

FARMACOCINÉTICA DA ASSOCIAÇÃO DE GLUCOSAMINA E SULFATO DE CONDROITINA EM HUMANOS SADIOS DO SEXO MASCULINO

PHARMACOKINETIC PROFILE OF GLUCOSAMINE AND CHONDROITIN SULFATE ASSOCIATION IN HEALTHY MALE INDIVIDUALS

ODALY TOFFOLETTO¹, AGOSTINHO TAVARES², DULCE ELENA CASARINI³, BEATA MARIE REDUBLO⁴, ARTUR BELTRAME RIBEIRO⁵

RESUMO

A osteoartrite é uma doença crônica das articulações que, uma vez instalada, leva seus portadores a uma incapacidade funcional progressiva. Como os proteoglicanos sulfato são os maiores constituintes das cartilagens, espera-se que com a ingestão de glucosamina e condroitina haja uma melhora das condições biológicas desse tecido. Uma vez que não temos conhecimento de estudo da farmacocinética da administração oral dessa associação em seres humanos, o objetivo deste trabalho foi avaliá-la utilizando a associação entre o sulfato de glucosamina (SG) e o sulfato de condroitina (SC) administrada a dois grupos de doze voluntários sadios do sexo masculino (grupo I uma cápsula de 500 mg SG; 400 mg SC) e grupo II quatro cápsulas). Amostras de sangue foram retiradas a intervalos de tempo pré-definidos até 48 horas pós-dose. O SG e o SC foram dosados no plasma pelo método de DMMB (azul de 1,9, dimetildimetileno). A concentração máxima foi atingida em 2 horas (média \pm SE; $0,893 \pm 0,093 \mu\text{g}/\text{mL}$, grupo I e $2,222 \pm 0,313 \mu\text{g}/\text{mL}$, grupo II). As áreas sob a curva até 48 horas foram de $10,803 \pm 0,965 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ e $38,776 \pm 2,981 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$, respectivamente para os grupos I e II. Os dois grupos apresentaram um segundo pico após 18 horas, indicando circulação entero-hepática. Os nossos resultados indicam que essa associação é absorvida por via oral por mecanismo saturável, o que pode facilitar o seu uso em tratamentos clínicos.

Descritores: Osteoartrite; Sulfato de condroitina; Glucosamina; Proteoglicanos

SUMMARY

Osteoarthritis is a chronic joint disease that, once patent, leads to a progressive functional disability. As proteoglycans sulfates are the major contents of the cartilage, it is expected that the ingestion of glucosamine and chondroitin might improve the biological status of that tissue. As we could not find any studies on the pharmacokinetic profile of this association by oral administration route in human beings, the objective of this study was to evaluate it by using the association of glucosamine sulfate (GS) and chondroitin sulfate (CS) given to two groups of twelve healthy male volunteers (group I: one capsule containing 500 mg of GS and 400 mg of CS; group II: four capsules with the same content). Blood samples were collected at pre-determined time intervals up to 48 hours post-dosing. GS and CS were measured in plasma by the DMMB (1,9, dimethyl-dimethylene blue) method. Maximum concentration was achieved within 2 hours (average \pm SE; $0.893 \pm 0.093 \mu\text{g}/\text{mL}$, group I; and $2.222 \pm 0.313 \mu\text{g}/\text{mL}$, group II). Areas under curve up to 48 hours were $10.803 \pm 0.965 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ and $38.776 \pm 2.981 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ for groups I and II, respectively. Both groups showed a second peak after 18 hours, indicating an enterohepatic flow. Our results indicate that this association is absorbed through the oral route by a saturable mechanism, which can enable its use in clinical treatments.

Keywords: Osteoarthritis; Chondroitin Sulfate; Glucosamine; Proteoglycans

INTRODUÇÃO

A osteoartrite é uma doença crônica das articulações que leva seus portadores a uma incapacidade funcional progressiva. A doença não é sinônimo de envelhecimento, mas, uma vez instalada, progride com a idade⁽¹⁻³⁾. Ela está relacionada com a perda da capacidade funcional das articulações, e é caracterizada por dor constante. A ausência de cura da osteoartrite faz com que somente a dor seja tratada por meio de agentes tópicos,

antiinflamatórios, analgésicos tipo opióide e -adrenérgicos, agentes intra-articulares, como depocorticosteróides, hialuronato e radionucleotídeos de emissão beta. Têm sido utilizados também glicosaminoglicanos sulfatados como sulfato de condroitina (CS) e de glucosamina (GS)⁽⁴⁻⁶⁾. Por outro lado, o tratamento cirúrgico por meio de desbridamentos, ostertomias e próteses totais têm surtido bons efeitos.

