UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do potencial da associação de dendrímeros e iontoforese para
a administração ocular de fármacos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientado: Joel Gonçalves de Souza
Orientadora: Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna
Lopez

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 22/09/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Souza, Joel Gonçalves de.

Avaliação do potencial da associação de dendrímeros e iontoforese para a administração ocular de fármacos. Ribeirão Preto, 2014.
137 p.; 30cm.

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Lopez, Renata Fonseca Vianna.

1. Iontoforese. 2. Dendrímeros. 3. Administração ocular de fármacos. 4. Uveíte.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Joel Gonçalves de Souza

Título: Avaliação do potencial da associação de dendrímeros e iontoforese para a administração ocular de fármacos

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A DEUS, pela constante presença em todas as jornadas de minha vida. Obrigado por ser meu guia, pela proteção e por todas oportunidades concedidas.

Aos meus pais José e Maria pelo constante estímulo, incentivo e apoio na realização de meus sonhos e por acreditarem em meu potencial.

À minha esposa Andréia, por estar sempre presente em minha vida e por todos os momentos passados juntos, incentivando-me a cada passo dado. Muito obrigado pelo companheirismo e por todo carinho.

Aos meus irmãos Andréia, Aline e Júnior, e aos meus cunhados Claudinei e Benedito, pelo constante apoio e incentivo ao longo de minha vida.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Renata Fonseca Vianna Lopez por todo empenho, dedicação e amor pela sua profissão. Por me orientar ao longo desses anos e por contribuir de maneira imensurável na minha formação como pesquisador. Muito obrigado pelos ensinamentos e por ter aberto as portas de seu laboratório para que eu pudesse fazer parte de sua equipe.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP por todo apoio concedido desde a graduação até o doutorado, por proporcionar todo suporte para que eu pudesse cumprir etapas tão importantes de minha vida.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Renata Fonseca Vianna Lopez pelo empenho e dedicação em sua profissão, fazendo com que seus alunos sejam capazes de descobrir a verdadeira vocação pela ciência.

Ao Prof. Dr. Robert Samuel Langer e Daniel Kohane por terem me orientado durante meu doutorado sanduíche no Massachusetts Institute of Technology (MIT) e na Harvard Medical School. Agradeço também ao Pós Doutorando Rong Tong dessas mesmas instituições. Com certeza a supervisão desses pesquisadores foi muito produtiva e trouxe grandes contribuições para minha formação científica.

Aos colegas de laboratório Camila, Karina, Yomi, Laura, Daniela, Patrícia, Lucas, Tatiana, Renê, Beatriz, Danielle, pelas experiências e ensinamentos compartilhados e pelo apoio ao longo dessa trajetória.

Aos meus grandes amigos Silas Arandas e Alexandre Kanashiro, pelo constante apoio, incentivo e pela grande sabedoria. Agradeço também aos meus amigos Renê, Estael e Maurílio pelas inúmeras experiências trocadas e pela confiança.

À Prof^a Yara Maria Lucisano Valim e Cristiane Masetto de Gaitani, e a todos os membros de seus respectivos laboratórios, por terem me orientado como aluno de iniciação científica, tendo fundamental importância no desenvolvimento de minha vida científica.

Aos colegas de república Alexandre, Daniel, David, Rui e Izaque, pelo harmonioso convívio em república.

À Patrícia, Henrique e José Orestes, técnicos dos Laboratórios de Tecnologia Farmacêutica, por todo apoio e dedicação durante esta etapa. Em especial à Patrícia, pelo empenho e dedicação durante a realização dos experimentos.

Ao Prof Dr Flávio da Silva Emery e ao doutorando Lucas C.D. Rezende da FCFRP-USP por todo empenho e dedicação nas análises de Ressonância Magnética Nuclear, colaborando de forma significativa na caracterização dos sistemas desenvolvidos.

Ao Prof Dr Eduardo Melani Rocha da FMRP-USP por toda atenção e suporte científico na área de oftalmologia, trazendo grandes contribuições para a execução deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Mônica Talarico Pupo, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, e aos demais funcionários Eleni, Rosana, Henrique, Rafael e Rosemary por todo suporte oferecido.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado (Proc. 2010/19210-7) e pelo auxílio financeiro por meio de projetos regulares de auxílio à pesquisa (Proc. 2011/11305-1). Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Proc. 551958/2011-1) pelo suporte financeiro concedido ao doutorado sanduíche realizado no MIT e ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Fisiopatologia e Terapia Ocular (NAP-FTO) (12.1.25431.01.7) pelo apoio à pesquisa.

RESUMO

SOUZA, J.G. **Avaliação do potencial da associação de dendrímeros e iontoforese para a administração ocular de fármacos.** 2014. 137f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A administração tópica de colírios é a maneira mais conveniente de se tratar doenças oculares. O grande desafio para a tecnologia farmacêutica é garantir que o fármaco administrado nessa forma farmacêutica chegue ao local de ação em concentrações adequadas, com efeitos adversos reduzidos, tempo de ação prolongado e dose única. Para tanto, o desenvolvimento de sistemas de liberação e de estratégias adequadas de administração tornam-se necessários. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da iontoforese na penetração ocular de dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) de geração 4, com diferentes grupos superficiais (PAMAM G4, catiônico e PAMAM G3.5, aniônico), preparar complexos desses dendrímeros com um anti-inflamatório modelo, a dexametasona (Dexa), e avaliar a influência da associação de dendrímeros e iontoforese na penetração corneal da Dexa em modelos *ex vivo* e *in vivo*. Complexos Dexa-PAMAM foram obtidos e caracterizados por espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear (^1H -RMN, ^{13}C -RMN e DOSY), espalhamento dinâmico de luz e espectroscopia UV/vis para avaliar a formação dos complexos, seu tamanho e potencial zeta, além de alterações na solubilidade da Dexa. A velocidade de liberação da Dexa dos complexos foi verificada por estudos de liberação *in vitro* utilizando membrana sintética. A penetração e distribuição dos PAMAMs na córnea e sua influência na penetração da Dexa foi avaliada *ex vivo* utilizando córnea de porco, microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) e cromatografia de ultra performance aliada a um detector de massas para quantificação do fármaco permeado. A citotoxicidade dos PAMAMs foi avaliada em cultura de células epiteliais da retina e células epiteliais da córnea. Por fim, verificou-se *in vivo* a influência da iontoforese e dos PAMAMs sobre a quantidade de Dexa no humor aquoso de olhos de coelhos. Os estudos de caracterização indicaram que a Dexa foi incorporada aos PAMAMs e que esses complexos apresentaram cerca de 50 nm de tamanho médio pela técnica de NTA, com a presença de partículas pequenas e agregadas quando dispersos em meio fisiológico e potencial zeta de + 6,4 mV e -18,5 mV para Dexa-PAMAM G4 e Dexa-PAMAM G3.5, respectivamente. A solubilidade aparente da Dexa aumentou 3,9 e 10,3 vezes nos complexos com PAMAM G4 e PAMAM G3.5, respectivamente. O PAMAM G3.5 e PAMAM G4 diminuíram 82 e 1,7 vezes, respectivamente, o coeficiente de difusão da Dexa. Os estudos *ex vivo* indicaram que a iontoforese foi capaz de direcionar os dendrímeros para dentro da córnea, além de aumentar 2,9, 5,6 e 3,0 vezes a quantidade de Dexa permeada a partir das formulações que continham Dexa livre, Dexa-PAMAM G4 e Dexa-PAMAM G3.5, respectivamente. Aumentou também a quantidade de Dexa retida na córnea em aproximadamente 2 vezes para todas as formulações. Os experimentos de citotoxicidade evidenciaram a maior toxicidade do PAMAM G4 e sua dependência da concentração e tempo de incubação. Por fim, os experimentos *in vivo* mostraram que a iontoforese aumentou a concentração de Dexa no humor aquoso cerca de 2, 2,5 e 6,6 para a Dexa livre, Dexa-PAMAM G4 e Dexa-PAMAM G3.5, respectivamente. Portanto, a associação de dendrímeros PAMAM com a iontoforese representa uma estratégia promissora para a administração tópica direcionada e sustentada de fármacos na córnea.

Palavras-chave: dendrímero PAMAM; iontoforese; administração ocular tópica, dexametasona, córnea, microscopia confocal.

ABSTRACT

SOUZA, J.G. **Evaluation of the combination of dendrimers and iontophoresis for ocular drug administration.** 2014. 137f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Topical administration of eye drops is the most convenient way for treatment of eye diseases. The challenge for the pharmaceutical technology is to ensure that the drug administered in the eye drops reaches the site of action in appropriate concentrations with reduced side effects, prolonged effect and single dose. Therefore, the development of drug delivery systems and appropriate strategies become necessary. The objective of this work was to evaluate the influence of iontophoresis in the ocular penetration of generation 4 polyamidoamine dendrimers (PAMAM) with different surface groups (PAMAM G4, cationic, and PAMAM G3.5, anionic), prepare complexes of these dendrimers with an anti-inflammatory drug model, dexamethasone (Dexa), and evaluate the influence of dendrimers and iontophoresis association on Dexa cornea penetration using *ex vivo* and *in vivo* models. Dexa-PAMAM complexes were obtained and characterized by infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance (^1H -NMR, ^{13}C -NMR and DOSY), dynamic light scattering and UV/VIS spectroscopy to evaluate the formation of the complexes, their size and zeta potential, as well as changes in drug solubility. Dexa release rate from complexes was determined from the *in vitro* release studies using synthetic membrane. The penetration and distribution of PAMAMs into the cornea and their influence in the *ex vivo* Dexa penetration was assessed using pig's cornea, confocal scanning laser microscopy (CSLM) and ultra performance chromatography coupled to a mass spectrometer for quantification of the drug permeated. PAMAMs cytotoxicity was assessed in culture of retina epithelial cells and cornea epithelial cells. Finally, the influence of iontophoresis and PAMAMs on Dexa concentration in the aqueous humor of rabbit eyes was evaluated *in vivo*. The characterization results showed that Dexa was incorporated to PAMAMs and that these complexes had an average size of approximately 50 nm using the NTA technique, with the distribution of small particles and aggregates when dispersed in physiological medium. The zeta potential of Dexa-PAMAM G4 and Dexa PAMAM G3.5 complexes were +6.4 mV and -18.5 mV, respectively. PAMAM G4 and G3.5 PAMAM enhanced Dexa solubility by 3.9 and 10.3-fold, respectively. PAMAM G3.5 and PAMAM G4 decreased by 82 and 1.7-fold Dexa diffusion coefficient. The *ex vivo* studies indicated that iontophoresis directed dendrimers into the cornea, increasing the amount of Dexa permeated by 2.9, 5.6 and 3.0-fold for the formulations containing free Dexa, Dexa-PAMAM G4 and Dexa-PAMAM G3.5, respectively. Iontophoresis also increased approximately 2-fold the amount of drug retained into the cornea for all formulations. The cytotoxicity experiments revealed that PAMAM G4 toxicity was dependent on the concentration and incubation time. Finally, the *in vivo* experiments showed that iontophoresis increased Dexa concentration in the aqueous humor by 2, 2.5 and 6.6-fold for free Dexa, Dexa-PAMAM G4 and Dexa-PAMAM-G3.5, respectively. Therefore, the combination of iontophoresis with PAMAM dendrimers represents a promising strategy for targeted and sustained topical drug delivery to the cornea.

Keywords: PAMAM dendrimer; iontophoresis; topical ocular administration, dexamethasone, cornea, confocal microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura do olho (Adaptado de GAUDANA et al., 2009).....	5
Figura 2.	Organização celular da córnea (BARAR et al., 2009)	6
Figura 3.	Estrutura química dos dendrímeros PAMAM G4 (a) e PAMAM G3.5 (b) (KLAJNERT <i>et al.</i> , 2003).....	10
Figura 4.	Rota sintética do PAMAM (ESFAND; TOMALIA, 2001).....	10
Figura 5.	Representação esquemática de dendrímeros PAMAM de geração 4 a 7 e comparação dessas estruturas com proteínas (Adaptado de ESFAND; TOMALIA, 2001)	11
Figura 6.	Iontoforese com eletrodos de Ag/AgCl demonstrando as reações eletroquímicas que ocorrem na superfície dos eletrodos e fluxo de íons durante a iontoforese. Ânodo contendo um fármaco ionizável D^+ e seu contra íon A^- e Na^+Cl^- (Adaptado de KALIA <i>et al.</i> , 2014).....	15
Figura 7.	Representação dos mecanismos envolvidos na iontoforese: (A) eletromigração e (B) eletrosmose (GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2009).....	16
Figura 8.	Fotografia da sistema Eyegate II (www.eyegatepharma.com).....	19
Figura 9.	Representação esquemática do dispositivo Visulex. (Adaptado de http://www.aciont.com/technologies/samples)	20
Figura 10.	Sistema de liberação iontoforética OcuPhor TM inserido no olho humano (FISHER <i>et al.</i> , 2005).....	20
Figura 11.	Fotografia do olho com uveíte anterior (http://www.kellogg.umich.edu/theeyeshaveit/red-eye/anterior-uveitis.html)	22
Figura 12.	Diagrama que representa o formato da célula de difusão. Componentes da célula: a = compartimento doador, b = córnea, c = compartimento receptor, d = banho, e = barra magnética e f = porta para amostragem (GRATIERI <i>et al.</i> , 2010)	35
Figura 13.	Procedimento para a obtenção do eletrodo negativo (cátodo). Um pedaço de fio de prata foi dobrado (1) e mergulhado em um cadinho com cloreto de prata fundido (2). Após a retirada do fio e a solidificação do cloreto de prata nele depositado (3) o eletrodo está pronto para o uso (SIMONETTI, 2004)	36

Figura 14.	Preparo do ânodo em solução salina (5,78 mol/L NaCl) com corrente elétrica de 0,4 mA por 16 h (TAVEIRA, 2007)	36
Figura 15.	Fotografia de um experimento de iontoforese transcorneal <i>in vivo</i> realizado em coelhos Nova Zelândia	45
Figura 16.	Perfil cromatográfico da Dexa. Condições cromatográficas: fase móvel ACN:ácido fórmico 1,3 % em água (30:70), fluxo da fase móvel de 0,4 mL/min, coluna C18 (150 mm x 2 mm, 5 µm) com pré coluna C18 (2 mm x 5 mm) e temperatura de 35 °C. Tempo de retenção: 7,5 min	46
Figura 17.	Perfil cromatográfico do homogeneizado da córnea de olho de porco analisado por UPLC-MS. Tempo de retenção da Dexa: 7,5 min	47
Figura 18.	Curva analítica mostrando a linearidade do método de análise da Dexa, no intervalo de concentração entre 15 e 500 µg/mL. Equação da reta: $y = 12055x - 30173$; coeficiente de correlação linear: $r^2 = 1$. Condições cromatográficas: fase móvel ACN:ácido fórmico 1,3 % em água (30:70), fluxo da fase móvel de 0,4 mL/min, coluna C18 (150 mm x 2 mm, 5 µm) com pré coluna C18 (2 mm x 5 mm) e temperatura de 35 °C	47
Figura 19.	Estrutura química da Dexa.....	51
Figura 20.	Espectro no infravermelho da Dexa	51
Figura 21.	Espectro de infravermelho do PAMAM G4 e do complexo Dexa-PAMAM G4	52
Figura 22.	Espectro de infravermelho do PAMAM G3.5 e do complexo Dexa-PAMAM G3.5	53
Figura 23.	Espectro de RMN- ¹ H da Dexa em DMSO.....	54
Figura 24.	Espectro de RMN- ¹³ C da Dexa em DMSO	55
Figura 25.	Espectro de DOSY da Dexa em DMSO	56
Figura 26.	Divisão da estrutura do dendrímero PAMAM G4 e contagem de átomos de hidrogênio e carbono magneticamente não equivalentes	57
Figura 27.	Espectro de RMN- ¹ H do PAMAM G4 em D ₂ O	58
Figura 28.	Espectro de RMN- ¹³ C do PAMAM G4 em D ₂ O	58
Figura 29.	Espectro de HMBC do PAMAM G4.....	59
Figura 30.	Espectro de HSQC do PAMAM G4.....	60
Figura 31.	Espectro DOSY do PAMAM G4 em D ₂ O	61

Figura 32.	Espectro de RMN- ¹ H do complexo Dexa-PAMAM G4 em D ₂ O. No detalhe é mostrada a sobreposição do espectro do complexo (vermelho) e do PAMAM G4 livre (azul) e a ampliação de regiões menos povoadas do espectro geral	62
Figura 33.	Espectro de RMN- ¹³ C do complexo Dexa-PAMAM G4 em D ₂ O. No detalhe é mostrada a sobreposição do espectro do complexo (vermelho) e do PAMAM G4 livre (azul).....	63
Figura 34.	Espectro de DOSY do complexo Dexa-PAMAM G4 em D ₂ O	63
Figura 35.	Espectro de DOSY após transformação Bayesiana. Destacado em vermelho os sinais do dendrímero (mais intensos) e em azul os sinais da Dexa (menos intensos)	65
Figura 36.	Estrutura do PAMAM G3.5.....	65
Figura 37.	Espectro de RMN- ¹ H do PAMAM G 3.5 em D ₂ O	66
Figura 38.	Espectro de RMN- ¹³ C do PAMAM G3.5 em D ₂ O	67
Figura 39.	Espectro de HMBC do PAMAM G3.5.....	67
Figura 40.	Espectro de HSQC do PAMAM G3.5.....	68
Figura 41.	Espectro DOSY do PAMAM G3.5 em D ₂ O	69
Figura 42.	Espectro de RMN- ¹ H do complexo Dexa-PAMAM G3.5 em D ₂ O. A amplificação no canto esquerdo superior apresenta a sobreposição do espectro do complexo (vermelho) e do PAMAM G3.5 livre (azul).....	70
Figura 43.	Espectro de RMN- ¹³ C do complexo Dexa-PAMAM G3.5 em D ₂ O	71
Figura 44.	Espectro de DOSY do complexo Dexa-PAMAM G3.5 em D ₂ O	72
Figura 45.	Espectro de DOSY do complexo Dexa-PAMAM G3.5 após transformação Bayesiana. Os sinais circulados em verde, vermelho e azul correspondem, respectivamente, à Dexa livre, ao PAMAM G3.5 e à Dexa complexada ao PAMAM G3.5	73
Figura 46.	Distribuição do tamanho de partícula do PAMAM G3.5 e PAMAM G4 e seus complexos com a Dexa empregando a técnica de NTA. (A): PAMAM G4; (B): Dexa-PAMAM G4; (C) PAMAM G3.5; (D) Dexa-PAMAM G3.5	76
Figura 47.	Espectro de absorção da Dexa.....	77
Figura 48.	Espectros de absorção do PAMAM G4 (esquerda) e do complexo Dexa-PAMAM G4 (direita).....	77

- Figura 49.** Espectros de absorção do PAMAM G3.5 (esquerda) e do complexo DEXA-PAMAM G3.5 (direita)78
- Figura 50.** Perfil de liberação *in vitro* da DEXA a partir das dispersões em PBS de DEXA livre e complexada com PAMAM G4 e G3.5. Os dados representam a média $\pm$ DP (n = 4-5).....80
- Figura 51.** Fotomicrografias de secções transversais da córnea após 3 h de permeação passiva e iontoforética do FITC livre e ligado ao PAMAM G4-FITC e PAMAM G3.5-FITC. Todas as imagens foram obtidas nos mesmos parâmetros e não receberam tratamento após a captura. A córnea não-tratada não apresentou fluorescência nas condições de análise. Os comprimentos de onda de excitação/emissão foram 480/515-530 nm. Escala = 250 μ m82
- Figura 52.** Secções ópticas paralelas à superfície da córnea em diferentes profundidades depois de 5 min (painel da esquerda) e 3 h (painel da direita) de iontoforese. A: Iontoforesse anódica do PAMAM G3.5; B: Iontoforesse catódica do PAMAM G3.5; C: Iontoforesse anódica do PAMAM G4. A córnea não tratada foi usada como controle e não apresentou fluorescência nas condições de análise. Todas as imagens foram capturadas nos mesmos parâmetros e não receberam qualquer tratamento após a captura. A excitação/emissão foram realizadas em 480/515-530 nm.....85
- Figura 53.** Secções ópticas paralelas à superfície da córnea em diferentes profundidades após 3 h de aplicação passiva e iontoforética da solução de FITC livre. A: Passiva; B: Iontoforesse catódica; C: Iontoforesse anódica. A córnea não tratada não apresentou fluorescência nas condições de análise. Todas as imagens foram capturadas nos mesmos parâmetros e não receberam qualquer tratamento após a captura. A excitação/emissão foram realizadas em 480/515-530 nm87
- Figura 54.** DEXA recuperada da córnea após 3 h de experimentos *ex vivo* de permeação passiva e iontoforética a partir de formulações em PBS pH 7,4 contendo DEXA livre ou complexada com os dendrímeros PAMAM G3.5 ou PAMAM G491

- Figura 55.** Viabilidade celular frente ao PAMAM G3.5 das células ARPE-19 na densidade de 1×10^5 células por poço, verificada pelo teste do MTT após 4 e 24 h de incubação. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 4-6 determinações92
- Figura 56.** Viabilidade celular frente ao PAMAM G4 das células ARPE-19 na densidade de 1×10^5 células por poço, verificada pelo teste do MTT após 4 e 24 h de incubação. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 4-6 determinações93
- Figura 57.** Viabilidade celular das células primárias epiteliais da córnea humana na densidade de $1,5 \times 10^4$ células por poço, verificada pelo teste do MTT para o dendrímero PAMAM G3.5. Os resultados representam média $\pm$ EPM de 4-6 determinações.....94
- Figura 58.** Viabilidade celular das células primárias epiteliais da córnea humana na densidade de $1,5 \times 10^4$ células por poço, verificada pelo teste do MTT para o dendrímero PAMAM G4. Os resultados representam média $\pm$ EPM de 4-6 determinações.....95
- Figura 59.** Concentração de Dexa no humor aquoso após 5 min de aplicação iontoforética do complexo Dexa-PAMAM G4. Os resultados estão expressos em média $\pm$ EPM de 2-3 determinações.....99
- Figura 60.** Concentração de Dexa no humor aquoso 2 h após aplicação passiva e iontoforética *in vivo* da Dexa livre (iontoforese anódica) ou complexada com os dendrímeros PAMAM G3.5 (iontoforese catódica) ou PAMAM G4 (iontoforese anódica). Os valores representam a média $\pm$ EPM de 4 determinações (*P<0,05)100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Análises de Precisão e Exatidão intra e inter dia para a Dexa por UPLC-MS.....	48
Tabela 2	Estudo de recuperação da Dexa a partir da córnea e do meio receptor	49
Tabela 3	Estudo de recuperação da Dexa a partir do humor aquoso	50
Tabela 4	Hidrogênios do PAMAM G3.5 e seus respectivos deslocamentos químicos.....	68
Tabela 5	Carbonos do PAMAM G3.5 e seus respectivos deslocamentos químicos..	69
Tabela 6	Tamanho de partícula, índice de polidispersão (Pdl) e potencial zeta dos dendrímeros PAMAM G3.5 e PAMAM G4 livres e complexados com a Dexa, em PBS, pH 7,4, determinados por DLS	74
Tabela 7	Solubilidade da Dexa em água antes e após complexação com o PAMAM G4 e G3.5 à temperatura ambiente	78
Tabela 8	Taxa de liberação (K) e coeficiente de difusão (D) da Dexa a partir das diferentes dispersões saturadas com a Dexa em PBS pH 7,4.....	80
Tabela 9	Quantidade acumulada de Dexa na solução receptora após 3 h de administração passiva e iontoforética. A concentração inicial de Dexa no dador foi de 1000 µg/mL, 939,80 µg/mL e 353,15 µg/mL para Dexa não-complexada, Dexa-PAMAM G3.5 e Dexa-PAMAM G4, respectivamente. Os valores representam a média ± EPM de 4-5 determinações	89
Tabela 10	Recuperação <i>in vitro</i> da Dexa a partir das sondas de microdiálise. Os resultados estão expressos como média ± DP de 3 determinações	98
Tabela 11	Recuperação <i>in vivo</i> da Dexa a partir das sondas de microdiálise. Os resultados estão expressos como média ± DP de 2 determinações	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AM	Acrilato de metila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCRP	Proteína resistente a câncer de mama
CV	Coeficiente de Variação
Dexa	Dexametasona
E	Exatidão
EDA	Etilenodiamina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HEPES:	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico
HMP	Metilprednisolona
LQ	Limite de quantificação
MRP	Proteína resistente a multidrogas
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
ODN-1	Oligonucleotídeo
PAMAM	Poliamidoamina
P-gp	Glicoproteína P
UV/Vis	Ultravioleta visível
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. Globo ocular e administração tópica de fármacos.....	5
2.2. Dendrímeros.....	8
2.3. Iontoforese	13
2.4. Uveíte	20
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Objetivos gerais.....	24
3.2. Objetivos específicos.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Material.....	25
4.1.1. Solventes, Reagentes e Matérias primas	25
4.1.2. Equipamentos e Acessórios	25
4.2. Métodos.....	26
4.2.1. Metodologia analítica para quantificação da Dexa por Cromatografia Líquida de Ultra-Alta pressão acoplada ao espectrômetro de massas (UPLC-MS) ..	26
4.2.2. Validação do método analítico	27
4.2.3. Recuperação da Dexa da córnea.....	29
4.2.4. Recuperação da Dexa do meio receptor (tampão HEPES isotônico pH 7,4) ..	29
4.2.5. Recuperação da Dexa do humor aquoso	30
4.2.6. Obtenção dos complexos sólidos de Dexa com PAMAM.....	31
4.2.7. Caracterização dos complexos Dexa-PAMAM.....	31
4.2.7.1. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	31

4.2.7.2. Análise espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H RMN, ¹³ C RMN e DOSY (Diffusion ordered NMR spectroscopy)	31
4.2.7.3. Tamanho, distribuição e potencial zeta	32
4.2.7.4. Solubilidade dos complexos em água	32
4.2.7.5. Osmolaridade dos complexos	33
4.2.8. Liberação <i>in vitro</i> da Dexa a partir dos complexos Dexa-PAMAM	33
4.2.9. Permeação ocular <i>ex vivo</i>	34
4.2.9.1. Córnea.....	35
4.2.9.2. Eletrodos	35
4.2.9.3. Distribuição dos PAMAMs na córnea	36
4.2.9.4. Permeação da Dexa na córnea.....	38
4.2.10. Citotoxicidade dos dendrímeros PAMAM G3.5 e PAMAM G4 em células epiteliais pigmentadas da retina (ARPE-19).....	39
4.2.11. Citotoxicidade dos dendrímeros PAMAMs G3.5 e PAMAM G4 em células epiteliais da córnea humana.....	40
4.2.12. Experimentos <i>in vivo</i> de permeação corneal.....	42
4.2.12.1. Animais.....	42
4.2.12.2. Microdiálise.....	42
4.2.12.3. Permeação <i>in vivo</i> por 2 h.....	44
4.2.13. Análise estatística dos resultados	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1. Desenvolvimento e validação de um método analítico para quantificação da Dexa por UPLC-MS.....	46
5.1.1. Estudo de interferência da córnea na quantificação da Dexa por UPLC-MS ..	46
5.1.2. Linearidade.....	47
5.1.3. Limite de quantificação.....	48
5.1.4. Precisão e exatidão	48
5.1.5. Recuperação da Dexa da córnea e do meio receptor nos estudos <i>ex vivo</i>	49
5.1.6. Recuperação da Dexa a partir do humor aquoso nos estudos <i>in vivo</i>	50
5.2. Caracterização dos complexos Dexa-PAMAM G3.5 e Dexa-PAMAM G4.....	51
5.2.1. Análise espectroscópica de infravermelho com transformada de Fourier	51
5.2.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	54
5.2.2.1. Dexa	54
5.2.2.2. PAMAM G4	56
5.2.2.3. Complexo Dexa-PAMAM G4.....	61

5.2.2.4. PAMAM G3.5.....	65
5.2.2.6. Complexo Dexametasona-PAMAM G3.5	69
5.2.3. Tamanho de partícula e potencial zeta.....	73
5.2.4. Solubilidade da Dexametasona nos complexos Dexametasona-PAMAM	77
5.2.5. Osmolalidade dos complexos em tampão fosfato pH 7,4.....	79
5.3. Liberação <i>in vitro</i> da Dexametasona	80
5.4. Penetração e distribuição <i>ex vivo</i> de dendrímeros PAMAM na córnea	81
5.5. Permeação <i>ex vivo</i> da Dexametasona através da córnea	88
5.6. Citotoxicidade frente aos dendrímeros PAMAM G3.5 e PAMAM G4	92
5.7. Estudos <i>in vivo</i> de permeação passiva e iontoforética	96
 6. CONCLUSÃO	 103
 7. REFERÊNCIAS.....	 105
 ANEXO.....	 119

1. INTRODUÇÃO

O tratamento tópico de doenças oculares representa um grande desafio para as ciências farmacêuticas. Apesar da aplicação tópica ser a via de administração preferida para o tratamento dessas doenças, devido principalmente à facilidade de aplicação e adesão do paciente, ela é empregada na maioria das vezes somente para o tratamento de desordens no segmento anterior do olho (LEE; ROBINSON, 1986). A maior parte dos fármacos aplicados topicamente é drenada do olho por meio de vários mecanismos, como a lacrimação, a diluição do fármaco pela lágrima e a renovação da lágrima, resultando numa baixa biodisponibilidade do fármaco (GAUDANA *et al.*, 2009). Além disso, a própria estrutura do epitélio da córnea restringe a penetração de fármacos quando se realiza a aplicação tópica (LEBOURLAIS *et al.*, 1998). Devido a estes fatores, menos de 5% da dose administrada é absorvida pelo olho. Isso resulta na administração frequente de quantidades elevadas de fármacos, levando a efeitos colaterais sistêmicos e diminuindo a adesão do paciente ao tratamento (DUVVURI *et al.*, 2003).

