

2 Transporte de Fármacos

2.1 Dendrímeros

2.1.1 Carreadores de Medicamentos

Nanopolímeros carreadores de fármacos são uma grande promessa nos dias atuais por transportarem medicamentos até o alvo de interesse, diminuindo assim os efeitos colaterais (Hannah et al., 2007) (Fréchet, 2005) (Emmanuele, 2005) (Ding et al., 2012).

Uma analogia pode ser feita com a guerra entre os antigos troianos e gregos. Nesta guerra um grande cavalo de madeira foi construído pelos gregos e apresentado aos troianos. A estratégia era o fato de o cavalo ter escondido em seu interior soldados gregos que, assim, conseguiram entrar em Tróia sem que os soldados troianos oferecessem resistência. Tão logo os soldados troianos adormeceram os inúmeros soldados gregos saíram do cavalo e a batalha foi facilmente vencida pelos gregos. Deste modo funciona um nanotransportador, liberando de forma controlada várias moléculas do medicamento no alvo desejado. Devido a este fato podemos citar algumas de suas vantagens:

- 1) Aumentam a atividade terapêutica por liberarem a droga no local indicado;
- 2) Prolongam a atividade da droga no organismo por tornarem possível a sua liberação de forma controlada;
- 3) Reduzem a toxicidade por reduzirem o metabolismo da droga, evitando que atinja órgãos não desejados.

O mecanismo de entrega da droga depende das características do nanotransportador e do alvo de ação podendo ser utilizadas as vias normais de administração para a inserção destes carreadores no organismo como, por exemplo, nasal, oral, vaginal, retal, intradérmica, transdérmica e intravenosas.

2.1.2 Dendrímeros

O termo dendrímero é derivado das palavras gregas *dendrom* e *mero* que significam árvore e partes, respectivamente.

A síntese do dendrímero é feita a partir de um núcleo polifuncionalizado, às camadas, através de reações repetitivas que multiplicam a cada etapa, o número de grupamentos funcionais da superfície, formando as gerações de números crescentes (Majoros, 2008) (Walter & Michael, 2012). Dependendo do núcleo, tendem a uma geometria esférica que possui cavidades no seu interior e uma superfície altamente funcionalizada.

Nos dendrímeros, podem ser identificadas três regiões distintas: o núcleo, o interior e a superfície como indica a figura 1. A geometria e reatividade dos dendrímeros são definidas pela escolha das funções químicas que irão compor estas três regiões.

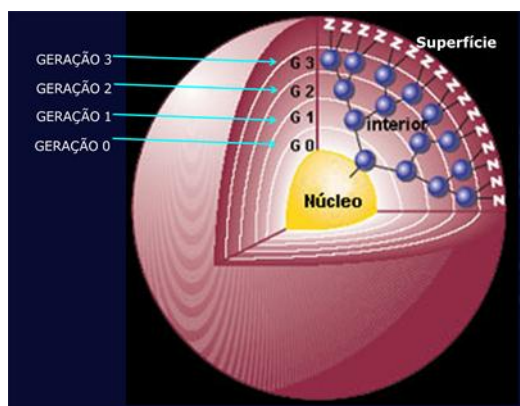


Figura 1: Representação esquemática das partes de um dendrímero (núcleo, interior e superfície).

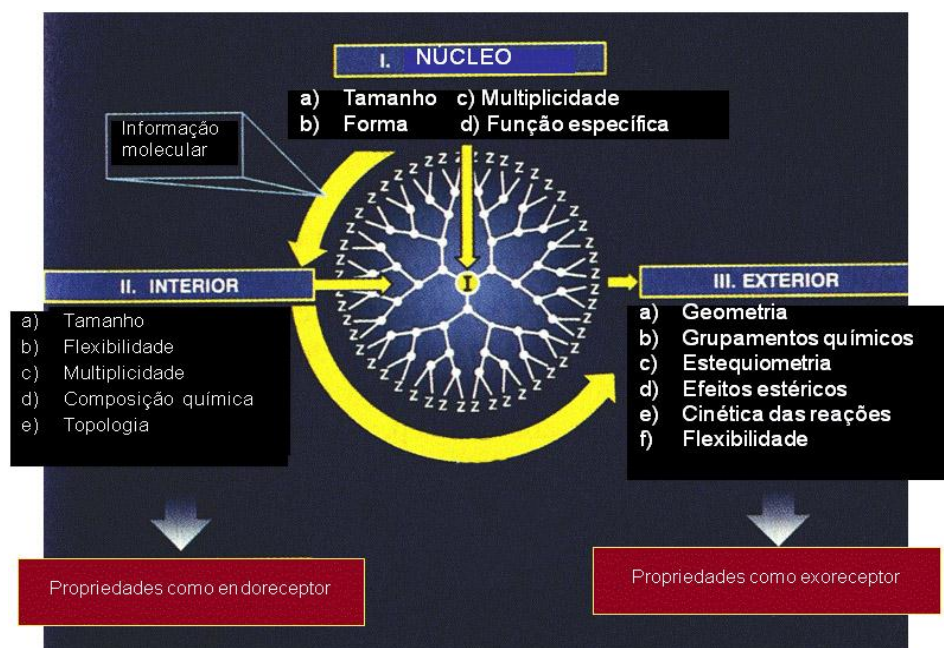
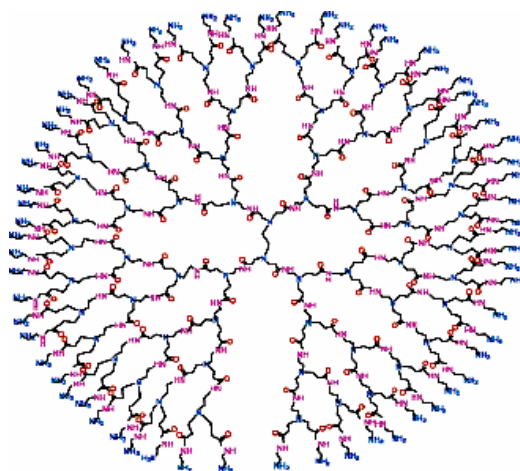
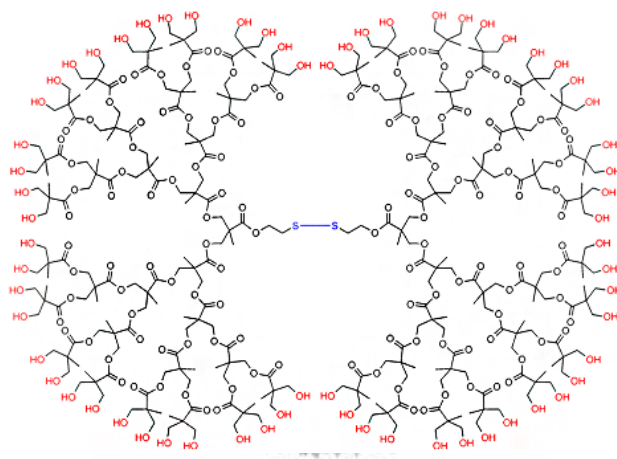


Figura 2: Representação esquemática da estrutura do dendrímero.