Glucosamina (N-acetil-glucosamina) é um produto do metabo-

Trabalho realizado no Hospital do Rim e Hipertensão - Rua Borges Lagoa, 960 - 04038-002 - São Paulo, SP - Brasil - Disciplina de Nefrologia - Universidade Federal de São Paulo

Endereço para Correspondência: Rua Pedro de Toledo, 720 - 2º andar - CEP: 04044-000

1. Doutora em Ciências, Coordenadora de Pesquisa Clínica Hospital do Rim e Hipertensão - Fundação Oswaldo Ramos
2. Doutor em Medicina, Professor Adjunto Disciplina de Nefrologia UNIFESP-EPM
3. Doutora em Ciências, Pesquisadora Disciplina de Nefrologia UNIFESP-EPM
4. Doutor em Medicina, Disciplina de Nefrologia UNIFESP-EPM
5. Doutor em Medicina, Professor Titular Disciplina de Nefrologia UNIFESP-EPM

Trabalho recebido em: 06/05/05 aprovado em 13/06/05

lismo da glicose e este produto de degradação é um dos constituintes dos galato e glicosaminoglicanos⁽⁶⁾. Os glicosaminoglicanos são polímeros lineares compostos por unidades dissacarídicas repetitivas onde uma das unidades é invariavelmente uma hexosamina (D-glucosamina ou D-galactosamina) e a outra um ácido hexurônico (glucurônico ou idurônico) ou uma galactose em seqüência não ramificada apresentando substituições de grupos sulfatos em várias posições da cadeia polissacarídica⁽⁷⁾. As três unidades dissacarídicas: N-acetil-galactosamina-ácido hexurônico; N-acetil-glucosamina-ácido hexurônico e N-acetil-glucosamina-galactose representam as unidades básicas na formação da cadeia dos glicosaminoglicanos. Os galactosaminoglicanos, cuja hexosamina será sempre uma D-galactosamina, são constituídos pela família das condroitinas sulfato e os glicosaminoglicanos, cuja hexosamina será sempre uma D-glucosamina, são constituídos pelo ácido hialurônico, heparina sulfato, heparina e queratina sulfato.

Na classe das condroitinas iremos encontrar as condroitina não sulfatadas, 4-sulfatadas, 6-sulfatadas e o dermatam sulfato⁽¹⁾.

As condroitinas sulfato são formadas por unidades dissacarídicas repetitivas de ácido glucurônico unidos por uma N-acetilgalactosamina e apresentam um éster sulfato na posição 4- ou 6- e por isso o polissacarídeo formado recebe a designação de condroitim 4-sulfato ou 6-sulfato.

As cadeias das condroitinas sulfato variam em seu comprimento médio de um tecido para outro ou dentro do mesmo tecido. Em geral, a massa molecular média das cadeias das condroitinas sulfato diminui do jovem para o adulto, na cartilagem articular⁽⁸⁾. Com exceção do ácido hialurônico todos os glicosamino e /ou galactosaminoglicanos são encontrados na forma de proteoglicanos.

Os tipos de proteoglicanos na cartilagem apresentam-se com diferentes volumes hidrodinâmicos, fato este ligado ao número de cadeias de glicosaminoglicanos. É importante lembrar que a maior parte dos glicosaminoglicanos encontrados em ossos e cartilagens é constituída por condroitins sulfato.

Proteoglicanos (PGs) são macromoléculas complexas que contêm um esqueleto protéico com uma ou mais cadeias de glicosaminoglicano, ligado covalentemente⁽⁹⁻¹³⁾. O esqueleto protéico dos proteoglicanos tem uma localização central na molécula e, freqüentemente, fica apoiado a um "berço" formado pelas cadeias dos glicosaminoglicanos.

Nas cartilagens, os condrocitos sintetizam os vários tipos de proteoglicanos que formam juntos com a matriz colagênica um complexo supramolecular que dão a este tecido a função de uma mola biológica capaz de resistir a forças de alta compressão, além de estarem envolvidos no crescimento e remodelação do tecido. As cartilagens têm um altíssimo teor de proteoglicanos que são responsáveis pela sua estrutura morfológica e pela nutrição das células cartilaginosas.

Como os proteocondroitins sulfato são os maiores constituintes das cartilagens, espera-se que fornecendo glucosamina e condroitina, haja uma melhora das condições biológicas do tecido. Entretanto, há controvérsias quanto a proposta sobre os benefícios do tratamento com glucosamina e condroitina nos pacientes com osteoartrite⁽¹⁴⁻¹⁷⁾. O presente estudo mostra que a administração de sulfato glucosamina associada do sulfato de condroitina sulfato é absorvida por via oral por indivíduos saudáveis.

CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

Casuística

Este protocolo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinque, expressos nas Resoluções 196/96 e 251/97 do CNS/MS – Normas de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos. O protocolo experimental e o termo de consentimento livre e esclarecido

(TCLE) foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital do Rim e Hipertensão, credenciado pelo CONEP/Ministério da Saúde. Foram incluídos no estudo voluntários saudáveis do sexo masculino, idade entre 18 e 45 anos, índice de massa corpórea (IMC) entre 19 e 25. Foram excluídos indivíduos com anormalidades clinicamente significativas nos exames bioquímicos, hematológicos e de urina I, presença de doença gastrintestinal, cardiovascular, hepática, hematopoiética, renal ou respiratória ou, ainda, história de alergia ao SC e ao SG. Outros critérios de exclusão foram: exposição recente (menos do que 3 meses) a drogas experimentais ou não, ingestão recente ou história de abuso de álcool ou de drogas ilícitas, fumantes, doação recente (menos do que 3 meses) de sangue, sorologia positiva para HIV e hepatites B e C. O estudo foi conduzido na Unidade de Farmacologia Clínica do Hospital do Rim e Hipertensão, de acordo com as normas de Boas Práticas Clínicas e o TCLE foi assinado por todos os voluntários incluídos antes do início do estudo.

Desenho do estudo

O estudo foi aberto, randomizado, dose única, um período. Vinte e quatro voluntários foram divididos aleatoriamente em dois grupos de 12 indivíduos. O grupo I (GI) recebeu 1 cápsula 500 mg de SC e 400 mg SG e o grupo II (GII) recebeu 4 cápsulas. Os voluntários foram internados na véspera da administração do medicamento. A administração foi feita às 7:00 da manhã após 10 horas de jejum. Os voluntários permaneceram sentados durante as 4 horas seguintes. Refeições padronizadas foram servidas 4, 7, 11, 13, 24, 28, 31, 35, 37 e 48 horas após a administração do medicamento.

Coleta e manipulação das amostras

As amostras de sangue dos voluntários deste estudo foram coletadas antes da administração do medicamento (coleta basal) e 0,5, 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36, 48 e 168 horas após. em tubos Vacutainer, perfazendo um total de 15 alíquotas. Como anticoagulante utilizou-se o EDTA. As amostras foram coletadas durante a internação dentro de 2 minutos do tempo determinado, mantidas em gelo e centrifugadas (10 minutos a 720 x g, 4°C). O plasma separado foi congelado em 2 (duas) alíquotas e mantido a -20°C até o momento da análise. O tempo entre a coleta do sangue e o congelamento do plasma não ultrapassou 30 minutos.

Método Analítico

O SG e o SC foram dosados pelo método que utiliza o azul de 1,9-dimetildimetileno⁽¹⁸⁾ (DMMB), desenvolvido para a determinação de glicosaminoglicanos sulfatados. O método, validado de acordo com normas da ANVISA, baseia-se em extração líquido-líquido e quantificação por espectrofotometria. O método é linear entre 0,5 e 5,0 µg/mL. Tanto o SG quanto o SC são estáveis no plasma nas condições do ensaio, a três ciclos de congelamento/descongelamento, à luz e até 3 meses de armazenamento a -20°C. A precisão intraensaio varia de 3,1 a 9,0% e interensaio de 2,9 a 13,9%; a exatidão intraensaio varia de 90 a 110% e interensaio de 100 a 115%.

Extração da Glucosamina e Condroitina

A cada alíquota de 2 mL de amostra de plasma foi adicionada 1 mg de papaína dissolvida em tampão fosfato:cisteína, pH 6,5 contendo EDTA 0,10 M. As amostras foram incubadas a 55°C durante 16 horas. Após incubação foram adicionados 500 µL de NaCl 4 M e, após agitação, o equivalente a 10% do volume total de ácido tricloroacético (TCA) 90%. O sobrenadante foi precipitado com etanol absoluto (3 vezes o volume) por 16 h a -20°C. O precipitado foi seco a vácuo e ressuspenso em 100 µL de água. Às amostras diluídas em água foi adicionado 1 mL do reagente

DMMB seguido de suave agitação. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 525 nm, dentro de 3 minutos da adição do DMBB. A curva padrão foi feita utilizando solução de condroitina sulfato SC (Achê Laboratórios Farmacêuticos).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Casística

Os dados antropométricos dos voluntários saudáveis que participaram do estudo estão resumidos na Tabela 1. Pode-se observar que a população de estudo é homogênea e os dois grupos são semelhantes.