O tratamento de infecções que atingem o segmento posterior do olho é ainda mais complexo. As barreiras anatômicas e fisiológicas do olho dificultam a chegada de fármacos administrados topicamente neste segmento, principalmente na retina e coróide (GAUDANA *et al.*, 2009). Sendo assim, a administração sistêmica, e não tópica, de fármacos desempenha um importante papel no tratamento de doenças que afetam o segmento posterior do olho. Uma grande desvantagem associada à administração sistêmica, no entanto, é que apenas de 1 a 2% da dose de fármaco administrada atinge a cavidade vítrea. Para diminuir este problema, a administração de injeções intra-vítreas é uma estratégia utilizada. No entanto, essa via de administração está associada a várias complicações, como descolamento da retina, endoftalmite e hemorragia intra-vítrea. Além disso, os pacientes submetidos a este tipo de tratamento precisam de um monitoramento contínuo após aplicação do fármaco (AUSAYAKHUN *et al.*, 2005). Assim, o desenvolvimento de formulações ou sistemas de liberação adequados, que contraponham a necessidade de altas dosagens e repetidas administrações, é o grande desafio da atualidade para o tratamento de doenças oculares.

Vários sistemas de liberação têm sido empregados com intuito de aumentar a biodisponibilidade de fármacos administrados topicamente. Esses sistemas podem

ser classificados em diferentes categorias, dentre eles os sistemas lipídicos e poliméricos. Os sistemas lipídicos compreendem as microemulsões, nanoemulsões, lipossomas e nanopartículas lipídicas sólidas. Os sistemas poliméricos abrangem os hidrogéis, lentes de contato, nanopartículas poliméricas e dendrímeros (SOUZA *et al.*, 2013).

A incorporação de fármacos em sistemas dispersos na escala nanométrica oferece várias vantagens, a começar pela ausência de efeitos que atrapalhem a visão devido à menor dimensão dos sistemas de liberação. Além disso, o sistema de liberação pode conferir proteção contra enzimas metabólicas, como peptidases e nucleases, aumento no tempo de permanência na superfície ocular e nos tecidos intra-oculares e uma liberação prolongada do fármaco, diminuindo a necessidade de repetidas instilações ou injeções. Por fim, o emprego de sistemas de liberação que façam com que a ação do fármaco seja mais direcionada a determinado sítio alvo possibilita a redução de efeitos colaterais sistêmicos e a diminuição da dose necessária para determinado fim terapêutico (VANDERVOORT; LUDWIG, 2007).

Embora existam na literatura estudos de aplicação de dendrímeros como sistemas de liberação tópica de fármacos, não foram realizados até o momento estudos da associação de dendrímeros e métodos físicos, como a iontoforese, para investigar o efeito dessa associação sobre a permeação intra-ocular de fármacos.

Os dendrímeros de poliamidoamino (PAMAM) apresentam interesse como sistemas de liberação de fármacos. Sua arquitetura possibilita a interação com fármacos muito ou pouco solúveis em água e a alta densidade de cargas superficiais, devido à presença dos múltiplos grupos ionizáveis nas suas terminações, confere a eles diferentes propriedades de superfície. O uso de dendrímeros como carreadores de fármacos para a administração ocular tem levado a um aumento do tempo de residência da formulação aplicada topicamente, evitando, portanto, que o fármaco seja drenado rapidamente da superfície ocular e sustentando sua liberação (VANDERVOORT; LUDWIG, 2007). No entanto, como são macromoléculas, acredita-se que apresentem dificuldade de permear a córnea ou a retina por difusão passiva após a administração tópica, podendo não proporcionar, nesses casos, um aumento significativo da quantidade de fármaco capaz de atingir os segmentos mais internos do olho. A aplicação de métodos físicos, como a iontoforese, pode auxiliar no aumento da penetração dessas

nanoestruturas através das membranas mais impermeáveis do olho (córnea e retina), aumentando a quantidade de fármaco que elas carregam.

Há vários estudos demonstrando o emprego da iontoforese na liberação ocular de fármacos, evidenciando que a iontoforese foi capaz de aumentar a liberação ocular de fármacos tanto no segmento anterior como no posterior (BEHAR-COHEN *et al.*, 1997; ELJARRAT-BINSTOCK *et al.*, 2008; GRATIERI *et al.*, 2010). No entanto, a influência da iontoforese na penetração ocular de dendrímeros ainda não foi estudada.

Como os dendrímeros podem ser dispersos em meio aquoso e ainda apresentar cargas dependendo de seus grupos funcionais e do pH da formulação em que são incorporados, eles podem penetrar na córnea com o auxílio da iontoforese e, desta forma, funcionar como sistemas de liberação direcionados do fármaco neles incorporados. Ou seja, se o dendrímero for capaz de entrar na córnea, poderá liberar o fármaco nele encapsulado no interior deste tecido, sustentando e direcionando sua liberação. Sendo assim, no presente trabalho investigou-se a influência da iontoforese na penetração corneal de dendrímeros. Para tanto, escolheu-se a dexametasona (Dexa) como fármaco modelo para ser complexada com os dendrímeros. A Dexa penetra bem através da córnea, atingindo a câmara anterior do olho, mas deve ser aplicada com frequência para manter a concentração desejada no tratamento de, por exemplo, uveíte ativa neste local. No caso de uveíte anterior grave, injeções subconjuntivais são aplicadas com frequência (TAYLOR *et al.*, 2010). Quando se trata da uveíte no segmento posterior do olho, a injeção de Dexa no humor vítreo é o tratamento de escolha. No entanto, como este fármaco permanece no olho em níveis terapêuticos durante um curto período, especialmente em um olho vitrectomizado (CHALAM; MALKANI; SHAH, 2003; GAN *et al.*, 2005), o resultado são injeções intra-vítreas frequentes. Portanto, o desenvolvimento de formulações tópicas que contenham dendrímeros como sistemas carreadores da Dexa pode auxiliar na liberação sustentada deste fármaco, evitando aplicações frequentes. A aplicação da iontoforese associada a esses nanocarreadores pode resultar em um aumento da penetração tanto do dendrímero quanto do fármaco que ele carrega nos segmentos mais internos do olho, fazendo com que esses sistemas fiquem retidos nos tecidos oculares por um período prolongado. Desta forma, neste trabalho, prepararam-se e caracterizaram-se complexos Dexa/dendrímero a partir de diferentes dendrímeros, um catiônico

(PAMAM G4) e outro aniônico (PAMAM G3.5). Além disso, realizaram-se estudos de permeação corneal passiva e iontoforética da Dexa a partir dos complexos desenvolvidos em modelos de córnea *ex vivo* e *in vivo*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Globo ocular e administração tópica de fármacos

O globo ocular é formado por dois segmentos, o anterior e o posterior. O segmento anterior representa um terço do olho, sendo formado pela córnea, pupila, íris, corpo ciliar e humor aquoso. A fração restante corresponde ao segmento posterior do olho, a qual é constituída pela coróide, retina, humor vítreo e nervo óptico (IDREES *et al.*, 2006; DAYLE; GEROSKI; EDELHAUSER, 2000). A Figura 1 representa a estrutura do globo ocular com suas diferentes estruturas.

Figura 1. Estrutura do olho (Adaptado de GAUDANA *et al.*, 2009).

A córnea humana, com diâmetro médio de 12 mm e espessura de 520 μm , é um tecido transparente, avascularizado, altamente innervado e sensível (ROZSA; BEUERMANN, 1982). Ela é formada por 5 camadas, dentre as quais o epitélio, camada de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio (BARAR *et al.*, 2009). A maneira pela qual as camadas de células se organizam ao longo da córnea proporciona a ela rigidez e resistência. A interação entre essas diferentes camadas é importante para manutenção da integridade e função da córnea (CHOLCAR *et al.*, 2013). A Figura 2 apresenta a organização estrutural da córnea com suas diferentes camadas.

Figura 2. Organização celular da córnea (BARAR *et al.*, 2009).

O epitélio consiste em tecido estratificado que apresenta uma espessura média de 50 μm , representando a camada em contato direto com o meio ambiente. Ele é formado por 5-6 camadas de células derivadas da ectoderme epidérmica, sendo recoberto pelo filme da lágrima (CHOLCAR *et al.*, 2013). O epitélio representa uma barreira limitante no transporte de fármacos, restringindo principalmente o transporte de moléculas hidrofílicas e macromoléculas para a câmara anterior do olho. Essa propriedade da barreira frente à difusão de fármacos é conferida pelas "tight junctions" presentes na camada apical mais superficial do epitélio (MAURICE; MISHIMA, 1984) (Figura 2).

O estroma representa 90% da espessura total da córnea. Ele é formado por matriz extracelular e consiste de um arranjo lamelar de fibras de colágeno. A composição hidrofílica devido à presença de colágeno dificulta o transporte de moléculas lipofílicas através dessa camada (GUADANA *et al.*, 2010).

O endotélio corneal consiste em uma camada de células localizada entre o estroma e o humor aquoso (HUANG *et al.*, 1983). Os mecanismos de transporte ativo presentes no endotélio são importantes na manutenção da transparência da córnea (SUNKARA; KOMPELLA, 2003).

Assim sendo, a estrutura complexa da córnea faz com que ela constitua uma barreira determinante na penetração para a maioria dos fármacos com característica lipofílica e hidrofílica. De modo geral, para que um fármaco apresente uma difusão

adequada através da córnea é necessário que ele apresente um coeficiente de partilha entre 2-3 (MANNERMAA *et al.*, 2006).

Dentre os principais fatores que influenciam a permeação passiva de um fármaco através da córnea tem-se a lipofilicidade, peso molecular, carga e grau de ionização (SCHOENWALD; HUANG, 1983). Por exemplo, a difusão através da via transcelular é maior para fármacos com característica lipofílica, sendo essa via a principal responsável pela permeação de fármacos administrados topicamente. Além disso, vale destacar que o aumento do peso molecular de um fármaco determina a redução da difusão pela via transcelular (HUANG *et al.*, 1989; HAMALAINEN *et al.*, 1997a).

Quando uma formulação é aplicada topicamente, além da barreira conferida pela córnea, a absorção do fármaco fica sujeita aos fatores pré-corneais. Dentre os fatores pré-corneais, tem-se a drenagem da formulação da superfície ocular, o ato de piscar, o filme da lágrima, a renovação da lágrima e a lacrimação induzida (ANANTHULA *et al.*, 2009). Assim, a simples aplicação da formulação na superfície do olho ativa os mecanismos de defesa, como a lacrimação. Considerando a influência do fluxo lacrimal, a dose de uma formulação aplicada topicamente é rapidamente reduzida devido à produção de lágrima, que apresenta um fluxo médio de 1,2 μ L por minuto e um volume de 7 μ L na superfície corneal.

Portanto, após a administração tópica, ocorre a diluição do fármaco e posterior drenagem do mesmo da superfície do globo ocular, fazendo com que apenas uma porcentagem entre 10% e 20% da dose administrada fique disponível para absorção. Como resultado, menos de 5% da dose administrada é absorvida pelos tecidos intra-oculares e o excesso da dose é eliminado pela drenagem pré-corneal ou através do ducto nasolacrimal. Uma vez que o fármaco tenha sido drenado através do ducto nasolacrimal, ele pode sofrer absorção nasal e atingir a circulação sistêmica (LEE; ROBINSON, 1986; GAUDANA *et al.*, 2010; CHOLKAR *et al.*, 2013). Consequentemente, a baixa biodisponibilidade de vários fármacos administrados topicamente torna necessário o aumento da frequência de administração (GAUDANA *et al.*, 2009).

Além da influência da lágrima, destacam-se também as bombas de efluxo transmembrana (GAUDANA *et al.*, 2010). As bombas de efluxo diminuem a biodisponibilidade através do efluxo de moléculas de dentro do citoplasma. Dentre os principais sistemas de efluxo presentes nos tecidos oculares, destacam-se a

glicoproteína P (P-gp), a proteína resistente a multidrogas (MRP) e a proteína resistente a câncer de mama (BCRP). O papel desses sistemas de efluxo na liberação ocular de fármacos tem sido abordado por diversos autores (DEY *et al.*, 2003; MANNERMAA *et al.*, 2006).

O tratamento tópico de infecções que afetam o segmento posterior do olho é mais complicado quando comparado ao segmento anterior. As membranas do olho, tais como a córnea, a conjuntiva e a esclera limitam a absorção de fármacos para regiões mais internas do olho. Dessa forma, a baixa absorção de fármacos em regiões do segmento posterior limita de maneira considerável a administração tópica como alternativa para o tratamento de doenças que afetam a retina, coróide ou humor vítreo (GAUDANA *et al.*, 2009; LE-BOURLAIS *et al.*, 1998).

Assim, o desenvolvimento de formulações ou sistemas de liberação adequados, que contraponham a necessidade de altas dosagens e repetidas administrações, é o grande desafio da atualidade para o tratamento de doenças oculares.

2.2. Dendrímeros

Os dendrímeros são polímeros que apresentam estruturas globulares com tamanho na escala nanométrica. Eles possuem estrutura ramificada e repetitiva (Figura 3), sendo obtidos de maneira sintética (ESFAND; TOMALIA, 2001). Uma característica importante dos dendrímeros é a possibilidade do controle preciso do tamanho e do número dos grupos de superficiais (LIU; FRÉCHET, 1999; KAMINSKAS *et al.*, 2011; MINTZER; GRINSTAFF, 2011). Os dendrímeros têm sido intensamente estudados para várias aplicações, dentre elas a terapia gênica, bioimagem e liberação de fármacos. Como sistemas de liberação, os dendrímeros são capazes de carrear moléculas de fármacos por meio de conjugação, complexação e encapsulamento (KOLHE *et al.*, 2003; KHANDARE *et al.*, 2005; NAVAT *et al.*, 2008; ANTONI *et al.*, 2009; KURTOGLU *et al.*, 2009).

O uso de dendrímeros como sistemas carreadores de fármacos, principalmente para fármacos lipossolúveis, aumenta a solubilidade do fármaco por meio de seu encapsulamento no interior da estrutura do dendrímero devido ao efeito hidrofóbico, já que o dendrímero apresenta cavidades hidrofóbicas no interior de sua

estrutura (KOLHE *et al.*, 2003). A interação entre o dendrímero e o fármaco também pode ocorrer pela formação de pontes de hidrogênio entre grupos polares da molécula do fármaco e aminas presentes no interior e na superfície dos dendrímeros. Por fim, para fármacos que apresentam carga positiva ou negativa, pode haver interações eletrostáticas com os grupos de superfície dos dendrímeros (LIU; FRÉCHET, 1999; D'EMANUELE *et al.*, 2004). Como cada molécula de dendrímero pode interagir com diversas moléculas do fármaco, é possível que complexos fármaco/dendrímero com estequiometria acima de 1:1 sejam formados, determinando um aumento da solubilidade de fármacos lipofílicos em água (CHAUHAN *et al.*, 2003).

Os dendrímeros de poliamidoamina (PAMAMs) foram sintetizados por Tomalia e colaboradores em meados da década de 1980 (TOMALIA *et al.*, 1985) e têm sido amplamente estudados como sistemas de liberação de fármacos. Os PAMAMs, principalmente os de baixa geração, possuem métodos bem estabelecidos de síntese, estabilidade, disponibilidade e baixa citotoxicidade (KOLHE *et al.*, 2003; KHANDARE *et al.*, 2005; TOMALIA *et al.*, 1985; MALIK *et al.*, 2000). A maioria deles apresenta-se sob a forma líquida viscosa, monodispersos e ramificados. Podem apresentar diferentes grupos funcionais de superfície, como aminas, carboxilas ou hidroxilas. O aumento no número de geração (G0, G1, G2, etc.) dos PAMAMs resulta em um aumento no tamanho de sua estrutura, peso molecular e também no número de grupamentos superficiais (VANDAMME; BROBECK, 2005). A Figura 3 representa as estruturas dos dendrímeros PAMAM G3.5 (aminas primárias superficiais) e PAMAM G4 (grupos carboxílicos superficiais), ambos de quarta geração.

Figura 3. Estrutura química dos dendrímeros PAMAM G4 (a) e PAMAM G3.5 (b) (KLAJNERT *et al.*, 2003).

No processo de síntese dos PAMAMs, a reação tem como ponto de partida uma molécula de etileno diamina (EDA). A EDA reage com 4 moléculas de acrilato de metila (AM) ($\text{HC}=\text{CHCOOCH}_3$), formando o dendrímero de meia geração (G0.5), como demonstrado na Figura 4. Se o dendrímero de meia geração G0.5 sofrer mais uma reação com a EDA, será formado o dendrímero de primeira geração. De acordo com a Figura 4, para se obter um dendrímero de meia geração é necessário submeter um dendrímero de geração completa, do inglês “full generation”, a uma reação com AM. Por exemplo, se o objetivo é obter um PAMAM G3.5 é necessário submeter um PAMAM G3 a mais uma reação com AM. Para se obter o PAMAM G4, deve-se reagir o PAMAM G3.5 com EDA em proporções estequiométricas adequadas (WANG *et al.*, 2010).

Figura 4. Rota sintética do PAMAM (ESFAND; TOMALIA, 2001).

O diâmetro dos PAMAMs aumenta sistematicamente a uma taxa de aproximadamente 1 nm por geração. Os de geração maiores do que 3 são estruturas que mimetizam proteínas globulares, apresentando tamanho e propriedades eletroforéticas semelhantes (BROTHERS; PIEHLER; TOMALIA, 1998; ESFAND, TOMALIA, 2001). Em razão disso, os PAMAMs são mencionados como “proteínas artificiais”. Como exemplo, PAMAMs de geração 3, 4 e 5 apresentam tamanho médio de 3, 4 e 5 nm, respectivamente, muito próximos ao tamanho médio da insulina (3 nm), citocromo C (4 nm) e hemoglobina (5,5 nm) (ESFAND; TOMALIA, 2001). A Figura 5 mostra uma representação esquemática de PAMAM de geração 4 a 7 e a comparação da dimensão dessas estruturas com proteínas.

Figura 5. Representação esquemática de dendrímeros PAMAM de geração 4 a 7 e comparação dessas estruturas com proteínas (Adaptado de ESFAND; TOMALIA, 2001).

A avaliação do potencial de PAMAMs como carreadores de fármacos visando a aplicação tópica na superfície do globo ocular encontra-se em seus estágios iniciais de pesquisa, sendo os primeiros estudos realizados em 2005 (VANDAMME; BROBECK, 2005). Nesse estudo, avaliou-se a atividade miótica e midriática de soluções dendriméricas contendo os fármacos tropicamida e nitrato de pilocarpina, respectivamente, bem como o tempo de permanência do fármaco na superfície do globo ocular de coelhos. Os resultados demonstraram que os PAMAMs determinaram um aumento da atividade midriática e sustentaram esse efeito (VANDERVOORT; LUDWIG, 2007).

Em outro estudo, avaliou-se *ex vivo* a influência de PAMAMs com diferentes grupos de superfície (aminas primárias ou carboxilas) sobre o tempo de permanência e a permeação da puerarina através da córnea (YAO *et al.*, 2010). Foi

demonstrado que os complexos de puerarina-PAMAM aumentaram o tempo de residência da puerarina na superfície do globo ocular de coelhos em relação a uma solução de puerarina livre. Além disso, enquanto a solução de puerarina livre resultou em um tempo de meia-vida de 0,8 h, os complexos puerarina-PAMAM G3.5 e puerarina-PAMAM G4 apresentaram meia-vida de $1,01 \pm 0,14$ e $1,08 \pm 0,41$ h, respectivamente.

Estudos *in vivo* de microdiálise demonstraram efeito promissor dos dendrímeros PAMAM sobre as propriedades farmacocinéticas da puerarina a partir do complexo puerarina-PAMAM G3 no humor aquoso. Os resultados demonstraram que o complexo aumentou 1,3, 2,0 e 2,7 vezes a $C_{\max}$, AUC e $T_{1/2}$, respectivamente, em relação à solução do fármaco livre. Por outro lado, mais estudos precisam ser realizados a fim de investigar a influência de diferentes grupos de superfície dos PAMAMs sobre a permeação de fármacos no globo ocular (WANG *et al.*, 2011).

Outra aplicação importante de dendrímeros como sistemas de liberação de fármacos está relacionada à terapia gênica. Como ácidos nucleicos livres podem ser degradados por enzimas endógenas e pelo fato dessas macromoléculas apresentarem carga negativa, a formação de complexos com dendrímeros catiônicos levaria à proteção contra a degradação e ao aumento do transporte através de membranas celulares (WHITEHEAD *et al.*, 2009). Marano *et al.* (2004) investigaram a ação de dendrímeros sobre a liberação de um oligonucleotídeo (ODN-1) visando à redução da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) para a terapia gênica de doenças oculares. Os resultados demonstraram que os dendrímeros avaliados proporcionaram uma redução na expressão de VEGF por 24 h, mostrando um efeito protetor contra a atividade de nucleases em experimentos *in vitro*. Nos experimentos *in vivo*, os dendrímeros foram capazes de liberar o ODN-1, diminuindo significativamente a severidade da neovascularização coroidal. Além disso, os complexos dendrímero/ODN-1 mantiveram a atividade até dois meses após aplicação e proporcionaram uma atividade protetora contra a ação de nucleases. Por outro lado, os complexos foram administrados de maneira invasiva por meio de injeção intra-vítrea.

Apesar de resultados promissores dos dendrímeros como sistemas de liberação ocular de fármacos, quando se trata da aplicação tópica é importante levar em consideração vários aspectos da formulação, como, por exemplo, a dimensão do sistema de liberação em questão. Como os dendrímeros são macromoléculas,

acredita-se que eles apresentem dificuldade de penetrar na córnea por difusão passiva após a administração tópica, podendo não proporcionar, nesses casos, um aumento significativo da quantidade de fármaco necessária para proporcionar efeito farmacológico. A aplicação de métodos físicos, como a iontoforese, pode proporcionar um aumento da penetração dessas nanoestruturas e, consequentemente, dos fármacos que elas carregam, através de membranas mais impermeáveis do olho, como a córnea, por exemplo.

2.3. Iontoforese

A iontoforese consiste na aplicação de uma corrente eléctrica de baixa densidade que facilita e direciona a penetração de moléculas através de diferentes epitélios, como a pele (LOPEZ *et al.*, 2004), unha (DUTET; DELGADO-CHARRO, 2009) e estruturas oculares (HAO *et al.*, 2009; GRATIERI *et al.*, 2010). A iontoforese ocular foi realizada pela primeira vez em 1908, quando se investigou a aplicação tópica de sais de zinco para o tratamento de úlceras na córnea (WIRTZ, 1908).

Após os estudos realizados por Wirtz, a influência da iontoforese na penetração ocular da penicilina (VON SALLMANN, 1944; VON SALLMANN; MEYER, 1944) merece destaque. Através desses estudos, foi demonstrado que a iontoforese promoveu um aumento da concentração de penicilina no humor aquoso em relação às injeções subconjuntivais (VON SALLMANN; MEYER, 1944), proporcionando resultados positivos quanto ao tratamento de infecções intra-oculares induzidas por estafilococos (VON SALLMANN, 1944). Várias outras investigações foram realizadas com intuito de aumentar a penetração de fármacos através da córnea (GRATIERI *et al.*, 2010; HUGHES; MAURICE, 1984; FRUCHT-PERY, 2004; ELJARRAT-BINSTOCK *et al.*, 2005) e da esclera (LAM *et al.*, 1989; BEHAR-COHEN *et al.*, 1997; ELJARRAT-BINSTOCK *et al.*, 2005; BEHAR-COHEN *et al.*, 2002), ressaltando também o aumento da penetração de macromoléculas (HAO *et al.*, 2009; MOLOKHIA *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2011).

De maneira geral, a iontoforese aplicada através da esclera (iontoforese transescleral) é mais eficaz para a liberação de fármacos no segmento posterior do olho, ao passo que a iontoforese aplicada através da córnea (iontoforese transcorneal) apresenta melhores resultados para a liberação de fármacos no segmento anterior do olho (LI *et al.*, 2004).

Um dispositivo iontoforético compreende uma fonte de energia e dois compartimentos: um contendo o eletrodo positivo (ânodo) e o outro o eletrodo negativo (cátodo). Desta maneira, o fármaco com carga geralmente é colocado no compartimento que apresenta o eletrodo de mesma polaridade (KALIA *et al.*, 2004). Além disso, a formulação deve ser hidrofílica para que ocorra a passagem da corrente elétrica. Quando a corrente é acionada, ela é transportada pelos íons presentes no sistema. Assim sendo, os cátions presentes no ânodo se movem em direção ao cátodo, ao passo que os ânions presentes no cátodo se movem na direção oposta.

Apesar de haver diferentes tipos de eletrodos, o mais comumente usado na iontoforese é o eletrodo de Ag/AgCl, pois evita a redução de pH durante a iontoforese e suas reações eletroquímicas ocorrem em voltagens menores que as da eletrólise da água. Esta última vantagem é extremamente relevante, pois no caso de hidrólise da água os ânions gerados no ânodo podem competir com as moléculas do fármaco pela corrente elétrica, diminuindo a eficiência da liberação do fármaco. Além disso, a redução do pH pode provocar irritação no tecido em contato com o compartimento do ânodo, além de afetar a estabilidade do fármaco (KALIA *et al.*, 2004).

Quando os eletrodos de Ag/AgCl são empregados, as reações eletroquímicas no ânodo (eletrodo de Ag) necessitam da presença de íons Cl^- (Figura 6), o que geralmente provoca a redução da eficiência na liberação do fármaco, já que o NaCl usado para fornecer íons Cl^- também introduz íons Na^+ no sistema que competem com o fármaco carregado positivamente pelo transporte de corrente elétrica (KALIA *et al.*, 2004). Os íons Cl^- reagem com a prata e formam cloreto de prata, que, devido a sua baixa solubilidade, é simultaneamente depositada na superfície do eletrodo, liberando um elétron. Para manter a neutralidade elétrica, ou um cátion deve deixar este compartimento e mover-se através da pele, ou um ânion presente no tecido biológico deve migrar para o ânodo. Já no cátodo, o cloreto de prata é reduzido com a chegada de elétrons da fonte de energia e há formação de Ag, que permanece depositada no eletrodo, e liberação de íons Cl^- para a solução (Figura 6). Novamente, a neutralidade elétrica deve ser mantida, ou com a entrada de cátions da córnea, ou com a perda de um ânion desta para o cátodo (KALIA *et al.*, 2004).

Figura 6. Iontoforese com eletrodos de Ag/AgCl demonstrando as reações eletroquímicas que ocorrem na superfície dos eletrodos e fluxo de íons durante a iontoforese. Ânodo contendo um fármaco ionizável D^+ e seu contra íon A^- e Na^+Cl^- (Adaptado de KALIA *et al.*, 2004).

A iontoforese promove o aumento na penetração de fármacos através de epitélios por meio de dois mecanismos, a eletromigração e a eletrosmose. A eletromigração consiste no movimento ordenado de íons na presença de uma corrente elétrica aplicada ao meio e está diretamente relacionada com o fluxo da corrente elétrica (MARRO *et al.*, 2001). Ou seja, colocando-se um fármaco ionizado em contato com o eletrodo de mesma polaridade ocorre repulsão de cargas, facilitando e direcionando o transporte do fármaco através de diferentes tecidos biológicos.

A eletrosmose pode ser definida como um fluxo de solvente gerado pela corrente elétrica, ou seja, pelo fluxo de cargas que ocorre na pele ou córnea. Como a pele apresenta pI entre 4,0 e 4,5 (MERINO *et al.*, 1997) e a córnea um $pI = 3,2$ (ROJANASAKUL *et al.*, 1989), em pH s acima desses valores os grupos carboxilatos presentes nesses tecidos ficam negativamente carregados, tornando a pele ou a córnea cátion seletivas, facilitando a passagem de cátions através desses tecidos. Dessa maneira, quando a corrente elétrica é acionada, ocorre a movimentação de cátions do eletrodo positivo em direção ao eletrodo negativo. Esse fluxo de cátions gera também um fluxo de água, denominado fluxo eletrosmótico. A existência desse fluxo de solvente que ocorre do ânodo para o cátodo significa que moléculas neutras podem ser transportadas por meio da iontoforese anódica e que cátions apresentam esta contribuição somada à eletromigração (KALIA *et al.*, 2004). A eletrosmose é

considerada o mecanismo predominante para moléculas de elevado peso molecular. A Figura 7 apresenta os mecanismos de eletromigração e eletrosmose.

Figura 7. Representação dos mecanismos envolvidos na iontoforese: (A) eletromigração e (B) eletrosmose (GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2009).