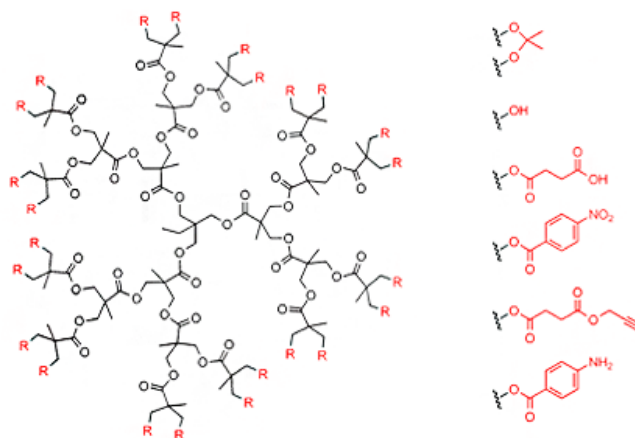
Alguns tipos de dendrímeros são comercializados por empresas especializadas como, por exemplo, os dendrímeros do tipo PAMAM pela empresa Dendritech, do tipo poli(propilenoimina), PPI, também chamado de Astramol ou DAB-Am-X, comercializados pela SyMO e dendrímeros do tipo poliéster comercializados pela POLYMER FACTORY (Figura 3, a, b e c, respectivamente). Todos estes dendrímeros são comercializados com diferentes tipos de núcleo e grupos de superfície. Esta grande variedade de grupos funcionais e núcleos dos dendrímeros fazem com que estas estruturas possam ser usadas para uma vasta gama de aplicações.



(a)



(b)



(c)

Figura 3: Representação de dendrímeros com diferentes características.

2.1.3 Dendrímeros PAMAM

Os dendrímeros do tipo PAMAM poli(amidoamina), foram os primeiros a serem sintetizados, em 1983 por Donald A. Tomalia (Tomalia, Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomicry to drug delivery and biomedical applications, 2001).

Tomalia utilizou o método denominado divergente, ou seja, partindo de um núcleo polifuncionalizado (amônia, etilenodiamina, por exemplo) e adicionando camadas através de reações repetitivas, formando as gerações crescentes G1, G2, G3.

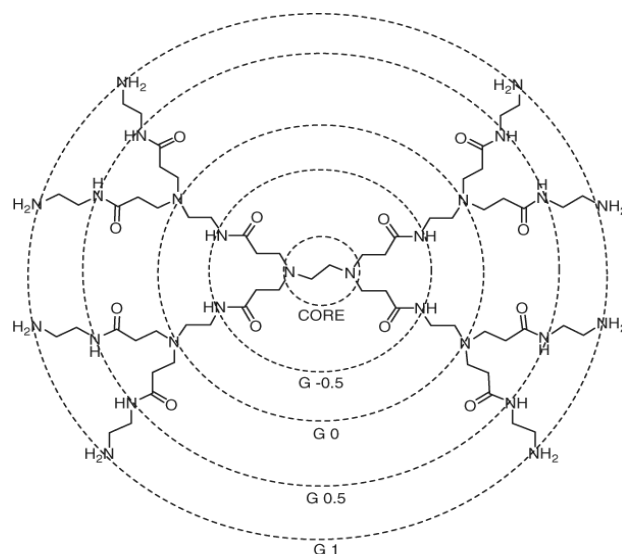


Figura 4: Dendrímtero de Geração 1. Fonte: (Prabal, 2005).

O crescimento do dendrímtero PAMAM é limitado pelo congestionamento da superfície, quando nenhuma reação adicional é possível devido ao impedimento estérico. A maior geração alcançada é a geração 10 (G10). O quadro da Tabela 1 ilustra o número de grupamentos da superfície, peso molecular e diâmetro das gerações crescentes do dendrímtero PAMAM.

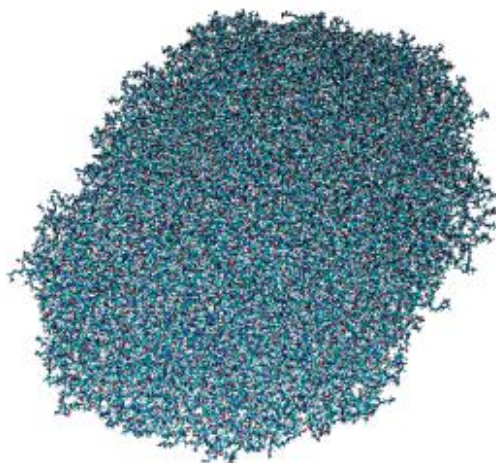


Figura 5: Representação de um dendrímtero PAMAM de geração 10.

N ^o DA GERAÇÃO	PM	N ^o DE GRUPOS CARBOXILA NA SUPERFÍCIE DO DENDRÍMERO	N ^o DE GRUPOS AMINO NA SUPERFÍCIE DO DENDRÍMERO	DIÂMETRO MÉDIO (Å)
0,5	1.269	8		
1,0	1.429		8	22
1,5	2.935	16		
2,0	3.256		16	29
2,5	6.011	32		
3,0	6.909		32	36
3,5	12.419	64		
4,0	14.215		64	40
4,5	26.258	128		
5,0	28.826		128	53
5,5	50.865	256		
6	58.048		256	67
7	116.493		512	81
8	233.383		1024	97
9	467.162		2048	
10	934.720		4096	135

Tabela 1: Tabela representativa das propriedades do dendrímero PAMAM.

2.1.4 Matemática do Dendrímero PAMAM

O número de ligações covalentes existentes em cada geração, bem como o número de aminas primárias terminais ou de aminas terciárias e amidas do interior do dendrímero PAMAM podem ser calculadas a partir de fórmulas propostas por Tomalia (Tomalia, 2001).

- 1) Número de grupos na superfície

$$N_s = N_c N_b^G \quad (1)$$

- 2) Número de ligações covalentes formadas a cada geração

$$N_{cov} = \frac{N_b^G - 1}{N_b - 1} \quad (2)$$

- 3) Número de aminas Terciárias

$$N_t + N_c \frac{N_b^G - 1}{N_b - 1} \quad (2)$$

Onde N_c é o número de átomos do núcleo, N_b é o número de ramificações que partem de cada braço, G a geração. N_t número de aminas terciárias no núcleo.

2.1.5 Propriedades Estruturais

A síntese do dendrímero PAMAM é feita a partir de um núcleo poliaminado, através de duas reações subsequentes, reação com acrilato de metila seguida da reação com etilenodiamina, onde a segunda reação é responsável pela duplicação da funcionalidade como mostra a Figura 6.

