

### 3.

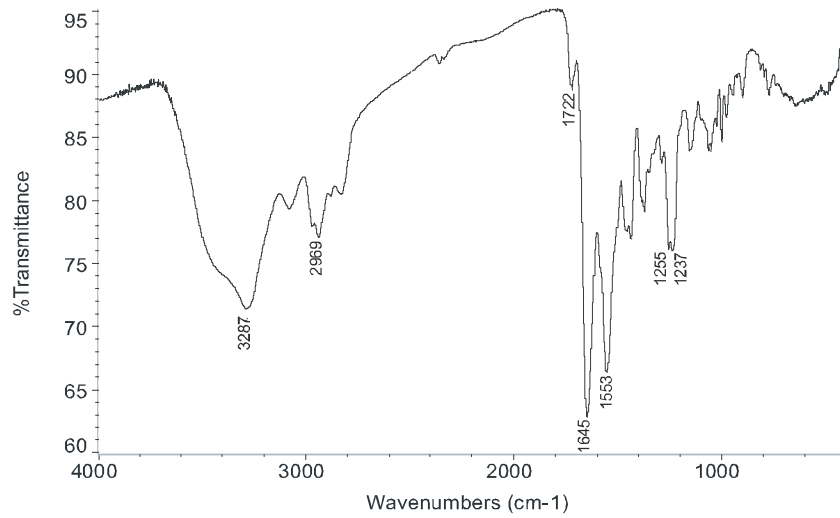
#### **Complexo - O Modelo Prático onde o trabalho se baseia.**

As atividades de complexos tuberculostáticos formados entre dendrímeros PAMAM G4 e rifampicina foram estudadas como parte das pesquisas realizadas pelo Projeto PRONEX de Tuberculose, através da colaboração entre o Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas (IPEC- Fiocruz), sob coordenação da Dra Maria Cristina S. Lourenço e o Laboratório DENDRIQUIM do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UFRJ, coordenado pela professora Vanessa L. Rodrigues Furtado.

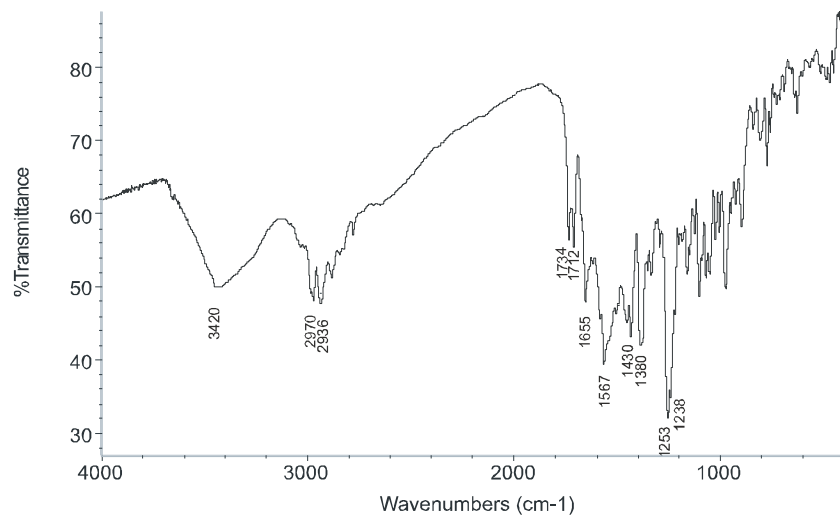
A proposta dos experimentos bem como a preparação e caracterização dos complexos foi feita no laboratório da UFRJ e os testes biológicos no laboratório do IPEC. Para esta tese foi considerado o complexo rifampicina/PAMAM G4 (Buckley et al., 2007), assim sendo são apresentados a seguir os dados relevantes para a compreensão do trabalho. Foram liberadas algumas figuras uma vez que o trabalho foi apresentado em Congressos Internacionais e está sendo enviado para publicação.

A caracterização do complexo rifampicina/PAMAM G4 foi feita por IV e RMN do hidrogênio, como mostra a figura 12.