Como mencionado anteriormente, a corrente elétrica é transportada pelos íons presentes no sistema. A passagem da corrente elétrica através da solução eletrolítica e da córnea depende dos íons que compõem a solução, pois a corrente elétrica é por eles carregada. A fração de corrente carregada pelo fármaco ionizado e/ou outros íons presentes no sistema (cátions e/ou ânions, univalentes e/ou bivalentes) é denominada número de transporte. A razão máxima de transporte para dado íon ocorre quando o número de transporte deste íon é igual a um, ou seja, quando ele é capaz de carregar sozinho 100% da corrente através da membrana (PHIPPS; GYORY, 1992).

Portanto, além do local de aplicação da iontoforese, parâmetros relacionados à corrente elétrica e à formulação do fármaco podem influenciar tanto a quantidade de fármaco liberada quanto a região do olho na qual o fármaco pode se acumular. Assim, a influência do tempo de aplicação e da densidade de corrente elétrica, bem como concentração do fármaco e seu estado de ionização devem ser levados em consideração para melhor compreensão dos resultados e para maior segurança no uso da técnica (SOUZA *et al.*, 2013).

Considerando a influência dos parâmetros elétricos sobre a penetração/permeação de fármacos, um aumento da densidade de corrente elétrica e no tempo de aplicação da corrente resulta no aumento da penetração (ELJARRAT-BINSTOCK *et al.*, 2005; LAM *et al.*, 1989; BEHAR-COHEN *et al.*, 1997; BEHAR-COHEN *et al.*, 2002). BEHAR-COHEN *et al.* (2002) realizaram a iontoforese transescleral catódica (a partir do cátodo) da metilprednisolona (HMP), um fármaco carregado negativamente. Os autores constataram concentrações de $16,1 \pm 7,6$

$\mu\text{g/mL}$, $32,9 \pm 12,8 \mu\text{g/mL}$ e de $46,0 \pm 27,6 \mu\text{g/mL}$ no humor aquoso para densidades de correntes de 0,8, 2,0 e 4,0 mA/cm^2 , respectivamente, por um período de aplicação de 4 min. Quando o fármaco foi aplicado na ausência de corrente elétrica, a concentração de HMP no humor aquoso foi de $0,6 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$. Os resultados destacaram que o aumento da densidade de corrente resultou no aumento da penetração do fármaco.

O tempo de aplicação da iontoforese também representa um parâmetro muito importante sobre a quantidade de fármaco que permeia/penetra um determinado tecido. Estudos de aplicação de iontoforese transcorneal da tobramicina em olhos de coelhos investigaram o efeito do tempo de aplicação sobre a concentração do fármaco no humor aquoso. Assim, o fármaco foi aplicado durante 5 e 10 min (ROOTMAN *et al.*, 1988). Em ambas situações, empregaram-se densidades de corrente de 0,84 mA/cm^2 . De acordo com os resultados, a concentração de tobramicina no humor aquoso 1 h após a aplicação foi de 145,3 e 312,8 $\mu\text{g/mL}$ para 5 e 10 minutos de iontoforese, respectivamente. A influência do tempo de aplicação da iontoforese transescleral sobre quantidade de fármaco que penetra em diferentes regiões do segmento posterior do globo ocular também já foi investigada por diversos autores. Em dois dos estudos, realizou-se iontoforese transescleral da gentamicina em olhos de coelhos e determinou-se a concentração do fármaco no humor vítreo. A iontoforese foi aplicada por 2 min (BARZA; PECKMAN; BAUM, 1987) e 5 min (BARZA *et al.*, 1986). Em ambas situações, empregaram-se densidades de corrente de 254,6 mA/cm^2 . Os autores demonstraram que a aplicação por 2 e 5 minutos resultou em concentrações de 91,0 e 207,0 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina no humor vítreo.

Uma abordagem promissora da iontoforese para a liberação ocular de fármacos consiste em sua associação com sistemas nanoparticulados. Estudos recentes apresentam a combinação da iontoforese com nanopartículas para aumentar a penetração desses sistemas através de membranas biológicas. Assim sendo, o aumento da penetração de nanossistemas em tecidos oculares poderia resultar no aumento da liberação dos fármacos carregados pelas nanopartículas.

O efeito de iontoforese sobre a liberação de nanoesferas de poliestireno (FluoSpheres[®]) carregadas negativamente ou positivamente foi investigado por meio da iontoforese catódica e anódica, respectivamente (ELJARRAT-BINSTOCK *et al.*, 2008). Uma densidade de corrente elétrica de 6 mA/cm^2 foi aplicada durante 5

minutos na córnea com uso de um hidrogel contendo as nanopartículas, seguido da aplicação por cinco minutos adicionais na esclera. Os resultados demonstraram que as nanoesferas carregadas positivamente apresentaram uma melhor penetração nos tecidos mais internos do globo ocular comparado às nanoesferas negativas. Este efeito foi atribuído à interação das nanoesferas carregadas positivamente com a córnea e a mucosa da conjuntiva, as quais apresentam residual de carga negativa em condições fisiológicas.

Ainda em relação à associação da iontoforese com sistemas nanoparticulados, o efeito da iontoforese no transporte de sistemas micelares através da esclera humana também foi avaliado em experimentos *in vitro* (CHOPRA *et al.*, 2012). Os resultados demonstraram que a liberação transescleral do fármaco encapsulado foi prolongada após aplicação passiva e iontoforética. A iontoforese proporcionou um efeito mais pronunciado quando comparado à aplicação passiva (CHOPRA *et al.*, 2012).

Outra abordagem promissora da iontoforese consiste em seu uso no aumento da penetração de macromoléculas através de tecidos biológicos. Pesquisadores avaliaram recentemente o efeito da aplicação da iontoforese sobre a penetração corneal de moléculas neutras (dextran) e ionizadas (siRNA para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase/siRNA GAPDH) em camundongos C57BL/6 (HAO *et al.*, 2009). Os resultados demonstraram que a iontoforese anódica aumentou a penetração corneal do dextran e que esse aumento foi devido à eletrosmose, a qual desempenha ação importante sobre a penetração de moléculas neutras. A iontoforese catódica foi efetiva sobre a penetração do siRNA GAPDH carregado negativamente, indicando que a eletromigração contribuiu de maneira significativa sobre a penetração corneal dessa macromolécula (HAO *et al.*, 2009).

Diferentes dispositivos têm sido desenvolvidos para administração ocular de fármacos, como o Eyegate II (Eyegate Pharma, Waltham, MA, EUA), o Ocuphor (Iomed Inc., Salt Lake City, UT, EUA) e o Visulex (Aciont Inc., Salt Lake City, UT, EUA). O sistema Eyegate II promove a liberação de fármacos nos segmentos anterior e posterior do olho (PATANE *et al.*, 2011; COHEN *et al.*, 2012). Em um ensaio clínico de fase II, o sistema Eyegate II foi usado para administração do fosfato de dexametasona em 102 pacientes com síndrome do olho seco (PATANE *et al.*, 2011). Os pacientes foram divididos em três grupos. Nos três grupos, correntes de 2,5 mA e 3,5 mA foram aplicadas durante 3 min. Um dos grupos recebeu uma

corrente de 3,5 mA, mas não foi tratado com o fármaco. Os resultados demonstraram que a iontoforese do fármaco reduziu de maneira significativa os sinais e sintomas da síndrome do olho seco (Patane *et al.*, 2011). A Figura 8 representa uma fotografia do sistema Eyegate II.

Figura 8. Fotografia da sistema Eyegate II (www.eyegatepharma.com).

O sistema Visulex consiste em uma combinação de tecnologias visando aumentar a liberação de fármacos no segmento posterior do olho através da esclera (iontoforese transescleral) (<http://www.aciont.com/technologies/visulex>). Nesse dispositivo, o formato da lente, os eletrodos e os componentes da formulação foram delineados de forma a aumentar a penetração de moléculas através de tecidos oculares e evitar a perda do fármaco na superfície do olho. O Visulex é formado por dois compartimentos. Um dos compartimentos contém o fármaco ionizado a ser liberado e o outro compartimento contém o contra íon que promove a precipitação do fármaco após interação com o mesmo no tecido biológico. O contra íon empregado no Visulex é o cálcio. Quando a corrente elétrica é acionada no dispositivo, os contra íons e as moléculas ionizadas do fármaco penetram simultaneamente na esclera, com posterior interação, precipitação e formação de um “depósito” do fármaco neste tecido. Assim sendo, o uso do Visulex pode sustentar a liberação do fármaco por meio da formação de um “depósito” na esclera, proporcionando uma redução na frequência de administração. A Figura 9 representa o sistema Visulex.

Figura 9. Representação esquemática do dispositivo Visulex. (Adaptado de <http://www.aciont.com/technologies/samples>).

Além do Visulex e do Eyegate II, foi desenvolvido um outro sistema para liberação ocular de fármacos, o qual é denominado OcuPhor[®], (Iomed Inc., Salt Lake City, UT, USA). O OcuPhor[®] é um dispositivo prático, descartável, cuja aplicação pode ser realizada em consultório oftalmológico para tratamento de doenças que atinjam o segmento posterior do olho. O uso desse dispositivo requer mínimo procedimento de pré-tratamento e baixa dependência técnica. Como a aplicação é feita através da esclera, este dispositivo é apropriado para liberação de fármacos no segmento posterior do olho. A Figura 10 representa o dispositivo OcuPhor.

Figura 10. Sistema de liberação iontoforética OcuPhor[™] inserido no olho humano (FISHER *et al.*, 2005).

2.4. Uveíte

As principais doenças oculares que carecem de tratamentos menos invasivos e mais eficientes incluem a degeneração macular, as infecções virais (como as causadas pelo citomegalovírus – CMV), as uveítes e a degeneração da retina. O grande desafio é desenvolver sistemas de liberação adequados para os fármacos mais utilizados no tratamento dessas doenças. Ou seja, esses sistemas devem

possibilitar que o fármaco chegue ao local onde a doença se insere em concentrações terapêuticas adequadas. Além disso, os sistemas de liberação devem apresentar mínimos efeitos colaterais, facilidade de aplicação, tempo de ação prolongado e redução nas complicações associadas à terapia (DEL AMO; URTTI, 2008).

A uveíte pode ser classificada anatomicamente em uveíte anterior, intermediária e posterior ou panuveíte. Essa doença pode apresentar característica aguda ou crônica se durar mais ou menos de 3 meses (DESCHENES *et al.*, 2008). A uveíte mais comum é a anterior aguda. A uveíte anterior crônica apresenta uma duração acima de 3 meses e pode ou não estar associada a uma doença sistêmica (TAYLOR *et al.*, 2010). Os demais tipos de uveíte geralmente apresentam caráter crônico. Além disso, os casos mais graves que atingem o segmento posterior estão associados à perda de visão (TAYLOR *et al.*, 2010).

A uveíte anterior consiste na inflamação intraocular da porção anterior da úvea, especialmente a íris e/ou corpo ciliar (BORA; KAPLAN, 2007; GRITZ; WONG, 2004; REEVES *et al.*, 2006; ABELSON; FOSTER; GUPTA, 2002). Ela representa aproximadamente 75% de todos os casos de uveíte (BORA; KAPLAN, 2007). Nos Estados Unidos, a incidência anual de uveíte é estimada em cerca de 26,6 a 102,7 casos em 100.000 adultos, sendo que a incidência é mais elevada para pessoas com mais de 65 anos de idade (GRITZ; WONG, 2004; REEVES *et al.*, 2006).

A uveíte anterior causa dor, irritação da conjuntiva e fotofobia. Assim, esses sinais são úteis para avaliação do grau de inflamação associada à uveíte, bem como para acompanhamento da progressão da doença. Caso o paciente com uveíte anterior não receba tratamento, pode haver perda temporária da visão por meio da formação de catarata, lesão do nervo óptico proveniente de glaucoma secundário, colapso permanente da barreira sanguínea-aquosa, etc (SAMUDRE *et al.*, 2004).

Os fármacos mais usados no tratamento das uveítes são os corticosteróides, como a dexametasona (Dexa). No caso de uveíte anterior, os corticosteróides controlam a dor, fotofobia e vermelhidão, além de diminuir complicações como desenvolvimento de catarata e edema macular. Os corticosteróides tópicos são capazes de penetrar na câmara anterior, sendo administrados frequentemente no caso de uveíte ativa nessa região (TAYLOR *et al.*, 2010).

No caso de uveíte anterior grave, injeções subconjuntivais de corticosteróides representam uma forma de tratamento eficaz (TAYLOR *et al.*, 2010). Quando se

trata da uveíte no segmento posterior do olho, a injeção de Dexametasona no humor vítreo representa uma modalidade de tratamento. No entanto, como este fármaco permanece no olho em níveis terapêuticos durante um curto período, especialmente em um olho vitrectomizado (GAN *et al.*, 2005), o resultado são injeções intra-vítreas frequentes.

O uso de corticosteróides na forma de colírios para tratamento de uveíte anterior pode apresentar limitações devido à baixa biodisponibilidade ocular dessas substâncias. Assim, torna-se necessário realizar a administração frequente e até mesmo crônica desses fármacos, com períodos de tratamento acima de 6 meses. Como consequência, o uso crônico de corticosteróides pode levar à formação de catarata e à elevação da pressão intra-ocular (COHEN *et al.*, 2012). A Figura 11 representa a uveíte anterior.

Figura 11. Fotografia de globo ocular com uveíte anterior (<http://www.kellogg.umich.edu/theeyeshaveit/red-eye/anterior-uveitis.html>).

Cohen *et al.* (2012) investigaram recentemente a segurança e a eficácia da administração iontoforética do fosfato de dexametasona utilizando o sistema Eyegatell® para tratamento de uveíte anterior não infecciosa por meio de ensaios clínicos de fase I e II. Os testes foram realizados em 40 pacientes com uveíte anterior. Foram aplicadas doses de 1,6, 4,8, 10 e 14 mA/min. Os autores demonstraram que a dose de 1,6 mA/min foi mais eficaz no sentido de reduzir a contagem de células da câmara anterior (ACC, parâmetro utilizado para avaliação do grau de inflamação) em relação a doses mais elevadas. Relataram também que dois terços dos pacientes que receberam apenas um tratamento iontoforético apresentaram uma contagem de ACC igual a zero num período de 28 dias pós-tratamento. Além disso, foi demonstrado que doses menores de corrente elétrica foram mais eficazes na redução da inflamação.

Apesar dos resultados promissores, o fármaco foi administrado na forma livre. Em outras palavras, no caso do tratamento de um processo inflamatório de caráter crônico, é importante propor sistemas de liberação que propiciem a liberação prolongada do fármaco após aplicação iontoforética. Desta forma, o desenvolvimento de formulações tópicas que contenham dendrímeros com altas concentrações de Dexa, e que, ao mesmo tempo, fiquem retidos no olho por um período prolongado, aliado a aplicação da iontoforese, de forma que esta permita a penetração tanto do dendrímero quanto do fármaco que ele carrega nos segmentos mais internos do olho, é de fundamental importância para o tratamento de doenças do globo ocular. Caso essa associação demonstre um potencial para aplicação tópica da Dexa, ela poderá ser investigada para aplicação de outros fármacos lipofílicos que também apresentam limitação quanto à aplicação tópica.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Preparar e caracterizar complexos de Dexa com dendrímeros PAMAM (Dexa-PAMAM) de quarta geração (catiônicos e aniônicos). Estudar a influência da iontoforese na penetração ocular dos dendrímeros e da Dexa a partir dos complexos Dexa-PAMAM em modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

3.2. Objetivos específicos

- i) Preparar e caracterizar complexos Dexa-PAMAM empregando dendrímeros com 64 grupamentos superficiais catiônicos (aminas primárias – PAMAM G4) e aniônicos (íons carboxilatos – PAMAM G3.5);
- ii) Avaliar a influência dos PAMAMs sobre a liberação da Dexa usando membrana sintética;
- iii) Avaliar a influência da iontoforese sobre a penetração e distribuição corneal *ex vivo* do PAMAM G4 e G3.5 marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC);
- iv) Avaliar a influência dos complexos Dexa-PAMAM sobre a permeação passiva e iontoforética da Dexa através da córnea utilizando modelo *ex vivo*;
- v) Realizar estudos de citotoxicidade dos dendrímeros em culturas de células epiteliais primárias da córnea (ATCC PCS-700-010) e células epiteliais pigmentadas da retina (ARPE-19), linhagens representativas dos segmentos anterior e posterior do olho, respectivamente;
- vi) Avaliar *in vivo* a influência da associação de dendrímeros e iontoforese sobre a permeação passiva e iontoforética da Dexa na córnea de olhos de coelhos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Solventes, Reagentes e Matérias-primas

- Acetonitrila (grau cromatográfico) – J.T. Baker
- Ácido fórmico 88% - J.T. Baker
- Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico (HEPES) - J.T. Baker
- Cloreto de prata – Sigma Aldrich
- Cloreto de sódio – Synth
- Dendrímero PAMAM geração 4 – Starbust® 10% em metanol – Sigma Aldrich
- Dendrímero PAMAM geração 3,5 – Starbust® 10% sem metanol – Sigma Aldrich
- Dexametasona - Tianjin Pharmaceutic
- Etilenodiamina – Sigma Aldrich
- Fio de platina - Sigma Aldrich
- Fio de prata pura de 1,5 cm de diâmetro (99,99% pureza) – Sigma Aldrich
- Fosfato de sódio bibásico anidro – J.T. Baker
- Fosfato de sódio monobásico anidro – J.T. Baker
- Isotiocianato de fluoresceína (FITC) – Sigma Aldrich
- Metanol (grau cromatográfico) – J.T. Baker
- N-Etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida hidrocloreto (EDC) – Sigma Aldrich
- Tissue Tek – O.C.T Compound

4.1.2. Equipamentos e Acessórios

- Agitador magnético - Variomag Multipoint, Labortechnik, Alemanha
- Balança analítica - AUW220D, Shimadzu
- Balança Semi-analítica - AS 2000C, Marte
- Banho termostatzado Ecoline 003 - E100, Lauda, Alemanha
- Banho-Maria 314/4 - Nova Ética, Brasil
- Bomba de microinjecção - Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN, EUA
- Câmara de imagem - CoverwellTM imaging chamber, Invitrogen

- Células de difusão vertical - Unividros
- Coluna Shim-Pack VP-ODS C18 – Shimadzu
- Criostato - D-6900, Microm
- Espectrofluorímetro - F-4500, HITACHI, Tokyo, Japão
- Espectrofotômetro UV-VIS - Femto – 800XI
- Espectrômetro de RMN - Bruker DRX 500-MHz, Bruker Daltonics
- Espectrômetro de massas - LCMS 2020, Shimadzu
- Fonte de energia – APH 500DM, Kepco Power Supply
- Light Scatering Zetasizer Nano – Malvern
- Leitor de microplacas - Multiskan FC, Thermo Scientific
- Medidor de pH - DM-20, Digimed
- Membrana de acetate de celulose – Fisherbrand
- Membrana de PVDF com poro de 45 µm e 13 mm – Milipore
- Microscópio confocal - TCS SP5, Leica
- Microscópio ótico - Primo Vert, Zeiss
- Nanosight - LM 20, UK
- Osmômetro - K 7400, Knauer
- Pré-coluna - Shim-pack GVP-ODS, Shimadzu Corporation
- Ultracentrífuga - Heraeus Megafuge 16R, Thermo Scientific
- Ultra turrax - Turratec TE-102, Tecnal, Brazil

4.2. Métodos

4.2.1. Metodologia analítica para quantificação da Dexa por Cromatografia Líquida de Ultra-Alta pressão acoplada ao espectrômetro de massas (UPLC-MS).

A Dexa foi analisada empregando-se o sistema cromatográfico Shimadzu (Kyoto, Japan) equipado com duas bombas LC 20-AD, uma unidade controladora CBM-20A, um forno de coluna CTO-20A e um espectrômetro de massas LCMS-2020. A injeção das amostras foi realizada pelo auto-injetor SIL-20AHT. Empregou-se uma coluna C18 (150 mm x 2 mm d.i., 5 µm) Shim-Pack VP-ODS (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) com pré coluna C18 Shim-pack GVP-ODS (2 mm x 5

mm) (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). A fase móvel utilizada foi composta por acetonitrila (ACN):ácido fórmico 0,13% em água deionizada (30:70), com vazão de 0,4 mL/min. Algumas condições foram adaptadas a partir de método descrito na literatura (PATEL *et al.*, 2010). O volume de injeção foi de 25 µL e a temperatura do forno da coluna foi programada a 35°C. O fármaco foi detectado empregando o espectrômetro Shimadzu LCMS 2020 equipado com fonte de ionização por electrospray. Os parâmetros do detector foram definidos no modo SIM (*single ion monitoring*) para monitoramento do íon molecular protonado da Dexa (M^+H^+) em m/z 393,1. O *software* empregado para operar o sistema, adquirir e processar os dados foi o LabSolutions LCMS (Versão 5.42 SP4, Shimadzu Corporation).

4.2.2. Validação do método analítico

O método analítico utilizado para a quantificação da Dexa por UPLC-MS foi validado com intuito de assegurar sua qualidade e confiabilidade, segundo recomendações descritas na literatura (ANVISA, 2003). A linearidade foi avaliada através da construção de curva analítica, em triplicata para cada concentração, com valores expressos em ng/mL, a partir de soluções de Dexa nas concentrações de 15, 25, 50, 100, 250 e 500 ng/mL. Essas soluções foram preparadas por diluição da Dexa em metanol (MEOH):água (1:1) a partir da solução padrão de Dexa em MEOH na concentração de 100 µg/mL. A linearidade foi avaliada através da construção da curva analítica plotando-se a média das área obtida versus concentração.

O limite de quantificação (LQ) foi determinado a partir de soluções de Dexa em MEOH:água (1:1) nas concentrações de 5, 10 e 15 ng/mL, todas em quintuplicata, e analisadas com base na curva analítica preparada na concentração de 15 a 500 ng/mL. Considerou-se o LQ a concentração mais baixa que resultasse em valores de precisão e exatidão $\leq 5\%$.

A precisão representa a dispersão dos resultados entre ensaios independentes de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições definidas. A precisão pode ser determinada através da estimativa do coeficiente de variação (CV) de acordo com a equação I:

$$CV = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad (\text{Equação I})$$

Onde s representa o desvio padrão e $\bar{X}$ a média das concentrações.

A precisão é classificada em três diferentes níveis, incluindo a precisão intra-ensaio, precisão inter-ensaio e reprodutibilidade (RIBANI *et al.*, 2004). A precisão intra-ensaio consiste na realização de medições da mesma amostra, em diferentes preparações. É também denominada precisão intra-corrida ou repetitividade, sendo expressa através da determinação do CV. A precisão inter-ensaio demonstra o efeito de variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação desses fatores. A validação da precisão inter-ensaio é importante no sentido de verificar se no mesmo laboratório o método proporcionará resultados reprodutíveis.

A exatidão de um método analítico demonstra o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (RIBANI *et al.*, 2004). A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade. Assim, deve-se verificar, no mínimo, nove determinações que estejam inseridas na faixa linear da curva analítica, de forma que três concentrações (baixa, média e alta) com três réplicas cada (ANVISA, 2003) sejam avaliadas. A exatidão é determinada de acordo com a equação II:

$$E = \frac{A_{obtida} - A_{teórica}}{A_{teórica}} \times 100 \quad (\text{Equação II})$$

Onde E representa a exatidão, A_{obtida} a área do pico da Dexa determinada experimentalmente e $A_{teórica}$ a área do pico da Dexa presente na solução padrão.

Para se determinar a precisão e exatidão intra-ensaio, foram avaliadas soluções de Dexa nas concentrações de 15, 100 e 500 ng/mL, em triplicata para cada concentração. Para se determinar a precisão e exatidão interensaio, foram avaliadas durante 3 dias consecutivos soluções de Dexa preparadas a cada dia nas concentrações de 15, 100 e 500 ng/mL, em triplicata para cada concentração. As

análises foram realizadas com base na curva analítica preparada na faixa de concentração de 15 a 500 ng/mL, sendo para cada dia foi feita uma curva analítica.

A especificidade foi avaliada na presença de um homogenato de córnea. Para tanto, a córnea foi picotada e adicionou-se 5,0 mL de uma solução de água:MEOH (1:1). Posteriormente, a córnea foi triturada empregando-se um homogeneizador de tecidos (Turrtec TE-102, Tecnal) por 1 minuto, havendo a formação de uma suspensão. Essa suspensão foi filtrada em filtro de PVDF de 0,45 µm de diâmetro e analisada por UPLC-MS. O perfil cromatográfico dessa amostra foi comparado com o perfil do padrão de Dexa em concentração conhecida também preparado em água:MEOH a fim de verificar a presença de possíveis interferentes.

4.2.3. Recuperação da Dexa da córnea

A córnea foi picotada e transferida para um tubo falcon. Em seguida, adicionaram-se diferentes volumes de uma solução metanólica da Dexa contendo quantidades conhecidas do fármaco, resultando em concentrações de 25, 100 e 500 ng/mL. O MEOH foi evaporado, para deixar uma massa conhecida de fármaco em contato com a córnea, e em seguida adicionou-se 5 mL da solução água:MEOH (1:1), utilizada como solvente extrator, para a extração da Dexa presente na córnea. O tubo foi colocado no homogeneizador de tecidos por 1 min e em banho de ultrassom por 15 min. As amostras foram filtradas e quantificadas por UPLC-MS. Esse experimento foi realizado em triplicata para cada nível de concentração. A recuperação foi calculada de acordo com a equação III:

$$\%R = \frac{A_{obtida}}{A_{teórica}} \times 100 \quad (\text{Equação III})$$

Onde %R representa a porcentagem de recuperação, A_{obtida} a área do pico da Dexa determinada experimentalmente e $A_{teórica}$ a área do pico da Dexa presente na solução padrão.

4.2.4. Recuperação da Dexa do meio receptor (tampão HEPES isotônico pH 7,4).

A recuperação de Dexa do meio receptor foi avaliada em triplicata para cada concentração, em três concentrações diferentes: 25, 100 e 500 ng/mL. Assim sendo,

soluções metanólicas de Dexa contendo quantidades conhecidas do fármaco foram adicionadas aos tubos. O metanol foi evaporado e 1 mL de tampão HEPES isotônico pH 7,4 foi adicionado em cada tubo. Adicionou-se 1 mL de acetato de etila a cada tubo para efetuar a partição. Os tubos foram agitados em vórtex por 1 min e mantidos em repouso. Após a partição, coletou-se 700 µL da fase acetato de etila e evaporou-se o solvente. As amostras foram dissolvidas em 700 µL de água:MEOH (1:1), filtradas em filtro de PVDF e analisadas por UPLC-MS. A porcentagem da recuperação foi determinada com base na equação IV:

$$\% R = \frac{A_{receptor}}{A_{padrão}} \times 100 \quad (\text{Equação IV})$$

Onde %R representa a porcentagem de recuperação da Dexa da solução receptora, $A_{receptor}$ a área do pico da Dexa no meio receptor e $A_{padrão}$ a área do pico da Dexa presente na solução padrão.

A curva analítica utilizada neste experimento foi construída da mesma forma como descrito no item 4.2.2.

4.2.5. Recuperação da Dexa do humor aquoso

A recuperação de Dexa do humor aquoso também foi avaliada em triplicata para as concentrações de 25, 100 e 500 ng/mL. Soluções metanólicas de Dexa contendo quantidades conhecidas do fármaco foram adicionadas aos tubos. O metanol foi evaporado e 100 µL de humor aquoso foram adicionados em cada tubo. Em seguida, adicionou-se 200 µL de acetato de etila a cada tubo para efetuar a partição. Os tubos foram agitados em vórtex por 1 min e mantidos em repouso. Após a partição, coletou-se 150 µL da fase acetato de etila e evaporou-se o solvente. As amostras foram dissolvidas em 150 µL de água:MEOH (1:1) e analisadas por UPLC-MS. A porcentagem de recuperação da Dexa do humor aquoso foi determinada de acordo com a equação IV.

4.2.6. Obtenção dos complexos sólidos de Dexa com PAMAM

Os complexos sólidos de Dexa com os dendrímeros PAMAM (Dexa-PAMAM) foram obtidos com o PAMAM G4 (Dexa-PAMAM G4) e com o PAMAM G3.5 (Dexa-PAMAM G3.5) conforme descrito na literatura (NA *et al.*, 2006; KOLHE *et al.*, 2003). Para isso, pesou-se 116,0 mg de Dexa, transferiu-se o fármaco para um béquer de 50 mL e adicionou-se 25 mL de MEOH contendo dendrímero de forma que a quantidade de fármaco e dendrímero adicionadas resultassem em uma razão molar de 100 mols de Dexa para cada mol de dendrímero. Dessa forma, os 25 mL de MEOH continham ou 42,0 mg de PAMAM G4 ou 38,0 mg de PAMAM G3.5. O meio de reação foi agitado a 300 rpm por 24 h e após a agitação o MEOH foi evaporado a temperatura ambiente empregando ar comprimido. Em seguida, adicionou-se 50 mL de água e a dispersão formada foi novamente agitada a 300 rpm durante 24 h. A suspensão foi filtrada em membrana de PVDF 0,45 μm . A dispersão aquosa contendo o complexo de Dexa-PAMAM foi congelada em freezer a -80°C e liofilizada.