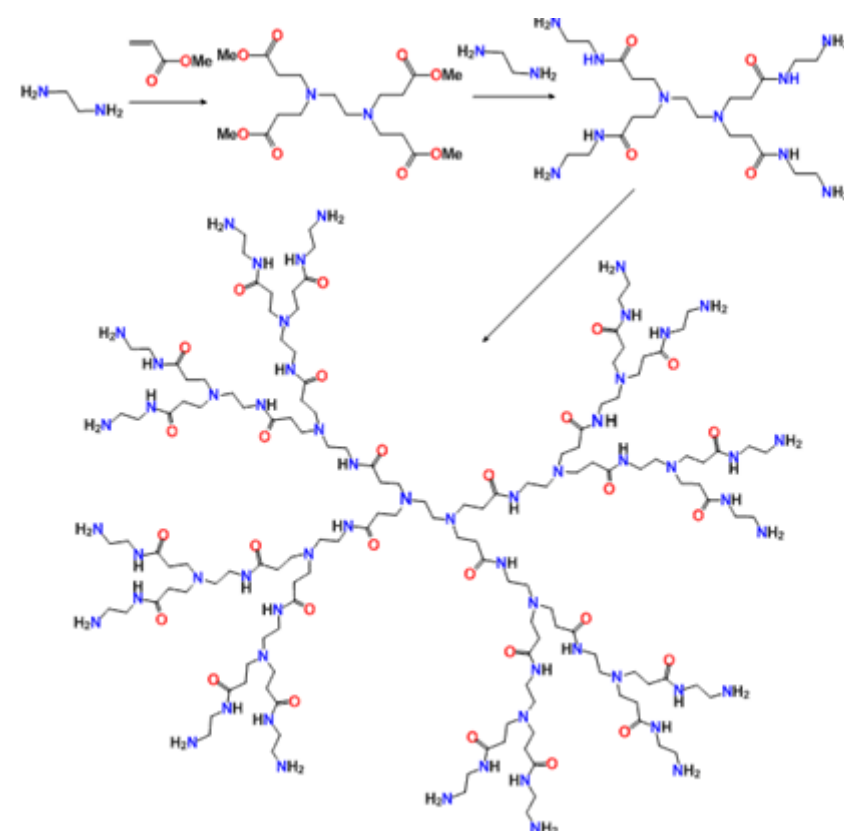


Figura 6: Reações sucessivas da formação do dendrímero PAMAM.

As gerações de número inteiro crescentes, G_0 , G_1 , G_2 , etc, são terminadas em aminas primárias. Quando a síntese é interrompida na primeira reação, com acrilato de metila, o dendrímero é denominado de meia geração, $G_{0,5}$ - G_1 , 5, etc.

O número de grupamentos amina na superfície dobra a cada nova geração sendo que o dendrímero PAMAM tem acréscimo de 1nm em diâmetro a cada geração (Kitchens *et al.*, 2004) (Labieniec *et al.*, 2009).

A geometria esférica dos dendrímeros PAMAM leva à formação de cavidades no seu interior onde podem ser encapsuladas pequenas moléculas (Babu *et al.*, 2010). Estas cavidades são formadas por amidas e aminas terciárias, um ambiente menos polar do que a superfície, formada por aminas primárias nas gerações inteiras. As moléculas que podem ser encapsuladas nestas cavidades dependem menos do seu tamanho e mais da interação química destas moléculas com o ambiente químico das cavidades. A característica anfifílica de sua estrutura faz também com que os dendrímeros PAMAM sejam solúveis em meio aquoso e em alguns solventes orgânicos (metanol, DMSO, por exemplo).

A grande reatividade das aminas primárias da superfície do PAMAM e a menor reatividade dos demais grupamentos funcionais presentes no seu interior, permite que sejam feitas alterações na superfície sem que o interior seja modificado. Desta forma os dendrímeros PAMAM podem funcionar como excelente plataforma para construção de novos materiais.

Quando se trata de aplicações biológicas, modificações na superfície do dendrímero PAMAM são geralmente feitas com diferentes objetivos como, por exemplo, para alterar a solubilidade, diminuir a toxicidade, para fixar uma droga na produção de um conjugado para atuar como uma pró-droga ou na fixação de moléculas alvo.

Como ilustração, podemos citar dois exemplos que têm levado a bons resultados dentro do que estava sendo proposto com a modificação da superfície do dendrímero.

O primeiro deles, trata-se da modificação da superfície do PAMAM com o objetivo de otimizar uma das importantes propriedades destes dendrímeros, a facilidade em atravessar membranas celulares, propriedade esta utilizada na transfecção de genes. A superfície do dendrímero PAMAM de geração 4 foi modificada com os aminoácidos hidrofóbicos a L-fenilalanina e leucina e foram formados complexos com o DNA em pH neutro. Foi verificado que o conjugado com L-fenilalanina apresentou um aumento considerável na capacidade de transfecção de genes (Kono *et al.*, 2005).

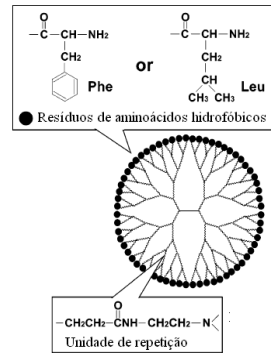


Figura 7: Dendrimer PAMAM de geração 4, Adaptado de (Kono *et al.*, 2005).

Outro importante estudo avaliou a citotoxicidade de dendrímeros PAMAM modificados em sua superfície com polietilenoglicol (PEG-dendrímeros) (Zhang *et al.*, 2011). Este estudo mostrou através de testes *in vitro* que a droga doxorubicina, um fármaco para tratamento de tumores no cérebro, tem sua toxicidade reduzida comparada a esta droga conjugada a outros tipos de polímeros. Estes resultados tornam dendrímeros PAMAM a serem importantes agentes para quimioterapia envolvendo tumores no cérebro.

Além destes importantes exemplos, os dendrímeros PAMAM são biocompatíveis, sendo que possuem semelhanças químicas com proteínas. As gerações G4 ou maiores se assemelham em tamanho a pequenas moléculas biológicas globulares, como a insulina (3nm), citocromo C (4nm) e a hemoglobina (5,5nm). Seu tamanho é também compatível com o tamanho das bicamadas lipídicas celulares, como mostra a Figura 8.

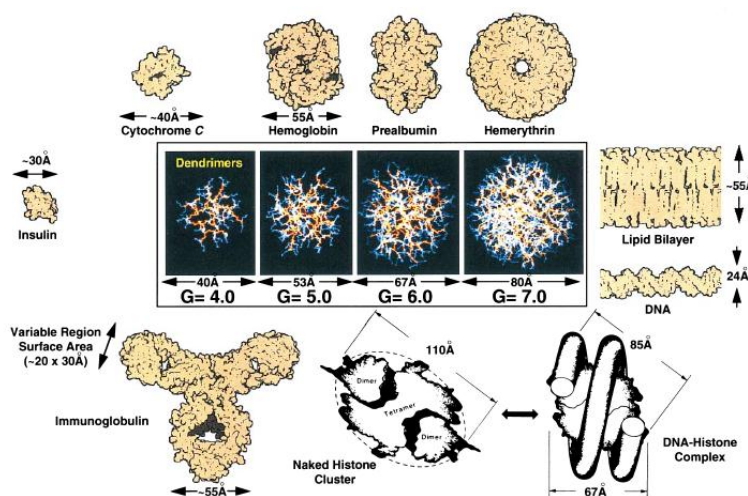


Figura 8: Propriedades estruturais dos dendrímeros PAMAM.