Ensaio Clínico

Os voluntários foram observados durante a interação e especificamente argüidos sobre eventos adversos a cada 4 horas.

Durante esse período, não foram observados eventos adversos. Após 7 dias da alta hospitalar, os voluntários retornaram para exames bioquímicos, ECG e exame clínico, quando receberam alta do estudo.

Cinética Plasmática

A Figura 1A mostra a média±SE dos resultados brutos dos dois grupos (incluindo a concentração endógena). Após administração oral, a concentração plasmática aumenta, atingindo o máximo após 2 horas ($T_{máx}$), decrescendo até o mínimo após 8 horas da administração, tanto no grupo I quanto no grupo II. Segue-se um segundo pico, após 18 horas de administração, provavelmente devido à re-circulação entero-hepática⁽¹⁹⁾. A Figura 1B exibe a média±SE do resultado líquido, isto é, após desconto da concentração basal (endógena).

Idade (anos)	Peso (kg)	Altura (m)	IMC (kg/m ²)	Idade (anos)	Peso (kg)	Altura (m)	IMC (kg/m ²)	
média:	26	67,2	1,74	22,12	29	67,4	1,73	22,49
SD:	7	7,1	0,04	1,81	9	10,0	0,08	2,10
SE:	2	2,7	0,20	1,35	3	3,2	0,29	1,45
mínimo:	19	59,4	1,68	19,85	20	52,4	1,62	19,29
mediana:	24	65,9	1,74	21,49	28	65,2	1,72	22,54
máximo:	45	84,7	1,84	25,00	45	86,5	1,86	25,00

Tabela 1 - Dados antropométricos dos voluntários.

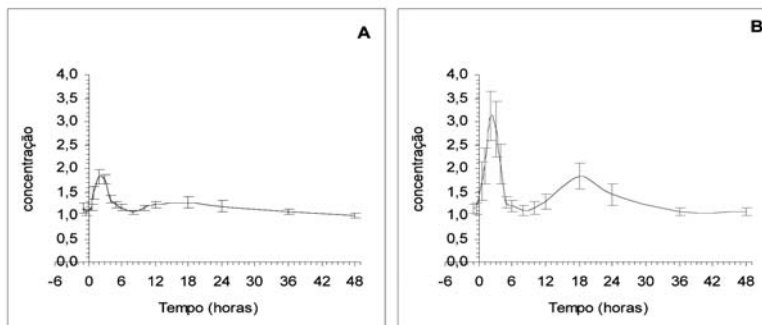


Figura 1 - Cinética plasmática da associação entre sulfato de glucosamina 500 mg e sulfato de condroitina 400 mg, cápsulas. Os pontos representam a média±SE de 12 (doze) voluntários. A. grupo I (1 cápsula); B. grupo II (4 cápsulas).

	GI	GII	GII/GI
(CS) dosagem (µg/kg)	5952,4±628,9	23738,9±3522,1	4,0
(SC) dosagem (µg/kg)	7440,5±786,1	29673,6±4402,6	4,0
$C_{máx}$ (µg/mL)	0,893±0,093	2,222±0,313	2,4
AUC_{0-t} (µg-hr/mL)	10,803±0,965	28,543±6,704	2,6
AUC_{0-inf} (µg-hr/mL)	12,000±1,072	38,776±2,981	3,2
C_{18h} (µg/mL)	0,365±0,041	0,974±0,198	2,7
meia-vida (h)	16,931±1,902	25,515±2,560	1,5
$C_{18}/C_{máx}$	0,41	0,44	1,0

Tabela 2 - Parâmetros farmacocinéticos calculados descontando-se a concentração basal (endógena). Os dados representam a média ± SE de cada grupo. CS, condroitim sulfato; SG, sulfato de glucosamina. GI, grupo 1, administrada uma cápsula; GII, grupo 2, administradas quatro cápsulas.

O $C_{máx}$ observado (acima da concentração basal) foi de $0,893 \pm 0,093 \mu\text{g/mL}$ e $2,222 \pm 0,313 \mu\text{g/mL}$ e a AUC_{0-48h} $10,803 \pm 0,965 \mu\text{g-h/mL}$ e $28,543 \pm 6,704 \mu\text{g-h/mL}$ (média ±SE), respectivamente para GI e GII. Após 18 horas de administração a concentração foi de $0,365 \pm 0,041 \mu\text{g/mL}$ e $0,974 \pm 0,198 \mu\text{g/mL}$, GI e GII, respectivamente.