4.2.7. Caracterização dos complexos Dexa-PAMAM

4.2.7.1. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Com intuito de verificar mudanças estruturais presentes nos complexos obtidos, realizaram-se análises de infravermelho com transformada de Fourier de amostras de Dexa, dos dendrímeros PAMAM G3.5 e PAMAM G4 livres e dos complexos Dexa-PAMAM G3.5 e Dexa-PAMAM G4. Os espectros no infravermelho foram obtidos em espectrômetro com transformada de Fourier Perkin-Elmer 502 FTIR, na região de $4450\text{-}450\text{ cm}^{-1}$, resolução de 4 cm^{-1} . As amostras foram preparadas formando pastilhas de KBr.

4.2.7.2. Análise espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H RMN, ^{13}C RMN e DOSY (Diffusion ordered NMR spectroscopy)

As análises de RMN de ^{13}C 125 MHz, ^1H 500 MHz e DOSY foram realizadas em espectrômetro Bruker DRX 500 MHz Ultra Shield da Bruker Daltonics® (Billerica,

MA, EUA) no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP. Os coeficientes de difusão para o PAMAM e para os complexos Dexa-PAMAM foram determinados empregando o decaimento de intensidade do sinal e também da integral de cada um dos sinais obtidos por DOSY. Para as análises, uma solução de Dexa em DMSO deuterado foi preparada na concentração de $2,5 \times 10^{-3}$ mol/L. Dispersões dos dendrímeros foram preparadas na concentração de 3×10^{-3} mol/L em óxido de deutério. Os complexos Dexa-PAMAM G4 e Dexa-PAMAM G3.5 foram também dispersos em óxido de deutério na concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L. As amostras foram filtradas e condicionadas em tubos de quartzo de 5 mm de diâmetro externo.

4.2.7.3. Tamanho, distribuição e potencial zeta

O tamanho, distribuição e potencial zeta dos dendrímeros livres e de seus complexos com a Dexa foram analisados por espalhamento dinâmico de luz (DLS) empregando o Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, UK) equipado com laser He-Ne de comprimento de onda de 633 nm, ângulo do detector de 90° e volume de amostra de 1 mL (Malvern Instruments, UK). As amostras foram dispersas em tampão fosfato isotônico pH 7,4 em uma concentração dos PAMAMs ou dos complexos Dexa-PAMAM equivalente a 1 mg/mL.

O tamanho de partícula também foi determinado pela técnica de análise do rastreamento de nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis-NTA) utilizando o equipamento NanoSight (LM 20, Reino Unido) equipado com software de análise de nanopartículas Tracking (NTA 2.0). As análises foram realizadas no NanoBioss, localizado no Instituto de Química da Unicamp. As amostras foram preparadas em tampão fosfato pH 7,4 na concentração de 1 mg/mL para os PAMAMs e para os complexos Dexa-PAMAM.

4.2.7.4. Solubilidade dos complexos em água

Após a obtenção dos complexos na forma de pó branco liofilizado, amostras dos complexos sólidos Dexa-PAMAM foram pesadas, dispersas em água e sua absorbância foi determinada em 260 nm, visto que nesta região os dendrímeros apresentam mínima absorbância, garantindo que a leitura obtida fosse da própria

Dexa. Assim sendo, foi construída uma curva analítica do fármaco em água na concentração de 0,5-5,0 µg/mL e a concentração do fármaco nos complexos foi determinada com base nesta curva analítica. Após a determinação da concentração da Dexa em cada uma das amostras, foi possível calcular a massa de fármaco presente na massa total do complexo, bem como a massa dos dendrímeros (Equação V).

$$M_{PAMAM} = M_{Complexo} - M_{Dexa} \quad \text{Equação (V)}$$

Onde M_{PAMAM} representa a massa de PAMAM presente no complexo, $M_{Complexo}$ a massa de complexo pesada para preparo das dispersões e M_{Dexa} a massa de fármaco determinada com base na curva analítica.

Dessa forma, após o cálculo da massa de Dexa e dos PAMAMs nas amostras, foi possível calcular o número de mols de cada substância nas amostras, possibilitando a obtenção da razão molar Dexa/PAMAM. Vale destacar que foram obtidos os espectros de absorção da Dexa, de ambos dendrímeros e de seus complexos com a Dexa.

4.2.7.5. Osmolaridade dos complexos

A Dexa livre e complexada com os PAMAMs foram dispersas em tampão fosfato isotônico pH 7,4 contendo 75,2 mmol/L de NaCl. A osmolalidade dessas dispersões foi determinada pelo método de diminuição do ponto de fusão com o auxílio de um osmômetro (Semi-micro osmometer, modelo K 7400, Knauer).

4.2.8. Liberação *in vitro* da Dexa a partir dos complexos Dexa-PAMAM

Foram utilizadas dispersões saturadas de Dexa em tampão fosfato isotônico pH 7,4 contendo 75,2 mmol/L de NaCl (Dexa livre) ou dispersões dos complexos Dexa-PAMAM G4 e Dexa-PAMAM G3.5, também saturadas em relação a concentração de Dexa, no mesmo solvente que a dispersão de Dexa livre.

A difusão da Dexa a partir dos complexos ou da Dexa livre foi estudada utilizando-se célula de difusão vertical (GRATIERI *et al.*, 2011) e membrana sintética de acetato de celulose (cutoff = 3500 Da). Assim sendo, os complexos Dexa-PAMAM ou a Dexa livre foram mantidos em condições de saturação do fármaco,

resultando em concentrações de Dexa de 91,7 µg/mL, 353,1 µg/mL e 939,8 µg/mL para a Dexa, Dexa-PAMAM G4 e Dexa-PAMAM G3.5, respectivamente. Nesse sentido, 1 mL das formulações foi adicionado no compartimento doador e o compartimento receptor foi preenchido com 35 mL de tampão HEPES pH 7,4. O receptor foi mantido sob agitação magnética (600 rpm) a 35°C. Amostras de 1 mL foram coletadas da solução receptora durante 12 horas, com intervalos de 1 hora até 6 horas e de 2 horas após 6 h de experimento. Após cada procedimento de amostragem, o receptor foi substituído com o próprio tampão HEPES. A quantidade de Dexa na solução receptora foi determinada por UPLC-MS, como descrito na Secção 4.2.1. Os coeficientes de difusão da Dexa (D) a partir das dispersões foram calculados utilizando-se a equação VI (HIGUCHI, 1962):

$$Q = 2C_0 \sqrt{\frac{(Dt)}{\pi}} \quad (\text{Equação VI})$$

Onde Q é a quantidade acumulada de Dexa liberada por unidade de área (cm²), C_0 é a concentração inicial de Dexa no doador (µg/mL), D é o coeficiente de difusão da Dexa e t é o tempo. A velocidade de liberação da Dexa (K) foi calculada a partir da inclinação dos gráficos da quantidade de Dexa permeada *versus* a raiz quadrada do tempo.

4.2.9. Permeação ocular *ex vivo*

Esses estudos foram realizados empregando-se células de difusão vertical desenvolvidas e validadas em nosso laboratório (GRATIERI *et al.*, 2010). Estas células consistem de um compartimento receptor e um doador (Figura 12). O compartimento receptor apresenta duas aberturas: uma para a inserção da córnea e outra para amostragem manual da solução receptora. Na parte inferior do compartimento receptor, foram colocados agitadores magnéticos a 600 rpm (15 mm) para homogeneizar adequadamente o conteúdo deste compartimento. As células foram colocadas num compartimento com banho externo para a manutenção da temperatura a 35°C. O receptor foi preenchido com solução tampão HEPES 25 mmol/L contendo 133 mmol/L de NaCl, pH 7,4 (GRATIERI *et al.*, 2010).

Figura 12. Diagrama que representa o formato da célula de difusão. Componentes da célula: a = compartimento doador, b = córnea, c = compartimento receptor, d = banho, e = barra magnética e f = porta para amostragem (GRATIERI *et al.*, 2010).

A córnea foi colocada entre o compartimento doador e o receptor da célula de difusão. A área da córnea em contato com as formulações foi de 0,78 cm². O doador foi preenchido com 1 mL das formulações que se pretendia estudar e o receptor foi preenchido com solução tampão HEPES 25 mmol/L contendo 133 mmol/L NaCl, pH 7,4.

4.2.9.1. Córnea

As córneas empregadas nos experimentos foram obtidas de olhos de porco, as quais foram coletadas imediatamente após o abate dos animais (Matadouro e Frigorífico Olhos D'Água Ltda, Ipuã - SP, Brasil). Os olhos não foram tratados por nenhum tipo de calor no abatedouro. Após a retirada no abatedouro, os olhos foram mantidos a 4° C enquanto transportados para o laboratório e usados dentro de 1 hora e 30 min. Após a preparação da córnea, o tecido foi montado na célula de difusão e mantido em contato com o receptor (tampão HEPES) a 35°C.

4.2.9.2. Eletrodos

Os eletrodos utilizados nos experimentos de iontoforese foram os eletrodos de prata (Ag) e cloreto de prata (AgCl), obtidos segundo LOPEZ (2000). Com o uso de um bico de Bunsen, fundiu-se o cloreto de prata (AgCl) em um cadinho de porcelana para mergulhar uma extremidade do fio de prata com a ponta dobrada, conforme ilustra a Figura 13. Após a imersão do fio de prata (99,9% de pureza), este

foi retirado com a extremidade banhada coberta com cloreto de prata solidificado. Desta maneira, obteve-se o eletrodo negativo (cátodo).

Figura 13. Procedimento para a obtenção do eletrodo negativo (cátodo). Um pedaço de fio de prata foi dobrado (1) e mergulhado em um cadinho com cloreto de prata fundido (2). Após a retirada do fio e a solidificação do cloreto de prata nele depositado (3) o eletrodo está pronto para o uso (SIMONETTI, 2004).

Para o preparo do eletrodo positivo (ânodo), uma solução salina de 5,78 mol/L de NaCl foi utilizada para reduzir o AgCl com o uso de um pedaço de fio de platina e a passagem de corrente elétrica. O terminal positivo do gerador foi conectado ao pedaço de fio de platina e o terminal negativo foi conectado ao eletrodo de AgCl, o qual foi reduzido em Ag por meio da passagem de uma corrente elétrica de 0,4 mA por 16 h (Figura 14).

Figura 14. Preparo do ânodo em solução salina (5,78 mol/L NaCl) com corrente elétrica de 0,4 mA por 16 h (TAVEIRA, 2007).

4.2.9.3. Distribuição dos PAMAMs na córnea

Para a realização desses estudos, os dendrímeros foram marcados com FITC para possibilitar sua visualização por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL). O PAMAM G4 marcado (PAMAM G4-FITC) foi preparado de acordo com

Perumal *et al.* (2008) e Kolhe *et al.* (2003). O dendrímero foi inicialmente dissolvido em tampão fosfato pH 7,4. O FITC foi pré-dissolvido em acetona (razão molar FITC:PAMAM = 5) e posteriormente adicionado ao tampão contendo o PAMAM G4. A mistura foi agitada na ausência de luz durante 24 h. A síntese do PAMAM G3.5 marcado com FITC (PAMAM G3.5-FITC) foi realizada segundo Jevprasesphant *et al.* (2003) e Wiwattanapatapee *et al.* (2000). Inicialmente, o PAMAM G3.5 foi dissolvido em tampão fosfato isotônico pH 7,4, com subsequente adição de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) a uma razão molar de 1:1. Essa mistura foi agitada por 30 min à temperatura ambiente. Uma razão molar equivalente de etilenodiamina (EDA) foi adicionada e a mistura reacional foi agitada por mais 4 h. Por fim, uma solução metanólica de FITC (razão molar FITC:dendrímero = 5) foi adicionada e a solução foi agitada por 24 h na ausência de luz.

As soluções contendo PAMAM G4-FITC ou PAMAM G3.5-FITC foram dialisadas em água deionizada por 2 dias empregando uma membrana de diálise com *cutoff* de 3500 KDa (Fisherbrand, Fisher Scientific) para remover o FITC não reagido com os PAMAMs. Finalmente, a ausência de FITC não reagido foi confirmada por HPLC empregando coluna C18 (Shim-Pack VP-ODS, 4.6 mm x 25 cm). A fase móvel foi composta de ácido acético 1% e acetonitrila (ACN) (10:90), com vazão de 1 mL/min. A fluorescência foi monitorada com uso de um detector de fluorescência (RF-10AXL, Shimadzu). Nestas condições, o FITC livre apresentou um tempo de retenção de 4 min, ao passo que os conjugados de FITC-PAMAMs eluíram em aproximadamente 2,7 minutos. Portanto, caso houvesse moléculas de FITC não reagidas com os dendrímeros, seria possível detectá-las em 4 min. Para avaliar o número de moléculas de FITC ligadas aos grupos terminais dos PAMAMs, a intensidade de fluorescência de FITC foi monitorada utilizando um espectrofluorímetro (F-4500, Hitachi, Tóquio, Japão) em 490/518 nm (excitação/emissão). As curvas de calibração foram lineares ($r = 0,99$) para o FITC no intervalo de concentração de 20-1000 ng/mL. Para ambos os PAMAMs, 1,2 moléculas de FITC foram ligadas aos dendrímeros.

Para avaliar a distribuição do PAMAM na córnea, PAMAMG4-FITC e PAMAM G3.5-FITC contendo 200 µg/mL de FITC ou uma solução saturada de FITC livre (<100 µg/mL), todos em tampão fosfato isotônico pH 7,4, foram colocados nas células de difusão descritas anteriormente (Figura 12). O PAMAM G4-FITC foi

submetido apenas à iontoforese anódica enquanto o PAMAM G3.5-FITC e o FITC livre foram submetidos à iontoforese catódica e anódica.

Nesse sentido, uma corrente elétrica constante de 1 mA/cm^2 foi aplicada por 5 minutos e 3 horas para avaliar a influência do tempo de aplicação da iontoforese na penetração corneal dos PAMAMs. O mesmo protocolo, mas na ausência de corrente elétrica, também foi realizado. Vale destacar que a integridade da córnea na presença da iontoforese foi previamente confirmada após 6 horas de aplicação de uma densidade total de corrente de 180 mA/cm^2 (GRATIERI *et al.*, 2010).

A fluorescência de amostras de córnea após os experimentos passivos e iontoforéticos foi preservada com o uso de uma solução de Tissue Tek (O.C.T. Compound). As córneas foram congeladas a -80°C . Para as análises da distribuição da fluorescência na córnea, foram utilizados dois protocolos diferentes. No primeiro deles, cortes de $20 \mu\text{m}$ de espessura perpendiculares à superfície da córnea foram obtidos com uso de criostato. Em seguida, realizou-se a análise de microscopia utilizando microscópio confocal Leica TCS SP5 (Mannheim, Alemanha) com uma objetiva de imersão com aumento de 20 x. As amostras foram excitadas com laser a 480 nm e a fluorescência foi detectada em 515-530 nm.

No segundo protocolo, as córneas foram colocadas em uma câmara de imagem (câmara de imagem Coverwell™, Invitrogen) e as imagens foram obtidas em um plano paralelo à superfície da córnea (modo xy) com uma objetiva de imersão com aumento 40 x. Assim, as secções ópticas foram feitas no modo “z-stack”, fixando a superfície da córnea como a posição inicial. As amostras foram excitadas como descrito acima. As córneas sem tratamento com PAMAM-FITC foram utilizadas como controle para configurar os parâmetros do microscópio. As imagens foram obtidas com o uso do software LAS AF Lite 2.6. 0 (Leica, Alemanha).

4.2.9.4. Permeação da Dexa na córnea

O doador das células de difusão (Figura 12) foi preenchido com 1 mL de Dexa livre e complexada (Dexa-PAMAM G4 ou Dexa-PAMAM G3.5) na concentração de saturação da Dexa e o receptor foi preenchido com solução tampão HEPES 25 mmol/L contendo 133 mmol/L NaCl, pH 7,4. Dispersões de Dexa livre a 1 mg/mL também foram avaliadas. As dispersões de Dexa livre foram colocadas em contato com o eletrodo positivo (iontoforese anódica). Como o complexo Dexa-PAMAM G4

apresenta carga positiva, ele foi colocado em contato com o eletrodo positivo (Ag) para avaliação do efeito do fluxo eletrosmótico e eletromigratório simultaneamente. O complexo Dexa-PAMAM G3.5 (carga negativa) foi colocado em contato com o eletrodo negativo para avaliar a influência do fluxo eletromigratório e também em contato com o eletrodo positivo para investigação do efeito do fluxo eletrosmótico. Em todas as situações, o contra-eletrodo permaneceu em contato com a solução receptora (HEPES, pH 7,4, 133 mmol/L de NaCl) para completar o circuito. Foi aplicada uma corrente elétrica constante de 1 mA/cm² gerada por uma fonte APH Kepco 500 DM (fonte de alimentação Kepco, EUA). Os experimentos foram realizados por 3 h. Amostras foram coletadas da solução receptora a cada hora e a quantidade de Dexa aí presente analisada por UPLC-MS após extração do fármaco do meio receptor (item 4.2.4).

Para se determinar a cinética de permeação da Dexa três modelos matemáticos foram aplicados: quantidade permeada em função do tempo (cinética de ordem zero), quantidade permeada em função da raiz quadrada do tempo (Higuchi) e logaritmo da quantidade permeada em função do tempo (cinética de primeira ordem). A reta que se apresentou mais linear, com coeficiente de correlação linear (r) mais próximo de 1, foi utilizada para a determinação da cinética da Dexa a partir de cada dispersão.

A Dexa acumulada na córnea também foi avaliada após 3 h de experimento extraindo-se o fármaco da mesma como descrito no item 4.2.3 e quantificando-se o recuperado por UPLC-MS (item 4.2.1).

4.2.10. Citotoxicidade dos dendrímeros PAMAM G3.5 e PAMAM G4 em células epiteliais pigmentadas da retina (ARPE-19)

Para a realização dos experimentos de citotoxicidade em uma linhagem representativa do segmento posterior do olho, foi utilizado como modelo a linhagem de células epiteliais pigmentadas da retina humana (ARPE-19). Esta linhagem foi obtida da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). A linhagem foi mantida na condição de criopreservação em nitrogênio líquido, em solução de congelamento com 10% de dimetilsulfóxido e 90% de soro bovino fetal (SBF) inativado. Para realização dos experimentos, as células foram descongeladas e expandidas em frascos de cultura

celular empregando meio DEMEM/F12 (1:1) completo. As células foram mantidas em incubadora umidificada a 37°C contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂.

Para remover as células dos frascos de cultura foi adicionada uma solução de tripsina a 0,5% em solução salina. Em seguida, os frascos foram mantidos em estufa a 37°C por 3 minutos, sendo que as garrafas foram agitadas por mais 1 min. Logo após, adicionou-se em cada garrafa 10 mL de meio DEMEM/F12 (1:1) completo para neutralizar a tripsina. O conteúdo de cada garrafa foi transferido para tubo falcon e centrifugado a 10°C e 1100 rpm durante 15 minutos.

A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer, seguido da ressuspensão das mesmas em meio DEMEM/F12 (1:1) completo. O plaqueamento foi feito adicionando-se, em cada poço da placa de 96 poços, 1 x 10⁵ células contidas em um volume de 200 µL de meio. Incubaram-se as placas por 24 horas em estufa incubadora umidificada contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂.

No dia seguinte ao plaqueamento das células, o meio de cultura foi removido e os poços da placa foram lavados uma vez com solução salina. Adicionou-se aos poços 180 µL de meio DEMEM/F12 incompleto contendo 10.000 U/mL de penicilina G e 10.000 µg/mL de estreptomicina. Em seguida, foram adicionados em cada poço 20 µL de soluções dos dendrímeros PAMAM G3.5 e PAMAM G4, perfazendo as concentrações finais de 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 e 1000 µmol/L para cada dendrímero. As placas de cultura com os dendrímeros foram incubadas por 4 ou 24 horas. Após a incubação, o meio contendo o dendrímero foi removido e lavou-se cada poço três vezes com solução salina, seguido da adição de 200 µL do meio DEMEM/F12 (1:1). Assim sendo, as placas foram incubadas por mais 24 horas em estufa incubadora umidificada contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂. A citotoxicidade foi determinada pelo teste do MTT.

4.2.11. Citotoxicidade dos dendrímeros PAMAMs G3.5 e PAMAM G4 em células epiteliais da córnea humana

Para realização dos estudos de citotoxicidade em uma linhagem representativa do segmento anterior do olho, foi empregada uma linhagem de cultura primária de células epiteliais da córnea humana. Esta linhagem foi obtida da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC® PCS-700-010™, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). A linhagem foi mantida na condição de

criopreservação na segunda passagem em nitrogênio líquido, em solução de congelamento com 10% de dimetilsulfóxido e 90% de meio de cultivo para garantir máxima viabilidade celular e eficiência de plaqueamento. Para realização dos experimentos, as células foram descongeladas e expandidas em frascos de cultura celular, empregando meio de cultura para células epiteliais basais (ATCC PCS-700-030), contendo kit de crescimento para as células epiteliais da córnea (ATCC PCS-700-040). Este kit contém os seguintes fatores de crescimento: apo-transferrina (5 mg/mL), epinefrina (1 mmol/L), extrato P (0,4 %), hemisuccinato de hidrocortisona (100 ng/mL), L-glutamina (6 mmol/L) e insulina humana recombinante (5 mg/mL). Além da adição destes componentes, também foi adicionada ao meio uma solução de gentamicina (10 µg/mL) e amfotericina B (0,25 µg/mL) (ATCC PCS-999-025). Após descongelamento do vial contendo 5×10^5 células, realizou-se a inoculação em garrafa de 25 cm² em uma densidade de 5000 células/cm², sendo adicionados 5 mL de meio completo. As células foram incubadas à temperatura de 37°C, em estufa incubadora umidificada contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂. Após as células atingirem confluência entre 80-90%, a superfície da garrafa foi cuidadosamente lavada com D-PBS (ATCC 30-2200) e em seguida adicionou-se 2 mL de uma solução de tripsina-EDTA pré-aquecida (37°C). As células foram incubadas por 3 minutos. Posteriormente, agitou-se cuidadosamente a garrafa para completa remoção das células. A tripsina foi neutralizada com o mesmo volume de uma solução neutralizante (ATCC PCS-999-004). O conteúdo de cada garrafa foi transferido para tubo falcon e centrifugado a 4°C e 150 x g por 4 minutos. As células foram novamente transferidas para garrafas de 75 cm² na densidade de 5000 células/cm² e adicionou-se 15 mL de meio de cultura completo. Após atingir novamente confluência entre 80-90%, as células foram tripsinizadas da mesma forma descrita acima. Realizou-se a contagem em contator automatizado (Countess®, Invitrogen) e avaliou-se a viabilidade celular com o uso de tripan blue.

O plaqueamento foi feito adicionando em cada poço da placa de 96 poços $1,5 \times 10^4$ células contidas em um volume de 100 µL de meio. Incubaram-se as placas por 24 horas em estufa incubadora umidificada contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂. No dia seguinte ao plaqueamento das células, o meio de cultura foi removido e adicionou-se aos poços 90 µL de meio de cultura contendo 10.000 U/mL de penicilina G e 10.000 µg/mL de estreptomicina. Em seguida, foram adicionados em cada poço 10 µL de soluções dos dendrímeros PAMAM G3.5 e PAMAM G4,

perfazendo as concentrações finais de 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 e 100 $\mu\text{mol/L}$ para cada dendrímero. As placas de cultura com os dendrímeros foram incubadas por 4 ou 24 horas. Após a incubação, o meio contendo o dendrímero foi removido e lavaram-se os poço com PBS, seguido da adição de 100 μL de meio. Assim sendo, as placas foram incubadas por mais 24 horas em estufa incubadora umidificada contendo 95% de O_2 e 5% de CO_2 e a citotoxicidade determinada pelo teste do MTT.

4.2.12. Experimentos *in vivo* de permeação corneal

4.2.12.1. Animais

Para a realização dos experimentos *in vivo*, foram utilizados como modelo experimental coelhos albinos Nova Zelândia com peso entre 2,0 e 2,5 kg. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de São Paulo (CEUA, Comissão de Ética no Uso de Animais - Protocolo nº 11.1.121.53.6). Durante os experimentos, os coelhos foram mantidos sob anestesia por meio da aplicação via intramuscular de uma mistura dos anestésicos cloridrato de cetamina (35 mg/kg) e xilazina (3,5 mg/kg) a cada 40 min. Ao final dos experimentos, os animais foram eutanasiados por asfixia numa câmara saturada de CO_2 .

4.2.12.2. Microdiálise

A) Implantação da sonda de microdiálise

Uma sonda linear de microdiálise foi implantada no humor aquoso com uso de uma agulha de 22 gauge. O olho do animal foi luxado com o uso de uma luva cirúrgica, seguido de uma pequena incisão no limbo córneo-escleral. Assim sendo, a agulha com a sonda ligada em uma de suas extremidades atravessou o centro da câmara anterior em direção à outra extremidade da córnea, fazendo com que a sonda ficasse no meio da câmara anterior. Em seguida, as sondas foram conectadas às seringas de um sistema de microinjeção em uma de suas extremidades e a outra extremidade foi colocada em tubos para coleta das amostras. As sondas foram perfundidas com tampão fosfato isotônico pH 7,4 com fluxo de 2 $\mu\text{L/min}$ utilizando uma bomba de microinjeção (Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN, EUA). Ao final do processo de implantação das sondas, o globo

ocular foi colocado em posição normal e os animais permaneceram em repouso por 2 h para reestabelecimento da pressão intra-ocular (MACHA, MITRA, 2001; GRATIERI *et al.*, 2011).

B) Recuperação *in vitro* da Dexa a partir da sonda

Os estudos de recuperação *in vitro* da Dexa a partir da sonda foram realizados através da imersão das sondas em soluções de Dexa em diferentes concentrações (25 e 100 ng/mL). As sondas foram conectadas a um sistema de micro-injeção e perfundiu-se tampão fosfato isotônico pH 7,4 através das mesmas em um fluxo de 2 µL/min. As amostras foram coletadas e analisadas por UPLC-MS como descrito no item 4.2.1. A recuperação foi determinada dividindo-se a concentração de Dexa perfundida através da sonda pela concentração inicial de Dexa nas soluções onde as sondas foram imersas.

C) Recuperação *in vivo* da Dexa da sonda (retrodiálise)

A sonda foi implantada no humor aquoso de olhos de coelhos e uma solução de Dexa de concentração conhecida (500 ng/mL) foi perfundida através da sonda, sendo que o dalisato foi coletado e o fármaco nele presente foi quantificado por UPLC-MS (item 4.2.1) após extração da Dexa do humor aquoso (item 4.2.5). A quantidade de fármaco recuperada (R) *in vivo* foi determinada de acordo com a equação VII.

$$R_{in vivo} = \frac{C_i - C_d}{C_i} \quad (\text{Equação VII})$$

Onde C_i é a concentração inicial de Dexa no tampão fosfato e C_d é a concentração de fármaco no dialisado.

Com base nesta padronização, nos estudos de permeação *in vivo* os dados foram corrigidos pelo dado médio obtido nos estudos de recuperação *in vivo* (retrodiálise), de acordo com a equação VIII para determinação da concentração real de Dexa na câmara anterior do globo ocular.

$$C_{real} = \left(\frac{C_{amostra}}{R_{in vivo}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação VIII})$$

Onde $C_{amostra}$ representa a concentração de Dexa na amostra e $R_{in vivo}$ a porcentagem de recuperação do fármaco *in vivo*.

D) Permeação da Dexa

Após a implantação da sonda na câmara anterior, colocou-se um *template* cilíndrico de silicone com diâmetro próximo ao da córnea de forma que as dispersões estudadas ficassem em contato com a superfície da córnea sem haver vazamentos. As dispersões de Dexa livre e Dexa-PAMAM G4 nas concentrações de saturação da Dexa (91,67 e 353,15 µg/mL, respectivamente) foram adicionadas a esses templates. Nos estudos de iontoforese, o eletrodo de prata (ânodo) foi imerso nas dispersões e o contra eletrodo foi conectado à uma das orelhas do animal para completar o circuito elétrico. Foi aplicada uma corrente elétrica constante de 2 mA/cm² gerada por uma fonte APH Kepco 500 DM por 5 min.

Para determinar a concentração de Dexa no humor aquoso, amostras de dialisato foram coletadas a cada hora durante 6 h de experimento após aplicação passiva ou iontoforética. A concentração de Dexa no humor aquoso foi determinada dividindo-se a concentração obtida pela porcentagem de recuperação da Dexa determinada no estudo de retrodiálise.

4.2.12.3. Permeação *in vivo* por 2 h

Após anestesia dos animais, colocou-se um *template* de silicone, cuja borda inferior foi impregnada de graxa de silicone para evitar vazamento da formulação. Assim sendo, o template foi cuidadosamente colocado em contato com a córnea do animal, de forma que a área da córnea delineada pelo dispositivo fosse de aproximadamente 0,8 cm². Em seguida, 1 mL das dispersões de Dexa livre ou complexada com o PAMAM G4 foi adicionado no template e mantido em contato com o eletrodo positivo. A dispersão de Dexa-PAMAM G3.5 foi colocada em contato com o eletrodo negativo. Uma corrente elétrica constante de 5,1 mA/cm² foi aplicada com o auxílio de uma fonte de energia (Futron Data) por 4 min (Figura 15). Para completar o circuito elétrico, na orelha do animal foi fixado um *patch* desenvolvido pela *Iomed* para atuar como contra-eletrodo. Os experimentos de aplicação passiva foram realizados da mesma forma, exceto pelo fato de que não foi aplicada corrente elétrica.