Estas características estruturais, além da razoável biocompatibilidade e solubilidade, permitiram que o dendrímero PAMAM fosse o dendrímero mais utilizado em aplicações biológicas até a atualidade (Karatasos et al., 2009), (Labieniec et al., 2009).

2.1.6 Dendrímeros como Nanocarreadores

Quando uma droga entra no organismo, este começa imediatamente a processá-la: absorção, distribuição, metabolismo e excreção. A absorção é a transferência do seu local de administração para o local de ação. No caso de preparações sólidas, a absorção depende inicialmente da dissolução do comprimido ou cápsula que então libera o fármaco. Após a absorção ou administração sistêmica para a corrente sanguínea, o fármaco se distribui para os líquidos intersticiais e intracelulares. A excreção ocorre eliminando os fármacos sem qualquer alteração ou transformando este em um metabólito. O rim é o principal órgão para a eliminação do fármaco e seus metabólitos. A excreção através das fezes se dá por fármacos ingeridos oralmente que não foram absorvidos ou fármacos excretados pela bile. A excreção pulmonar é importante para a eliminação de gases tóxicos.

Os fármacos são liberados em regiões que não são o seu alvo de ação, diminuindo a sua biodisponibilidade tornando necessária a administração de uma quantidade maior do que a suficiente da droga para manter a dose terapêutica.

Uma alternativa para contornar estes problemas é a utilização dos denominados sistemas de liberação controlada. Diferentemente de sistemas de liberação imediata (comprimidos, cápsulas) este sistema libera de forma gradual quantidades específicas de um fármaco por um maior período de tempo (Pandit, 2008). Suas principais vantagens são:

- Menor frequência de doses;
- Melhor eficácia e menor efeito colateral, por liberar o fármaco diretamente no local de ação;
- Melhor adesão do paciente ao tratamento por este tomar um menor número de doses;

- Proteger o medicamento no trânsito do organismo até este atingir o alvo desejado;

- Reduzir toxicidade.

Os dendrímeros PAMAM possuem características que os tornam nanocarreadores ideais. Drogas podem ser encapsuladas no seu interior, reduzindo assim sua toxicidade, melhorando a solubilidade e protegendo-as da decomposição no trânsito pelo organismo. Direcionadores podem também ser ligados covalentemente à sua superfície, de tal forma a conduzir a droga a um alvo específico. Sua superfície pode ser modificada de forma a possibilitar o controle da liberação da droga.

Além destas propriedades, os dendrímeros PAMAM são biocompatíveis, apresentando toxicidade controlável, não são imunogênicos e apresentam bioeliminação ou biodegradabilidade aceitáveis. Possuem adesão celular apropriada, capacidade de sofrer endocitose e tráfego intracelular para permitir a liberação da droga no citoplasma ou no núcleo.

2.1.7

Interações entre Dendrímeros e Drogas

O transporte de drogas utilizando dendrímeros PAMAM como nanocarreadores pode ser feito através do encapsulamento da droga no interior do dendrímero, formando os chamados complexos, ou ligando-se a droga covalentemente à superfície do dendrímero, formando conjugados. A interação droga/dendrímero pode ocorrer também na superfície do dendrímero, através de interações eletrostáticas. No caso de moléculas maiores, o dendrímero se organiza à volta destas, como o que acontece quando é utilizado na transfecção de genes.

A constituição química do interior do dendrímero é o fator determinante na interação droga/dendrímero e o número de moléculas que podem ser inseridas. A geração do dendrímero (tamanho) também influencia na capacidade de transporte de pequenas moléculas. Estruturas nas gerações mais baixas são abertas e nas gerações mais altas são mais fechadas, contendo um número maior de cavidades (Prabal & Goddard III et al, 2004).

Como exemplo da formação de complexo, podemos citar o dendrímero PAMAM com o ibuprofeno (Karatasos et al., 2009). Neste trabalho foi observado

que o número máximo de moléculas acopladas ao dendrímero nunca excedia o número de aminas primárias na superfície do PAMAM, ou seja, 32 moléculas de ibuprofeno, já que o dendrímero utilizado foi o PAMAM G3 que tem 32 aminas primárias na superfície. Este fato mostrou que as interações se davam preferencialmente na superfície principalmente através da formação de pares iônicos entre as aminas do PAMAM e as carboxilas das moléculas de ibuprofeno.

Muitos outros fármacos foram acoplados aos dendrímeros PAMAM e diferentes formas de administração são estudadas para avaliar a atuação destes dendrímeros como vetores. A tabela 2 apresenta um resumo de algumas drogas estudadas, o tipo de interação com o dendrímero e a razão entre a atividade do complexo ou conjugado e da droga livre (Cheng et al., 2008).

Drogas	Interação	Ação
sulfamethoxazola	Complexado	bactericida
Prulifloxacina	Complexado	bactericida
Nadifloxacina	Complexada	bactericida
Sulfadiazina	Complexada	Toxoplasmica
Ibuprofeno	Conjugado	Anti-inflamatório
Paclitaxel	Conjugado	Anti-Câncer
Metotrexato	Conjugado	Anti-Câncer
Cisplatina	Conjugado	Anti-Câncer
metotrexato	Conjugado	Anti-Câncer

Tabela 2: Drogas complexadas ou conjugadas com o dendrímero PAMAM.

2.1.8 Toxicidade

Dendrímeros PAMAM têm sido avaliados sistematicamente *in vitro*, através de células epiteliais. Entretanto poucos estudos têm sido realizados *in vivo*, para o transporte e liberação de drogas através de vias orais. Até o ano de 2012 não houve nenhum resultado publicado *in vivo* da translocação intacta intestinal de complexos de dendrímeros. Estudos *in vivo* são críticos por ser difícil de manter o complexo formado por um determinado tempo para avaliar a toxicidade intestinal. O estudo de enzimas específicas que clivam o dendrímero pode ajudar a avaliar e entender o processo. Sendo assim estudos *in vitro*, não podem ser extrapolados para casos *in vivo*. Deste modo muitos estudos têm ainda que ser realizados para avaliar com precisão a toxicidade do dendrímero PAMAM *in vivo*. Uma de suas vantagens está em poder mudar seus grupos de superfície, o que pode ser útil para

diminuir a toxicidade. Outro fator para a redução da toxicidade é reduzir a dosagem, que pode contribuir para amenizar estes efeitos (Sadekar et al., 2012).

2.1.9

Solubilidade

Nos complexos, devido às moléculas das drogas estarem inseridas nos dendrímeros, a solubilidade em água é determinada pela capacidade de solvatação da superfície do dendrímero. Sendo a superfície do dendrímero hidrofílica, o complexo aumenta o tempo de trânsito do medicamento no organismo.

A indometacina, um antiinflamatório com características hidrofóbicas foi investigado quanto ao aumento da sua solubilidade quando incluído em dendrímeros PAMAM G4 (Chauhan et al., 2004). Foi observado que a concentração de indometacina complexada com PAMAM na região de inflamação é muito maior quando comparada à droga livre.