A Tabela 2 resume a média±SE dos parâmetros calculados desconsiderando a concentração plasmática basal (endógena).

A cinética de absorção do SC e do SG não é linear, como indicado pela relação entre os $C_{máx}$ e as AUC_{0-48h} (2,389 e 2,642, respectivamente, Tabela 2). Essa relação se mantém no pico de 18 horas, resultante de recirculação entero-hepática

(2,668), o que reforça a evidência de que a etapa de absorção é limitante. Além disso, a meia-vida também é dependente da dose ($16,931 \pm 1,902$ h e $25,515 \pm 2,560$ h, respectivamente para 1 e 4 cápsulas).

CONCLUSÃO

Os nossos resultados indicam que a dose única de até quatro cápsulas de 500 mg SC associada a 400 mg SG é bem tolerada e o perfil encontrado é consistente com administração a cada 12 horas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Achê Laboratórios Farmacêuticos pelo patrocínio e apoio deste estudo e Dra. Mônica V. Marquezim Dra. em Ciências pela cuidadosa revisão dos resultados do estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee. Arthritis & Rheumatism. 43, 1905-1915, 2000
- Altman RD, Lozada CJ. Practice guidelines in the management of osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage. Suppl A:22-4. 1998.
- Vannucci A.B. Osteoartrite. Rev. Bras. Med. 59, 36 – 46, 2002.
- Update: Treatment of Osteoarthritis. Arthritis & Rheumatology. 47, 686 – 690, 2002.
- Oegema TR, Deloria LB, Sandy JD and Hart DA. Effect of oral glucosamine on cartilage and meniscus in normal and chymopapain-injected knees of young rabbits. Arthritis & Rheumatology. 46, 2495 – 2503, 2002.
- Pavelka K, Gatterova J, Olejarova M, Machacek S, Giacomelli G, Rovati LC. Glucosamine sulfate use and delay of progression of knee osteoarthritis: a 3-year, randomized, placebo-controlled, double-blind study. Arch Intern Med. 2002 Oct 14;162(18):2113-23.
- Carney, S. L. & Muir, H. The structure and function of cartilage proteoglycans. Physiol. Rev. 68:858-910, 1988
- Mathews, M. B. & Glacov, S. Acid mucopolysaccharide patterns in aging human cartilage. J. Clin. Invest. 45: 1103-1111, 1968.
- Hascall, V. C. & Kimura, J. H. Proteoglycans: Isolation and Characterization. Methods Enzymol. 82A: 769-800, 1982
- Heinegård, D. & Oldberg, Å. Structure and Biology of Cartilage and Bone Matrix Noncollagenous Macromolecules. Faseb J. 3: 2042-2051, 1989.
- Ruoslahti, E. & Yamaguchi, Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. Cell 64: 867-869, 1991.
- Kjellén, L. & Lindahl, V. Proteoglycans: Structures and interactions. Annu Rev. Biochem. 60:443-475, 1991.
- Yanagishita, M. Function of proteoglycans in the extracellular matrix. Acta Pathologica Japonica. 43:283-293, 1993.
- Owens S, Wagner P, Vangness CT Jr. Recent advances in glucosamine and chondroitin supplementation J Knee Surg. 2004 Oct;17(4):185-93.
- Shikman AR, Amiel D, D'Lima D, Hwang SB, Hu C, Xu A, Hashimoto S, Kobayashi K, Sasho T, Lotz MK. Chondroprotective activity of N-acetylglucosamine in rabbits with experimental osteoarthritis. Ann Rheum Dis. 2005 Jan;64(1):89-94.
- Van Linthout D, Gerster JC. Slow-acting anti-rheumatic agents: recent developments Rev Med Suisse Romande. 2004 Sep;124(9):565-7.
- Christgau S, Henrotin Y, Tanko LB, Rovati LC, Collette J, Bruyere O, Deroisy R, Reginster JY. Osteoarthritic patients with high cartilage turnover show increased responsiveness to the cartilage protecting effects of glucosamine sulphate. Clin Exp Rheumatol. 2004 Jan-Feb;22(1):36-42.
- Farndale RW, Buttle DF, Barrett AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. Biochim. Biophys. Acta, 1986, 883:173-177
- Hofmann, A.F. The enterohepatic circulation of bile acids in health and disease. In, Gastrointestinal Disease, 5th edition (Sleisinger, M.H., and Fordtran, J.S., eds.) W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1993, pp. 127-150.