



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

Dendrímeros de PAMAM: Uma revisão das metodologias empregadas na classificação biofarmacêutica

Felipe Guizze de Souza

Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Orientadora:

Prof.(a). Dr(a) Cristina Helena dos Reis Serra

São Paulo
2022

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Cristina Helena dos Reis Serra, pela oportunidade de aprendizado, confiança depositada em mim e pela atenção e apoio fornecidos durante todo o tempo em que estive no laboratório.

À professora Jeanine Giarolla Vargas, pela parceria, paciência ao me ensinar os conceitos abordados nesse projeto e por estar disponível para me ajudar sempre que eu precisei.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo que, com seu corpo de docentes e funcionários, contribuíram, de forma ímpar, para a conclusão do meu curso de graduação.

Aos meus amigos e colegas de sala, pelos momentos de apoio e pelas atividades realizadas em grupo.

À minha família, pelo incentivo, apoio e por tudo que fazem por mim.

A Deus, por sempre me manter em Teus caminhos, fazendo com que eu alcançasse meus objetivos durante os anos de estudo.

“Em tudo dai graças, porque esta é a vontade
de Deus em Cristo Jesus para convosco.”

1 Tessalonicenses 5:18

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Abreviaturas	1
Resumo	2
Abstract	3
Introdução	4
Objetivos.....	9
Métodos	10
Bases de dados	10
Critérios de inclusão e exclusão	10
Dendrímeros de PAMAM e Propriedades Biofarmacêuticas.....	10
Estudos de solubilidade e Efeito do pH em Conjugados de Dendrímero- Composto	19
Estudos de Permeabilidade de Dendrímeros de PAMAM	23
Conclusão	33
Referências	34

Lista de abreviaturas

PAMAM	Poli(amidoamina)
PAMPA	Modelo de permeabilidade em membrana artificial paralela
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
P-gp	Glicoproteína P
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
IFAs	Ingredientes farmacêuticos ativos
TGI	Trato gastrointestinal
PB	Probucol
NAP	Naproxeno
SMV	Sinvastatina
BBH	Cloridrato de berberina
CHR	Crisofanol
Pt	Platina
RSV	Resveratrol
DOX	Doxorrubicina
Peff	Permeabilidade Efetiva
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney

Resumo

DE SOUZA, F. G. **Dendrímeros de PAMAM: Uma revisão das metodologias empregadas na classificação biofarmacêutica.** 2022. no. 1192-21. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Palavras-chave: Propriedades Biofarmacêuticas; Dendrímeros; PAMAM; Solubilidade; Permeabilidade

A via oral é a via preferencial de administração de medicamentos para a maioria dos fármacos, cujo sucesso do tratamento está diretamente relacionado à absorção intestinal do composto. Esse processo de absorção, por sua vez, é influenciado por diversos fatores que impactam na biodisponibilidade do fármaco, que é extremamente dependente da máxima solubilidade e permeabilidade. No entanto, otimizar esses dois últimos fatores, sem modificação estrutural química, é um desafio. Embora os dendrímeros de poli(amidoamina) (PAMAM) sejam uma estratégia inovadora e promissora como sistemas de liberação de fármacos, existem poucos estudos que determinam a permeabilidade e solubilidade de conjugados de fármacos e dendrímeros de PAMAM. Considerando este cenário, este trabalho teve como objetivo realizar uma revisão de literatura dos últimos cinco anos sobre caracterizações biofarmacêuticas de carreadores dendriméricos. Metodologias *in vitro*, como o modelo de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA) (modelo não baseado em células) e células Caco-2, utilizadas para a avaliação da permeabilidade nos estágios iniciais da descoberta de medicamentos, provaram ser as metodologias mais promissoras. Como resultado, discutimos, por exemplo, que através do uso do PAMPA foi possível avaliar a maior capacidade de entrega transdérmica de DNA do PAMAM conjugado com TAT quando comparado ao dendrímero PAMAM não modificado com um valor de $P<0,05$. Apresentamos também a importância da escolha dos métodos corretos de caracterização biofarmacêutica, que serão essenciais para garantir a eficácia e segurança do medicamento candidato.