Outro estudo realizado com um bactericida denominado sulfonamida, mostrou que dendrímeros PAMAM de geração 3 dobram a solubilidade desta molécula, quando há formação do complexo (Minglu et al., 2006).

No caso de fármacos oftalmológicos, um trabalho usando coelhos como modelos *in vivo* (Brobeck, 2004), permitiu um prolongamento da droga complexada com dendrímero na rota oftalmológica. Neste estudo foi mostrado que o uso de dendrímeros PAMAM não aumentou a irritabilidade comparada a outros dendrímero não catiônicos.

Os anti-inflamatórios lipofílicos flurbiprofeno e ketoprofeno complexados com o PAMAM de geração 4 (Yiyun, 2005) também foram testados em modelos *in vivo* (ratos albinos) (Asthana et al., 2005). O estudo mostrou que o dendrímero interage com as drogas aumentando sua solubilidade.

2.1.10

Interações com Membranas

Muitos grupos têm estudado a interação entre dendrímeros e membranas celulares (Emanuele, 2006). A eficiência em atravessar a membrana ou romper a mesma está intimamente relacionada com o tamanho da geração do dendrímero PAMAM, estrutura química, bem como sua concentração (Sayed et al., 2003).

Um estudo realizado com células de fígado de cães (Madin-Darby) (Irvine et al., 1999), determinou a permeabilidade de dendrímeros PAMAM da geração 0 a 4 através destas membranas. A ordem de permeabilidade encontrada foi $G4 \gg G1 \approx G0 > G3 > G2$. Este estudo concluiu que a transposição dos dendrímeros através destas membranas é dependente do tamanho e dos grupamentos da superfície (Tarajobi et al., 2001).

O trabalho realizado em tecidos vasculares, que são tecidos com uma grande quantidade de glicosaminoglicanos negativamente carregados, envolvidos com a mobilidade celular, proliferação e regulação de atividades enzimáticas, observou uma grande quantidade de dendrímeros PAMAM acoplados a paredes vasculares. Estas ligações tornam os dendrímeros promissores carreadores de drogas cardíacas (Sakharov et al, 2003). Outro estudo sobre o endotélio microvascular (Sayed et al., 2001), mostrou grande dependência de tamanho e peso molecular do dendrímero em atravessar o endotélio. Geometrias e cargas de drogas acopladas ao dendrímero também influenciam a passagem por este.

Interações entre dendrímeros e membranas celulares de bactérias foram estudadas por (Chen et al., 2002), onde foram testadas bactérias gram-positivas e gram-negativas por técnica de ultravioleta, espectroscopia e calorimetria diferencial. Grandes concentrações de dendrímeros foram precipitadas com vesículas fosfolipídicas sugerindo uma forte interação destas membranas com estes dendrímeros. Estes precipitados desestabilizaram a parede das células da bactéria destruindo-a e assim tendo seu efeito bactericida.

Estudos experimentais da interação de dendrímeros PAMAM com bicamadas lipídicas mostraram que dendrímeros com terminação CH_3 , provocam poucas mudanças de conformações na estrutura da camada lipídica, concluindo que estes tipos de dendrímeros hidrofóbicos podem se acomodar no interior de membranas sem criar alguma ruptura na camada lipídica. Quando se tem grandes concentrações de dendrímeros, estes formam agregados que não são facilmente incorporados a membranas (Epand et al., 2005).

2.1.11

Entrada do Dendrímero na Célula

O mecanismo de endocitose é o processo pelo qual as células vivas ativamente absorvem materiais através da membrana celular. Dendrímeros

catiônicos como o PAMAM têm sido estudados quanto a sua entrada na célula através de endocitose (Wiwattanapatapee et al., 2000).

Trabalhos realizados concluíram que para pequenas concentrações de PAMAM G4, a velocidade de endocitose não varia significativamente e aumenta rapidamente para concentrações maiores do dendrímero (Kelly M. Kitchens, 2007). Estes trabalhos concluíram também que através de inibidores de endocitose a entrada de dendrímeros nas células é reduzida rapidamente, o que comprova a internalização do PAMAM através deste processo. Esta entrada ocorre através de interações eletrostáticas entre grupamentos amina carregados na superfície do PAMAM e a membrana celular.

Em um trabalho realizado com dendrímeros de geração 3 para avaliar o potencial destes em transpor células Caco-2 foi verificado que a endocitose está intimamente envolvida no transporte epitelial de dendrímeros (Rachaneekorn Jevprasesphant et al., 2004).

2.1.12 Simulação Computacional dos Dendrímeros

Devido a não serem esclarecidas as estruturas dos dendrímeros através de métodos experimentais, muitos estudos teóricos têm sido realizados para tal fato, e estes estudos são feitos através de dinâmica molecular ou métodos de Monte Carlo. Através destes cálculos podemos esclarecer a estrutura tridimensional destes e avaliar suas possibilidades quanto a transporte de moléculas em seu interior. Estes cálculos são realizados, e após a simulação muitas propriedades são medidas, tais como: o raio de giro, que mede a compactação espacial da estrutura do dendrímero, RMSD (Root Mean Square Deviation), que apresenta a diferença espacial entre duas moléculas, entre outras medidas, que definem as propriedades estruturais de moléculas. Quando são realizadas dinâmicas moleculares até o equilíbrio da estrutura, foram observados que no pH neutro a estrutura possui uma conformação mais fechada, contendo várias cavidades em seu interior (Maiti et al., 2006). Quando são considerados dendrímeros carregados, as repulsões de cargas entre grupos amina afastam os monômeros fazendo com que a estrutura tenha um raio de giro maior e conseqüentemente seja mais aberta (Liu et al., 2009),

Para que o dendrímero possa ser usado como um nanotransportador deve interagir com muitas moléculas. Sejam elas moléculas no interior do dendrímero, com a dupla camada lipídica, com proteínas ou com o DNA. (Lee et al, 2006) Estudaram a interação entre a bicamada lipídica e os dendrímeros. Estas simulações mostraram que os dendrímeros acetilados G3 e G5 não são inseridos na membrana. O não acetilado e o parcialmente acetilado G5 é totalmente inserido na membrana plasmática. Estes estudos foram importantes para uma avaliação da penetração destes dendrímeros na bi-camada lipídica.

Embora muitos campos de força sejam usados para simular os dendrímeros, os resultados mostram resultados quantitativos semelhantes (Goddard III et al., 2006)(Roberts et al., 2009). Este fato indica a robustez de dinâmicas moleculares do tipo atômicas onde a simulação é feita considerando átomo a átomo dando uma maior precisão a simulação. Outro tipo de dinâmica é denominada *Coarse-Grained*, onde a simulação une conjuntos de átomos para se tornar mais rápida, mas perde precisão a nível atômico.

Os trabalhos teóricos realizados com dendrímeros nos últimos tempos chegaram a conclusões de que a dinâmica molecular de átomos unidos prevê de uma forma global as propriedades geométricas de dendrímeros bem como sua interação com membranas celulares (Lee et al., 2008).