Figura 15. Fotografia de um experimento de iontoforese transcorneal *in vivo* realizado em coelhos Nova Zelândia.

Após a aplicação da iontoforese, os animais foram mantidos em repouso por 2 h para posterior coleta do humor aquoso e quantificação do fármaco presente no mesmo. No final dos experimentos, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e as amostras de humor aquoso foram processadas para quantificação da Dexa. Para tal, 100 µL das amostras foram transferidas para tubos eppendorf de 1,5 mL e particionadas com 200 µL de acetato de etila. Os tubos foram agitados em vórtex por 1 min e mantidos em repouso. Após a partição, coletou-se 150 µL da fase de acetato de etila contendo a Dexa e evaporou-se o solvente. As amostras foram dissolvidas em 100 µL de água:MEOH (1:1) e analisadas por UPLC-MS.

4.2.13. Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa de estatística GraphPad Prism 3.0. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ erro padrão da média (EPM) ou $\pm$ desvio padrão (DP), comparando os diferentes grupos por meio do Student-t não paramétrico. Foram consideradas diferenças significativas os valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desenvolvimento e validação de um método analítico para quantificação da Dexa por UPLC-MS

Apesar de haverem descritas na literatura diversas condições cromatográficas para a quantificação da Dexa, foi necessário modificar tais condições para quantificar a Dexa a partir da córnea devido à complexidade deste tecido. As condições estabelecidas foram: fase móvel ACN:ácido fórmico 1,3% em água (30:70), fluxo da fase móvel de 0,4 mL/min, coluna C18 (150 mm x 2 mm, 5 μ m) com pré coluna C18 (2 mm x 5 mm) e temperatura do forno da coluna de 35 °C. A Figura 16 mostra o perfil cromatográfico da Dexa sob as condições cromatográficas estabelecidas, com tempo de retenção em 7,5 minutos.

Figura 16. Perfil cromatográfico da Dexa. Condições cromatográficas: fase móvel ACN:ácido fórmico 1,3 % em água (30:70), fluxo da fase móvel de 0,4 mL/min, coluna C18 (150 mm x 2 mm, 5 μ m) com pré coluna C18 (2 mm x 5 mm) e temperatura de 35 °C. Tempo de retenção: 7,5 min.

5.1.1. Estudo de interferência da córnea na quantificação da Dexa por UPLC-MS

A análise do perfil cromatográfico do homogeneizado da córnea de porco foi importante para verificar possíveis interferências deste tecido quimicamente complexo na quantificação do fármaco estudado. De acordo com a Figura 17, pode-se afirmar que as substâncias presentes na córnea apresentam menor tempo de

retenção do que a Dexa por apresentarem menor polaridade, não interferindo, portanto, na análise da Dexa.

Figura 17. Perfil cromatográfico do homogeneizado da córnea de olho de porco analisado por UPLC-MS. Tempo de retenção da Dexa: 7,5 min.

5.1.2. Linearidade

O método proposto foi seletivo e linear na faixa de concentração de 15 a 500 ng/mL, com coeficiente de correlação linear adequado ($r^2 = 1$). A Figura 18 representa a curva analítica relativa ao método desenvolvido e validado.

Figura 18. Curva analítica mostrando a linearidade do método de análise da Dexa, no intervalo de concentração entre 15 e 500 $\mu\text{g/mL}$. Equação da reta: $y = 12055x - 30173$; coeficiente de correlação linear: $r^2 = 1$. Condições cromatográficas: fase móvel ACN:ácido fórmico 1,3 % em água (30:70), fluxo da fase móvel de 0,4 mL/min, coluna C18 (150 mm x 2 mm, 5 μm) com pré coluna C18 (2 mm x 5 mm) e temperatura de 35 $^{\circ}\text{C}$.

5.1.3. Limite de quantificação

O limite de quantificação determinado para a Dexa foi igual à menor concentração da curva analítica, ou seja, igual a 15 ng/mL, com coeficiente de variação (CV) igual a 2,76 e erro relativo (E%) de -4,74 %, valores inferiores ao máximo preconizado na literatura (máximo de 5%) (ANVISA, 2003). Os ensaios foram realizados em quintuplicata.

5.1.4. Precisão e exatidão

A Tabela 1 mostra os valores de precisão e exatidão obtidos nos estudos intradia para a Dexa, expressos em CV (%) e erro relativo (E%), respectivamente.

Tabela 1. Análises de Precisão e Exatidão intra e inter-dia para a Dexa por UPLC-MS.

Parâmetros	Concentração nominal (ng/mL)		
Precisão e exatidão intra-dia	15	100	500
Concentração média (ng/mL) ^a	14,43 (±0,11)	99,07 (±0,90)	499,72(±1,72)
Precisão (CV%) ^b	0,79	0,91	0,34
Exatidão (E%) ^c	-3,83	-0,93	-0,06
Precisão e exatidão inter-dia			
Concentração média (ng/mL) ^a	14,41 (±0,11)	99,58 (±2,43)	495,90 (±2,97)
Precisão (CV%) ^b	0,78	2,44	0,60
Exatidão (E%) ^c	-3,95	-0,42	-0,82

^aOs valores representam os desvios - padrão de 3 determinações; ^bPrecisão expressa como coeficiente de variação ($CV\% = (\text{desvio padrão}/\text{média}) \times 100$);

^cExatidão expressa como porcentagem de erro ($E\% = [(\text{conc. obtida} - \text{conc. teórica})/\text{conc. teórica}] \times 100$).

A precisão e a exatidão analisadas intra e interdia foram satisfatórias para o fármaco em estudo, já que os valores de coeficiente de variação e porcentagem de erro relativo obtidos estão de acordo com o recomendado pela literatura vigente, ou seja, menores que 5% (RIBANI *et al.*, 2004).

5.1.5. Recuperação da Dexa da córnea e do meio receptor nos estudos *ex vivo*

O teste de recuperação da Dexa foi realizado com o intuito de verificar se o fármaco é adequadamente extraído da córnea e do meio receptor sob as condições de extração empregadas. A Tabela 2 mostra que, dentro das condições estabelecidas, a solução de água:MEOH (1:1) empregada foi satisfatória para extração da Dexa a partir da córnea e do meio receptor em quantidades detectáveis pelo método de análise validado. Destacam-se que valores de recuperação obtidos ficaram acima de 95% para todos os níveis de concentração testados, mostrando que a variação da concentração de Dexa não interfere na eficiência da extração do fármaco por este método.

Tabela 2. Estudo de recuperação da Dexa a partir da córnea e do meio receptor.

	Concentração adicionada (ng/mL) ^a		
Córnea	25	100	500
Concentração (ng/mL) ^b	23,92	99,12	481,71
Recuperação (%) ^c	95,67 (±0,33)	99,12 (±3,83)	96,34 (±2,51)
Precisão (CV%) ^d	1,36	3,87	0,52
Meio receptor			
Concentração (ng/mL) ^b	25,35	101,57	507,83
Recuperação (%) ^c	101,42 (± 1,25)	101,57 (± 0,73)	101,57 (± 3,07)
Precisão (CV%) ^d	4,95	0,72	0,61

^aConcentração de fármaco adicionada à córnea e ao meio receptor; ^bConcentração do fármaco após extração; ^cRecuperação do fármaco da córnea e do meio receptor; ^dPrecisão do método de extração para os diferentes níveis de concentração. O experimento foi realizado em triplicata para cada nível de concentração.

De acordo com os dados de recuperação a partir da córnea, a recuperação da Dexa para as concentrações de 25, 100 e 500 ng/mL encontra-se entre 95,7 – 99,1%, com o maior coeficiente de variação em torno de 4%. Estes resultados mostram claramente que o método de extração desenvolvido é eficaz e reprodutível na faixa de concentração avaliada. Considerando os dados de extração a partir do

meio receptor, os resultados mostram que o método padronizado também é eficaz e reprodutível para extração de Dexa, apresentando coeficientes de variação abaixo de 5%.

5.1.6. Recuperação da Dexa a partir do humor aquoso nos estudos *in vivo*

Os valores de recuperação da Dexa a partir do humor aquoso estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Estudo de recuperação da Dexa a partir do humor aquoso.

	Concentração adicionada (ng/mL) ^a		
Humor aquoso	25	100	500
Concentração (ng/mL) ^b	26,33	103,85	510,18
Recuperação (%) ^c	105,32 (±0,33)	103,85 (±3,83)	102,04 (±2,51)
Precisão (CV%) ^d	3,75	1,54	0,75

^aConcentração de fármaco adicionada ao humor aquoso; ^bConcentração do fármaco extraído; ^cRecuperação do fármaco do humor aquoso; ^dPrecisão do método de extração para os diferentes níveis de concentração. O experimento foi realizado em triplicata para cada nível de concentração.

De acordo com a Tabela 3, pode-se inferir que as condições de extração do fármaco a partir do humor aquoso apresentaram resultados satisfatórios, com valores de recuperação entre 102,04 e 105,32 %. Assim sendo, o método de extração proposto pode ser empregado para extração do fármaco presente no humor aquoso dos olhos dos coelhos após os experimentos *in vivo* com precisão e exatidão.

5.2. Caracterização dos complexos Dexa-PAMAM G3.5 e Dexa-PAMAM G4

5.2.1. Análise espectroscópica de infravermelho com transformada de Fourier

A estrutura química e o espectro de infravermelho da Dexa estão apresentados nas Figuras 19 e 20, respectivamente.

Figura 19. Estrutura química da Dexa.

Figura 20. Espectro de infravermelho da Dexa.

De acordo com a literatura (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1998), as bandas presentes no espectro de infravermelho da Dexa podem ser atribuídas de acordo com o Quadro 1.

Quadro 1. Bandas presentes no espectro de infravermelho da Dexa (Adaptado de BERGAMINI, 2008).

<i>Região do espectro (cm⁻¹)</i>	<i>Atribuições correspondentes</i>
3400-3675	Deformação axial da ligação OH e ligações de hidrogênio intramoleculares
3020-3050	Deformação axial da ligação C-H aromáticos
2850-3000	Deformação axial da ligação C-H alifáticos
1745-1723	Deformações axiais C=O de acetato
1660	Carbonila C ₂₀
1620-1600	Deformação axial C=C do anel aromático
1130-1040	Deformação angular C-OH
890,12	$\Delta^{1,4}$ -dieno-3-ona

A Figura 21 representa os espectros do dendrímero PAMAM G4 e de seu complexo com a Dexa.

Figura 21. Espectro de infravermelho do PAMAM G4 e do complexo Dexa-PAMAM G4.

No espectro do PAMAM G4 observa-se uma banda larga na região de 3287,81 cm⁻¹, resultante da deformação angular da ligação N-H de amina primária, uma banda fraca em 1132,26 cm⁻¹ relativa à deformação axial C-N, uma banda em 1036,78 cm⁻¹ oriunda da deformação axial C=O. No espectro do complexo Dexa-

PAMAM G4 verifica-se que as bandas relativas ao dendrímero praticamente mascaram as da Dexa. No entanto, ainda assim foi possível observar algumas alterações nas bandas dos dendrímeros e a presença de bandas da Dexa no espectro do complexo. Na Figura 20, pode-se observar que a Dexa apresenta uma banda em 893 cm^{-1} característica da ligação $\Delta^{1,4}$ -dieno-3-cetona. Tal banda pode ser observada no espectro do complexo Dexa-PAMAM G-4 (Figura 21). As bandas em $1550,83$ e $1644,39\text{ cm}^{-1}$ que aparecem no espectro do PAMAM G4, relativas à deformação de ligação amida N-H (KOLHE *et al.*, 2003), apresentaram redução de intensidade no espectro do complexo. As bandas em 2930 , 1460 , 1428 e 1360 cm^{-1} (grupos $-\text{CH}_2-$) também apresentaram redução de intensidade. Essas informações reunidas sugerem a formação do complexo Dexa-PAMAM G4.

A Figura 22 representa os espectro do PAMAM G3.5 e de seu complexo com a Dexa.

Figura 22. Espectro de infravermelho do PAMAM G3.5 e do complexo Dexa-PAMAM G3.5.

Observa-se na Figura 22 uma banda intensa entre 1130 - 1040 cm^{-1} relativa à deformação angular da ligação C-OH da Dexa. Além disso, a intensidade desta banda é relativamente maior quando comparada ao espectro do complexo com o PAMAM G4, o que sugere que o complexo com o dendrímero PAMAM G3.5 apresente uma maior quantidade de Dexa encapsulada do que com o PAMAM G4. A

banda entre 2850-3000 cm^{-1} , que corresponde à deformação axial da ligação C-H de carbonos alifáticos da Dexa, fica sobreposta às bandas do dendrímero. No entanto, é possível observar um aumento na intensidade do sinal nesta região. Portanto, as alterações observadas no espectro do complexo Dexa-PAMAM G3.5 sugerem que o fármaco interage em maior proporção com o PAMAM G3.5 do que com o PAMAM G4.

5.2.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

5.2.2.1. Dexa

Os espectros de RMN de hidrogênio (RMN- ^1H) e de carbono (RMN- ^{13}C) da Dexa livre estão apresentados nas Figuras 23 e 24, respectivamente.

Figura 23. Espectro de RMN- ^1H da Dexa.

Figura 24. Espectro de RMN-¹³C da Dexa em DMSO.

Além da realização das análises de RMN-¹³C e de RMN-¹H, realizou-se também a análise de DOSY, na qual é possível calcular o coeficiente de difusão da(s) molécula(s) presente(s) em uma amostra. Nos experimentos de DOSY, uma sequência específica de pulsos é aplicada à amostra, resultando em um espectro no qual é possível observar a atenuação de cada sinal em função da força do gradiente. A atenuação do sinal segue um decaimento monoexponencial, cujo coeficiente angular é proporcional ao coeficiente de difusão. Para cada espécie química na amostra, espera-se uma atenuação exponencial semelhante de seus sinais e que resulte num valor semelhante de coeficiente de difusão (BRUKER, 2002-2006).

Como esperado, tal padrão foi observado para os sinais estudados de Dexa. O decaimento da intensidade e da integral de cada sinal da Dexa (Figura 25) foi estudado utilizando um modelo de decaimento monoexponencial, possibilitando a determinação do coeficiente de difusão do fármaco. Para cada um dos sinais da Dexa, foram obtidos valores semelhantes de coeficiente de difusão, sendo que esses valores estiveram entre $1,7 \times 10^{-6}$ e $2,0 \times 10^{-6}$.

Figura 25. Espectro de DOSY da Dexa em DMSO.

5.2.2.2. PAMAM G4

Para realizar a análise de RMN do PAMAM G4, foi necessário identificar os carbonos e hidrogênios magneticamente equivalentes na estrutura da molécula. Assim sendo, a molécula do dendrímero foi dividida em 3 partes que se repetem ao longo de sua estrutura. De acordo com os tipos de átomos presentes e com o número de repetições de cada parte da molécula, foi possível contabilizar seis átomos de hidrogênio (H_A ; H_B ; H_C ; H_D ; H_E e H_F) e seis átomos de carbono (C_A ; C_B ; C_C ; C_D ; C_E e C_F) magneticamente diferentes entre si, o que pode ser visualizado na Figura 26.

Figura 26. Divisão da estrutura do dendrímero PAMAM G4 e contagem de átomos de hidrogênio e carbono magneticamente não equivalentes.

O espectro de RMN- 1H do PAMAM G4 está mostrado na Figura 27. Entre 2,3 e 3,3 ppm foi possível observar os sinais referentes a cada um dos seis tipos de hidrogênios presentes na estrutura do dendrímero. No espectro de RMN- ^{13}C , mostrado na Figura 28, observa-se os sinais relativos aos carbonos C_A a C_F entre 32 e 52 ppm e o sinal da carbonila em 175 ppm.

Figura 27. Espectro de RMN- ^1H do PAMAM G4 em D_2O .

Figura 28. Espectro de RMN- ^{13}C do PAMAM G4 em D_2O .

Para determinar as correlações entre os hidrogênios e os carbonos do PAMAM G4, foram realizadas duas análises bidimensionais do dendrímero, HMBC

(*Heteronuclear MultipleBond Coherence*) e HSQC (*Heteronuclear MultipleQuantum Coherence*). Na análise de HMBC (Figura 29), foram observadas interações entre átomos de hidrogênio e de carbono separados entre si por pelo menos duas ligações químicas. Na análise de HSQC (Figura 30), observaram-se interações entre átomos de hidrogênio e de carbono diretamente ligados entre si.

Figura 29. Espectro de HMBC do PAMAM G4.

Figura 30. Espectro de HSQC do PAMAM G4.

Analisando os espectros de HMBC e HSQC juntamente com o espectro de RMN- ^{13}C (Figura 28), pode-se concluir que o sinal em 49 ppm no espectro de RMN- ^{13}C corresponde ao C_A , o sinal em 32,7 ppm ao C_B , o sinal em 41,1 ppm ao C_C , o sinal em 52,3 ppm ao C_D , o sinal em 36,7 ppm ao C_E e o sinal em 39,7 ppm ao C_F . Com relação aos diferentes tipos de hidrogênio observados no espectro de RMN- ^1H (Figura 27), pode-se inferir que o sinal em 2,78 ppm corresponde ao H_A , o sinal em 2,38 ppm ao H_B , o sinal em 3,22 ppm ao H_C , o sinal em 2,58 ppm ao H_D , o sinal em 3,25 ppm ao H_E e o sinal em 2,72 ppm ao H_F . Cabe salientar que as conclusões obtidas na análise dos espectros estão de acordo com dados expostos em artigos presentes na literatura (WANG; SHAO; CHENG, 2013).

Por fim, foi obtido o espectro de DOSY (Figura 31), a partir do qual o decaimento da intensidade e da integral de cada sinal foi estudado e o valor do coeficiente de difusão foi obtido. Para cada um dos sinais de PAMAM G4, foram obtidos valores de coeficiente de difusão entre 7×10^{-7} e 8×10^{-7} .

Figura 31. Espectro de DOSY do PAMAM G4 em D₂O.

5.2.2.3. Complexo Dexa-PAMAM G4

A Figura 32 apresenta o espectro de RMN-¹H do complexo Dexa-PAMAM G4. Foi possível observar sinais referentes aos hidrogênios do dendrímero na mesma região do espectro em que foram observados os sinais para o PAMAM G4 livre (entre 2,3 e 3,3 ppm, Figura 27). Vale destacar que o padrão de sinais obtidos para o complexo foi diferente daquele obtido com o dendrímero livre. No detalhe da Figura 32, em que o espectro do complexo (em vermelho) e do PAMAM G4 livre (azul) estão sobrepostos, pode-se observar claramente essas diferenças. Em regiões menos povoadas do espectro existem sinais de baixa intensidade referentes à Dexa, os quais podem ser observados na ampliação da Figura 32 nas regiões entre 0,5 e 2 ppm, 7 e 8,5 ppm e 5,0 e 7 ppm.

Figura 32. Espectro de RMN- ^1H do complexo Dexa-PAMAM G4 em D_2O . No detalhe é mostrada a sobreposição do espectro do complexo (vermelho) e do PAMAM G4 livre (azul) e a ampliação de regiões menos povoadas do espectro geral.

A Figura 33 representa o espectro de RMN- ^{13}C do complexo Dexa-PAMAM G4. Observa-se um padrão de sinais muito semelhante àquele obtido para o dendrímero livre (Figura 28), com pequenos desvios no valor do deslocamento químico. Não foi possível diferenciar os sinais da Dexa do ruído no espectro apresentado na Figura 33.

Figura 33. Espectro de RMN- ^{13}C do complexo Dexa-PAMAM G4 em D_2O . No detalhe é mostrada a sobreposição do espectro do complexo (vermelho) e do PAMAM G4 livre (azul).

Apesar dos sinais da Dexa terem sido muito pouco intensos para esse complexo, algumas informações puderam ser obtidas do espectro de DOSY do complexo Dexa-PAMAM G4 (Figura 34).

Figura 34. Espectro de DOSY do complexo Dexa-PAMAM G4 em D_2O .

A análise da atenuação exponencial dos sinais mais intensos (aqueles referentes aos hidrogênios do dendrímero) resultou em valores bem uniformes para o coeficiente de difusão, entre $6,0 \times 10^{-7}$ e $6,4 \times 10^{-7}$. Foi possível observar uma leve diminuição nesse parâmetro comparado ao PAMAM G4 (cujo valor obtido foi entre 7×10^{-7} e 8×10^{-7}) e essa diminuição sugere a formação do complexo Dexa-PAMAM G4. A atenuação dos sinais da Dexa também foi analisada, resultando em valores de coeficiente de difusão entre $2,5 \times 10^{-7}$ e $8,9 \times 10^{-7}$, semelhantes aos valores obtidos com os sinais mais intensos relativos ao PAMAM G4. A menor uniformidade dos valores obtidos resulta, provavelmente, da baixa intensidade dos sinais analisados, que estão mais susceptíveis a erros no processo de cálculo do decaimento exponencial. Apesar da baixa uniformidade, os resultados mostram claramente uma diminuição significativa do coeficiente de difusão da Dexa complexada quando comparada à Dexa livre, cujos valores do coeficiente de difusão foram bem maiores (entre $1,7 \times 10^{-6}$ e 2×10^{-6}).

A diminuição considerável do coeficiente de difusão calculado a partir dos sinais da Dexa no complexo Dexa-PAMAM G4, somada à proximidade desses valores com valores obtidos na análise dos sinais do dendrímero, sugere a formação de complexo entre a Dexa e o dendrímero.

Por fim, realizou-se uma transformação Bayesiana, método matemático que possibilita visualizar graficamente os sinais das substâncias químicas em função do coeficiente de difusão. O espectro obtido a partir dessa análise (Figura 35) mostra os sinais do PAMAM G4 (sinais mais intensos destacados em vermelho) e alguns dos sinais da Dexa (sinais menos intensos destacados em azul) na mesma região do espectro, com coeficiente de difusão entre 4×10^{-7} e 9×10^{-7} , o que reforça a hipótese de que houve formação de complexo entre a Dexa e o PAMAM G4.

Figura 35. Espectro de DOSY após transformação Bayesiana. Destacado em vermelho os sinais do dendrímero (mais intensos) e em azul os sinais da Dexa (menos intensos).

5.2.2.4. PAMAM G3.5

Para o PAMAM G3.5, realizaram-se os mesmos procedimentos, sendo que a molécula foi dividida em duas partes que se repetem na estrutura. Assim, foram contabilizados seis átomos de hidrogênio (H_A ; H_B ; H_C ; H_D ; H_E e H_F) e seis átomos de carbono (C_A ; C_B ; C_C ; C_D ; C_E e C_F) magneticamente diferentes entre si, o que está apresentado na Figura 36.

Figura 36. Estrutura do PAMAM G3.5.

O espectro de hidrogênio do PAMAM G 3.5 está representado na Figura 37. Foram observados seis sinais entre 2,3 e 3,5 ppm, semelhante ao observado para o PAMAM G4 (Figura 27).

Figura 37. Espectro de RMN- ^1H do PAMAM G 3.5 em D_2O .

O espectro de RMN- ^{13}C está mostrado na Figura 38. Este espectro apresenta características semelhantes ao espectro do PAMAM G4 (Figura 27). Os sinais entre 32 e 52 ppm são referentes aos carbonos C_A a C_F , ao passo que os sinais 175 e 180 ppm são relativos aos carbonos carbonílicos das amidas e dos ácidos carboxílicos, respectivamente.

Figura 38. Espectro de RMN- ^{13}C do PAMAM G3.5 em D_2O .

Cabe salientar que as correlações entre os hidrogênios e os carbonos do PAMAM G3.5 também foram determinadas por meio das análises bidimensionais HMBC e HSQC, as quais estão apresentadas nas Figuras 39 e 40, respectivamente.

Figura 39. Espectro de HMBC do PAMAM G3.5.

Figura 40. Espectro de HSQC do PAMAM G3.5.

A Tabela 4 apresenta os hidrogênios, identificados pela correlação entre os dados obtidos do espectro de RMN ^1H (Figura 37) e dos espectros de HMBC (Figura 39) e HSQC (Figura 40), e seus respectivos deslocamentos. Cabe salientar que as conclusões obtidas por meio da análise dos espectros estão de acordo com dados expostos em artigos presentes na literatura (WANG; SHAO; CHENG, 2013).

Tabela 4. Hidrogênios do PAMAM G3.5 e seus respectivos deslocamentos químicos.

Identificação	Região (ppm)
H _A	2,78
H _B	2,38
H _C	3,22
H _D	2,58
H _E	3,25
H _F	2,72

A Tabela 5 apresenta os carbonos do PAMAM G3.5, identificados pela correlação entre os dados obtidos do espectro de RMN- ^{13}C (Figura 38) e dos espectros de HMBC (Figura 39) e HSQC (Figura 40), com seus respectivos

deslocamentos. Os resultados estão de acordo com dados obtidos a partir da literatura (WANG; SHAO; CHENG, 2013).

Tabela 5. Carbonos do PAMAM G3.5 e seus respectivos deslocamentos químicos.

Identificação	Região (ppm)
C _A	33,0
C _B	32,7
C _C	41,1
C _D	52,3
C _E	36,7
C _F	39,7

Com relação ao espectro de DOSY do PAMAM G3.5 (Figura 41), foram obtidos valores de coeficiente de difusão entre $7,8 \times 10^{-7}$ e $9,8 \times 10^{-7}$.

Figura 41. Espectro de DOSY do PAMAM G3.5 em D₂O.

5.2.2.6. Complexo Dexa-PAMAM G3.5

A Figura 42 apresenta o espectro de RMN-¹H do complexo Dexa-PAMAM G3.5. Foi possível observar um grupo de sinais entre 2,3 e 3,6 ppm, os quais correspondem aos hidrogênios do dendrímero. O padrão de sinais obtidos para o complexo foi diferente daquele obtido para o dendrímero livre, conforme amplificação da Figura 42, em que o espectro do complexo (vermelho) e do PAMAM G3.5 (azul) livre estão sobrepostos.

Figura 42. Espectro de RMN- ^1H do complexo DEXA-PAMAM G3.5 em D_2O . A amplificação no canto esquerdo superior apresenta a sobreposição do espectro do complexo (vermelho) e do PAMAM G3.5 livre (azul).

Diferentemente do que foi observado no espectro de RMN- ^1H do complexo DEXA-PAMAM G4 (Figura 32), foi possível observar os sinais da DEXA com alta intensidade nas regiões entre 0,5 e 2 ppm, 7 e 8,5 ppm e entre 5,5 e 7 ppm no espectro do complexo DEXA-PAMAM G3.5 (Figura 42).

Quanto ao espectro de RMN- ^{13}C do complexo DEXA-PAMAM G3.5 (Figura 43), os sinais do PAMAM G3.5 e da DEXA apresentaram um padrão um pouco diferente do que havia sido observado no espectro de RMN- ^{13}C do complexo DEXA-PAMAM G4 (Figura 33). Esses dois espectros sugerem que a relação estequiométrica DEXA/dendrômero é maior no complexo com o PAMAM G3.5 do que naquele com o PAMAM G4.

Figura 43. Espectro de RMN- ^{13}C do complexo Dexa-PAMAM G3.5 em D_2O .

Por fim, com relação ao espectro de DOSY apresentado na Figura 44, a análise da atenuação exponencial dos sinais entre 2,3 e 3,6 ppm referentes aos hidrogênios do dendrímero resultou em valores de coeficiente de difusão entre $7,0 \times 10^{-7}$ e $8,0 \times 10^{-7}$, havendo uma pequena redução desse parâmetro comparado ao PAMAM G3.5 livre (Figura 41), cujos valores obtidos ficaram entre $7,8 \times 10^{-7}$ e $9,8 \times 10^{-7}$. Embora a redução do coeficiente de difusão tenha sido pequena, acredita-se que essa diminuição seja devido à formação do complexo Dexa-PAMAM G3.5. A análise dos sinais da Dexa presente no complexo Dexa-PAMAM G3.5 possibilitou a determinação de valores de coeficiente de difusão uniformes, entre $2,7 \times 10^{-7}$ e $2,9 \times 10^{-7}$. Assim sendo, é possível que parte da Dexa esteja complexada com o PAMAM G3.5 e uma outra fração esteja na forma livre, mascarando os sinais referentes ao fármaco complexado.

Figura 44. Espectro de DOSY do complexo Dexa-PAMAM G3.5 em D₂O.

A aplicação da transformação Bayesiana foi bastante elucidativa, tornando possível a visualização gráfica de um grupo de sinais da Dexa livre (Figura 45, destacado em verde), sinais do PAMAM (Figura 45, destacado em vermelho) e um grupo de sinais pouco intensos da Dexa complexada (Figura 45, destacado em azul). Essas observações, principalmente dos sinais destacados em azul, reforçam a hipótese de que o sistema contém Dexa livre e complexada ao dendrímero.

Figura 45. Espectro de DOSY do complexo Dexa-PAMAM G3.5 após transformação Bayesiana. Os sinais circutados em verde, vermelho e azul correspondem, respectivamente, à Dexa livre, ao PAMAM G3.5 e à Dexa complexada ao PAMAM G3.5.

5.2.3. Tamanho de partícula e potencial zeta

A Tabela 6 mostra o potencial zeta, a distribuição de tamanho de partícula e índice de polidispersão (Pdl) de dispersões em PBS de PAMAM G3.5 e PAMAM G4 livres e complexados com a Dexa, pH 7,4, determinados por DLS.