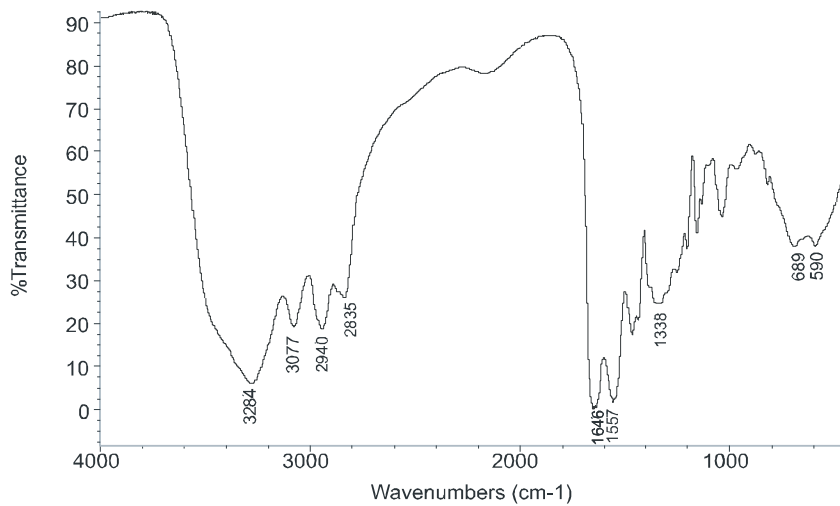
O estudo do complexo por espectrometria no IV foi de extrema importância para a avaliação do encapsulamento da rifampicina. No espectro do complexo apenas uma banda de carbonila a  $1722\text{ cm}^{-1}$  é observada, em vez das duas bandas presentes no espectro da rifampicina a  $1734$  e  $1712\text{ cm}^{-1}$ . Este fato está em concordância com o espectro obtido por colaboradores (Agrawal et al., 2004) para uma das três diferentes formas da rifampicina (duas polimórficas e uma amorfa. Como proposto pelo pesquisador, os dois picos de carbonilas observados para a forma II ( $1734$  and  $1712\text{ cm}^{-1}$ ) são bandas de estiramento da furanona (C11) e do carbonilado grupamento acetila (C35), respectivamente. A razão pela qual a banda da carbonila da furanona não ser vista no espectro da forma I e da rifampicina amorfa é pelo fato de, nestas formas, não ser formada a ligação hidrogênio C(4)-OH · · · O=C(11) e, neste caso, a carbonila da furanona absorve em  $1644\text{ cm}^{-1}$ .



(a)



(b)



(c)

Figura 12: Espectros no IV. a) espectro da complexo. B) rifampicina c) PAMAM G4.

A falta da banda de absorção  $O=C(11)$  no espectro do complexo rifampicina/PAMAM G4, comparado com o espectro da rifampicina, é devido à mudança na absorção da carbonila para comprimentos de onda menores, com a consequente superposição desta banda.

A ligação hidrogênio intramolecular  $C(4)-OH \cdots O=C(11)$  foi provavelmente substituída pela formação de outra ligação hidrogênio com os grupamentos das cavidades do dendrímero, mostrando que foi formado um complexo de inclusão.

No caso dos dados obtidos por RMN do hidrogênio, o alargamento das absorções do complexo no espectro indicou a imobilização do sistema, ocasionada pela forte interação da rifampicina no interior do dendrímero, confirmando o que já havia sido observado nos estudos por espectrometria no IV.