Estudos de dinâmicas moleculares e inserção de porfirinas em diferentes gerações de dendrímeros PAMAM (Roberts B. a., 1999) foram avaliados. Através destes modelos verificou-se que o dendrímero de geração 3 tem uma estrutura assimétrica e quando esta geração sobe para 4, o dendrímero se torna mais esférico, mas ainda assimétrico. Estes resultados foram também observados por (Goddard III et al, 2009). Muitas aminas na superfície do dendrímero estão voltadas para dentro, indicando interações da superfície com o interior do dendrímero. Estas aminas voltadas para o interior diminuem a interação destes dendrímeros com moléculas acopladas em sua superfície. Outros trabalhos também verificaram a inserção de porfirinas em dendrímeros PAMAM (Bhalgat et l., 1997). Tendo como conclusão que a inserção de um número maior de porfirinas na superfície do dendrímero diminui a chance de outras moléculas serem acopladas por diminuir o número de interações da superfície do dendrímero com as mesmas.

Sobre a estrutura do dendrímero foram realizadas dinâmicas moleculares (Canetta & Maimo, 2003) para confrontar com estudo de espalhamento de raios-x (SAXS). Este estudo com dendrímeros PAMAM não iônicos mostrou que para gerações maiores ($G > 5$) os dendrímeros são mais homogêneos e esféricos. Tem seu núcleo bastante denso com átomos da periferia mais espalhados. Estes resultados comprovam o que foi obtido por (Canetta et al., 2002) através de experimentos de raios-x.

Através do uso do algoritmo de *simulated annealing* na dinâmica molecular (Groman et al., 2000) foram estudadas as geometrias dos dendrímeros PAMAM. A estrutura do dendrímero encontrada é globular, mas não esférica o que foi atribuído ao fato de as aminas da superfície estarem voltadas para o interior do dendrímero.

2.2

Rifampicina e Tuberculose

O objetivo em estudos futuros do nosso grupo é criar um nanodispositivo que possa transportar drogas diretamente ao pulmão, para o tratamento da tuberculose. Esta seção faz uma discussão desta doença e do principal fármaco utilizado em seu tratamento, que será usado neste trabalho como primeiro fármaco acoplado nos dendrímeros.

2.2.1

Introdução à Tuberculose

A tuberculose é uma doença contagiosa conhecida desde os tempos da Magna Grécia, mas que pode ter acometido à humanidade há mais de 5000 anos, sendo que o bacilo que provoca a doença pode ter surgido no solo terrestre há mais de 15000 anos. Este bacilo adaptou-se em mamíferos com a domesticação do gado e posteriormente foi transmitido para o homem pelo convívio com estes animais (Coura, 2003). Estudos de paleopatologia detectaram a presença do bacilo *M.tuberculosis* em múmias egípcias com mais de 3000 anos. O filósofo grego Hipócrates (460-377 A.C) tinha conhecimento da tuberculose pulmonar, mas esta doença só ficou conhecida na Europa na idade média após acometer reis e pessoas importantes da sociedade. A tuberculose é de grande contágio devido a ser transmitida pelo ar através de doentes que contêm a forma ativa da doença. Aliada

à epidemia de AIDS e à emergência de bacilos multirresistentes é considerada pela OMS uma doença de emergência mundial.

O agente etiológico da tuberculose é o *M.tuberculosis* ou bacilo de Koch. Esta bactéria foi descrita pela primeira vez em 1882 por Robert Koch, laureado com o prêmio Nobel por esta descoberta em 1905. É uma bactéria aeróbica que se divide a cada 16-20 horas e graças à parede celular formada por lipídios (ácidos micólicos), resiste a desinfetantes fracos e ao ácido gástrico, podendo ficar semanas em estado latente e só se desenvolve quando inserida em um organismo.

O ressurgimento da tuberculose está relacionado com o HIV (vírus da imunodeficiência adquirida). O HIV e o bacilo têm interação sinérgica, um potencializando o outro. Segundo dados da OMS (Organização Mundial de Saúde) o Brasil é responsável por 80% dos casos em todo o mundo, tendo em média 110 mil pessoas contaminadas por ano com a tuberculose, atingindo principalmente as classes menos favorecidas.

Ainda de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), têm-se três milhões de óbitos por ano em todo o mundo. Este fato fez com que a OMS declarasse a tuberculose como uma doença de emergência global.

2.2.2

Genoma do *Mycobacterium Tuberculosis*

O bacilo de Koch é uma bactéria aeróbica que se multiplica lentamente a cada 25-32 horas (Coura, 2003). Apesar de sua lenta multiplicação é de grande periculosidade por ser transmitido pelas vias nasais. Seu genoma possui por volta de 4000 genes (Domenech, 2001). Aproximadamente 200 destes genes codificam enzimas para a produção de ácidos graxos. Foi descoberto também que 170 de seus genes podem estar envolvidos na variação antigênica do bacilo. Dois trabalhos realizados (Banu et al., 2002) (Barrel, 1998) descobriram que um grupamento de genes que corresponde a 10% do genoma, seria responsável pela variação antigênica do bacilo, determinando os mecanismos de escape da resposta imune do hospedeiro. O bacilo de Koch tem parede celular complexa recoberta por lipídios, sendo composta por ácidos graxos de cadeia longa, que contribuem para a sobrevivência da bactéria dentro dos fagócitos do hospedeiro.

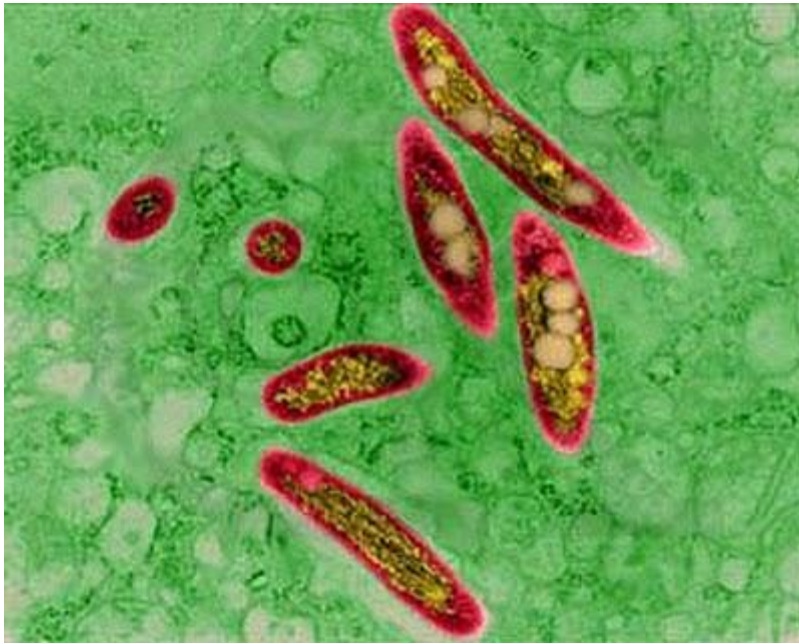


Figura 9: Bacilo de Koch. Fonte: (Piedade, 2010).