Tabela 6. Tamanho de partícula, índice de polidispersão (Pdl) e potencial zeta dos dendrímeros PAMAM G3.5 e PAMAM G4 livres e complexados com a Dexa, em PBS, pH 7,4, determinados por DLS.

Amostra	Tamanho (nm)	Distribuição	Pdl	Potencial Zeta (mV)
PAMAM G3.5	368,1	3,8 nm (21,6 %) 242,0 nm (78,4 %)	0,6	- 17,3
PAMAM G4	261,3	4,9 nm (23,8%) 16,4 nm (6,7%) 259,7 nm (69,6%)	0,5	+ 6,4
Dexa- PAMAM G3.5	284,0	243,1 nm (100%)	0,4	- 18,5
Dexa- PAMAM G4	180,5	5,4 nm (60,4%) 495,8 nm (39,6%)	0,6	+ 6,14

A distribuição de tamanho de partícula dos dendrímeros PAMAM G4 e PAMAM G3.5 em PBS demonstrou ser polidispersa e multimodal (Tabela 6). Segundo a literatura, os dendrímeros PAMAM de geração 4 apresentam um tamanho de partícula de aproximadamente 4 nm (ESFAND; TOMALIA, 2001). Portanto, partículas com tamanhos acima dessa faixa de tamanho podem estar relacionadas com a formação de aglomerados de dendrímeros em PBS e populações em torno de 4-5 nm correspondem provavelmente aos dendrímeros na forma não-agregada. Vale destacar que foram realizadas várias análises de tamanho empregando a técnica de DLS e que os resultados obtidos apontam uma variação muito grande no tamanho médio e na distribuição dos dendrímeros para amostras diferentes e para diferentes análises de uma mesma amostra.

Atualmente, a técnica de *Dynamic Light Sacttering* (DLS) é a técnica mais utilizada para determinar o tamanho de nanopartículas (FILIPE; HAWE; JISKOOT, 2010) e tem sido empregada para determinar o tamanho de dendrímeros PAMAM (KHOURI; TAM, 2010; SADEKAR; GHANDEHARI, 2012). Dependendo do modelo do equipamento utilizado, é possível determinar o tamanho de partículas na faixa de 0,3 nm a 5,0 μ m. No entanto, quando a amostra contém grandes agregados, a determinação do tamanho de partículas menores (não-agregadas) pode ser

comprometida (BERNA; PECORA, 2000). Como a análise de tamanho de partícula dos dendrímeros PAMAM por DLS sugere a presença de grandes agregados, decidiu-se avaliar as dispersões dos PAMAMs usando uma técnica que também é baseada no espalhamento de luz, a análise de rastreamento das nanopátulas (NTA - *Nanoparticle Tracking Analysis*).

A técnica de NTA, da mesma forma que a de DLS, baseia-se no movimento *Browniano*, estabelecendo uma correlação entre este movimento e o raio hidrodinâmico para estimar o tamanho das partículas. A NTA, no entanto, analisa o espalhamento da luz por microscopia com a associação a um dispositivo de carga acoplado a uma câmera (*charged-coupled device* - CCD). Essa combinação permite o monitoramento e a gravação individualizada do movimento das partículas. Dessa forma, as partículas são identificadas e rastreadas e as suas dimensões são determinadas de acordo com a equação de Stokes-Einstein (VIII).

$$Dt = \frac{TKb}{3\pi\eta d} \quad \text{Equação (VIII)}$$

Onde Dt é a constante de difusão em função do tempo, Kb é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, η a viscosidade e d o diâmetro da partícula (<http://nanosight.com.uk>).

As diferenças entre DLS e NTA baseiam-se no fato de que a NTA determina o movimento Browniano pela análise da imagem das partículas, atribuindo o movimento das mesmas a um tamanho específico. Com o uso do DLS não é possível visualizar as partículas. Neste caso, a determinação do tamanho das partículas é feita através da variação da intensidade da luz espalhada em função do tempo. Assim sendo, o cálculo do tamanho das partículas é realizado com base nessas variações.

A Figura 46 representa a distribuição de tamanho de partícula para os PAMAMs e seus complexos com a Dexa empregando a técnica de NTA.

Figura 46. Distribuição do tamanho de partícula do PAMAM G3.5 e PAMAM G4 e seus complexos com a Dexa empregando a técnica de NTA. (A): PAMAM G4; (B): Dexa-PAMAM G4; (C) PAMAM G3.5; (D) Dexa-PAMAM G3.5.

O emprego de NTA para a análise das dispersões dendriméricas possibilitou a visualização dinâmica das partículas individuais, além da formação de agregados. O tamanho médio das partículas presentes nas dispersões de PAMAM G3.5 e PAMAM G4 foi de 54 nm e 48 nm, respectivamente. Para os complexos Dexa-PAMAM G3.5 e Dexa-PAMAM G4 o tamanho foi de 53 nm e 45 nm, respectivamente, não havendo diferença significativa do tamanho dos dendrímeros na forma livre. Esses valores foram menores do que os obtidos com a técnica de DLS (Tabela 6). Além disso, essa técnica possibilitou a visualização de partículas pequenas, movendo-se de maneira rápida, bem como a formação dinâmica de grandes agregados. Assim, acredita-se que as partículas pequenas e os grandes agregados sejam, supostamente, os PAMAMs nas formas não-agregada e agregada, respectivamente. Para todas as amostras analisadas, a distribuição de tamanho variou aproximadamente entre 5 nm e 100 nm.

5.2.4. Solubilidade da Dexa nos complexos Dexa-PAMAM

As Figuras 47, 48 e 49 representam os espectros de absorção da Dexa, dos dendrímeros livres e de seus complexos com a Dexa em água.

Figura 47. Espectro de absorção da Dexa.

Figura 48. Espectros de absorção do PAMAM G4 (esquerda) e do complexo Dexa-PAMAM G4 (direita).

Figura 49. Espectros de absorção do PAMAM G3.5 (esquerda) e do complexo DEXA-PAMAM G3.5 (direita).

De acordo com os espectros, verifica-se que os complexos formados continuam apresentando uma alta absorção na região de absorção dos dendrímeros livres e da própria Dexa. Vale destacar que os dendrímeros apresentam absorção mínima em torno de 260 nm, fato que explica a razão pela qual foi escolhido este comprimento de onda para determinação da estequiometria dos complexos obtidos.

A Tabela 7 mostra a solubilidade da Dexa em água na presença dos dendrímeros e a razão molar Dexa/PAMAM obtida após complexação.

Tabela 7. Solubilidade aparente da Dexa em água antes e após complexação com o PAMAM G4 e G3.5 à temperatura ambiente.

Amostra	Solubilidade ($\mu\text{g/mL}$)	Razão molar	Aumento de solubilidade (%)
Dexa	91,67	---	---
Dexa- PAMAM G3.5	939,80	22,28	1.025
Dexa-PAMAM G4	353,15	7,07	385

Para um fármaco lipofílico como a Dexa, o aumento da solubilidade em água pode aumentar tanto a captação celular (KOLHE *et al.*, 2003) quanto a biodisponibilidade do fármaco (NA *et al.*, 2006; YAO *et al.*, 2010). De acordo com a Tabela 7, a solubilidade da Dexa livre em água foi 91,67 $\mu\text{g/mL}$. A complexação da Dexa com o PAMAM G4 e G3.5 aumentou, respectivamente, 4 e 10 vezes essa

solubilidade. Dessa forma, o uso de PAMAMs como sistemas carreadores para a administração tópica de Dexametasona parece ser uma alternativa promissora para melhorar a biodisponibilidade ocular de fármacos lipofílicos.

Uma característica importante dos PAMAMs como sistemas carreadores é a quantidade de moléculas de fármaco que uma molécula de dendrímero é capaz de carrear. Estudos com a nifedipina e PAMAMs em três pHs diferentes (pH 4, 7 e 10) mostraram que PAMAMs de meia geração (G0.5, G1.5 e G2.5) aumentaram mais expressivamente a solubilidade da nifedipina do que PAMAMs de “geração completa” (G1 e G2). Além disso, observou-se que o maior aumento de solubilidade ocorreu em pH 7,0, visto que neste pH os PAMAMs de “meia geração” são menos suscetíveis à protonação em relação aos PAMAMs de “geração completa” (DEVARAKONDA; HILL; VILLIERS, 2004). Dessa forma, em pH fisiológico, o dendrímero de “meia geração” PAMAM G3.5 apresenta um menor número de aminas terciárias internas protonadas do que o de “geração completa” PAMAM G4. Consequentemente, o PAMAM G3.5 possui um número mais elevado de aminas internas não protonadas disponíveis para interação através de ligações de hidrogênio (OTTAVIANI *et al.*, 1996). Além das possíveis interações por meio de ligações de hidrogênio, o maior número de aminas terciárias não-protonadas proporcionaria maior hidrofobicidade para as cavidades internas do PAMAM G3.5. Como resultado, a interação entre Dexametasona e essas cavidades hidrofóbicas internas são mais fortes para o PAMAM G3.5 do que para o PAMAM G4. Portanto, o PAMAM G3.5 interage com um maior número de moléculas de Dexametasona, aumentando em maior extensão a solubilidade da Dexametasona lipofílica. O aumento de solubilidade pronunciado da Dexametasona conferido pelo PAMAM G3.5 é confirmado pela maior intensidade dos sinais da Dexametasona nos espectros de RMN (Figuras 34 e 44).

5.2.5. Osmolalidade dos complexos em tampão fosfato pH 7,4

As osmolalidades dos complexos Dex-PAMAM G3.5 e Dexa-PAMAM G4 em tampão fosfato pH 7,4 foram 289 e 291 mOsm/kg, respectivamente. Estes valores estão dentro dos limites descritos na literatura para formulações oftálmicas (entre 260 e 340 mOsm/kg) (LUDWIG *et al.*, 1987; BOWMAN *et al.*, 2009). Assim sendo, a osmolalidade das formulações contendo os complexos proporciona uma aplicação segura das mesmas.

5.3. Liberação *in vitro* da Dexa

A Figura 50 mostra o perfil de liberação da Dexa a partir das formulações saturadas usando uma membrana de acetato de celulose como suporte.

Figura 50. Perfil de liberação *in vitro* da Dexa a partir das dispersões em PBS de Dexa livre e complexada com PAMAM G4 e G3,5. Os dados representam a média $\pm$ DP (n = 4-5).

A taxa de liberação (K) e o coeficiente de difusão (D) da Dexa em cada uma das formulações estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Taxa de liberação (K) e coeficiente de difusão (D) da Dexa a partir das diferentes dispersões saturadas com a Dexa em PBS pH 7,4.

Dispersões	Conc. Dexa (µg/mL)	K (µg/cm ² /h ^{1/2})	D x 10 ⁻⁷ (cm ² /s)
Dexa	91,7	14,1 ($\pm$ 1,1)	32,7
Dexa-PAMAM G4	353,2	39,7 ($\pm$ 5,3)	19,2
Dexa-PAMAM G3.5	940,0	14,4 ($\pm$ 3,1)	0,4

O complexo Dexa-PAMAM G4 apresentou um K quase 3 vezes maior quando comparado à solução de Dexa e ao complexo Dexa-PAMAM G3.5. Provavelmente, a maior quantidade de Dexa na dispersão saturada de Dexa-PAMAM G4 em relação à

dispersão de Dexa livre, 4 vezes (Tabela 8), foi o fator responsável pelo maior K apresentado por este complexo. No entanto, a dispersão de Dexa-PAMAM G3.5, apesar de ter uma quantidade ainda maior de Dexa do que a dispersão com o complexo G4, resultou em um K bem menor, sugerindo que o PAMAM G3.5 retarda mais a liberação da Dexa do que o G4. De fato, a análise do D, que leva em consideração a quantidade de fármaco presente na dispersão, mostrou claramente este retardo. Pode-se observar na Tabela 8 que o complexo Dexa-PAMAM G3.5 diminuiu cerca de 82 vezes o D da Dexa enquanto o complexo Dexa-PAMAM G4 diminuiu apenas 1,7 vezes este coeficiente. Estes resultados sugerem que o PAMAM G3.5 pode ter fortes interações com a Dexa lipofílica, interagindo com mais moléculas de Dexa em relação ao PAMAM G4 e retardando a liberação do fármaco.

5.4. Penetração e distribuição *ex vivo* de dendrímeros PAMAM na córnea

As principais razões que levaram à escolha dos dendrímeros de geração 4 foi o fato de que gerações intermediárias são candidatos promissores como sistemas carreadores de fármacos, pois apresentam cavidades hidrofóbicas e estrutura aberta que permitem o encapsulamento e posterior liberação de fármacos (CHENG *et al.*, 2005; TOMALIA, 2005). Ademais, outro fator levado em consideração na escolha dos dendrímeros foi a carga de superfície, a qual está relacionada com o tipo de grupo terminal. Como para a aplicação da iontoforese é interessante que o sistema de liberação ou o fármaco em si apresente carga, o uso de PAMAMs com aminas ou grupos carboxílicos terminais que em pH fisiológico permanecem na forma NH^{3+} e COO^- , respectivamente, favoreceria a penetração desses sistemas.

Para verificar a influência da iontoforese na penetração e distribuição dos PAMAMs na córnea, esses dendrímeros foram marcados com FITC possibilitando sua visualização por microscopia confocal. A penetração do FITC livre, sem dendrímero, foi utilizada como controle.

A Figura 51 representa a distribuição da fluorescência em cortes transversais da córnea após 3 h de aplicação passiva e iontoforética da solução de FITC livre e dos dendrímeros PAMAM G3.5-FITC e PAMAM G4-FITC.

Figura 51. Fotomicrografias de secções transversais da córnea após 3 h de permeação passiva e iontoforética do FITC livre e ligado ao PAMAM G4-FITC e PAMAM G3.5-FITC. Todas as imagens foram obtidas nos mesmos parâmetros e não receberam tratamento após a captura. A córnea não-tratada não apresentou fluorescência nas condições de análise. Os comprimentos de onda de excitação/emissão foram 480/515-530 nm. Escala = 250 μm.

De acordo com a Figura 51, o FITC livre se distribui homogeneamente pelo epitélio da córnea, com alta intensidade de fluorescência. A aplicação passiva do PAMAM G3.5-FITC e PAMAM G 4-FITC resultou em uma baixa intensidade de fluorescência distribuída de maneira heterogênea apenas na superfície da córnea. Esses resultados indicam que o PAMAM não penetra no epitélio da córnea de forma passiva nas condições empregadas. O epitélio da córnea é a camada mais externa desse tecido, sendo o fator limitante para a absorção de substâncias hidrofílicas.

Portanto, como os dendrímeros são substâncias hidrofílicas e de elevado peso molecular, sua baixa penetração no epitélio já era esperada.

O FITC tem um pKa de 6,6 (MCHEDLOV-PETROSSYAN *et al.*, 2003), apresentando uma porcentagem de suas moléculas na forma aniônica no pH da solução (pH=7,4). A iontoforese anódica desta solução, que sofre influência do fluxo eletrosmótico, causou uma distribuição homogênea e intensa do FITC apenas no epitélio. A iontoforese catódica, que sofre leve influência da eletromigração, mas sem contribuição do fluxo eletrosmótico, resultou numa distribuição heterogênea do FITC na superfície da córnea e alguma penetração, de baixa intensidade, nas camadas mais profundas. A iontoforese dos conjugados PAMAM G3.5-FITC e PAMAM G4-FITC aumentou consideravelmente a intensidade e a profundidade da fluorescência na córnea em relação a iontoforese do FITC livre (Figura 51). Este resultado sugere um aumento no transporte dos PAMAMs através do epitélio em direção ao estroma quando a iontoforese é aplicada.

O epitélio tem cerca de 5-7 camadas de células e os espaços intercelulares da camada superficial de células apresentam um grande número de “tight junctions”. As células das camadas profundas estão ligadas às células das camadas superficiais e às células vizinhas pelos desmossomas (WATSKY; OLSEN; EDELHAUSER, 1995; SUNKARA; KOMPELLA, 2003). Como o espaço intercelular do epitélio é de 2-3 nm (HÄMÄLÄINEN *et al.*, 1997b; LEE; CARSON; TAKEMOTO, 1986), a iontoforese pode ter forçado a entrada do dendrímero na forma não agregada por esses espaços intercelulares, uma vez que o tamanho médio dos PAMAMs na forma não agregada (Tabela 6) é próximo do tamanho do espaço intercelular e pelo fato de os dendrímeros PAMAM de geração 4-6 apresentarem estrutura semi-rígida (ESFAND; TOMALIA, 2001). Além disso, é possível que a iontoforese altere a distribuição do tamanho de partícula dos dendrímeros na dispersão, facilitando o transporte de dendrímeros não-agregados em detrimento dos agregados.

A via transcelular é outra possível via para penetração dos dendrímeros em camadas mais profundas da córnea e o transporte pode ocorrer por difusão facilitada, transporte ativo e endocitose (SUNKARA; KOMPELLA, 2003). Como os dendrímeros PAMAM apresentam uma alta captação por diversas linhagens celulares (DAI *et al.*, 2010; PERUMAL *et al.*, 2008), a rota transcelular pode

representar uma alternativa importante para a difusão transcorneal dessas macromoléculas sobre a aplicação da iontoforese.

Pode-se observar também na Figura 51 que dependendo do grupo de superfície do dendrímero a homogeneidade da distribuição da fluorescência ao longo da córnea se altera. A iontoforese anódica do PAMAM G4 e a catódica do PAMAM G3.5 parecem resultar em uma distribuição de fluorescência mais intensa e mais heterogênea do que a iontoforese anódica do PAMAM G3.5. As dispersões dos dendrímeros PAMAM G 3.5 e PAMAM G4 apresentaram potencial zeta negativo e positivo, respectivamente (Tabela 6). Assim sendo, sugere-se que a eletromigração possa desempenhar um papel importante na penetração do PAMAM G4 quando a dispersão desse dendrímero é colocada em contato com o ânodo. Por outro lado, a dispersão do PAMAM G3.5 carregado negativamente não deve apresentar a contribuição desse fluxo quando em contato com o ânodo. Neste caso, o fluxo eletrosmótico, do ânodo em direção ao cátodo em condições fisiológicas (MARRO *et al.*, 2001), é o único mecanismo iontoforético a contribuir para a penetração do PAMAM G3.5 a partir do ânodo, enquanto a eletromigração contribui para sua penetração a partir do cátodo. As diferenças na distribuição da fluorescência depois da iontoforese, mostradas na Figura 51, sugerem, portanto, que o mecanismo de iontoforese que mais contribui para a penetração dos PAMAMs na córnea também influencia sua distribuição nas primeiras camadas desse tecido.

Para avaliar o padrão de distribuição dos PAMAMs ao longo da córnea após aplicação da iontoforese, secções ópticas paralelas à superfície da córnea foram obtidas em diferentes profundidades fixando a superfície da córnea como posição inicial. Nesse caso, realizou-se a aplicação das formulações por dois diferentes períodos de aplicação (Figura 52).

Figura 52. Secções ópticas paralelas à superfície da córnea em diferentes profundidades depois de 5 min (painel da esquerda) e 3 h (painel da direita) de iontoforese. A: Iontoforese anódica do PAMAM G3.5; B: Iontoforese catódica do PAMAM G3.5; C: Iontoforese anódica do PAMAM G4. A córnea não tratada foi usada como controle e não apresentou fluorescência nas condições de análise. Todas as imagens foram capturadas nos mesmos parâmetros e não receberam qualquer tratamento após a captura. A excitação/emissão foram realizadas em 480/515-530 nm.

De acordo com os resultados, após 5 minutos de iontoforese (Figura 52, painel da esquerda), a fluorescência relativa ao PAMAM G3.5 distribuiu-se de maneira mais homogênea quando iontoforese anódica (A) foi realizada. Por outro lado, a profundidade de penetração do PAMAM G3.5 foi menor, apenas até 20 μm contra aproximadamente 35 μm resultante da iontoforese catódica. A contribuição do fluxo eletromigratório, presente durante a iontoforese catódica do PAMAM G3.5, parece, portanto, aumentar a penetração do PAMAM G3.5 em maior proporção do que a eletrosmose, presente na iontoforese anódica deste dendrímero, apesar de fazê-lo de forma heterogênea. De maneira semelhante, a iontoforese anódica do PAMAM G4, que sofre além da eletrosmose alguma influência da eletromigração devido ao potencial zeta levemente positivo, aumentou sua penetração até cerca de 25 μm e a distribuição do dendrímero foi também heterogênea.

Após 3 h de iontoforese (Figura 52, painel da direita), foi possível visualizar a distribuição dos PAMAMs em células mais internas da córnea. A profundidade de penetração para ambos dendrímeros após a aplicação iontoforética foi cerca de 40

μm . Segundo a literatura, a espessura do epitélio da córnea de olhos de suínos é de $45,52 \pm 5,26 \mu\text{m}$ (CAFARO *et al.*, 2009). Portanto, com base nos resultados, sugere-se que a iontoforese melhorou o transporte dos dendrímeros ao longo do epitélio até o início da próxima camada da córnea, o estroma.

A distribuição corneal dos dendrímeros no estroma parece ser diferente para PAMAM G4 e PAMAM G3.5. O PAMAM G4 (Figura 52 C, painel da direita), que possui aminas primárias como grupos de superfície, distribuiu-se de maneira mais homogênea comparado ao PAMAM G3.5, que tem grupos carboxílicos na superfície. De acordo com a literatura, os PAMAMs catiônicos apresentam um transporte transepitelial maior do que os aniônicos em cultura de células epiteliais do intestino Caco-2 (JEVPRASESPHANT *et al.*, 2003), o que pode explicar a distribuição mais homogênea do PAMAM G4 em regiões mais profundas da córnea após a iontoforese.

Diversos estudos demonstram que os dendrímeros apresentam a capacidade de se translocar através do epitélio do intestino devido à sua estrutura compacta (WIWATTANAPATAPEE *et al.*, 2000; D'EMANUELE *et al.*, 2004; KITCHENS *et al.*, 2006; KOLHATKAR; SWAAN; GHANDEHARI, 2008). Os PAMAMs são capazes de atravessar o epitélio através das rotas transcelular e paracelular, além de promoverem uma abertura transitória das “*tight junctions*”, proporcionando um aumento no seu próprio transporte através da via paracelular (EL-SAYED *et al.*, 2003; JEVPRASESPHANT *et al.*, 2004; KITCHENS *et al.*, 2008; GOLDBERG; GHANDEHARI; SWAAN, 2010). A penetração dos dendrímeros na córnea pode, portanto, estar ocorrendo tanto por via transcelular como por via paracelular e sua distribuição nas células depende de suas propriedades de superfície.

Por fim, para confirmar que a fluorescência observada era do dendrímero ligado ao FITC e não do FITC livre, o padrão de distribuição do FITC livre em função da profundidade da córnea também foi avaliado após aplicação passiva e iontoforética por um período de 3 h (Figura 53).

Figura 53. Secções ópticas paralelas à superfície da córnea em diferentes profundidades após 3 h de aplicação passiva e iontoforética da solução de FITC livre. A: Passiva; B: Iontoforese catódica; C: Iontoforese anódica. A córnea não tratada não apresentou fluorescência nas condições de análise. Todas as imagens foram capturadas nos mesmos parâmetros e não receberam qualquer tratamento após a captura. A excitação/emissão foram realizadas em 480/515-530 nm.

Pode-se observar na Figura 53 que o FITC penetra em menor extensão através do epitélio da córnea quando comparado aos conjugados PAMAM-FITC (Figura 52). A iontoforese catódica do FITC resultou em uma profundidade de penetração de aproximadamente 20 μm e a anódica de aproximadamente 5 μm, muito menos profunda e com padrão de distribuição diferente da iontoforese dos conjugados PAMAM-FITC. Portanto, os resultados de microscopia confocal sugerem não haver FITC livre na dispersão dos conjugados PAMAM-FITC e que a fluorescência observada pode ser correlacionada com a penetração dos dendrímeros.

5.5. Permeação *ex vivo* da Dexa através da córnea

Esses estudos foram realizados para investigar se os dendrímeros, além de penetrar (Figura 52), são capazes de liberar a Dexa na córnea. Assim sendo, a permeação da Dexa foi avaliada por um período de 3 h. Apesar desse tempo de aplicação não apresentar viabilidade clínica, ele foi escolhido pela necessidade de se analisar concentrações acima do limite de quantificação do fármaco. Em outras palavras, como a quantidade de Dexa permeada em um tempo curto de aplicação é baixa e o volume do receptor da célula de difusão empregada nos estudos é relativamente alto (35 mL), não seria possível quantificar o fármaco pelo método analítico empregado. Note que a viabilidade da córnea foi previamente avaliada após 6 horas de aplicação de uma densidade total de corrente de 180 mA/cm² (GRATIERI *et al.*, 2010).

A Dexa é uma molécula pequena e hidrofóbica que não apresenta dificuldades em penetrar o epitélio corneano. É administrada normalmente na forma de suspensão a uma concentração inicial de 1 mg/mL (por exemplo, Maxidex[®], Maxitrol[®]). Como a Dexa administrada em suspensão é rapidamente removida dos tecidos do olho devido a barreiras estáticas e dinâmicas, a frequência de administração é alta, a cada 1 h em casos de uveíte anterior grave (COHEN *et al.*, 2012). A penetração dos dendrímeros (Figura 52) pode proporcionar uma liberação sustentada da Dexa (Tabela 8) nos tecidos intra-oculares, mas deve garantir também que concentrações adequadas do fármaco sejam liberadas.

A Tabela 9 apresenta a quantidade de Dexa acumulada na solução receptora após 3 h de administração passiva e iontoforética das dispersões de Dexa livre e complexada com os dendrímeros. As concentrações de Dexa nos complexos Dexa-PAMAM G3.5 e Dexa-PAMAM G4 foram mantidas em condições de saturação a 939,80 e 353,15 µg/mL, respectivamente. Um experimento com uma solução de Dexa saturada a 91,37 µg/mL foi realizado para comparação, mas a quantidade de fármaco permeada ficou abaixo do limite de quantificação. Desta forma, a penetração da Dexa a partir das soluções saturadas de Dexa-PAMAM foram comparadas com a penetração da Dexa livre a partir de uma suspensão a 1 mg/mL. Em todos os casos, a velocidade de permeação da Dexa seguiu cinética de ordem zero, independente da concentração de fármaco no doador.

Tabela 9. Quantidade acumulada de Dexa na solução receptora após 3 h de administração passiva e iontoforética. A concentração inicial de Dexa no doador foi de 1000 µg/mL, 939,80 µg/mL e 353,15 µg/mL para Dexa não-complexada, Dexa-PAMAM G3.5 e Dexa-PAMAM G4, respectivamente. Os valores representam a média ± EPM de 4-5 determinações. Símbolos diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$).

Dexa em PBS	Quantidade acumulada (ng/cm ²) após 3 h de administração		
	Passiva	Iontoforesse	
		Anódica	Catódica
Dexa	726,2 (±143,4)*	2123,8 (±144,4)**	-
Dexa-PAMAM G4	1622,2 (±224,5)**	9133,3 (±1070,7) [@]	-
Dexa-PAMAM G3,5	698,0 (±72,3)*	2127,1 (±532,2)**	1545,7 (±257,9)**

De acordo com a Tabela 9, a aplicação passiva do complexo Dexa-PAMAM G4 aumentou 2,2 vezes ($P < 0,05$) a quantidade de Dexa permeada através da córnea, enquanto o complexo Dexa-PAMAM G3.5 não a alterou de forma significativa em relação à dispersão de Dexa livre (sem dendrímero), já usada comercialmente. Como a massa de Dexa da dispersão doadora que continha o PAMAM G4 era menor do que a das outras dispersões, sugere-se que o PAMAM G4 esteja modificando a superfície da córnea em certa medida, facilitando a permeação da Dexa. Os mecanismos pelos quais os PAMAMs catiônicos, como o G4, aumentam a permeação de fármacos envolve a interação do PAMAM catiônico com os tecidos carregados negativamente de membranas biológicas em pHs fisiológicos, aumentando a permeabilidade da membrana. Em um estudo realizado por Gardikis *et al.* (2006) empregando o dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) como modelo de membrana lipídica, o PAMAM G4 interagiu com os grupos hidrofílicos do fosfolípido, levando à sua incorporação à bicamada lipídica e causando a fluidificação desta. Em outro estudo da interação entre o PAMAM G5 catiônico e bicamadas lipídicas de membranas, o dendrímero promoveu o rompimento das membranas planares de fosfatidilcolina, alterando sua arquitetura (SHCHARBIN *et al.*, 2006). Desta forma, é possível supor que o PAMAM G4, catiônico, esteja interagindo de alguma forma com o epitélio da córnea, facilitando a penetração da Dexa.

Ainda de acordo com a Tabela 9, verificou-se que a iontoforese aumentou a permeação da Dexa em todas as situações quando comparada a administração passiva correspondente, mas em uma extensão diferente para cada formulação. A iontoforese anódica aumentou 2,9, 5,6 e 3,0 vezes ($P < 0,05$) a quantidade de Dexa permeada para a suspensão do fármaco livre, Dexa-PAMAM G4 e Dexa-PAMAM G3,5, respectivamente, em relação à sua respectiva aplicação passiva. A iontoforese catódica aumentou 2,2 vezes a permeação da Dexa para o complexo Dexa-PAMAM G3.5 ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as quantidades de Dexa permeadas após 3 h de iontoforese catódica e anódica do complexo Dexa-PAMAM G3.5. Em razão disso, não foi possível observar diferenças entre as contribuições dos fluxos eletromigratório e eletrosmótico dos dendrímeros sobre a penetração corneal da Dexa. Esses dados corroboram os resultados de microscopia confocal na presença de dendrímeros, que demonstra não haver diferenças na distribuição corneal do PAMAM G3.5 sob aplicação da iontoforese catódica e anódica por um período prolongado (Figura 52, painel da direita).