Abstract

Keywords: Biopharmaceutical Properties; Dendrimers; PAMAM; Solubility; Permeability.

The oral route is the preferred way of drug administration for most drugs, whose treatment success is directly related to the compound intestinal absorption. This absorption process, in turn, is influenced by several factors impacting the drug bioavailability, which is extremely dependent on the maximum solubility and permeability. However, optimizing these last two factors, without chemical structural modification, is challenging. Although poly(amidoamine) dendrimers (PAMAM) are an innovative and promising strategy as drug delivery compounds, there are few studies that determine the permeability and solubility of PAMAM-drugs derivatives. Considering this scenario, this paper aimed to carry out a literature review of the last five years concerning biopharmaceutical characterizations of dendrimer delivery systems. *In vitro* methodologies, such as the Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) (non-cellular based model) and Caco-2 cells (cellular based model), used for the permeability evaluation in the early stages of drug discovery proved to be the most promising methodologies. As a result, we discussed, for instance, that through the usage of PAMPA it was possible to evaluate the higher capacity for transdermal delivery of DNA of TAT-conjugated PAMAM when in comparison with unmodified PAMAM dendrimer with a $P<0.05$. We also presented the importance of choosing the correct methods of biopharmaceutical characterization, which will be essential to guarantee the efficacy and safety of the drug candidate.

Introdução

A via oral de administração é a forma preferida de administração de medicamentos devido às suas vantagens, como adesão do paciente, conveniência e praticidade. A maioria dos medicamentos comercializados está disponível na forma farmacêutica para administração oral, e o sucesso do tratamento requer a absorção intestinal do fármaco, que depende da capacidade do fármaco ser liberado no trato gastrointestinal em quantidade suficiente para que se torne biodisponível e exerça seu efeito farmacológico. A biodisponibilidade é uma propriedade biológica que corresponde à medida da taxa e extensão com que o fármaco é absorvido de sua forma farmacêutica e chega à circulação sistêmica (SHARGEL *et al.*, 2016; VOLPE, 2010). A biodisponibilidade oral ocorre quando o fármaco apresenta solubilidade máxima e permeabilidade máxima no local de absorção, portanto, a quantidade absorvida do fármaco pode ser prevista com base nas características de solubilidade e permeabilidade em ensaios *in vitro* (DAHAN; MILLER, 2012; MARTINEZ; AMIDON, 2002).

A solubilidade do fármaco desempenha um papel fundamental no controle de sua dissolução da forma farmacêutica, e a extensão da solubilização do fármaco *in vivo*, particularmente no intestino delgado, é determinante para produzir boas estimativas de absorção *in vivo* (AMIDON *et al.*, 1995; SAVJANI *et al.*, 2012). A solubilidade, portanto, é uma propriedade extremamente importante a ser considerada no processo de desenvolvimento de moléculas candidatas a fármacos. As estatísticas mostram que mais de 40% das novas entidades químicas desenvolvidas pela indústria farmacêutica apresentam problemas importantes nesse sentido, representando uma grande preocupação. Assim, existem várias abordagens para enfrentar esse desafio, que incluem modificações moleculares, design de pró-fármacos, processos físicos como solubilização com co-solvente, dispersões sólidas, complexação com ciclodextrinas, diminuição do tamanho de partícula e adsorção em carreadores dendriméricos (COLTESCU *et al.*, 2020; MELO *et al.*, 2020; SAVJANI *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2021). Também é importante destacar que a permeabilidade é uma propriedade essencial e deve ser considerada no planejamento de novos compostos. (YOUHANNA; LAUSCHKE, 2021).