2.2.3 Patologia

O *M. tuberculosis* é eliminado pelas vias nasais por um indivíduo portador do bacilo, com a forma ativa da doença, sendo de grande contágio (Coura, 2003). Existem três vias de contaminação, a primeira é pelo leite tomado *in natura*, o que ocorre raramente nos dias atuais, devido ao processo de pasteurização. A segunda forma está relacionada com a inoculação direta do bacilo pelos agentes de saúde. A terceira acontece quando este é eliminado pelo ar através das vias nasais de um indivíduo portador do bacilo. Morrem 4600 pacientes vítimas da tuberculose por ano no Brasil segundo o sistema único de saúde (SUS).

A fase inicial ocorre entre um e seis dias após o contágio onde os macrófagos fagocitam os bacilos. O bacilo uma vez dentro do organismo liga-se a vários receptores celulares. Depois de passar pelas defesas inespecíficas do trato respiratório será fagocitado pelos macrófagos alveolares e pneumócitos tipo II. A interação entre bacilo e macrófago é o que vai determinar a progressão da doença. O macrófago é dotado de vários receptores de superfície que facilitam sua ligação aos antígenos que permitem a invasão do hospedeiro. A concentração

de alesterol na membrana celular tem grande influência na ligação do bacilo aos macrófagos. Quando o alesterol está em quantidade baixa a fagocitose não acontece.

Após ser fagocitado pelos macrófagos há formação de vacúolo (parte que uma célula isola do citoplasma para combater agentes patogênicos), cujo ambiente é hostil para o parasita. A seguir acontece um mecanismo de junção do fagossoma com o lisossoma, que contém substâncias que tentam destruir o patógeno, formando o que chamamos de fagolisossoma. O bacilo então por sua vez emprega mecanismos para evitar a formação dos fagolisossomas, inibindo o processo de fusão e inativando enzimas, facilitando assim sua proliferação. Este processo é feito através da expressão de uma proteína denominada coronina 1. Após o processo de fagocitose, o bacilo fica preso ao fagossoma através de receptores CR1, CR3, e CR4 e pelo receptor de manose. Esta interação entre o bacilo e os receptores é feita através de lipoproteínas.

Com a fusão do fagossoma ao lisossoma o ambiente passa a ser hostil para o bacilo, que sofre ação do pH ácido, enzimas e peptídeos tóxicos, podendo ocorrer três ações:

- 1) Uma parte dos bacilos é destruída;
- 2) Outra parte entra em estado latente podendo causar a doença no futuro, quando o sistema imunológico ficar deficiente;
- 3) A terceira parte são bacilos que escapam dos fagolisossomas por processos ainda não esclarecidos ou por produção de amônia que inibe a junção do fagossoma com o lisossoma.

Após fagocitar o bacilo os macrófagos expressam enzimas que recrutam monócitos, linfócitos e neutrófilos para a sua destruição. Com a chegada dos linfócitos ao local da infecção, tem início à lesão granulomatosa característica da tuberculose. Nesta fase os linfócitos e as células gigantes derivadas dos macrófagos tentam destruir o bacilo.

Com o avanço da imunidade, células vão sendo mortas formando grânulos cercados por fibroblastos, linfócitos e monócitos, oriundos do sangue. Neste estado que se torna hostil para o bacilo, este adormece, podendo permanecer no corpo por décadas.

2.2.4

Sintomas

Alguns infectados não apresentam sintomas aparentes, mas na grande maioria das vezes uma tosse seca e continua no início, seguida da presença de secreção por mais de quatro semanas o que pode evoluir para uma tosse com pus ou sangue. Cansaço excessivo, febre ao entardecer, falta de apetite, palidez, emagrecimento acentuado, rouquidão, são também comuns. Nos casos mais graves pode ocorrer dificuldade de respiração com eliminação de grande quantidade de sangue. Acumulo de pus na pleura (membrana que reveste o pulmão). Se esta membrana for comprometida pode haver dor no tórax (Ministério da Saúde, 2011).

2.2.5

Resistência do Bacilo as Drogas

A resistência do bacilo da tuberculose aos quimioterápicos é a principal preocupação no tratamento atual. No inquérito nacional brasileiro de resistência às drogas utilizadas no tratamento da tuberculose, realizado em 1995-1997 para avaliar a multirresistência à izoniazida e rifampicina, foram constatadas algumas formas resistentes. Entre os 5.138 pacientes em 13 estados amostrados a resistência encontrada foi de 10.6%.

2.2.6

Introdução aos fármacos

Um fármaco pode ser definido como uma substância química que interage com a estrutura corporal para alterar um determinado processo biológico(Pandit, 2008). Pode aumentar ou diminuir a função de um órgão, tecido ou célula. As características de um fármaco ideal são:

- . Ação farmacológica desejada;

- . Mínimos efeitos colaterais;
- . Chegada ao sítio de ação no tempo e quantidade desejada;
- . Permanecer no sítio de ação pelo tempo desejado;
- . Rapidez de eliminação após seu efeito.

2.2.7

Vias de Administração e Excreção

Existem diversas vias de administração para a entrada de um fármaco no organismo, tais como as vias orais, retais, sublingual, transdérmica, parenteral (intravenosa, subcutânea e intramuscular) e aplicações tópicas. Após a administração, os fármacos são absorvidos. No caso de preparações sólidas a absorção vai depender inicialmente da dissolução do comprimido ou cápsula, que libera o medicamento. Nestes casos de ingestão oral, primeiramente o fármaco deve ser absorvido pelo estômago e intestino, além disso, precisa passar pelo fígado, onde ocorre seu metabolismo. Por estas razões uma fração administrada e absorvida será inativada ou desviada antes de chegar à circulação sistêmica e ao local de ação. Após a fase de distribuição o fármaco se distribui para os líquidos intersticiais e intracelulares. Estes fatores dependem de processos físico-químicos destes fármacos.

Alguns fármacos circulam na corrente sanguínea ligada a proteínas plasmáticas. Fármacos que possuem propriedades físicas e químicas semelhantes podem competir entre si por sítios de ligação, provocando a troca significativa de um fármaco pelo outro.

2.2.8

Membrana Celular

A atuação dos medicamentos dentro das células dependem de sua capacidade de atravessar membranas celulares. A membrana plasmática, que reveste as células, consiste em uma cadeia de lipídios anfipáticos, com sua cadeia

de carbonetos orientados para o interior formando uma região hidrofóbica, enquanto suas extremidades estão voltadas para fora formando uma parte hidrofílica. Lipídios inseridos nesta membrana não são fixos e esta mobilidade confere fluidez à membrana celular além de permeabilidade seletiva. Estão inseridas também nesta membrana as chamadas proteínas de membrana que servem como canais iônicos, transportadores de sinais elétricos ou químicos e alta seletividade para a passagem de moléculas específicas pela membrana celular. Através da membrana podem ocorrer dois tipos de transportes:

- Transporte passivo – As moléculas neste tipo de transporte penetram na membrana seguindo um gradiente de concentração, esta passagem ocorre até o momento do equilíbrio, isto é, a concentração de uma determinada molécula é igual dos dois lados da membrana. No caso de compostos iônicos, as concentrações no estado de equilíbrio dependem da diferença de pH através da membrana que influencia o estado de ionização das moléculas. (Pandit, 2008), (Goodman, 2006)

- Transporte ativo – Neste tipo de transporte através de membranas são necessárias certas proteínas inseridas na dupla camada para efetuar o transporte (Rowland, 2009). A diferença é que conseguem transportar moléculas contra o gradiente de concentração. Necessitam de energia celular, conseguida através do ATP (Trifosfato de Adenosina). Um modelo de membrana celular é mostrado na figura 10.