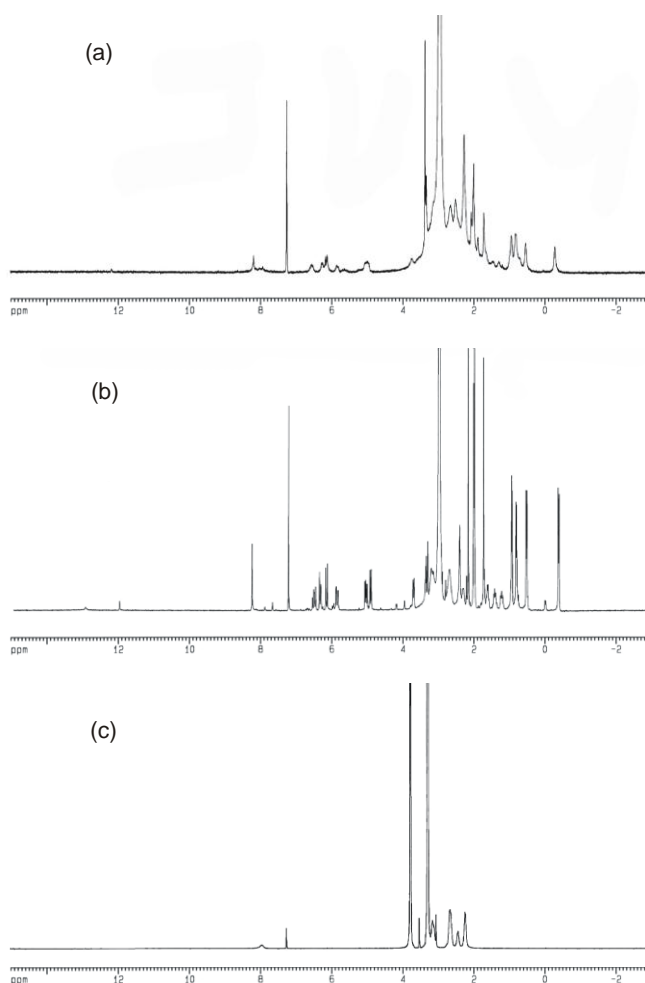
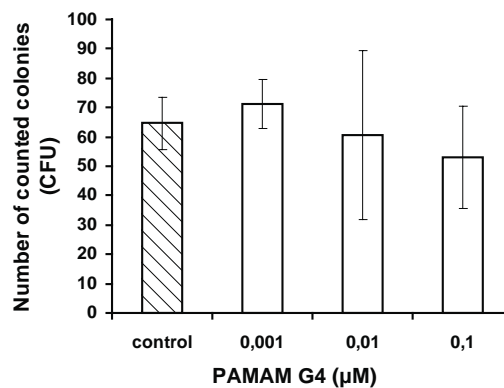


Figura 13: Espectro de infravermelho do hidrogênio. a) Complexo rifampicina e PAMAM G4. b) RRifampicina. C) PAMAM G4.

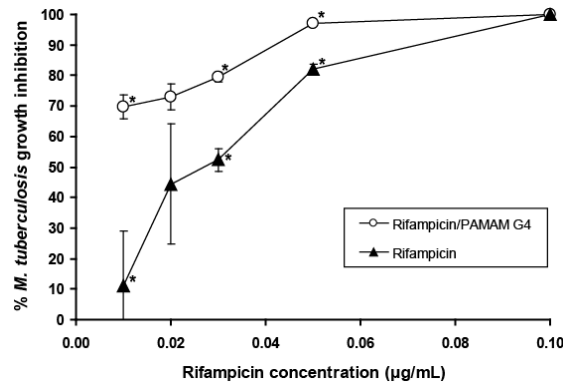
O número de moléculas de rifampicina encapsuladas no dendrímero PAMAM foi determinado indiretamente por ultra-filtração das moléculas não encapsuladas em membranas Microcom<sup>®</sup> YM-3 (Cutoff: 3000 NMWL) e posterior quantificação por UV (429 nm). Através deste método foi determinado que 20 moléculas de rifampicina foram encapsuladas no dendrímero PAMAM G4.