Para inferir sobre a influência dos dendrímeros na penetração da Dexa por iontoforese, a quantidade de fármaco permeada na presença dos dendrímeros foi comparada a quantidade de Dexa permeada a partir da suspensão que não continha dendrímero. Como pode ser observado na Tabela 9, aproximadamente $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Dexa permearam a córnea em 3 h quando a iontoforese anódica foi empregada. A complexação da Dexa com o PAMAM G3,5 não alterou significativamente este valor ($P > 0,05$), ao passo que a complexação com o PAMAM G4 o aumentou mais de 4 vezes ($P < 0,05$). O aumento significativo na permeação da Dexa proporcionado pela iontoforese anódica do complexo Dexa-PAMAM G4, apesar da baixa concentração do fármaco do doador (3 vezes menor do que na suspensão de Dexa não complexada), sugere, mais uma vez, que o PAMAM G4 exerce algum efeito promotor de penetração na córnea, como havia sido observado no experimento passivo.

Nesse sentido, a maior penetração iontoforética da Dexa a partir de Dexa-PAMAM G4 sugere a penetração do complexo na córnea, corroborando os experimentos feitos com o PAMAM marcado com FITC (Figuras 51 e 52), os quais demonstram a penetração corneal do dendrímero. Por outro lado, a iontoforese do complexo Dexa-PAMAM G3.5 não alterou significativamente a permeação da Dexa. Embora os estudos de microscopia confocal tenham sugerido que o PAMAM G3.5

penetra na córnea sob aplicação da iontoforese (Figuras 51 e 52), o baixo coeficiente de difusão da Dexta a partir deste complexo (Tabela 8) pode influenciar a quantidade de fármaco permeado através da córnea.

Além da permeação da Dexta através da córnea, ao final dos experimentos o fármaco foi extraído desse tecido e quantificado por UPLC-MS. A Figura 54 mostra a quantidade de Dexta recuperada da córnea após aplicação passiva e iontoforética do fármaco livre e complexado com PAMAM G3.5 e PAMAM G4.

Figura 54. Dexta recuperada da córnea após 3 h de experimentos *ex vivo* de permeação passiva e iontoforética a partir de formulações em PBS pH 7,4 contendo Dexta livre ou complexada com os dendrímeros PAMAM G3.5 ou PAMAM G4.

Em todos os casos, a iontoforese aumentou aproximadamente 2 vezes a quantidade de fármaco na córnea em relação aos respectivos experimentos passivos. O aumento da retenção da Dexta na córnea pode estar relacionado com a maior permeação da Dexta por iontoforese. Com excessão da iontoforese anódica do Dexta-PAMAM G4, a quantidade de Dexta acumulada na córnea foi maior do que a quantidade acumulada no receptor. Como em 3 h o estado estacionário já havia sido estabelecido, a maior quantidade de Dexta na córnea pode estar relacionada à retenção da mesma na córnea, sustentando sua liberação. Esta retenção esta relacionada com a lipofilicidade da Dexta, que pode interagir com o epitélio lipofílico, mas também pode estar relacionada com a baixa taxa de liberação do fármaco

principalmente a partir do complexo Dexa-PAMAM G3.5 (Tabela 9), resultando em uma menor permeação do fármaco através da córnea, mas em uma maior quantidade de fármaco retido nesse tecido.

5.6. Citotoxicidade frente aos dendrímeros PAMAM G3.5 e PAMAM G4

Os estudos de citotoxicidade dos dendrímeros PAMAMs G3.5 e PAMAM G4 foram realizados em duas diferentes linhagens de células. Assim, empregou-se a linhagem de células epiteliais pigmentadas da retina (ARPE-19) como linhagem representativa do segmento posterior e as células primárias epiteliais da córnea humana para o segmento anterior. As Figuras 55 e 56 representam a viabilidade celular das células ARPE-19 após diferentes períodos de incubação com os dendrímeros PAMAM G3.5 e PAMAM G4, respectivamente.

Figura 55: Viabilidade celular frente ao PAMAM G3.5 das células ARPE-19 na densidade de 1×10^5 células por poço, verificada pelo teste do MTT após 4 e 24 h de incubação. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 4-6 determinações.

Figura 56: Viabilidade celular frente ao PAMAM G4 das células ARPE-19 na densidade de 1×10^5 células por poço, verificada pelo teste do MTT após 4 e 24 h de incubação. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 4-6 determinações.

A citotoxicidade dos dendrímeros PAMAM é dependente da concentração, da geração e da densidade de cargas superficiais (JEVPRASESPHANT *et al.*, 2003). O dendrímero aniônico (PAMAM G3.5) apresentou menor citotoxicidade para as células epiteliais pigmentadas da retina do que o dendrímero catiônico (PAMAM G4) durante 4 e 24 horas de incubação, o que está de acordo com estudos realizados previamente com esses PAMAMs em outras culturas de células. Jevprasesphant *et al.* (2003) avaliou a citotoxicidade dos PAMAMs G3.5 e PAMAM G4 em cultura de células Caco-2. A citotoxicidade do PAMAM G3.5 foi avaliada na faixa de 50 a 1000 µmol/l, ao passo que o PAMAM G4 foi avaliado na faixa de 2 a 100 µmol/l. As células foram incubadas com os dendrímeros por 3 h. Os autores demonstraram que para o PAMAM G3.5 a maior citotoxicidade observada, com 1000 µmol/L do dendrímero, ficou em torno de 10%, ao passo que para o PAMAM G4 uma concentração de 100 µmol/L resultou em uma citotoxicidade em torno de 50%. Nas células da retina, nossos resultados demonstram que o PAMAM G3.5, independentemente do tempo de incubação, apresentou citotoxicidade em torno de 20% para a maior concentração estudada (1000 µmol/l). Esse aumento de 10% na citotoxicidade do PAMAM G3.5 para as células epiteliais pigmentadas da retina em relação ao estudo realizado com as células Caco-2 pode estar associado à diferença na susceptibilidade de cada linhagem ao dendrímero. Além disso, tem-se o menor

tempo de incubação das células Caco-2 com os PAMAMs (3 h para Caco-2 e 4 h para células ARPE-19).

Para o PAMAM G4 (Figura 56), as concentrações de 10, 100 e 1000 $\mu\text{mol/L}$ de dendrímero resultaram em citotoxicidades em torno de 20, 30 e 50%, respectivamente, após 4 h de incubação. Os estudos realizados em células Caco-2 mostraram citotoxicidades de 40 e 50% para as concentrações de 10 e 100 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente, após 3 h de incubação (JEVPRASESPHANT *et al.*, 2003). Portanto, nossos resultados mostraram uma menor citotoxicidade do PAMAM catiônico com relação às células epiteliais pigmentadas da retina. O aumento no tempo de incubação das células da retina com o PAMAM G4 resultou em citotoxicidades em torno de 40, 60 e 70% para as concentrações de 10, 100 e 1000 $\mu\text{mol/L}$ (Figura 56), demonstrando que o efeito citotóxico induzido por tal dendrímero é dependente da concentração e do tempo de incubação.

Os estudos de citotoxicidade dos dendrímeros PAMAM G3.5 e PAMAM G4 em linhagem primária de células epiteliais da córnea humana também foram realizados por meio da incubação das células durante 4 e 24 horas. Os resultados para o PAMAM G3.5 e PAMAM G4 estão apresentados nas Figuras 57 e 58, respectivamente.

Figura 57: Viabilidade celular das células primárias epiteliais da córnea humana na densidade de $1,5 \times 10^4$ células por poço, verificada pelo teste do MTT para o dendrímero PAMAM G3.5. Os resultados representam média $\pm$ EPM de 4-6 determinações.

Figura 58: Viabilidade celular das células primárias epiteliais da córnea humana na densidade de $1,5 \times 10^4$ células por poço, verificada pelo teste do MTT para o dendrímero PAMAM G4. Os resultados representam média $\pm$ EPM de 4-6 determinações.

Da mesma forma como observado nos estudos realizados em ARPE-19, o dendrímero aniônico (PAMAM G3.5) apresentou menor citotoxicidade do que o dendrímero catiônico (PAMAM G4), corroborando os estudos realizados previamente com esses PAMAMs em outras culturas de células (JEVPRASESPHANT *et al.*, 2003). Nesses estudos, os autores demonstraram que o PAMAM G3.5 apresentou citotoxicidade em torno de 20% para a concentração de $100 \mu\text{mol/L}$, ao passo que para o PAMAM G4 a concentração de $100 \mu\text{mol/L}$ resultou em uma citotoxicidade em torno de 50%. Nas células primárias da córnea humana, nossos resultados demonstram que o PAMAM G3.5 apresentou citotoxicidade em torno de 17% para a maior concentração estudada ($100 \mu\text{mol/L}$). Para o PAMAM G4, as concentrações de 10 e $100 \mu\text{mol/L}$ de dendrímero resultaram em citotoxicidades em torno de 36 e 59%, respectivamente, após 4 h de incubação. Os estudos realizados em células Caco-2 por Jevprasesphant *et al.* (2003) mostraram citotoxicidades de 40 e 50% para as concentrações de 10 e $100 \mu\text{mol/L}$, respectivamente, após 3 h de incubação. Portanto, nossos resultados mostraram uma citotoxicidade próxima do PAMAM G4 sobre as células epiteliais primárias da córnea quando comparado as células Caco-2. O aumento no tempo de incubação das células epiteliais primárias da córnea para 24 h com o PAMAM G4 resultou em citotoxicidades em torno de 94 e 95% para as concentrações de 10 e $100 \mu\text{mol/L}$,

demonstrando que o efeito citotóxico induzido por tal dendrímero é dependente da concentração e do tempo de incubação.

5.7. Estudos *in vivo* de permeação passiva e iontoforética

Em estudos *in vivo*, a temperatura e os fatores fisiológicos são determinados pelo modelo animal. Os coelhos são os principais modelos animais para estudos de farmacocinética ocular devido principalmente às similaridades anatômicas com o olho humano em tamanho e volume de humor aquoso (RITTENHOUSE *et al.*, 2000) e, portanto, foram escolhidos como modelo animal para nossos estudos.

A iontoforese foi aplicada nos estudos *in vivo* por apenas 4 min empregando uma densidade de corrente de 5,1 mA/cm². Este tempo foi escolhido baseado nos estudos de iontoforese transcorneal do fosfato de Dexta realizados por Eljarrat-Binstock *et al.* (2005). Nesses estudos, os autores empregaram uma densidade de corrente de 5,1 mA/cm² durante 1 e 4 min. Vale destacar também a maior viabilidade clínica da aplicação por períodos mais curtos da iontoforese ocular.

Os primeiros estudos *in vivo* foram feitos com a Dexta livre e complexada com o PAMAM G4 com monitoração constante da permeação da Dexta através da córnea, ou seja, no humor aquoso, por microdiálise.

A microdiálise é uma técnica que permite o monitoramento contínuo da concentração de uma substância no espaço extracelular de tecidos ou órgãos provocando apenas interferência mínima na fisiologia deste tecido. Ela é capaz de responder a importantes questões utilizando um número pequeno de animais. Como não há introdução nem retirada de fluidos, o processo não é terminal, o que possibilita a obtenção de uma curva farmacocinética completa utilizando-se apenas um animal (MACHA *et al.*, 2001). Além disso, a farmacocinética pode ser determinada de maneira mais precisa, pois há menor variabilidade interindividual (OHTORI *et al.*, 1998). Alguns estudos recentes utilizaram a microdiálise na câmara anterior, com a inserção de sondas lineares, conforme esquema utilizado neste trabalho, para a avaliação de formulações oftálmicas contendo promotores de permeação (LIU *et al.*, 2005), propriedades bioadesivas (AGGARWAL *et al.*, 2007) e/ou propriedades termorreversíveis (WEI *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2007; CAO *et al.*, 2007). Sendo assim, esta técnica foi a escolhida para nossos estudos *in vivo* iniciais.

O equilíbrio da molécula do fármaco entre a membrana de microdiálise, o meio extracelular e o meio de perfusão é um processo dinâmico e requer uma técnica de calibração capaz de estimar a concentração real do fármaco no meio extracelular, uma vez que a concentração de uma substância no dialisado reflete somente uma fração da concentração real presente no meio circundante à sonda (ZHOU *et al.*, 2005). A razão entre a concentração presente do dialisado e a concentração real do meio é denominada recuperação. A recuperação é influenciada por diversos fatores, tais como fluxo, propriedades da membrana, características físico-químicas da substância, geometria e localização da sonda, temperatura e processos fisiológicos (transporte, metabolismo). Assim sendo, é preciso determinar o quanto de fármaco a sonda é capaz de recuperar para que ela seja utilizada nos experimentos de microdiálise. A fim de determinar a taxa de transferência (ou troca) de Dexa através da sonda de microdiálise foram realizados então estudos de recuperação *in vitro* e *in vivo*.

Os estudos de recuperação *in vitro* da Dexa a partir da sonda visaram verificar a porcentagem de recuperação do fármaco através da membrana de diálise utilizada. Para verificar a influência das condições reais do globo ocular, por exemplo, do metabolismo e do fluxo sanguíneo, na difusão da Dexa através da sonda implantada, a recuperação *in vivo* também foi determinada através da técnica da retrodiálise (STAHLE *et al.*, 1991; RITTENHOUSE *et al.*, 1998). Isto porque a microdiálise fundamenta-se no equilíbrio dinâmico, em que a quantidade de fármaco transferida para o meio circundante deve ser igual à quantidade de fármaco obtida a partir do meio circundante. Ou seja, esta técnica parte do princípio que no processo de diálise a troca através da membrana é bidirecional e que a recuperação independe da concentração de fármaco (LE QUELLEC *et al.*, 1995).

As Tabelas 10 e 11 apresentam os valores de recuperação da Dexa nas condições *in vitro* e *in vivo*, respectivamente.

Tabela 10. Recuperação *in vitro* da Dexa a partir das sondas de microdiálise. Os resultados estão expressos como média $\pm$ DP de 3 determinações.

Concentração (ng/mL)	Concentração final	Recuperação (%)
25	5,87 ($\pm 0,30$)	23,49
100	22,70 ($\pm 0,55$)	22,70

Tabela 11. Recuperação *in vivo* da Dexa a partir das sondas de microdiálise. Os resultados estão expressos como média $\pm$ DP de 2 determinações.

Conc. inicial (ng/mL)	Conc. final (ng/mL)	Recuperação (%)
500	399,66 ($\pm 4,76$)	20,07

De acordo com a Tabela 10, a porcentagem de recuperação *in vitro* da Dexa a partir das sondas ficou entre 22,7 a 23,5 %, indicando que a difusão do fármaco independe da concentração dentro da faixa de concentração estudada e comprovando o caráter lipofílico da Dexa (que dificulta sua difusão pela membrana, que mimetiza um capilar, hidrofílica). Além disso, verifica-se uma proximidade nos valores de recuperação para a condição *in vivo*, que apresentou uma recuperação em torno de 20% (Tabela 11). Também foi observado nesses estudos que o tempo necessário para ocorrer o equilíbrio entre o perfusado e o dialisado é de 30 min. Estes estudos comprovam a funcionalidade da sonda de microdiálise antes da implantação no animal e comprovam ainda que a recuperação independe da concentração de fármaco no meio. Ainda, a recuperação *in vivo* foi praticamente igual à recuperação *in vitro*.

Resultados de recuperação *in vitro* e *in vivo* semelhantes foram obtidos para o propranolol (~35%) (RITTENHOUSE *et al*, 1998) e para o fluconazol (~25%) (GRATIERI *et al.*, 2011), também na câmara anterior do olho de coelhos. Marcha & Mitra (2001) em um estudo de validação da microdiálise na câmara anterior de olhos de coelho obtiveram recuperação *in vitro* de 15 a 18% para a fluoresceína utilizando uma sonda linear de 0,32 x 10 mm. Por outro lado, Wei *et al.* (2006), em estudos de microdiálise, obtiveram *in vitro* uma recuperação de 57,67% para o timolol, enquanto que *in vivo* na câmara anterior de coelhos a recuperação foi de apenas 16,78%.

A Figura 59 apresenta a concentração de Dexta presente no humor aquoso após 5 min de aplicação iontoforética do complexo Dexta-PAMAM G4.

Figura 59. Concentração de Dexta no humor aquoso após 5 min de aplicação iontoforética do complexo Dexta-PAMAM G4. Os resultados estão expressos em média $\pm$ EPM de 2-3 determinações.

De acordo com o gráfico, verificou-se uma grande variabilidade nos resultados, com valores abaixo do limite de quantificação em algumas amostras. Além disso, não foi possível quantificar a Dexta nos experimentos passivos e de iontoforese para o fármaco na forma livre, bem como para a aplicação passiva do complexo Dexta-PAMAM G4 pelo fato de as concentrações estarem abaixo do limite de quantificação. Dentre as possíveis explicações para os resultados obtidos, pode-se apresentar a baixa recuperação da Dexta através da sonda. Como a recuperação *in vitro* ficou entre 22,70 e 23,49 % e o limite de quantificação do método é de 15 ng/mL, significa que concentrações de Dexta abaixo de aproximadamente 70 ng/mL no humor aquoso não puderam ser quantificadas com precisão e exatidão.

Dessa forma, decidiu-se quantificar a Dexta de forma estática após 2 h da aplicação. O tempo de coleta do humor aquoso para extração e quantificação da Dexta foi estabelecido como sendo 2 horas por duas razões. Em determinadas bulas de medicamentos (Vigadexa*), descreve-se que após a administração de uma Solução Oftálmica de Dexta a 0,1% em pacientes que passaram por cirurgia de catarata foi possível observar concentrações de Dexta de $31 \pm 3,9$ ng/mL 90 a 120

minutos após a aplicação. Assim sendo, a coleta nesse tempo permite uma comparação com uma formulação comercial. Além disso, com intuito de quantificar com precisão e exatidão o fármaco proveniente da aplicação passiva da Dexta e dos complexos, optou-se por um tempo mais curto.

A Figura 60 apresenta a concentração de Dexta presente no humor aquoso 2 h após aplicação passiva e iontoforética do fármaco livre ou complexado com os dendrímeros PAMAM G3.5 ou PAMAM G4. Vale destacar que o fármaco livre e o complexo Dexta-PAMAM G4 foram submetidos à iontoforese anódica para avaliação do efeito do fluxo eletrosmótico sobre a permeação da Dexta (molécula neutra) e da eletromigração somada à eletrosmose sobre a penetração do fármaco a partir do complexo Dexta-PAMAM G4 (macromolécula catiônica). O complexo Dexta-PAMAM G3.5 foi submetido à iontoforese catódica para avaliação apenas do efeito da eletromigração (macromolécula aniônica), visto não haver diferença estatística significativa entre as quantidades permeadas de Dexta nos experimentos *ex vivo* de iontoforese catódica e anódica. Além disso, de acordo com os estudos de microscopia confocal (Figura 52), a iontoforese catódica promoveu uma maior profundidade de penetração do PAMAM-FITC em relação à anódica durante 5 minutos de aplicação.

Figura 60. Concentração de Dexta no humor aquoso 2 h após aplicação passiva e iontoforética *in vivo* da Dexta livre (iontoforese anódica) ou complexada com os dendrímeros PAMAM G3.5 (iontoforese catódica) ou PAMAM G4 (iontoforese anódica). Os valores representam a média $\pm$ EPM de 4 determinações (* $P < 0,05$).

Pode-se observar na Figura 60 que não houve diferença na concentração de Dexa no humor aquoso quando as formulações foram aplicadas passivamente, ficando entre 34 e 41 ng/mL. Quando a iontoforese foi aplicada, houve um aumento na quantidade permeada do fármaco para as três formulações. A iontoforese da Dexa livre e complexada com o PAMAM G4 aumentou 2 e 2,5 vezes, respectivamente, a permeação da Dexa, sem diferença estatística entre as duas formulações ($P > 0,05$). Este aumento foi bem maior para o complexo Dexa-PAMAM G3,5 (6,6 vezes, $P < 0,05$).

O complexo Dexa-PAMAM G3.5 foi, no entanto, o que menos aumentou a permeação da Dexa através da córnea nos estudos *ex vivo* (Tabela 9). Esta grande quantidade de Dexa encontrada no humor aquoso após a iontoforese do complexo Dexa-PAMAM G3.5 está relacionada, muito provavelmente, à capacidade do dendrímero G3.5 em sustentar a liberação da Dexa (Tabela 8). Nos experimentos *ex vivo*, o fármaco que atravessa a córnea e chega à solução receptora não fica sob a influência de fatores presentes em um experimento *in vivo*, como a degradação enzimática e a renovação do humor aquoso com consequente remoção do fármaco aí presente. Em outras palavras, uma vez que o fármaco tenha atingido a câmara anterior, ele pode ser eliminado dessa região pela renovação do humor aquoso por meio da malha trabecular e do canal de Schlemm, bem como através da circulação uveoescleral sistêmica (URTTI, 2006). Portanto, como o PAMAM G3.5 é o dendrímero que apresenta maior número de moléculas de Dexa complexadas (Tabela 7), acredita-se que uma vez que o complexo Dexa-PAMAM G3.5 tenha penetrado nas camadas mais superficiais da córnea, ele possa proporcionar uma maior sustentação na liberação da Dexa, o que acarretaria em maior concentração desta na câmara anterior mesmo com a remoção dinâmica do fármaco. Como o complexo Dexa-PAMAM G4 possui menos moléculas de Dexa e pelo fato de as interações entre o fármaco e o dendrímero serem menores em relação ao complexo Dexa-PAMAM G3.5, a Dexa é liberada mais rapidamente desse complexo. Consequentemente, o fármaco é eliminado mais rapidamente da câmara anterior, assim como para a solução do fármaco na forma livre.

Por outro lado, como o complexo com o PAMAM G4 é capaz de carrear uma maior massa de Dexa através da córnea em relação à Dexa livre (Tabela 9), era esperado que o complexo Dexa-PAMAM G4 pudesse sustentar a liberação do

fármaco comparado à Dexa livre. Esses resultados puderam ser observados nos estudos preliminares de microdiálise, quando foi demonstrado que o complexo Dexa-PAMAM G4 liberou quantidades quantificáveis de Dexa no humor aquoso, o que não foi observado para o fármaco na forma livre.

6. CONCLUSÃO

Foram obtidos complexos da Dexa com os dendrímeros PAMAM G4 e PAMAM G3.5. Quando dispersos em tampão isosmótico esses complexos apresentaram partículas de 5 nm movendo-se rapidamente no meio, com formação dinâmica de grandes agregados, variando de 5 a 100 nm. O tamanho médio das partículas dos complexos foi semelhante ao dos PAMAMs livres, de aproximadamente 45 nm para o Dexa-PAMAM G4 e 53 nm para o Dexa PAMAM G3.5, com potencial zeta de +6,4 mV e -18,5 mV para o complexo com o PAMAM G4 e G3.5, respectivamente. Os PAMAMs aumentaram a solubilidade aparente da Dexa em água e esse efeito foi dependente da estrutura dos dendrímeros. Os estudos de liberação *in vitro* demonstraram que o PAMAM G3.5 diminuiu o coeficiente de difusão da Dexa cerca de 48 vezes em relação ao PAMAM G4 e 82 vezes em relação a Dexa livre. A iontoforese propiciou a penetração de ambos PAMAMs na córnea e o aumento no tempo de aplicação resultou no aumento da profundidade de penetração dos dendrímeros. O complexo Dexa-PAMAM G3.5 não alterou a velocidade de permeação da Dexa em relação à Dexa na forma livre, embora a aplicação iontoforética desse complexo tenha dobrado a quantidade de fármaco retido na córnea. A iontoforese aumentou a permeação do fármaco através da córnea 2,9, 5,6 e 3,0 vezes para a Dexa livre, complexada com PAMAM G4 e complexada com PAMAM G3.5, respectivamente. Após 3 h de experimento, não foram observadas diferenças entre a quantidade de Dexa permeada por iontoforese catódica e anódica a partir do complexo Dexa-PAMAM G3.5. O complexo Dexa-PAMAM G4 aumentou a permeação da Dexa cerca de 2,2 e 4,3 vezes após aplicação passiva e iontoforética, respectivamente, em relação ao fármaco na forma livre. Além disso, houve um aumento de 3 vezes na retenção corneal da Dexa devido a aplicação iontoforética desse complexo comparado à iontoforese da Dexa livre. Os experimentos de citotoxicidade evidenciaram que o PAMAM G3.5 apresentou baixa toxicidade e que o PAMAM G4 apresentou toxicidade dependente da concentração e tempo de incubação. Por fim, os experimentos *in vivo* evidenciaram que a iontoforese aumentou a concentração de Dexa no humor aquoso cerca de 2, 2,5 e 6,6 para a Dexa na forma livre, Dexa-PAMAM G4 e Dexa-PAMAM G3.5, respectivamente, em relação à aplicação passiva. Desta forma, a concentração do fármaco no humor aquoso foi cerca de 2,6 vezes maior para o

complexo Dexa-PAMAM G3.5 comparado ao fármaco na forma livre e ao complexo Dexa-PAMAM G4. Portanto, a associação de dendrímeros PAMAM com a iontoforese representa uma estratégia promissora para o tratamento tópico de doenças inflamatórias oculares.

7. REFERÊNCIAS

ABELSON, M.; FOSTER, C.S.; GUPTA, G. Diagnosing and managing anterior uveitis. **Rev. Ophthalmol.**, v. 9, p. 110–114, 2002.

ACIONT. Visulex® System. 2008. Disponível em: <http://www.aciont.com/technologies/visulex>>. Acesso em: 25 junho 2013.

ANANTHULA, H.K.; VAISHYA, R.D.; BAROT, M.; MITRA, A.K. Duane's Ophthalmology. In: Tasman W, Jaeger EA, editors. **Bioavailability**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2009.

ANTONI, P.; HED, Y.; NORDBERG, A.; NYSTRÖM, D.; VON HOLST, H.; HULT, A.; MALKOCH, M. Bifunctional dendrimers: from robust synthesis and accelerated one-pot postfunctionalization strategy to potential applications. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 48, p. 2126–2130, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RE nº 899, de 29/05/2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899-03.htm>>.

ANTONI, P.; HED, Y.; NORDBERG, A.; NYSTRÖM, D.; VON HOLST, H.; HULT, A.; MALKOCH, M. Bifunctional dendrimers: from robust synthesis and accelerated one-pot postfunctionalization strategy to potential applications. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 48, p. 2126–2130, 2009.

AUSAYAKHUN, S.; YUVAVES, P.; NGAMTIPHAKOM, S.; PRASITSILP. J. Treatment of cytomegalovirus retinitis in AIDS patients with intravitreal ganciclovir. **J. Med. Assoc. Thai.**, v. 88, (Supl 9):S15– S20, 2005.

BARAR, J.; ASADI, M.; MORTAZAVI-TABATABAEI, S.A.; OMIDI, Y. Ocular Drug Delivery; Impact of in vitro Cell Culture Models. **J. Ophthalmic Vis. Res.**, v. 4, p. 238-252, 2009.

BARZA, M. Transscleral iontophoresis of cefazolin, cicarcillin, and gentamicin in the rabbit. **Ophthalmology**, v. 93, p. 133-139, 1986.

BARZA, M.; PECKMAN, C.; BAUM, J. Transscleral iontophoresis as an adjunctive treatment for experimental endophthalmitis. **Archives of Ophthalmology**, v. 105, p. 1418–1420, 1987.

BEHAR-COHEN, F.F.; EL AOUNI, A.; GAUTIER, S.; DAVID, G.; DAVIS, J.; CHAPON, P.; PAREL, J.M. Transscleral Coulomb-controlled iontophoresis of methylprednisolone into the rabbit eye: influence of duration of treatment, current intensity and drug concentration on ocular tissue and fluid levels. **Exp. Eye Res.**, v. 74, p. 51–59, 2002.

BEHAR-COHEN, F.F.; PAREL, J.M.; POULIQUEN, Y.; THILLAYE-GOLDENBERG, B.; GOUREAU, O.; HEYDOLPH, S.; COURTOIS, Y.; DE KOZAK, Y. Iontophoresis of dexamethasone in the treatment of endotoxin-induced-uveitis in rats. **Exp. Eye Res.**, v. 65, p. 533–545, 1997.

BERGAMINI, G. Dexametasona: interação com ácidos carboxílicos aromáticos no estado sólido. Porto Alegre, 2008 (Dissertação de mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BERNE, B.; PECORA, R. **Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology, and physics**. Mineola: Dover Pubns, 2000.

BORA, N.S.; KAPLAN, H.J. Intraocular diseases-anterior uveitis. **Chem. Immunol. Allergy**, v. 92, p. 213–220, 2007.

BOWMAN, L.M.; SI, E.; PANG, J.; ARCHIBALD, R.; FRIEDLAENDER, M. Development of a topic polymeric mucoadhesive ocular delivery system for azithromycin. **J. Ocul. Pharm. Ther.**, v. 25, p. 133-139, 2009.