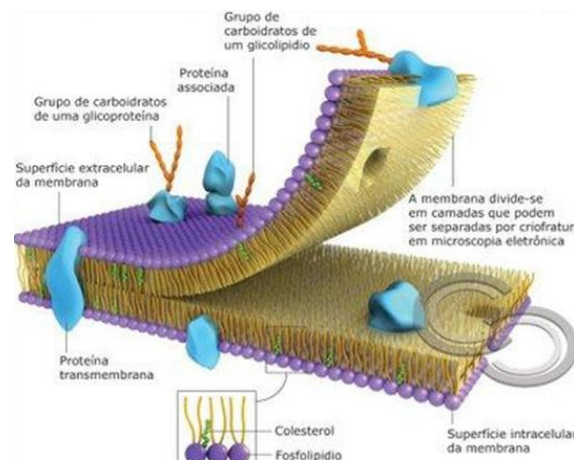


Figura 10: Esquema de uma membrana celular adaptada de Lehninger (Cox & David, 2011).

2.2.9 Tratamento da Tuberculose

Os seguintes medicamentos são padronizados no Brasil para o tratamento da tuberculose (Misra, 2010):

- . Isoniazida;

- . Rifampicina;

- . Pirazinamida;

- . Etionamida;

- . Etambutol;

- . Estreptomicina.

Segundo (Coura, 2003), (Dalcomo et al., 2007) podem-se ter os seguintes tratamentos da tuberculose no Brasil:

Esquema 1 - Para o tratamento de todos os casos de tuberculose. Nos dois primeiros meses rifampicina, isoniazida, pirazinamida. Nos quatro meses seguintes rifampicina e isoniazida. Em caso de tratamentos de reincidência ou casos de abandono do esquema 1, nos dois primeiros meses as 3 drogas do esquema 1 mais etambutol. Nos quatro meses seguintes as duas drogas do esquema 1 mais etambutol.

Esquema 2 - Para o tratamento de meningoencefalite com outras formas associadas. Dois primeiros meses, rifampicina, isoniazida, pirazinamida e prednisona. Nos sete meses seguintes rifampicina mais isoniazida.

Esquema 3 - Este esquema é para falha dos anteriores. Nos três primeiros meses, estreptomicina, etionamida, etambutol, pirazinamida. Nos nove meses seguintes etambutol e etionamida.

2.2.10 Rifampicina

Este fármaco foi descoberto em 1957 pelo cultivo de uma cepa de *Streptomyces mediterranei*, (Rieder, 2009). Sendo introduzida na década de 70 para o tratamento da tuberculose. A rifampicina inibe o crescimento da maioria das bactérias gram-positivas e de muitas gram-negativas. Em concentrações de 0,005 a 0,2 g/ml inibe o crescimento do *M.tuberculosis*. As concentrações plasmáticas máximas ocorrem de 2 a 4 horas após administração, com a ingestão de 600mg do fármaco. Sua eliminação ocorre rapidamente pela bile. A meia vida varia de 1,5 a 5 horas. É solúvel em solventes orgânicos e em água em pH ácido.

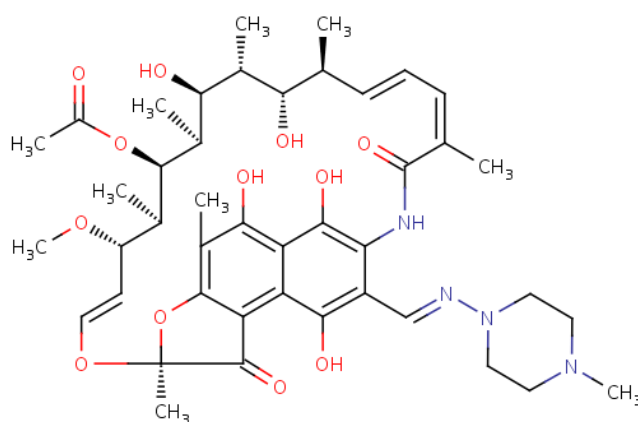


Figura 11: Molécula de Rifampicina. Fonte: (DRUG BANK, 2012).

2.2.11 Mecanismos de Ação da Rifampicina

A rifampicina inibe a RNA polimerase DNA-dependente das micobactérias e de outros organismos, através da supressão da iniciação da cadeia na síntese de RNA. A subunidade β desta enzima é o local de ação da rifampicina. A síntese de RNA não é afetada nas células de eucariotos, pois estas não se ligam à rifampicina.

Em altas concentrações a rifampicina pode inibir a síntese de RNA nas mitocôndrias de mamíferos, as RNA polimerases DNA dependentes virais e transcriptases reversas (Goodman, 2006).

A eliminação da rifampicina ocorre rapidamente na bile, sendo que após 6 horas toda a rifampicina se encontra na forma desacetilada retendo toda sua atividade antibacteriana. A presença de alimentos e desacetilação reduzem a

reabsorção intestinal. A meia vida da rifampicina é de 1,5 a 5 horas. Por volta de 30% da rifampicina é excretada na urina e cerca de 60-65% nas fezes.

2.2.12

Resistência a Rifampicina

A rifampicina é o principal fármaco no esquema terapêutico contra a tuberculose (Fiuza, 1997). Os indivíduos com cepas resistentes à rifampicina têm grandes chances de serem resistentes a outras drogas. (Mitchison, 1986), (Fischl, 1992) (Carvalho et al., 2007). Devido a esta resistência estes pacientes tem que ser submetidos a um tratamento com fármacos de segunda ordem (Iseman, 1993), (Drobniewski, 1997). Estes fármacos de segunda ordem possuem um custo mais elevado e além deste fato são mais tóxicos. A resistência do *Mycobacterium tuberculosis* à rifampicina ocorre através de mutações no gene *rpoB*, que é o gene responsável pela codificação da cadeia β da RNA-polimerase (Yamanda, 1985), (Telenti et al., 1993), (Kapur et al., 1994), (Williams et al., 1994), (Lucia et al., 2002). Das cepas isoladas resistentes à rifampicina, 95% tem mutações em uma região específica que compreende 69 pares de bases do gene *rpoB* correspondendo aos códons 511 a 533 (Spindola et al., 2001). Para os restantes 5%, o local específico da mutação ainda não é determinado com exceção dos códons 381 (Taniguchi et al., 1996), e dos códons 481 e 509 (Nash et al., 1997). Estas mutações no gene *rpoB* tem grande importância por fazer surgir bacilos multirresistentes.