A determinação da viabilidade do *M. tuberculosis* em presença do dendrímero e a atividade tuberculostática do complexo de inclusão *in vitro* foram realizadas no laboratório de parasitologia do IPEC utilizando a cepa de *M. tuberculosis*H<sub>37</sub>Rv ATCC 27294. As células de *M. tuberculosis*H<sub>37</sub>Rv foram crescidas em tubo sin Löwenstein-Jensen a 37°C por 30 dias. Após incubação, foram feitas sub colônias com 5 a 10 colônias em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC e 0.05% de Tween 80, por 7 dias. Nesta etapa o crescimento da fase log foi ajustado ao padrão de turbidimetria n<sup>o</sup>1 McFarland.

Para os testes de viabilidade em presença de PAMAM e de determinação da atividade tuberculostática do complexo, diferentes concentrações de PAMAM e do complexo foram adicionadas ao meio acima descrito. As placas foram incubadas a 37°C por 14 dias, quando as colônias foram contadas. Os resultados obtidos estão descritos na figura 14.



a)



b)

Figura 14: (a) Crescimento do *M. tuberculosis*H37Rv ATCC 27294 em presença de diferentes concentrações de dendrímero PAMAM G4, (b) Número de colônias contadas de *M. tuberculosis* nos experimentos com o complexo rifampicina/PAMAM G4 em

As células de *M. tuberculosis* se mostraram viáveis até uma concentração de 0,01 µM de PAMAM G4. A concentração máxima de PAMAM usada nos experimentos para a determinação da atividade tuberculostática do complexo, entretanto, foi de apenas 0.00486 µM.

O complexo rifampicina/PAMAM G4 mostrou maior atividade tuberculostática *in vitro* contra o *M. tuberculosis* do que a rifampicina sozinha. O complexo contendo apenas 10% do valor da concentração inibitória mínima de rifampicina foi 85% mais ativo do que a rifampicina na mesma concentração. Estes resultados mostram que utilizando o complexo da rifampicina com o PAMAM G4, a dose de rifampicina administrada pode ser drasticamente reduzida.

Posteriormente foram feito estudo para determinar o aumento da solubilidade da rifampicina pela formação do complexo e estudo de liberação da rifampicina do complexo rifampicina/PAMAM em diferentes pH. No gráfico da figura 15 pode ser observado que a velocidade de liberação em pH ácido foi mais alta do que em pH neutro.

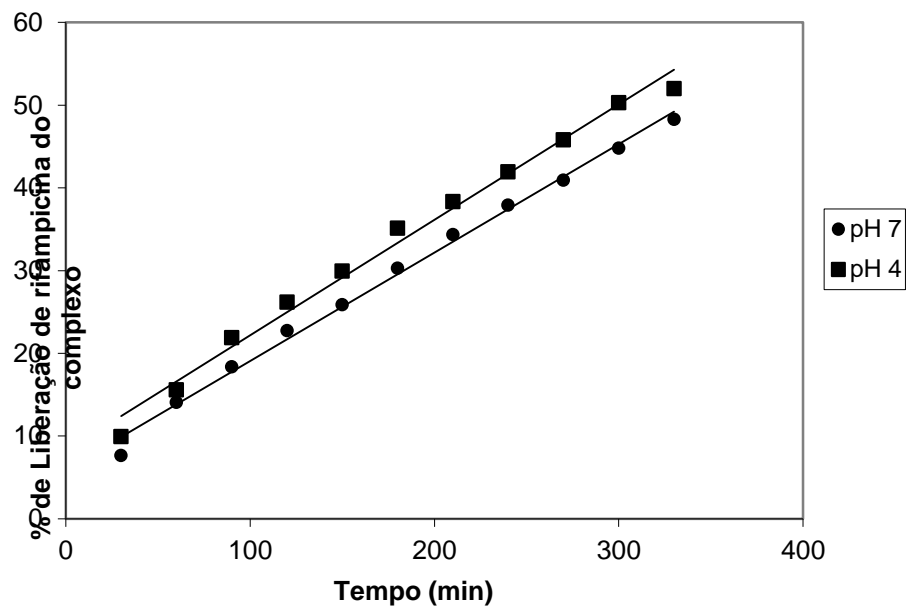


Figura 15: Liberação da rifampicina do complexo.