BROTHERS, H.M.; PIEHLER, L.T.; TOMALIA, D.A. Slab-gel and capillary electrophoretic characterization of polyamidoamine dendrimers. **J. Chromatogr. A**, v. 814, p. 233-246, 1998.

*BRUKER. A Tutorial for TopSpin Version 1.3; DOSY and Diffusion by NMR (2002-2*006). Disponível em: <http://www2.chem.uic.edu/nmr/downloads/dosy_ts13.pdf>. Acesso em: 28 junho 2014.

CAFARO, T.A.; ORTIZ, S.G.; MALDONADO, C.; ESPÓSITO, F.A.; CROXATTO, J.O.; BERRA, A.; ALE, O.L.; TORREALDAY, J.I.; URRETS-ZAVALÍA, F.A.; URRETS-ZAVALÍA, J.A.; SERRA, H.M. The cornea of Guinea pig: structural and functional studies. **Vet. Ophthalmol.**, v. 12, p. 234-241, 2009.

CHALAM, K.V.; MALKANI, S.; SHAH, V.A. Intravitreal dexamethasone effectively reduces postoperative inflammation after vitreoretinal surgery. **Ophthalmic Surg Lasers Imaging**, v. 34, p. 188–192, 2003.

CHAUHAN A.S.; SRIDEVI, S.; CHALASANI, K.B.; JAIN, A.K.; JAIN, S.K.; JAIN, N.K.; DIWAN, P.V. Dendrimer-mediated transdermal delivery: enhanced bioavailability of indomethacin. **J. Control. Release**, v. 90, p. 335-343, 2003.

CHENG, Y.Y.; ZHAO, L.B.; LI, Y.W.; XU, T.W. Design of biocompatible dendrimers for cancer diagnosis and therapy: current status and future perspectives. *Chem. Soc. Rev.*, v. 40, p. 2673-2703, 2011.

CHOLKAR, K.; PATEL, S.P.; VADLAPUDI, A.D.; MITRA, A.K. Novel Strategies for Anterior Segment Ocular Drug Delivery. **J. Ocul. Pharmacol. Ther.**, v. 29, p. 106-123, 2013.

CHOPRA, P.; HAO, J.; LI, S.K. Sustained release micellar carrier systems for iontophoretic transport of dexamethasone across human sclera. **J. Control. Release**, v. 160, p. 96–104, 2012.

COHEN, A.E.; ASSANG, C.; PATANE, M.A.; FROM, S.; KORENFELD, M.; AVION STUDY INVESTIGATORS. Evaluation of dexamethasone phosphate delivered by ocular iontophoresis for treating noninfectious anterior uveitis. **Ophthalmology**, v. 119, p. 66-73, 2012.

DAI, H.; NAVATH, R.S.; BALAKRISHNAN, B.; GURU, B.R.; MISHRA, M.K.; ROMERO, R.; KANNAN, R.M.; KANNAN, S. Intrinsic targeting of inflammatory cells in the brain by polyamidoamine dendrimers upon subarachnoid administration. **Nanomedicine (Lond)**, v. 9, p. 1317 – 1329, 2010.

DAYLE, H.; GEROSKI, H.F. Edelhauser. Drug Delivery for Posterior Segment Eye Disease. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 4, p. 961–964, 2000.

DEL AMO, E.M.; URTTI, A. Current and future ophthalmic drug delivery systems A shift to the posterior segment. **Drug Discovery Today**, v.13, p. 135-143, 2008.

D'EMANUELE, A.; JEVPRASESPHANT, R.; PENNY, J.; ATTWOOD, D. The use of a dendrimer–propranolol prodrug to bypass efflux transporters and enhance oral bioavailability. **J. Control. Release**, v. 95, p. 447–453, 2004.

DESCHENES, J.; MURRAY, P.I.; RAO, N.A.; NUSSENBLATT, R.B. International Uveitis Study Group: International Uveitis Study Group (IUSG) clinical classification of uveitis. **Ocul. Immunol. Inflamm.**, v. 16, p. 1–2, 2008.

DEVARAKONDA, B.; HILL, R.A.; VILLIERS, M.M. The effect of PAMAM dendrimer generation size and surface functional group on the aqueous solubility of nifedipine. **Int. J. Pharmaceutics**, v. 284, p. 133–140, 2004.

DEY, S.; ANAND, B.S.; PATEL, J.; MITRA, A.K. Transporters/receptors in the anterior chamber: pathways to explore ocular drug delivery strategies. **Expert Opin. Biol. Ther.**, v. 3, p. 23–44, 2003.

DUTET, J.; DELGADO-CHARRO, M.B. In vivo transungual iontophoresis: effect of DC current application on ionic transport and on transonychial water loss. **J. Control. Release**, v. 140, p. 117-125 2009.

DUVVURI, S.; MAJUMDAR, S.; MITRA, A.K. Drug delivery to the retina: challenges and opportunities. **Expert Opin. Biol. Ther.**, v. 3, p. 45–56, 2003.

Dynamic Light Scattering. Disponível em: <<http://www.malvern.com>>. Acesso em: 18 Fevereiro 2014.

ELJARRAT-BINSTOCK, E.; ORUCOV, F.; ALDOUBY, Y.; FRUCHT-PERY, J.; DOMB, A.J. Charged nanoparticles delivery to the eye using hydrogel iontophoresis. **J. Control. Release**, v. 126, p. 156–561, 2008.

ELJARRAT-BINSTOCK, E.; RAISKUP, F.; FRUCHT-PERY, J.; DOMB, A.J. Transcorneal and transscleral iontophoresis of dexamethasone phosphate using drug loaded hydrogel. **J. Control. Release**, v. 106, p. 386-90, 2005.

EL-SAYED, M.; RHODES, C.A.; GINSKI, M.; GHANDEHARI, H. Transport mechanism(s) of poly (amido amine) dendrimers across Caco-2 cell monolayers. **Int. J. Pharm.**, v. 265, p. 151–157, 2003.

ESFAND, R.; TOMALIA, D. A. Poly (amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. **Drug Discov. Today**, v.6, p. 427–436, 2001.

FILIFE, V.; HAWES, A.; JISKOOT, W. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. **Pharm. Res.**, v. 27, p. 796-810, 2010.

FISCHER, G.A. Iontophoretic drug delivery using the IOMED Phoresor system. **Expert Opin. Drug Deliv.**, v. 2, n. 2, p.391-403, 2005.

FRUCHT-PERY, J. Iontophoresis-gentamicin delivery into the rabbit cornea, using a hydrogel delivery probe. **Exp. Eye Res.**, v. 78, p. 745–749, 2004.

GAN, I.M.; UGAHARY, L.C.; VAN DISSEL, J.T.; FERON, E.; PEPERKAMP, E.; VECKENEER, M.; MULDER, P.G.; PLATENKAMP, G.J.; VAN MEURS, J.C. Intravitreal dexamethasone as adjuvant in the treatment of postoperative endophthalmitis: a prospective randomized trial. **Graefes Arch Clin. Exp. Ophthalmol.**, v. 243, p. 1200–1205, 2005.

GARDIKIS, K.; HATZIANTONIOU, S.; VIRAS, K.; WAGNER, M.; DEMETZOS, C. A DSC and Raman spectroscopy study on the effect of PAMAM dendrimer on DPPC model lipid membranes, **Int. J. Pharm.**, v. 318, p. 118-123, 2006.

GAUDANA, R.; ANANTHULA, H.K.; PARENKY, A.; MITRA, A.K. Ocular Drug Delivery. **The AAPS Journal**, v. 12, p. 348-360, 2010.

GAUDANA, R.; JWALA, J.; BODDU, S.H.S.; MITRA, A.K. Recent Perspectives in Ocular Drug Delivery. **Pharm. Research**, v. 26, p. 1197-1216, 2009.

GOLDBERG, D.S.; GHANDEHARI, H.; SWAAN, P.W. Cellular entry of G3.5 poly (amidoamine) dendrimers by clathrin- and dynamin-dependent endocytosis promotes tight junctional opening in intestinal epithelia. **Pharm. Res.**, v. 27, p. 1547–1557, 2010.

GRATIERI, T. Sistemas de liberação ocular contendo fluconazol: obtenção, caracterização e liberação passiva e iontoforética *in vitro* e *in vivo*. Ribeirão Preto: (Tese de doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2009.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G.M.; LOPEZ, R.F. Medição do futuro: iontoforese facilita entrada de fármaco no organismo. **Rev. Ciência Hoje**, v. 259, p. 20-25, 2009.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G.M.; THOMAZINI, J.A.; LOPEZ, R.F. Excised porcine cornea integrity evaluation in an *in vitro* model of iontophoretic ocular research. **Ophthalmic Res.**, v. 43, p. 208-216, 2010.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G.M.; DE FREITAS, O.; ROCHA, E.M.; LOPEZ, R.F. Enhancing and sustaining the topical ocular delivery of fluconazole using chitosan solution and poloxamer/chitosan *in situ* forming gel. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 79, p. 320-327, 2011.

GRITZ, D.C.; WONG, I.G. Incidence and prevalence of uveitis in Northern California: the Northern California Epidemiology of Uveitis Study. **Ophthalmology**, v. 111, p. 491–500, 2004.

HAMALAINEN, K.M.; KANANEN, K.; AURIOLA, S.; KONTTURI, K.; URTTI, A. Characterization of paracellular and aqueous penetration routes in cornea, conjunctiva, and sclera. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 38, p. 627-634, 1997a.

HÄMÄLÄINEN, K.M.; KONTTURI, K.; AURIOLA, S.; MURTOMÄKI, L.; URTTI, A. Estimation of pore size and pore density of biomembranes from permeability measurements of polyethylene glycols using an effusion-like approach. **J. Control. Release**, v. 49, p. 97-104, 1997b.

HAO, J.; LI, S.K.; LIU, C.Y.; KAO, W.W. Electrically assisted delivery of macromolecules into the corneal epithelium. **Exp. Eye Res.**, v. 89, p. 934-941, 2009.

HIGUCHI, W.I. Analysis of data on medicament release from ointments. **J. Pharm. Sci.**, v. 51, p. 802–804, 1962.

HUANG, A.J.; TSENG, S.C.; KENYON, K.R. Paracellular permeability of corneal and conjunctival epithelia. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 30, p. 684-689, 1989.

HUANG, H.S.; SCHOENWALD, R.D.; LACH, J.L. Corneal penetration behavior of beta-blocking agents II: Assessment of barrier contributions. **J. Pharm. Sci.**, v. 72, p.1272-1279, 1983.

HUGHES, L.; MAURICE, D.M. A fresh look at iontophoresis. **Arch Ophthalmol.**, v. 102, p. 1825–1829, 1984.

IDREES, F.; VAIDEANU, D.; FRASER, S.; SOWDEN, J.; KHAW, P. A review of anterior segment dysgeneses. **Survey of Ophthalmol.**, v. 51, p. 213–231, 2006.

JEVPRASESPHANT, R.; PENNY, J.; ATTWOOD, D.; D'EMANUELE, A. Transport of dendrimer nanocarriers through epithelial cells via the transcellular route. **J. Control. Release**, v. 97, p. 259–267, 2004.

JEVPRASESPHANT, R.; PENNY, J.; ATTWOOD, D.; MCKEOWN, N.B.; D'EMANUELE, A. Engineering of dendrimer surfaces to enhance transepithelial transport and reduce cytotoxicity. **Pharm. Res.**, v. 20, p.1543-50, 2003.

KALIA, Y.N.; NAIK, A.; GARRISON, J.; GUY, R.H. Iontophoretic drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 619– 658, 2004.

KAMINSKAS, L.M.; BOYD, B.J.; PORTER, C.J. Dendrimer pharmacokinetics: the effect of size, structure and surface characteristics on ADME properties. **Nanomedicine (Lond)**, v. 6, p. 1063–1084, 2011.

KHANDARE, J.; KOLHE, P.; PILLAI, O.; KANNAN, S.; LIEH-LAI, M.; KANNAN, R.M. Synthesis, cellular transport, and activity of polyamidoamine dendrimer-methylprednisolone conjugates. **Bioconjug. Chem.**, v. 16, p. 330–337, 2005.

KHOURI, S.; TAM, K.C. Complexation between α -cyclodextrin and PEGylated-PAMAM dendrimers at low and high pH values. **Langmuir**, v. 26, p. 17969-17974, 2010.

KITCHENS, K.M.; KOLHATKAR, R.B.; SWAAN, P.W.; GHANDEHARI, H. Endocytosis inhibitors prevent poly (amido amine) dendrimer internalization and permeability across Caco-2 cells. **Mol. Pharm.**, v. 5, p. 364–369, 2008.

KITCHENS, K.M.; KOLHATKAR, R.B.; SWAAN, P.W.; EDDINGTON, N.D.; GHANDEHARI, H. Transport of poly (amido amine) dendrimers across Caco-2 cell monolayers: influence of size, charge and fluorescent labeling. **Pharm. Res.**, v. 23, p. 2818–2826, 2006.

KLAJNERT, B.; STANISŁAWSKA, L.; BRYSZEWSKA, M.; PAŁECZ, B. Interactions between PAMAM dendrimers and bovine serum albumin. **Biochim Biophys Acta**, v. 1648, p. 115-126, 2003.

KOLHATKAR, R.B.; SWAAN, P.W.; GHANDEHARI, H. Potential oral delivery of 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38) using poly (amido amine) dendrimers. **Pharm. Res.**, v. 25, p. 1723–1729, 2008.

KOLHE, P.; MISRA, E.; KANNAN, R.M.; KANNAN, S.; LIEH-LAI, M. Drug complexation, in vitro release and cellular entry of dendrimers and hyperbranched polymers. **Int. J. Pharm.**, v. 259, p. 143–160, 2003.

KURTOGLU, Y.E.; NAVATH, R.S.; WANG, B.; KANNAN, S.; ROMERO, R.; KANNAN, R.M. Poly(amidoamine) dendrimer-drug conjugates with disulfide linkages for intracellular drug delivery. **Biomaterials**, v. 30, p. 2112–2121, 2009.

LAM, T.T.; EDWARD, D.P.; ZHU, X.A.; TSO, M.O. Transscleral iontophoresis of dexamethasone. **Arch Ophthalmol.**, v. 107, p. 1368–1371, 1989.

LE-BOURLAIS, C.L.; ACAR, L.; ZIA, H.; SADO, P.A.; NEEDHAM, T.; LEVERGE., R. Ophthalmic drug delivery systems recent advances. **Prog. Retin. Eye Res.**, v. 17, p. 33–58, 1998.

LE QUELLEC, A.; DUPIN, S.; GENISSEL, P.; SAIVIN, S.; MARCHAND, B.; HOUIN, G. Microdialysis probes calibration: gradient and tissue dependent changes in no net flux and reverse dialysis methods. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v.33, p. 11-16, 1995.

LEE, V.H.L.; CARSON, L.W.; TAKEMOTO, K.A. Macromolecular drug absorption in the albino rabbit eye, **Int. J. Pharm.**, v. 29, p. 43-51, 1986.

LEE, V.H.; J. R. ROBINSON. Topical ocular drug delivery: recent developments and future challenges. **J. Ocul. Pharmacol.**, v. 2, p. 67–108, 1986.

LI, S.K.; LIDDELL, M.R.; WEN, H. Effective electrophoretic mobilities and charges of anti-VEGF proteins determined by capillary zone electrophoresis. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 55, p. 603–607, 2011.

LI, S.K.; JEONG, E.K.; HASTINGS, M.S. Magnetic resonance imaging study of current and ion delivery into the eye during transscleral and transcorneal iontophoresis. **Invest Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 45, p. 1224–1231, 2004.

LIU, M.; FRÉCHET, J.M. Designing dendrimers for drug delivery. **Pharm. Sci. Technol. Today**, v. 2, p. 393–401, 1999.

LOPEZ, R.F.V., LANGE, N., GUY, R.H., BENTLEY, M.V.L.B. Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 56, p. 77-94, 2004.

LOPEZ, R. F. V. Estudo de um sistema de liberação para o ácido 5-aminolevulínico por iontoforese para aplicação na terapia fotodinâmica do câncer de pele. Ribeirão Preto, 2000 (Tese de doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

LUDWIG, A.; VAN OOTEGHEM, M. The influence of the osmolality on the precorneal retention of ophthalmic solutions. **J. Pharm. Belg.**, v. 42, p. 259-266, 1987.

MACHA, S.; MITRA, A.K. Ocular pharmacokinetics in rabbits using a novel dual probe microdialysis technique. **Exp. Eye Res.**, v.72, p.289-299, 2001.

MALIK, N.; WIWATTANAPATAPEE, R.; KLOPSCH, R.; LORENZ, K.; FREY, H.; WEENER, J.W.; MEIJER, E.W.; PAULUS, W.; DUNCAN, R. Dendrimers: relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of ¹²⁵I-labelled polyamidoamine dendrimers *in vivo*. **J. Control. Release**, v. 65, p. 133–148, 2000.

MANNERMAA, E.; VELLONEN, K.S.; URTTI, A. Drug transport in corneal epithelium and blood-retina barrier: emerging role of transporters in ocular pharmacokinetics. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 15, p. 1136-1163, 2006.

MARANO, R.J.; WIMMER, N.; KEARNS, P.S.; THOMAS, B.G.; TOTH, I.; BRANKOV, M.; RAKOCZY, P.E. Inhibition of in vitro VEGF expression and choroidal neovascularization by synthetic dendrimer peptide mediated delivery of a sense oligonucleotide. **Exp Eye Res.**, v. 79, p. 525-535, 2004.

MARRO, D.; KALIA, Y.N.; DELGADO-CHARRO, M.B.; GUY, R.H. Contributions of eletromigration and electroosmosis to iontophoretic drug delivery. **Pharm. Res.**, v.18, p.1701-1708, 2001.

MAURICE, D.M.; MISHIMA, S. Ocular pharmacokinetics, in: Sears M.L. (Ed.), **Handbook of Experimental Pharmacology**, Springer-Verlag, Berlin, p. 19–116, 1984.

MERINO, V.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Transdermal therapy and diagnosis by iontophoresis. **Trends Biotechnol.**, v. 15, n. 8, p. 288-290, 1997.

MCHEDLOV-PETROSSYAN, N.O.; ISAENKO, Y.V.; VODOLAZKAYA, N.A.; GOGA, S.T. Acid-Base Behavior of Fluorescein Isothiocyanate in Aqueous Media and in Micellar Surfactant Solutions. CPS: physchem/0309005.

MINTZER, M.A.; GRINSTAFF, M.W. Biomedical applications of dendrimers: a tutorial. **Chem. Soc. Rev.**, v. 40, p. 173–190, 2011.

MOLOKHIA, S.A.; JEONG, E.K.; HIGUCHI, W.I.; LI, S.K. Transscleral iontophoretic and intravitreal delivery of a macromolecule: study of ocular distribution in vivo and post-mortem with MRI. **Exp. Eye Res.**, v. 88, p. 418–425, 2009.

NA, M.; YIYUN, C.; TONGWEN, X.; YANG, D.; XIAOMIN, W.; ZHENWEI, L.; ZHICHAO, C.; GUANYI, H.; YUNYU, S.; LONGPING, W. Dendrimers as potential drug carriers. Part II. Prolonged delivery of ketoprofen by in vitro and in vivo studies. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 41, p. 670-674, 2006.

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). Disponível em: <<http://nanosight.com.uk>>. Acessado em: 18 Fevereiro 2014.

NAVATH, R.S.; KURTOGLU, Y.E.; WANG, B.; KANNAN, S.; ROMERO, R.; KANNAN, R.M. Dendrimer-drug conjugates for tailored intracellular drug release based on glutathione levels. **Bioconjug. Chem.**, v. 19, p. 2446–2455, 2008.

OHTORI, R.; SATO, H.; FUKUDA, S.; UEDA, T.; KOIDE, R.; KANDA, Y.; KIUCHI, Y.; OGUCHI, K. Pharmacokinetics of topical beta-adrenergic antagonists in rabbit aqueous humor evaluated with the microdialysis method. **Exp. Eye Res.**, v.66, p.487-494, 1998.

OTTAVIANI, M.F.; MONTALTI, F.; ROMANELLI, M.; TURRO, N.J.; TOMALIA, D.A. Characterization of starburst dendrimers by EPR. 4. Mn(II) as a probe of interphase properties. **J. Phys. Chem.**, v. 100, p. 11033–11042, 1996.

PATANE, M.A.; COHEN, A.; FROM, S.; TORKILDSEN, G.; WELCH, D.; OUSLER, G.W. Ocular iontophoresis of EGP-437 (dexamethasone phosphate) in dry eye patients: results of a randomized clinical trial. **Clin. Ophthalmol.**, v. 5, p. 633–643, 2011.

PATEL, P.; TANNA, S.; MULLA, H.; KAIRAMKONDA, V.; PANDYA, H.; LAWSON, G. Dexamethasone quantification in dried blood spot samples using LC-MS: The potential for application to neonatal pharmacokinetic studies. **J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 878, p. 3277-3282, 2010.

PERUMAL, O.P.; INAPAGOLLA, R.; KANNAN, S.; KANNAN, R.M. The effect of surface functionality on cellular trafficking of dendrimers. **Biomaterials**, v. 29, p. 3469-76, 2008.

PHIPPS, J. B.; GYORY, J. R. Transdermal ion migration. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 9, p. 137 – 176, 1992.

REEVES, S.W.; SLOAN, F.A.; LEE, P.P.; JAFFE, G.J. Uveitis in the elderly: epidemiological data from the National Long-term Care Survey Medicare Cohort. **Ophthalmology**, v. 113, p. 302–327, 2006.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, H.C.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RITTENHOUSE, K.D.; PEIFFER, R. L., JR.; POLLACK, G. M. Evaluation of microdialysis sampling of aqueous humor for in vivo models of ocular absorption and disposition. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.16, p.951-959, 1998.

ROJANASAKUL, Y.Y.; ROBINSON, J.R. Transport Mechanisms of the Cornea – Characterization of barrier Permselectivity. **Int. J. Pharm.**, v. 55, p. 237-246, 1989.

ROOTMAN, D.S.; JANTZEN, J.A.; GONZALEZ, J.R. et al. Pharmacokinetics and safety of transcorneal iontophoresis of tobramycin in the rabbit. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 29, p. 1397–1401, 1988.

ROZSA, A.J.; BEUERMAN, R.W. Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. **Pain**, v. 14, p. 105–120, 1982.

SADEKAR, S.; GHANDEHARI, H. Transepithelial transport and toxicity of PAMAM dendrimers: implications for oral drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 64, p. 571-588, 2012.

SAMUDRE, S.S.; LATTANZIO, F.A. Jr; WILLIAMS, P.B.; SHEPPARD, J.D. Jr. Comparison of topical steroids for acute anterior uveitis. **J. Ocul. Pharmacol. Ther.**, v. 20, p. 533–547, 2004.

SHCHARBIN, D.; DRAPEZA, A.; LOBAN, V.; LISICHENOK, A.; BRYSEWSKA, M. The breakdown of bilayer lipid membranes by dendrimers. **Cell Mol. Biol. Lett.**, v. 11, p. 242-248, 2006.

SCHOENWALD, R.D.; HUANG, H.S. Corneal penetration behavior of beta-blocking agents I: physiochemical factors. **J. Pharm. Sci.**, v. 72, p. 1266-1272, 1983.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. Identificação espectroscópica de compostos orgânicos. **6 ed. Rio de Janeiro**: Guanabara-Koogan, 1998.

SIMONETTI, L. D. D. Obtenção e caracterização de formulações contendo cisplatina para a quimioterapia tópica do câncer de pele: iontoforese versus promotor de absorção. Ribeirão Preto, 2004 (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP.

SOUZA, J.G.; DIAS, K.; PEREIRA, T.A.; BERNARDI, D.S.; LOPEZ, R.F.V. Topical delivery of ocular therapeutics: carrier systems and physical methods. **J. Pharm. Pharm.**, v. 66, p. 507–530, 2013.

STAHLE, L.; ARNER, P.; UNGERSTEDT, U. Drug distribution studies with microdialysis. III: Extracellular concentration of caffeine in adipose tissue in man. **Life Sci.**, v. 49, p. 1853-1858, 1991.

SUNKARA, G.; KOMPELLA, U.B. Membrane transport processes in the eye. In: Mitra AK (ed). Ophthalmic drug delivery systems. **New York: Marcel Dekker**, p. 13-58, 2003.

TAVEIRA, S.F. Desenvolvimento de formulações iontoforéticas semi-sólidas para o tratamento de tumores cutâneos: estudo in vitro em cultura de células tumorais. Ribeirão Preto: (Tese de doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2007.

TAYLOR, S.R.J.; ISA, H.; JOSHI, L.; Lightman, S. New Developments in Corticosteroid Therapy for Uveitis. **Ophthalmologica**, v. 224, p. 46–53, 2010.

TOMALIA, D.A. Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic polymer chemistry. **Prog. Polym. Sci.**, v. 30, p. 294-324, 2005.

TOMALIA D.A.; BAKER, H.; DEWALD, J.; HALL, M.; KALLOS, G.; MARTIN, S.; ROECK, J.; RYDER, J.; SMITH, P. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. **Polymer Journal**, v. 17, p. 117-132, 1985.

URTTI, A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. **Adv. Drug Deliv Rev.**, v. 58, p. 1131-1135, 2006.

VANDAMME, T.H.F.; BROBECK, L. Poly(amidoamine) dendrimers as ophthalmic vehicles for ocular delivery of pilocarpine nitrate and tropicamide. **J. Control. Release**, v. 102, n. 1, p. 23-38, 2005.

VANDERVOORT, J.; LUDWIG, A. Ocular drug delivery: nanomedicine applications. **Nanomedicine**, v. 2, n. 1, p. 11-21, 2007.

VON SALLMANN, L.; MEYER, K. Penetration of penicillin into the eye. **Arch Ophthalmol.**, v. 31, p. 1–7, 1944.

VON SALLMANN, L. Penicillin and sulfadiazine in the treatment of experimental intraocular infections with *Staphylococcus aureus* and *Clostridium welchii*. **Arch Ophthalmol.**, v. 31, p. 54–61, 1944.

WANG, F.; SHAO, N.; CHENG, Y. Paramagnetic NMR Investigation of Dendrimer-Based Host-Guest Interactions. **PLoS ONE**, v. 8, e64722, 2013.

WANG, W.Y.; YAO, C.; SHAO, Y.F.; MU, H.J.; SUN, K.X. Determination of puerarin in rabbit aqueous humor by liquid chromatography tandem mass spectrometry using microdialysis sampling after topical administration of puerarin PAMAM dendrimer complex. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 56, p. 825–829, 2011.

WANG, P.; ZHAO, X.H.; WANG, Z.Y.; MENG, M.; LI, X.; NING, Q. Generation 4 polyamidoamine dendrimers is a novel candidate of nano-carrier for gene delivery agents in breast cancer treatment. **Cancer Letters**, v. 298, p. 34–49, 2010.

WATSKY, M.A.; OLSEN, T.W.; EDELHAUSER, H.F. Cornea and sclera, in: W. Tasman (Ed), *Duane's foundations of clinical ophthalmology*, Lippincott-Raven, Philadelphia, p. 1-29, 1995.

WEI, G.; DING, P. T.; ZHENG, J. M.; LU, W. Y. Pharmacokinetics of timolol in aqueous humor sampled by microdialysis after topical administration of thermosetting gels. **Biomed. Chromatogr.**, v. 20, p.67-71, 2006.

WHITEHEAD, K.A.; LANGER, R.; ANDERSON, D.G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 8, p. 129-138, 2009.

WIRTZ, R. Die Ionentherapie in der Augenheilkunde. **Klin Mbl Augenheilk**, v. 46, p. 543, 1908.

WIWATTANAPATAPEE, R.; CARREÑO-GÓMEZ, B.; MALIK, N.; DUNCAN, R. Anionic PAMAM dendrimers rapidly cross adult rat intestine in vitro: a potential oral delivery system? **Pharm. Res.**, v. 17, p. 991–998, 2000.

YAO, W.J.; SUN, K.X.; LIU, Y.; LIANG, N.; MU, H.J.; YAO, C.; LIANG, R.C.; WANG, A.P. Effect of poly(amidoamine) dendrimers on corneal penetration of puerarin. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 33, p. 1371–1377, 2010.

YAO, W.; SUN, K.; MU, H.; LIANG, N.; LIU, Y.. YAO, C.; LIANG, R.; WANG, A. Preparation and characterization of puerarin-dendrimer complexes as an ocular drug delivery system. **Drug. Dev. Ind. Pharm.**, v. 36, p. 1027-1035, 2010.

ZHOU, Q.; GALLO, J. M. In vivo microdialysis for PK and PD studies of anticancer drugs. **AAPS J.** v.7, p.E659-E667, 2005.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 11.1.121.53.6), intitulado "Avaliação do Potencial da Associação de Dendrímeros e Iontoforese para a Administração Ocular de Fármacos", de autoria de **Joel Gonçalves de Souza**, e de **Renata Fonseca Vianna Lopez** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 05/07/2011.

This is to certify that the work (Protocol number 11.1.121.53.6), entitled: "Avaliação do Potencial da Associação de Dendrímeros e Iontoforese para a Administração Ocular de Fármacos", by **Joel Gonçalves de Souza** and **Renata Fonseca Vianna Lopez**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, July 05, 2011.

Ribeirão Preto, 7 de julho de 2011.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro