic investigation. BBA-Biomembranes, 1237, 86-94.
- Hovingh, P., Piepkorn, M., Linker, A., 1986. Biological implications of the structural, antithrombin affinity and anticoagulant activity relationships among vertebrate heparins and heparan sulfates. Biochem. J., 237, 573-581.
- Jacobs, H., Kim, S.W., 1986. *In vitro* bioactivity of a synthesized prostaglandin E₁-heparin conjugate. J. Pharm. Sci., 75, 172-175.
- Jaques, L.B., 1980. Heparins - anionic poly-electrolyte drugs. Pharmacol. Rev., 31, 99-166.
- Kelly, R.M., Meyer, J.D., Matsuura, J.E., Shefter, E., Hart, M.J., Malone, D.J., Manning, M.C., 1999. *In vitro* release kinetics of gentamycin from a sodium hyaluronate gel delivery system suitable for the treatment of peripheral vestibular disease. Drug Dev. Ind. Pharm., 25, 15-20.
- Kikuchi, S., Aramaki, Y., Nonaka, H., Tsuchiya, S., 1990. Effect of dextran sulfate on renal accumulation of gentamicin. Pharmaceut. Res., 7, 644-647.

- Kumar, K.V., Shifow, A.A., Naidu, M.U.R., Ratnakar, K.S., 2000. Carvedilol: a beta blocker with antioxidant property protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Life Sci.*, 66, 2603-2611.
- Langer, R., 1990. New methods of drug deliver. *Science*, 249, 1527-1624.
- Liang, J.F., Li, Y.T., Song, H., Park, Y.J., Naik, S.S., Yang, V.C.M., 2002. ATTEMPTS: a heparin/protamine-based delivery system for enzyme drugs. *J. Control. Release*, 6, 237-263.
- Luo, Y., Prestwich, G.D., 1999. Synthesis and selective cytotoxicity of a hyaluronic acid-antitumor bioconjugate. *Bioconjugate Chem.*, 10, 755-763.
- Mazzon, E., Britti, D., De Sarro, A., Caputi, A.P., Cuzzocrea, S., 2001. Effect of N-acetylcysteine on gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 424, 75-83.
- Nader, H.B., Porcionatto, M.A., Tersariol, I.L.S., Pinhal, M.A.S., Oliveira, F.W., Moraes, C.T., Dietrich, C.P., 1990. Purification and substrate specificity of heparitinase I and heparitinase II from *Flavobacterium heparinum*. *J. Biol. Chem.*, 265, 16807-16813.
- Nader, H.B., Takahashi, H.K., Straus, A.H., Dietrich, C.P., 1980. Selective distribution of the heparin in mammals conspicuous presence of heparin in lymphoid-tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, 627, 40-48.
- Putnam, D., Kopecek, J., 1995. Polymer conjugates with anticancer activity. *Adv. Polym. Sci.*, 122, 55-123.
- Sakiyama-Elbert, S.E., Hubbell, J.A., 2000. Development of fibrin derivatives for controlled release of heparin-binding growth factors. *J. Control. Release*, 65, 389-402.
- Sha, S.-H., Schacht, J., 2000. Antioxidants attenuate gentamicin-induced free radical formation *in vitro* and ototoxicity *in vivo*: D-methionine is a potential protectant. *Hearing Res.*, 142, 34-40.
- Shiotani, K., Irie, T., Uekama, K., Ishimaru, Y., 1995. Cyclodextrin sulfates in parenteral use: protection against gentamicin-nephrotoxicity in the rat. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 3, 139-151.
- Silva, M.E., Dietrich, C.P., 1975. Structure of heparin characterization of the products formed from heparin by action of a heparinase and a heparitinase from *Flavobacterium heparinum*. *J. Biol. Chem.*, 250, 6841-6846.
- Song, B.-B., Schacht, J., 1996. Variable efficacy of radical scavengers and iron chelators to attenuate gentamicin ototoxicity in guinea pig *in vivo*. *Hearing Res.*, 94, 87-93.

- Spelman, D.W., McDonald, M., Spicer, W.J., 1989. Aminoglycoside antibiotic agents: a review. *Med. J. Australia*, 151, 346-349.
- Takakura, Y., Fujita, T., Furitsu, H., Nishikawa, M., Sezaki, H., Hashida, M., 1994. Pharmacokinetics of succinylated proteins and dextran sulfate in mice - implications for hepatic targeting of protein drugs by direct succinylation via scavenger receptors. *Int. J. Pharm.*, 105, 19-29.
- Takakura, Y., Mahato, R.I., Nishikawa, M., Hashida, M., 1996. Control of pharmacokinetics profiles of drug-molecule conjugates. *Adv. Drug Del. Rev.*, 19, 377-399.
- Tyler, L.S., Rehder, T.L., Davis, R.B., 1981. Effect of gentamicin on heparin activity. *Am. J. Hosp. Pharm.*, 38, 537-540.
- Zhu, L.H., Kumar, V., Banker, G.S., 2001. Examination of oxidized cellulose as a macromolecular prodrug carrier: preparation and characterization of an oxidized cellulose-phenylpropanolamine conjugate. *Int. J. Pharm.*, 223, 35-47.

PROPERTIES OF CARBODIIMIDE TREATED HEPARIN

G.B. Oliveira, L.B. Carvalho Jr., M.P.C. Silva

Departamento de Bioquímica and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco. Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife, PE, Brazil.

Abstract

Heparin, a well-known anticoagulant, has been most frequently used as an immobilising biomolecule for attaining the blood compatibility of polymeric materials. Since carbodiimide are often used for immobilisation of heparin on these biomaterials, the present study was intended to evaluate some properties of carbodiimide-treated heparin. Here it was observed that the properties of heparin were impaired by treatment with carbodiimide, principally in the molar excess of these reagent. Then, dye fixation and electrophoretic behaviour of heparin were changed, as well as its degradability by specific enzymes. Also, these modification resulted in loss of anticoagulant activity. Infrared spectra of these carbodiimide-treated heparins presented sign that can confirm its modification. Nevertheless, some of these heparin properties are desirable in biomaterials, therefore more studies should be done with the purpose of better evaluate the carbodiimide method for heparin immobilisation.

Keywords: heparin, carbodiimide, I.R. spectra, heparin activities, cationic dyes

1. Introduction

Heparin is a linear polysaccharide composed of repeating units of uronic acid, containing an O-sulfate group at the C-2 position, and D-glucosamine, usually N-sulfated with an additional O-sulfate group at C-6.

A number of researchers have focused on the hybridisation of synthetic polymers with biologically active molecules in order to produce blood-or tissue-compatible materials. The use of heparin or heparin binding extracellular matrix proteins for surface coating of biomedical devices has been reported. Its use currently in cardiovascular surgery has the aims to achieve antithrombogenic materials, low degree of complement activation and reduced bacterial adhesion [1]. Often, carbodiimides are used for immobilisation of heparin on these biomaterials, because this reagent do not remain as part of the cross-link. Thus precluding depolymerization and possible release of potentially cytotoxic reagent and it produce water soluble reaction by-products, which can be easily removed during routine rinsing of the tissue. Carbodiimides have been used in a number of different research areas including, for example, peptide synthesis [2], conjugation of proteins in structural studies [3], quantification of carboxyl moieties in proteins [2,4], and coupling reactions in an anticalcification treatment for porcine bioprosthetic valves [5]. Two cross-linking techniques based on 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide (EDC) for bioprosthetic materials have already received US patents [6,7] and preliminary *in vitro* cell culture and *in vivo* biocompatibility performances appear promising [8,9]. The reaction of carbodiimide with a carboxyl group generally proceeds through the addition of the free carboxylate to one of the double bonds of the diimide system to give an O-acylurea product [2]. In the presence of a nucleophile the acyl-nucleophile product will form, plus the urea of the carbodiimide. The second pathway, which accounts for hindered O-acylureas and occurs in the absence of added nucleophiles, is for the O-acylurea to rearrange to the more stable N-acylurea through an intramolecular acyltransfer [10]. Among the techniques to quantify heparin immobilised on the surface of biomaterials, the assays based on metachromatic interaction with cationic dyes have been used [11-13]. Metachromasia is a well known phenomenon which has long been exploited in testing electrostatic properties of glycosaminoglycans [14-16]. Therefore this reaction is a very useful tool to evaluate the biological activity of these substances [17]. The use of the water soluble cationic dye absorption, as a means for quantification of chondroitin sulphate cross-linking was also suggested [18].

In the present study, heparin was treated with different concentrations of carbodiimide. The modified heparins were subjected to degradation by heparin lyases, electrophoresis in

different buffer systems and dye fixation studies, with methylene blue and toluidine blue. The modification of heparin by carbodiimide was also investigated by infrared (I.R.) spectra. Coagulation tests were performed to determine whether modified heparin maintain its anticoagulant activity,.

2. Materials And Methods

2.1. Materials

Heparin (Liquemine) was obtained from Roche Laboratories. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC) was purchased from Sigma Chemical Company. Methylene blue and Toluidine blue from Reagen Laboratories. Heparinase and heparitinase II were prepared as previously described [19]. All others reagents were from analytical grade.

2.2. Preparation of Carbodiimide-Modified Heparin

To 5 mL of heparin solution (3.3 mg/mL), at pH previously adjusted to 4.7 with hydrochloric acid, was added 2 mL of EDAC solution to final concentration ranging from 0.57 to 7.14 mg/mL. The reaction mixtures were maintained at room temperature for 1 h with pH controlled at a range of 4.5 to 5.0. After that the pH was adjusted to 8.0 with sodium hydroxide solution.

2.3. Interaction Between Cationic Dyes and Carbodiimide-Modified Heparin

This experiment was carried out according to Smith et al. [20] with some modifications. 0.015% of toluidine blue and 0.005% of methylene blue solutions were prepared in 0.01N HCl or aqueous solution pH 8.5, containing 0.2% NaCl. 2.5 mL of dyes solutions were pipetted into test tubes containing 1 mL of test samples, standards (10-100 μ g heparin) and a blank with distilled water. All the tubes were agitated in vortex mixer. Distilled water was added to a final volume of 17.5 mL, stirred again and placed to rest for up to 30 min. Absorbances were measured at 631 nm and 664 nm for toluidine blue and methylene blue respectively.

2.4. Enzymatic Degradation

The products formed from heparin and its derivatives by action of heparinase and heparitinase II were prepared and identified as follows: mixtures of 0.1 U of enzymes, 100 µg of samples (heparin, heparins treated with carbodiimide and standards) in 0.05M ethylenediamine-acetate buffer, pH 7.0 in a final volume of 30 µl and they were incubated for 18 h at 30°C. The incubation mixtures were then spotted in Whatman N° 1 paper and subjected to chromatography in isobutyric acid: 1M NH₃, 5/3 v/v, for 18h. The products formed were detected by silver nitrate and toluidine blue staining [19,21].

2.5. Agarose Gel Electrophoresis

Agarose gel electrophoresis of heparin and carbodiimide-modified heparin were performed in three different buffer systems, namely 0.05 M 1,3 diaminopropane-acetate buffer, pH 9.0 [22] or 0.05 M Tris-acetate buffer, pH 8.0 [23] or in the discontinuous buffer barium acetate/1,3 diaminopropane-acetate as previously described [24]. Densitometry at 540 nm was used to quantify the polysaccharides.

2.6. Fourier-Transform Infrared Spectroscopy

The infrared spectra of samples were taken in a BRUKER instrument model IFS 66 in KBr pellets. Spectra were run in the region 4000-400 cm⁻¹.

2.7. Anticoagulant Activity

The anticoagulant activity was measured essentially as described in the United States Pharmacopoeia [25].

3. Results

3.1. Interaction Between Cationic Dyes and Carbodiimide-Modified Heparin

The heparin's O-sulfate and N-sulfate groups are completely dissociated, even at a pH below 3.0. In this region, therefore, methylene blue binds only to the O-sulfate and N-sulfate

groups but the carboxyl group is weakly acidic and the pKa of uronic acid in heparin is 3.6. On the pH increasing above 3.0, the carboxyl groups gradually dissociate and combine with methylene blue, and reaching a constant level at pH above 5.0, where the carboxyl groups dissociation is complete [26]. To inspect this influence of the pH, the dyes were prepared in solutions with acid and alkaline pH.

The Figure 1 shows the dyes activity of heparins treated with carbodiimide. It can be seen that the increasing of the absorbance is related to the increasing of carbodiimide concentrations, however, the higher carbodiimide concentration didn't present further increasing in absorbance. The same behaviour was found with alkaline pH. It is observed that the carbodiimide-treated heparin didn't show the same interaction with dyes as untreated heparin (100µg/mL, Absorbances 0.475, 0.371 for methylene blue and toluidine blue respectively). In the same figure, can be observed a linear region between carbodiimide used to heparin modification and absorbance, with a correlation coefficient of 0.98 for methylene blue dye until carbodiimide concentration of 4.29 and 0.98 for toluidine blue until 1.71.

The carbodiimide concentrations used for heparin modification and their effects on the heparin molecule detected by the toluidine blue and methylene blue activity at acid pH, can be seen in Table 1. There is a decreasing of the complexation of dyes by heparin treated, which can be demonstrated by misestimation of the heparin concentration.

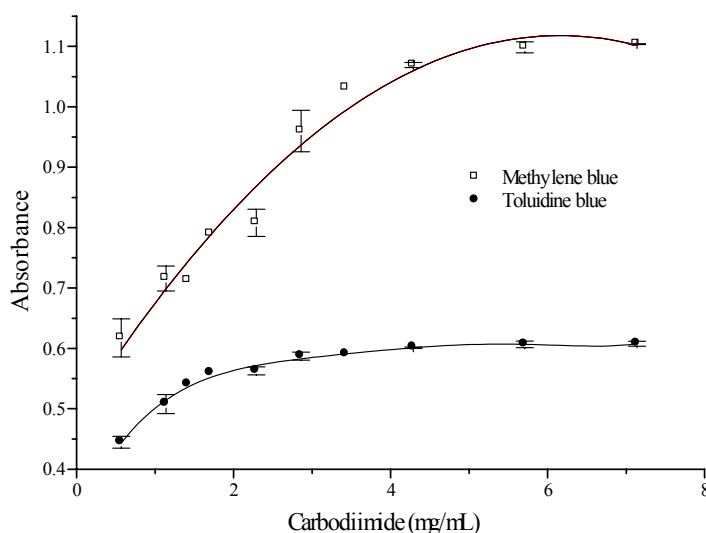


Figure 1. Effect of carbodiimide concentration on dye activity of heparin in acid pH. Absorbances read at: 664 nm for methylene blue and 631 nm for toluidine blue. Assay performed with 100 µg/mL of the derivatives prepared by the reaction of heparin (3.3 mg/mL) with carbodiimide at the concentrations indicated on the curve.

Table 1. Effect of EDAC concentration on toluidine blue and methylene blue activity of heparin in acid pH

EDAC concentration (mg/mL)	EDAC:Hep-COOH*	Apparent heparin concentration (µg/mL)	
		Methylene blue	Toluidine blue
0.00	—	100.0	100.0
0.57	0.77:1	80.0	80.0
1.14	1.54:1	68.8	64.7
2.29	3.08:1	58.2	46.1
2.86	3.86:1	41.0	39.0
4.29	5.79:1	28.5	35.0
5.71	7.72:1	25.1	33.5
7.14	9.65:1	24.5	33.2

The real heparin concentration in the assayed fractions was 100µg/mL. *The mole ratio of EDAC used by activation heparin's carboxyl groups (Hep-COOH) was calculate using molecular weights of 191.7 and 615 for EDAC and disaccharide unit of heparin, respectively.

3.2. Degradation Products

The heparinase act on the heparin producing principally Δ tetrasaccharides and Δ U,2S-GlcNS,6S. On the other hand, heparitinase II that act upon heparan sulphate produces Δ U-GlcNS,6S, Δ U-GlcNS, Δ U-GlcNAc,6S and others small products. However, the action of heparitinase II upon heparin produces Δ U,2S-GlcNS,6S and Δ U-GlcNS,6S [19].

The products formed by action of heparinase and heparitinase II upon heparin and carbodiimide-treated heparins are shown in the Figure 2. It can also be seen that the susceptibility of heparin to these heparin lyases was decreasing as the carbodiimide concentration for heparin modification increased. These resistance to degradation was accompanied by the reduction in the anticoagulant property (Table 2) of heparin. Then the degradability and anticoagulant activity of heparin were lost at high carbodiimide concentrations.

Abbreviations used: Δ U,2S-GlcNS,6S,O- α -L-ido(enepyransyluronic acid 2-O-sulfate)-(1-4)-2-sulfoamino-2-deoxy-D-glucose-6-O-sulfate; Δ U-GlcNS,6S, O-(enepyransyluronic acid)-(1-4)-2-sulfoamino-2-deoxy-D-glucose-6-O-sulfate; Δ U-GlcNS, O-(enepyransyluronic acid)-(1-4)-2-sulfoamino-2-deoxy-D-glucose; Δ U-GlcNAc,6S, O-(enepyransyluronic acid)-(1-4)-2-deoxy-2-acetamido-D-glucose-6-O-sulfate.

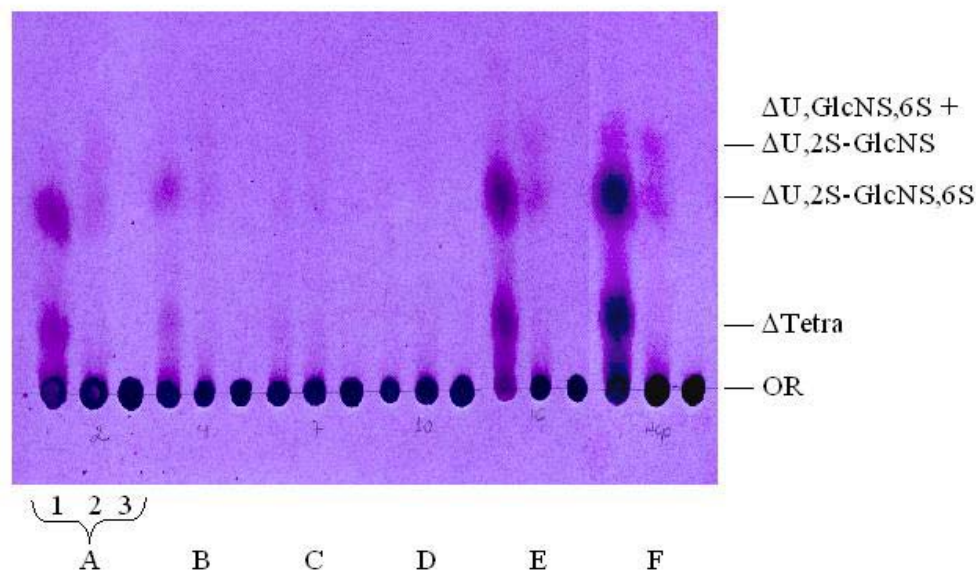


Figure 2. Paper chromatography of products formed by action of heparinase and heparitinase II upon heparin and carbodiimide-treated heparins. 100 μ g of heparin-treated with increased carbodiimide concentrations: 2 mg (A), 4 mg (B), 8 mg (C), 10 mg (D) and unmodified heparin 100 μ g (E), bovine mucosa heparin 100 μ g (F), were incubated with 0.1 U of heparinase (hpase) or 0.1 U of heparitinase II (Htase II) in ethylenediamine-acetate, pH 7.0 in a final volume of 30 μ l for 18h. 20 μ l of the incubation mixtures were then applied to Whatman N^o 1 paper and subjected to descending chromatography in isobutyric acid, 1 M NH₃, 5:3 v/v for 18 h. The products were identified after toluidine blue staining (1% in absolute ethanol) [19,21]. 1- Hpase, 2- Htase, 3- Control without enzyme.

Table 2. Effect of EDAC concentration on anticoagulant activity of heparin

EDAC concentration (mg/mL)	EDAC:Hep-COOH [#]	IU/mg
0.00	—	160
0.57	0.77:1	96
1.14	1.54:1	48
2.29	3.08:1	25

[#]The mole ratio of EDAC used by activation heparin's carboxyl groups (Hep-COOH) was calculate using molecular weights of 191,7 and 615 for EDAC and disaccharide unit of heparin, respectively. Test performed as describe in the US pharmacopeia [25].

3.3. Electrophoresis

The electrophoresis in the discontinuous system barium acetate/1,3-diaminopropane-acetate is showed in Figure 3. In this system the heparin is separated in three components: fast, intermediate and slow. However, the heparins treated with carbodiimide didn't show the slow component, which present the highest molecular weight and therefore high negative charge, carboxyl and sulfate groups. The others electrophoretic systems not presented difference in the electrophoretic behavior. Nevertheless, in all system was observed a reduction in the metachromatic activity, these feature was more pronounced at high concentrations of carbodiimide used for heparin activation, which was confirmed after densitometry at 540 nm. These results are in accordance with those of section 3.1.

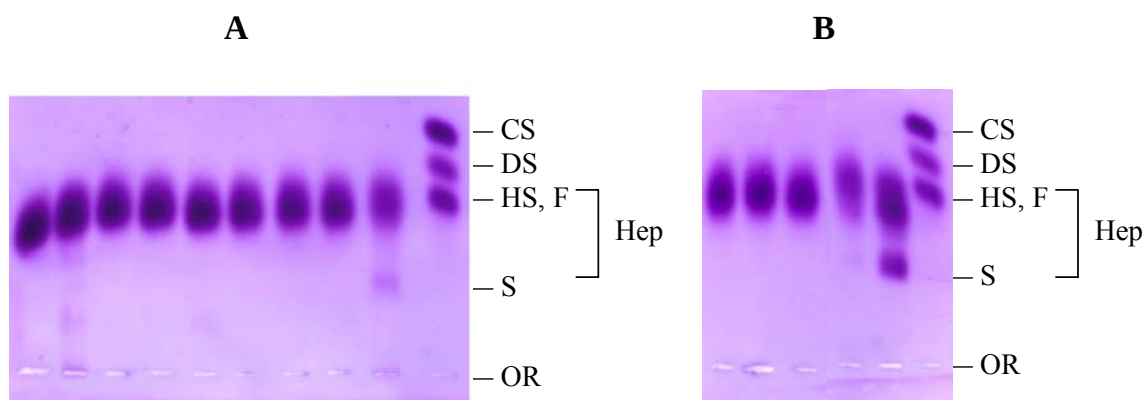


Figure 3. Agarose gel electrophoresis of heparin and carbodiimide-treated heparins. 10 µg of heparin-treated with increased carbodiimide concentrations: A) 2 mg (lane 1 and 2), 4 mg (lane 3 and 4), 5 mg (lane 5), 6 mg (lane 6), 8 mg (lane 7 and 8), bovine mucosa heparin 5 µg (lane 9), standards 15 µg (lane 10); B) 10 mg (lane 1,2 and 3), bovine mucosa heparin 5 µg (lane 4) and unmodified heparin 10 µg (lane 4), standards 15 µg (lane 6) were subjected to electrophoresis in discontinuous buffer 1,3-diaminopropane-acetate/barium acetate, as referred to in Section 2.5; Standards: mixture of heparan sulphate (HS), dermatan sulphate (DS) and chondroitin sulphate (CS). Hep, heparin; F, fast moving component; S, slow moving component; OR, origin.

3.4. Assignment Of Infrared Absorption Bands

Figure 4 shows the infrared spectra of sodium salt heparin and modified heparins with different amounts of carbodiimide. The broad band above 3000 cm^{-1} was assigned to hydroxyl-stretching vibrations of heparins. Unmodified heparin presented a band centered at 1624 cm^{-1} that

representing the antisymmetric stretching of carboxylate groups. The C-H stretching bands between 2800 and 3000 cm^{-1} showed very weak intensities. The absorbance due to S=O asymmetric stretching, at about 1236 cm^{-1} , and absorptions centered around 890 cm^{-1} (due to coupling of C–O–S and characteristic of heparin ring C–O–C) were observed in all spectra. These results also related by others authors [27,28]. The carboxy-group symmetric stretching band at 1425 cm^{-1} , decrease with modification of heparin. Grant et al. [28], showed that carboxy-group reduced heparin presented a decreased absorbance at 1430 cm^{-1} , which in the unmodified polymer, is due to symmetric stretching of the carboxy group. Nevertheless, the frequency of sulfate groups remains the same. The spectra of carbodiimide-treated heparin, apart from present a decrease at 1425 cm^{-1} band, showed the appearance of new bands at around 1640 cm^{-1} and 1565 cm^{-1} , which suggest be attributed to C=O (amide I) stretching N-H (amide II) bending vibrations respectively, due probably to formation of N-acylurea by reaction of carbodiimide with heparin.

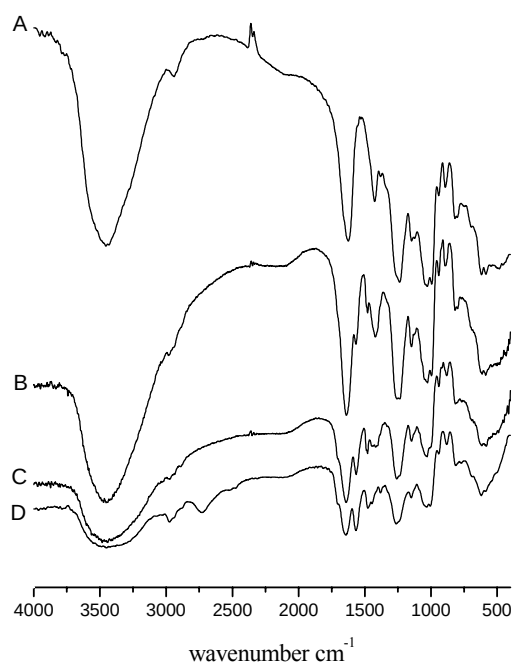


Figure 4. Infrared spectra of sodium salt heparin (A) and heparin treated with carbodiimide concentrations of 0.71, 1.43 and 2.86 mg/mL (B, C and D, respectively).

4. Discussion

A generally applied approach to improve the blood compatibility of biomaterials is covalent immobilization of heparin [29]. Heparin is an effective inhibitor of blood coagulation. Furthermore, immobilization of heparin is reported to reduce *in vitro* and *in vivo* platelet adhesion

and aggregation [30,31]. In general, the heparin's activities are due to the complex arrangement of its charges. However, not only charge combination is enough, but also the kind of charge. The carboxyl groups in the heparin molecule has an important role in the most heparin's activities, for instance, anticoagulant and haemorrhagic properties.

In the present study, the heparin modification with carbodiimide impaired its activities, i.e., dye fixation, anticoagulant and susceptibility to degradation. The change observed in the discontinuous electrophoretic system barium acetate/1,3 diaminopropane-acetate, probably was due a reduction in the interaction of heparin with barium, which is important in first stage of electrophoresis. However, the presence of carbodiimide adduct also would can interfere with interaction between the heparin and the diaminopropane in the second stage, although only in the diaminopropane-acetate system no one change was observed. Inoue and Nagasawa [32] reported that heparin electrophoretic behaviour on cellulose acetate membrane was different after its reaction with carbodiimide and this was more pronounced for O-acylurea derivative than for N-acylurea, since under basic conditions the O-acylurea of heparin was hydrolyzed to give N-acylurea, which contained only 30% of ureido residue per mol of uronic acid [32]. We also found a reduction in the metachromasia in all electrophoretic system tested, this is in accordance with the results of dye fixation performed in aqueous solution, which showed a decreased in dye activity of heparin treated with carbodiimide. It can be suggested that a steric hindrance instead of only displacement of the carboxyl groups by modification occur, because when the pH is bellow 3.0 in acidic condition, the carboxyl groups are protonated and, therefore they aren't involved in electrostatic interactions with dyes. However, in alkaline condition, pH above 8.0, all carboxyl groups are in salt form, so would can interact with dyes, nevertheless the dye activity was similar in either conditions.

When carbodiimide is used for heparin immobilization on biomaterials changes will occur in the structure and activity of heparin because the heparin's carboxyl groups are involved with the bond. Therefore, high amount of heparin on the biomaterials will be necessary to produce the desirable effect. Moreover, these biomaterials are resistant to enzymatic degradation, because the carboxyl groups in the iduronic or glucuronic acid residues are important for enzyme action. However, this is a good acquired property for biomaterials. Since of the most important disadvantages of the use of heparin is its rapid enzymatic degradation by heparinase [33]. The resistance to degradation by specific enzymes of biomaterials had been documented [34,35,36], in all carbodiimides were used for coupling production.

The dye fixation method for heparin quantification is often used, it is easy and inexpensive. Nevertheless, this method require a macromolecular structure of heparin for suitable

results [37]. Gitel [38] has related a decrease in the Azure A activity of heparin after treatment with carbodiimide. Rubinstein [18] also observed the same behaviour after cross-linked chondroitin sulfate with dicyclohexylcarbodiimide and 1,12-diaminododecane. Therefore, works that quantify the heparin on biomaterials through its dye fixation can misestimate the real amount. In some studies, a curve of ^3H -labeled heparin was constructed together with a dye calibration curve [39], however in others studies no one comment was made about that [40,41].

Wissink et al. [39], after immobilization of heparin to collagen matrices obtained improvement of anticoagulant activity. However, thrombin inactivation by matrices did not progressively increase with increasing amounts of immobilized heparin. They suggested that fact was due to decreased accessibility of the antithrombin III binding site and/or decreased thrombin binding to the immobilized heparin, caused by increased number of covalent bonds introduced between heparin and collagen.

The uronic acid unit of heparin is essential for anticoagulant activity [42], and carboxyl reduced heparin [43] had neither *in vitro* anticoagulant activity, nor antiproliferative effect on human smooth muscle cells [44]. Gitel et al. [38], Danishefsky and Siskovic [45] observed that heparin's anticoagulant activities were lost after reaction with carbodiimide. The first worked with the production of antibodies against heparin, and the second, looked for heparin derivatives with a prolonged *in vivo* anticoagulant effect. This indicates that the availability of carboxylate groups is indispensable for the anticoagulant activity of heparin. Formation of N-acylurea products from the reaction of a carboxylate with a carbodiimide in the absence of a nucleophile is well-documented [46,47]. The reactions of N-acetylchondrosine, N-acetylchondrosine 6-sulfate and heparin with EDC have been reported [32], in which putative O-acylurea products were isolated and then rearranged to the corresponding N-acylureas upon alkaline treatment with NaHCO_3 . Then, the condensation product of carbodiimide and heparin is an ester of the uronic acid group, that is, the O-acylurea and the product of alkaline migration is an amide of uronic acid group, the N-acylurea [32]. This amide perhaps is the reaction product of carbodiimide treated heparin, since that was observed in the I.R. spectra bands at around 1640cm^{-1} and 1565cm^{-1} , which probably are attributed to C=O (amide I) stretching N-H (amide II) bending vibrations, respectively.

5. Conclusions

In spite of well documented reaction of carbodiimide mediate coupling, every researcher perform it of several ways. Nowadays, heparin has been frequently used as an immobilising biomolecule for attaining the blood compatibility of biomaterials. Nevertheless, to exert this function efficiently, heparin should be with its binding sites available. Therefore, the amount of carbodiimide in the reaction, as well as, the formation of N-acylurea should be better evaluated affording as make the most of heparin. Here it observed that carbodiimide treated heparin had not the same physicochemical and biological properties of parent compound. In addition, dye activity could be useful tool for evaluate the biological activity of modified heparin.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Helena Bonciani Nader from the UNIFESP-EPM for critical reading of the manuscript and helpful suggestions.

References

- [1] Appelgren P, Ransjo V, Bindslev L, Espersen F, Larm O. Surface heparinization of central venous catheters reduces microbial colonization *in vitro* and *in vivo*: results from a prospective, randomized trial. Crit Care Med 1996;24:1482-1489.
- [2] Carraway KL, Koshland DE. Carbodiimide modification of proteins. Meth Enzymol 1972;25B:616-651.
- [3] O'Brien LM, Huggins CF, Pay PJ. Interactions regions in the A1 and A2 subunits of factor VIIIa identified by zero-length cross-linking. Blood 1997;90:3943-3950.
- [4] Kobayashi M, Chiba Y. Water-soluble carbodiimide for the fluorescent measurement of the carboxyl group produced by enzyme reactions. Anal Biochem 1994; 219:189-194.
- [5] Park KD, Yun JY, Han DK, Jeong SY, Kim YH, Choi KS, Kim HM, Kim HJ, Kim KT. Chemical modification of implantable biologic tissue for anti-calcification. ASAIO J 1994;40:M377-M382.
- [6] Girardot JM, Girardot MN. Method for fixation of biological tissue. US Patent No. 5447536, 1995.
- [7] Girardot JM, Girardot MN. Process for fixation of calcification resistant biological tissue. US Patent No. 5733339, 1998.

- [8] Olde Damink LHH, Dijkstra PJ, van Luyn MJA, van Wachen PB, Niewe-Huis P, Feijen J. *In vitro* degradation of dermal sheep collagen crosslinked using a water-soluble carbodiimide. *Biomaterials* 1996;17:679-684.
- [9] van Wachen PB, van Luyn MJA, Olde Damink LHH, Dijkstra PJ, Feijen J, Niewe-Huis P. Biocompatibility and tissue regenerating capacity of crosslinked dermal sheep collagen. *J Biomed Mater Res* 1994; 28:353-363.
- [10] Kuo J-W, Swann DA, Prestwich GD. Chemical modification of hyaluronic acid by carbodiimides. *Bioconjugate Chem* 1991;2:232-241.
- [11] van Wachen PB, Platinga JA, Wissink MJB, Beernink R, Poot AA, Engbers GHM, Beugeling T, van Aken WG, Feijen J, van Luyn MJA. *In vivo* biocompatibility of carbodiimide-crosslinked collagen matrices: effects of crosslink density, heparin immobilization, and bFGF loading. *J Biomed Mater Res* 2001;55:368-378.
- [12] Tsai CC, Chang Y, Sung HW, Hsu JC, Chen CN. Effects of heparin immobilization on the surface characteristics of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin): an *in vitro* study. *Biomaterials* 2001;22:523-533.
- [13] Kim YJ, Kang IK, Huh MW, Yoon SC. Surface characterization and *in vitro* compatibility of poly(ethylene terephthalate) immobilized with insulin and/or heparin using plasma glow discharge. *Biomaterials* 2000;21:121-130.
- [14] Jiao QC, Liu Q, Sun C, He H. Investigation on the binding site in heparin by spectrophotometry. *Talanta* 1999;48:1095-1101.
- [15] Jiao QC, Liu Q. Characterization of the interaction between methylene blue and glycosaminoglycans. *Spectrochim Acta A* 1999;55:1667-1673.
- [16] Templeton DM. General occurrence of isosbestic points in the metachromatic dye complexes of sulfated glycosaminoglycans. *Int J Biol Macromol* 1988;10:131-136.
- [17] Weisz PB, Hermann HC, Joullié MM, Kumor K, Levine EM, Macarak EJ, Weiner DB. *Angiogenesis: key principles-science-technology-medicine*. Basel: Marcell Dekker, 1992:107.
- [18] Rubinstein A, Nakar D, Sintov A. Chondroitin sulfate: a potential biodegradable carrier for colon-specific drug delivery. *Int J Pharm* 1992;84:141-150.
- [19] Nader HB, Porcionatto MA, Tersariol ILS, Pinhal MAS, Oliveira FW, Moraes CT, Dietrich CP. Purification and substrate specificity of heparitinase I and heparitinase II from *Flavobacterium heparinum*. *J Biol Chem* 1990;265:16807-16813.
- [20] Smith PK, Mallia AK, Hermanson GT. Colorimetric method for the assay of heparin content in immobilized heparin preparations. *Anal Biochem* 1980;109:466-473.

- [21] Silva ME, Dietrich CP. Structure of heparin characterization of the products formed from heparin by action of a heparinase and a heparitinase from *Flavobacterium heparinum*. J Biol Chem 1975;250:6841-6846.
- [22] Dietrich CP, McDuffie NM, Sampaio LO. Identification of acidic mucopolysaccharides by agarose gel electrophoresis. J Chromatogr 1977;130:299-304.
- [23] Dietrich CP, Paiva JF, Moraes CT, Takahashi HK, Porcionatto MA, Nader HB. Isolation and characterization of heparin with high anticoagulant activity from *Anomalocardia brasiliensis*. Biochim Biophys Acta 1985;843:1-7.
- [24] Bianchini P, Nader HB, Takahashi HK, Osima B, Straus AH, Dietrich CP. Fractionation identification of heparin and other acidic mucopolysaccharides by a new discontinuous electrophoretic method. J Chromatogr 1980;196:455-462.
- [25] United States Pharmacopoeia. The Pharmacopoeia of the United States of America. 17 rev. Easton, Mack Printing Company, 1965. p. 609-611.
- [26] Katayama T, Takai KI, Kariyama R, Kanamasa Y. Colloid titration of heparin using cat-floc (polydiallyldimethylammonium-chloride) as standard polycation. Anal Biochem 1978;88:382-387.
- [27] Lijour Y, Gentric E, Deslandes E, Guezennec J. Estimation of the sulfate content of hydrothermal vent bacterial polysaccharides by Fourier transform infrared spectroscopy. Anal Biochem 1994;220:244-248.
- [28] Grant D, Long WF, Moffat CF, Williamson FB. Infrared spectroscopy of heparins suggests that the region $750\text{-}950\text{ cm}^{-1}$ is sensitive to changes in iduronate residue ring conformation. Biochem J 1991;275:193-197.
- [29] Engbers GHM, Feijen J. Current techniques to improve the blood compatibility of biomaterial surfaces. Int J Artif Organs 1991;14:199-215.
- [30] Kashiwagi T, Ito Y, Imanishi Y. Non-thrombogenicity of organic polymers by blending with alkylamine-heparin complexes. Biomaterials 1993;14:1145-1153.
- [31] Erdtmann M, Keller R, Baumann H. Photochemical immobilization of heparin, dermatan sulphate, dextran sulphate and endothelial cell surface heparan sulphate onto cellulose membranes for the preparation of athrombogenic and antithrombogenic polymers. Biomaterials 1994;15:1043-1048.
- [32] Inoue Y, Nagasawa K. On the reaction of N-acetylchondrosine, N-acetylchondrosine 6-sulfate, chondroitin 6-sulfate, and heparin with 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide. Carbohydr Res 1982;111:113-125.
- [33] Abatangelo G, Barbucci R, Brun P, Lamponi S. Biocompatibility and enzymatic degradation studies on sulphated hyaluronic acid derivatives. Biomaterials 1997;18:1411-1415.

- [34] Park S-N, Park J-C, Kim HO, Song MJ, Such H. Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide. *Biomaterials* 2002;23:1205-1212.
- [35] Vercruysse KP, Prestwich GD. Hyaluronate derivatives in drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1998;15:513-555.
- [36] Tomihata K, Ikada Y. Crosslinking of hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide. *J Biom Mat Res* 1997;37:243-251.
- [37] Liu Q, Jiao Q. Mechanism of methylene blue action and interference in the heparin assay. *Spectrosc Lett* 1998;31:913-924.
- [38] Gitel SN, Medina VM, Wessler, S. Preparation and identification of a population of antibodies that recognize carbodiimide-modified heparin. *Blood* 1985;65:902-911.
- [39] Wissink MJB, Beernink R, Pieper JS, Poot AA, Engbers GHM, Beugeling T, van Aken WG, Feijen J. Immobilization of heparin to EDC/NHS-crosslinked collagen. Characterization and *in vitro* evaluation. *Biomaterials* 2001;22:151-153.
- [40] Tsai C-C, Chang Y, Sung H-W, Hsu J-C, Chen C-N. Effects of heparin immobilization on the surface characteristics of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin); an *in vitro* study. *Biomaterials* 2001;22:523-533.
- [41] Kim YJ, Kang I-K, Huh MW, Yoon S-C. Surface characterization and *in vitro* blood compatibility of poly(ethylene terephthalate) immobilized with insulin and/or heparin using plasma glow discharge. *Biomaterials* 2000;21:121-130.
- [42] Agarwal A, Danishefsky I. Requirement of free carboxyl groups for the anticoagulant activity of heparin. *Thrombo Res* 1986;42:673-680.
- [43] Taylor RL, Conrad HE. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reductions of their carbodiimide-activated carboxyl groups. *Biochemistry* 1972;11:1383-1388.
- [44] Wessel HP, Hosang M, Tschopp TB, Weimann B-J. Heparin, carboxyl-reduced sulfated heparin, and Trestatin A sulfate. Antiproliferative and anticoagulant activities. *Carbohydr Res* 1990;204:131-139.
- [45] Danishefsky I, Siskovic E. Heparin derivatives prepared by modification of the uronic acid carboxyl groups. *Thrombo Res* 1972;1:173-182.
- [46] Moench SJ, Saterlee JD, Erman JE. Proton NMR electrophoretic studies of the covalent complex formed by cross-linking yeast cytochrome C peroxidase and horse cytochrome C with a water-soluble carbodiimide. *Biochemistry* 1987;26:3821-3826.
- [47] Millet F, Darley-USmar V, Capaldi RA. Cytochrome C is cross-linked to subunit II of cytochrome C oxidase by a water-soluble carbodiimide. *Biochemistry* 1982;21:3821-3862.

5- CONCLUSÃO

- Os resultados da eletroforese indicam a formação do conjugado heparina-gentamicina e os espectros de infravermelho sugerem a presença de ligação amida.
- As eletroforeses e os testes de fixação aos corantes corroboram a modificação química da heparina ativada.
- Os ensaios anticoagulantes das heparinas ativadas e os ensaios de fixação aos corantes podem ser inter-relacionados, ou seja, dependendo da fixação da heparina modificada ao corante, é possível prever sua atividade biológica.
- A atividade antimicrobiana, além de confirmar a presença do antibiótico após a diálise, mostra que o processo de imobilização provavelmente não inativa a gentamicina.
- A reação com a ninidrina mostrou-se útil para determinar a presença do antibiótico, bem como estimá-lo.
- Os estudos de degradação mostraram que o conjugado é estável a ação das liases da heparina, e isto pode indicar uma estabilidade também *in vivo*.