Em 1995, Amidon e colaboradores desenvolveram o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) com base no princípio de que o controle da extensão e da taxa de absorção de um medicamento administrado por via oral depende basicamente de dois aspectos: solubilidade aquosa do medicamento e permeabilidade intestinal (AMIDON *et al.*, 1995; LENNERNÄS, 2007; LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2010). Assim, de acordo com o SCB, os fármacos podem ser classificados em 4 classes: classe I (alta solubilidade e alta permeabilidade), classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade), classe III (alta solubilidade e baixa permeabilidade) e classe IV (baixa solubilidade e baixa permeabilidade). O SCB tem sido uma importante ferramenta nos processos de descoberta de medicamentos e desenvolvimento de produtos farmacêuticos, incluindo ensaios pré-clínicos e clínicos (DAHAN *et al.*, 2010; LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2010). Consequentemente, a avaliação e determinação das características de solubilidade e permeabilidade, de acordo com os critérios do SCB, têm sido consideradas etapas fundamentais na predição ou estimativa da biodisponibilidade oral de moléculas candidatas a novos medicamentos, ou em estudos de pré-formulação e desenvolvimento farmacotécnico, ou mesmo para avaliar os efeitos de diversos excipientes, como co-solventes ou promotores de absorção na permeabilidade intestinal (BABADI *et al.*, 2021; BALIMANE *et al.*, 2006; FAGERHOLM *et al.*, 2021; LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2010).

A solubilidade de um fármaco pelo SCB é determinada a partir da dosagem mais alta em um produto de liberação imediata. Um fármaco é considerado altamente solúvel quando a maior dosagem disponível é solúvel em volume igual ou inferior a 250 mL de meio aquoso, dentro de uma faixa de pH de 1,0 a 7,5, caso contrário, o fármaco é considerado pouco solúvel. O volume de 250 mL foi estimado com base em protocolos tradicionais de estudos de bioequivalência que preconizam a administração do medicamento a voluntários em jejum com um copo de água (FDA, 2021; PAPICH; MARTINEZ, 2015).

Junto com a solubilidade, a permeabilidade também é um parâmetro fundamental, e ambas determinam a velocidade e a extensão do processo de absorção intestinal do fármaco após sua administração oral. O processo de absorção do fármaco ocorre principalmente no intestino delgado, mais

particularmente no duodeno e na porção proximal do jejuno, por meio de enterócitos. Existem vários mecanismos de permeação envolvidos, tais como: transporte passivo, que pode ocorrer através de membranas de enterócitos (transcelularmente) ou entre enterócitos (paracelularmente) e transporte ativo, que ocorre por meio de transportadores. Os transportadores podem estar presentes na membrana dos enterócitos, nos lados apicais ou basolateral, e podem ser transportadores de influxo ou efluxo. Enquanto os transportadores de influxo são responsáveis pela entrada do fármaco na célula, os transportadores de efluxo mediam o transporte do fármaco na direção oposta, ou seja, da membrana basolateral da célula para o seu lado apical, resultando na secreção do fármaco. A glicoproteína P (P-gp) é o principal representante dos transportadores de efluxo de fármacos. A maioria dos fármacos são absorvidos por difusão transcelular passiva (BALIMANE *et al.*, 2006; O'DRISCOLL; GRIFFIN, 2008; PRETORIUS; BOUC, 2009).

Atualmente, os métodos mais utilizados para estimar e caracterizar a permeabilidade de fármacos baseados em modelos animais são *ex vivo* com o uso de segmentos intestinais isolados; perfusão intestinal *in situ* em animais; perfusão intestinal *in vivo* em humanos e metodologias *in vivo* que contemplam estudos farmacocinéticos em animais ou humanos. Além disso, métodos alternativos ao uso de animais são *in silico*; *in vitro* não celular com uso de membranas artificiais; culturas celulares *in vitro*. Um ou uma combinação desses modelos têm sido usados rotineiramente para avaliar a permeabilidade no desenvolvimento de novos fármacos (BALIMANE; CHONG, 2005; BOHETS *et al.*, 2001; CALDEIRA *et al.*, 2017; FAGERHOLM *et al.*, 2021; FRÖHLICH; SALAR-BEHZADI, 2014; GALIPEAU; VERDU, 2016; LI *et al.*, 2018; VOLPE, 2010; YOUEHANNA; LAUSCHKE, 2021).

Com relação aos pró-fármacos, eles compreendem moléculas com pouca ou nenhuma atividade farmacológica, que precisam ser convertidas no fármaco original por reações enzimáticas ou químicas, ou por uma combinação dos dois efeitos para ter atividade biológica (GLISZCZYŃSKA; SÁNCHEZ-LÓPEZ, 2021; WALTHER *et al.*, 2017; ZAWILSKA *et al.*, 2013). Desse modo, essas formas latentes oferecem uma estratégia versátil para otimizar propriedades farmacêuticas, farmacocinéticas e, indiretamente, farmacodinâmicas, como a eficácia e segurança de medicamentos candidatos

e aprovados clinicamente (SANCHES; FERREIRA, 2019; WALTHER *et al.*, 2017). Dentre as estratégias de síntese, os principais grupos funcionais da molécula precursora favoráveis à modificação são os grupos polares e/ou ionizáveis, como hidroxilas, carboxilas, aminas e grupos fosfato (DI; KERNS, 2016; RAUTIO *et al.*, 2018). O design de pró-fármacos atrai constantemente a atenção da indústria farmacêutica. Nesse sentido, aproximadamente 10% dos medicamentos aprovados no mercado são classificados como pró-fármacos. Em 2015, por exemplo, a agência reguladora Food and Drug Administration (FDA) aprovou sete pró-fármacos, representando 15% dos compostos aprovados naquele ano (RAUTIO *et al.*, 2017).

Os dendrímeros, por outro lado, são moléculas simétricas de tamanho nanoscópico, com estrutura bem definida, homogênea e monodispersa, contendo "braços" ou "galhos" em forma de árvore (TOMALIA *et al.*, 1985) (Figura 1). Eles são usados para inúmeras finalidades, como sensores químicos, carreadores de genes e fármacos, incluindo compostos transdérmicos (ABBASI *et al.*, 2014; KALHAPURE *et al.*, 2015; MITTAL *et al.*, 2021).

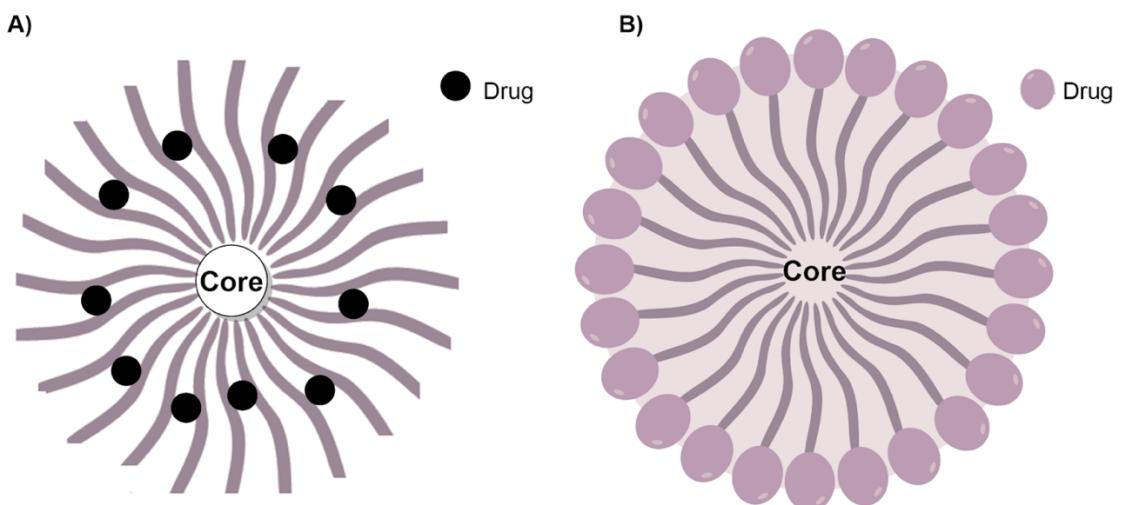


Figura 1. Representação esquemática de: A) fármaco adsorvido no dendrímero; B) pró-fármaco dendrimérico.

Além disso, a aplicação desses nanocompostos para melhorar a solubilidade de compostos bioativos tem sido amplamente discutida (FALCONIERI *et al.*, 2017; GUPTA, 2008a; POOJA *et al.*, 2014). Falconieri et

al. (2017) demonstraram, por exemplo, que a solubilidade da curcumina pode ser bastante melhorada usando o dendrímero de PAMAM - Geração G 0.5 (PAMAM G0.5) como sistema de liberação de medicamentos. É importante mencionar que a curcumina tem sido estudada para inúmeras atividades terapêuticas. No entanto, a solubilidade aquosa representa um grande desafio. Assim, a complexação com PAMAM G0.5 aumentou a solubilidade em até 150 vezes e houve liberação controlada do composto ativo (FALCONIERI *et al.*, 2017). Além do mais, os dendrimeros têm sido extremamente úteis para melhorar a permeabilidade de fármacos e/ou compostos bioativos (GHOSH *et al.*, 2019; KALYANE *et al.*, 2019; SHI *et al.*, 2020).

A síntese de dendrimeros adota principalmente dois métodos: (1) divergente, onde o dendrímero se desenvolve para fora de um núcleo multifuncional central, camada por camada, ou (2) convergente, onde o dendrímero é preparado passo a passo a partir de características periféricas que progridem para dentro (MARIYAM *et al.*, 2017).

Os dendrimeros de poli(amidoamina) (PAMAM) são um exemplo da abordagem sintética divergente, possuem numerosos grupos amina livres na superfície e um núcleo contendo diamina. Esses compostos variam em muitas aplicações biomédicas devido às suas propriedades físico-químicas ajustáveis (DE ARAÚJO *et al.*, 2018; DIAS *et al.*, 2020; FOX *et al.*, 2018; LI, J. *et al.*, 2018; MARIYAM *et al.*, 2017). Dentre as aplicações biológicas, destaca-se o uso como sistema de liberação de fármacos (CHAUHAN, 2018; DA SILVA SANTOS *et al.*, 2016; DIAS *et al.*, 2020).

É importante mencionar que a endocitose e a difusão passiva parecem ser os principais mecanismos de internalização dos dendrimeros, pois são úteis para melhorar o direcionamento de fármacos e a captação celular (RUSSIER *et al.*, 2015). Além disso, há evidências de passagem através de membranas celulares, como mucosa, epitélio e endotélio, atingindo alvos específicos *in vivo*. No entanto, algumas propriedades da molécula precisam ser consideradas para o processo de absorção como, por exemplo, tamanho, geração, forma e química da superfície (HILLAIRE; COUVREUR, 2009). Há relatos na literatura descrevendo a internalização de dendrimeros catiônicos de PAMAM, que pode ocorrer via endocitose dependente de clatrina e micropinocitose, ou via mecanismo independente de acordo com o ambiente

biológico (KITCHENS *et al.*, 2007, 2008; PERUMAL *et al.*, 2008; ZENG *et al.*, 2012).

Um artigo interessante publicado por Lu *et al.* (2018) (LU *et al.*, 2018) relataram o uso do dendrímero de PAMAM para aumentar a captação pulmonar de compostos pouco absorvidos, por exemplo, dextrans marcados com isotiocianato de fluoresceína (FDs) com diferentes pesos moleculares. Os autores utilizaram o PAMAM das gerações 0-3, com concentrações variando de 0,1-1,0%. Como principais achados, verificou-se que as absorções foram dependentes da concentração e geração de PAMAM, sendo o melhor resultado com a geração 3, incluindo toxicidade em células Calu-3. Para estes últimos compostos, foram estudados os mecanismos de absorção, que se mostraram dependentes da secreção de transportadores de cátions orgânicos.

É importante mencionar que os dendrimeros de PAMAM foram escolhidos para ser a essência deste artigo de revisão, uma vez que esses transportadores de fármacos estão sendo muito úteis para melhorar as propriedades físico-químicas de fármacos e compostos bioativos, que estão estreitamente relacionados aos processos de absorção e permeabilidade. A análise foi feita considerando artigos que continham testes de permeabilidade, além daqueles que mostravam experimentos de permeabilidade concomitantemente com solubilidade. Assim, aqueles que descrevem apenas a solubilidade não foram investigados.

Com base na informação apresentada e considerando a utilização de dendrimeros para resolver questões quanto às necessidades de melhoria de fatores determinantes na biodisponibilidade oral de fármacos e/ou compostos bioativos, nomeadamente a solubilidade e a permeabilidade, a classificação de tais propriedades é essencial para o sucesso na obtenção de formulações viáveis em diferentes estágios de desenvolvimento de fármacos.

Objetivos

O objetivo do presente projeto é realizar uma revisão bibliográfica e analisar com uma visão crítica os estudos das propriedades biofarmacêuticas (solubilidade e permeabilidade) quando aplicados no desenvolvimento de

dendrímeros de PAMAM e, quando possível, propor estratégias para a condução dessas pesquisas.

Métodos

Bases de dados

As buscas foram realizadas em quatro bases de dados bibliográficas — PubMed, Web of Science, Science Direct e Elsevier, com as palavras-chaves: “Dendrimer”, “PAMAM”, “Permeability”, “Solubility” and “pH Influence”.

Critérios de inclusão e exclusão

Foram selecionados trabalhos publicados entre 2015 e 2021 (incluindo aqueles disponíveis online em 2021, que poderiam ser publicados em 2022). Foram incluídos, ainda, todos os artigos indexados no período determinado, os quais apresentavam, em seu delineamento experimental, estudos de propriedades biofarmacêuticas de compostos dendriméricos de poli(amidoamina) (PAMAM). Excluíram-se os que não possuíam estudos referentes à permeabilidade.

Dendrímeros de PAMAM e Propriedades Biofarmacêuticas

Um dos principais objetivos da nanotecnologia e da nanomedicina é desenvolver uma formulação farmacêutica eficaz, ou seja, produzir uma formulação farmacêutica segura, com qualidade e perfil metabólico estável e, ao mesmo tempo, otimizar a biodisponibilidade de ingredientes farmacêuticos ativos (IFAs) (HOSHYAR *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2020).

Diversos fatores podem impactar na biodisponibilidade dos medicamentos, principalmente no caso de medicamentos administrados por via oral. Dentre elas, destacam-se aquelas relacionadas às propriedades fisiológicas do trato gastrointestinal, características farmacêuticas da forma farmacêutica e, além destas, as propriedades físico-químicas dos medicamentos. Os processos de dissolução de fármacos em fluidos biológicos, a partir de uma determinada forma farmacêutica, e sua absorção através de

membranas biológicas são determinantes da biodisponibilidade. Assim, a avaliação de parâmetros como dissolução do fármaco, solubilidade e permeabilidade é de fundamental importância para a predição da biodisponibilidade oral dos fármacos (MARTINEZ; AMIDON, 2002; RAVINDRAN *et al.*, 2018, 2019).

Fatores fisiológicos do trato gastrointestinal humano (TGI) devem ser considerados. O pH do TGI é um fator importante que pode afetar consideravelmente a absorção e a biodisponibilidade oral do fármaco, pois pode ter uma influência significativa nas propriedades mencionadas anteriormente, bem como na liberação e estabilidade do fármaco. As diferentes regiões do TGI possuem diferentes propriedades de absorção do fármaco e diferentes faixas de pH, com valores entre 1 e 7,5 (ABUHELWA *et al.*, 2017; GREENWOOD-VAN MEERVELD *et al.*, 2017; ZHU *et al.*, 2017).

A Tabela 1 apresenta um resumo dos dados de estudos relevantes para esta pesquisa (o número total de artigos selecionados foi de 22), que abordam análises de permeabilidade, solubilidade e influência do pH nos experimentos para classificação biofarmacêutica de dendrímeros de PAMAM. Dentre eles, apenas 5 artigos (23%) apresentaram algum estudo de solubilidade concomitantemente à avaliação da permeabilidade em seus experimentos e, do total, apenas 7 (32%) descreveram a influência do pH do meio reacional no experimento.

Tabela 1. Dados de estudos elegíveis

Autor, Ano de Publicação	PAMAM (Geração)	Apresentação	Estudo de solubilidade	Estudo do efeito do pH	Permeabilidade (modelo/ensaio)	Composto
(QI et al., 2015a)	G5-NH ₂ G7-NH ₂ G5-PEG G7-PEG PAMAM	Adsorvido	(G5-NH ₂ , G5-PEG, G7-NH ₂ ou G7-PEG) com uma concentração de 174 nM ou 696 nM (4 × 174 nM) foram misturados com um excesso de PB e diluídos com água pura até um volume de 10 mL.	Não descrito	Células Caco-2	Probucol (PB)
(NAJLAH et al., 2017)	G3-PAMAM	Adsorvido	A solubilidade dos conjugados dendrímeros G0 e G3 a pH 1,2 (tampão de ácido clorídrico 0,06 M) foi determinada a 37°C. 50 mg de conjugado foram adicionados ao tampão (pH 1,2, 1 mL) e agitados durante 72 horas para obter saturação.	A quantidade de 50 mg de conjugado por mL foi usada para avaliar o aumento da solubilidade do NAP após a conjugação em pH 1,2, pois neste pH o naproxeno (pKa 4,2) não é ionizado.	Células Caco-2	Naproxeno (NAP)
(QI et al., 2015b)	G5-NH ₂ PAMAM	Pró-fármaco	No experimento, 3 mg de SMV foi adicionado a 2 mL de PBS a pH 6,8 e agitado em um agitador de incubação a 100 rpm e 37°C.	Não descrito	Células Caco-2	Sinvastatina (SMV)

Autor, Ano de Publicação	PAMAM (Geração)	Apresentação	Estudo de solubilidade	Estudo do efeito do pH	Permeabilidade (modelo/ensaio)	Composto
(HUBBARD <i>et al.</i> , 2015)	G3.5-COOH G4-NH ₂ PAMAM	Pró-fármaco	Não descrito	Não descrito	1. Células Caco-2 2. Tecido intestinal de rato isolado	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)
(MA <i>et al.</i> , 2015)	G5 PAMAM	Pró-fármaco	Aproximadamente 5 mg de PB foram adicionados a 2 mL de água para garantir uma condição saturada. Dendrímeros G5 foram adicionados à suspensão de PB com concentração molar igual a 174 nM de dendrímero. Cada suspensão foi agitada mecanicamente a 37°C por 48h e centrifugada a 10.000 rpm.	Não descrito	Células Caco-2	Probucol (PB)

Autor, Ano de Publicação	PAMAM (Geração)	Apresentação	Estudo de solubilidade	Estudo do efeito do pH	Permeabilidade (modelo/ensaio)	Composto
(LAI <i>et al.</i> , 2019)	G3-PAMAM	Adsorvido	Não descrito	Para resolver o problema de precipitação que afeta a capacidade de carreamento do fármaco, lipossomas CHR foram preparados por dispersão em filme fino e ajuste do pH para carga ativa com entrada de BBH, levando a uma concentração encapsulada aceitável.	Células do tecido transcorneal Crisofanol (CHR)	Cloridrato de berberina (BBH)
(VIDAL <i>et al.</i> , 2018)	G4-PAMAM	Adsorvido	Não descrito	Não descrito	Cultura celular de neurônios do hipocampo de embriões de camundongo C57BL / J6	Folato e polietilenoglicol
(XU <i>et al.</i> , 2016)	G5-PAMAM	Adsorvido	Não descrito	Não descrito	Cultura de células endoteliais microvasculares do cérebro humano	Doxorrubicina
(WEN <i>et al.</i> , 2015)	G1 G2- PAMAM	Adsorvido	Não descrito	Não descrito	<i>E. coli</i> bactérias gram-	Quitosana

Autor, Ano de Publicação	PAMAM (Geração)	Apresentação	Estudo de solubilidade	Estudo do efeito do pH	Permeabilidade (modelo/ensaio)	Composto
(LI <i>et al.</i> , 2016)	PEG-b-PAEMA-PAMAM/Pt	Pró-fármaco	Não descrito	Em pH neutro, PAEMA é hidrofóbico e direciona a montagem de PEG-b-PAEMA-PAMAM/Pt em SCNs/Pt para circulação sanguínea prolongada . No pH ácido do tumor, o PAEMA é protonado em ritmo acelerado e se torna hidrofilico, resultando na desintegração instantânea de SCNs/Pt em pequenas nanopartículas que penetram efetivamente nos tumores.	Xenoenxerto de tumor BxPC-3 em camundongos	Platina (Pt)
(PENTEK <i>et al.</i> , 2017)	G4-PAMAM	Pró-fármaco	Excesso de RSV, cerca de 2 mg foi adicionado a frascos que continham 500 µL de metanol e complexados com dendrímeros. Em seguida, os frascos foram liofilizados durante a noite, retirando-se água e metanol para reconstituição com 1000 µL de água Millipore. Em seguida, as formulações foram agitadas por 2h.	O estudo do efeito do pH na formulação de RSV e dendrímero foi estudado em pH 2,5 e pH 7,0, avaliando o estado de ionização de ambos os compostos e quando em complexação.	Células de difusão de Franz (FDC) e amostras de pele de rato.	Resveratrol (RSV)

Autor, Ano de Publicação	PAMAM (Geração)	Apresentação	Estudo de solubilidade	Estudo do efeito do pH	Permeabilidade (modelo/ensaio)	Composto
(QIU <i>et al.</i> , 2017)	G5-PAMAM	Adsorvido	Não descrito	O diâmetro médio de PEG-PAMAM-DOX foi investigado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH = 7,4 e em urina artificial, respectivamente, a 0, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 h para avaliar sua estabilidade.	Tecido da bexiga <i>in vivo</i>	Doxorrubicina (DOX)
(WANG <i>et al.</i> , 2017)	G5-PAMAM	Adsorvido	Não descrito	Não descrito	Córneas extraídas de olhos de coelho e montadas em células de difusão de Franz	Brimonidina
(YELLEPEDDI <i>et al.</i> , 2018)	G4-PAMAM	Adsorvido	Não descrito	Não descrito	Células Caco-2	N-acetil-L-cisteína (NAC)
(HAN <i>et al.</i> , 2018)	G5-PAMAM	Adsorvido	Não descrito	Não descrito	Células endoteliais microvasculares do cérebro humano (HBMEC)	Borneol

Autor, Ano de Publicação	PAMAM (Geração)	Apresentação	Estudo de solubilidade	Estudo do efeito do pH	Permeabilidade (modelo/ensaio)	Composto
(CAO <i>et al.</i> , 2018)	G4-PAMAM	Adsorvido	Não descrito	Não descrito	MCF -7 linhagem de células de câncer de mama humano	Doxorrubicina
(YAN <i>et al.</i> , 2019)	G2-PAMAM	Adsorvido	Não descrito	Não descrito	Membranas pulmonares obtidas de uma rã com garras fêmea da África do Sul (<i>Xenopus laevis</i>)	Insulina
(PRADHAN <i>et al.</i> , 2019)	G2-PAMAM	Adsorvido	Não descrito	Não descrito	bEnd.3 células endoteliais microvasculares derivadas do cérebro de camundongo	Citicolina
(OMAR <i>et al.</i> , 2019)	G3-PAMAM	Adsorvido	Não descrito	O gel contendo o dendrímero PAMAM G3 como intensificador de permeação apresentou o pH muito mais próximo do pH da pele humana enquanto o gel preparado com Dimetilsulfóxido (DMSO) como potenciador de permeação tinha pH 5,3.	Sprague Dawley Female Rat Skins	Lidocaína

Autor, Ano de Publicação	PAMAM (Geração)	Apresentação	Estudo de solubilidade	Estudo do efeito do pH	Permeabilidade (modelo/ensaio)	Composto
(GAO <i>et al.</i> , 2020)	G4-PAMAM	Pró-fármaco	Não descrito	De acordo com o estudo, foi avaliado que as nanopartículas de AZM-DA se dissociariam em pH 6,0.	Membrana externa de <i>P. aeruginosa</i>	Azitromicina (AZM) 2,3-dimetil anidrido maleico (DA)
(BAHADORAN <i>et al.</i> , 2016)	nanopartículas de pDNA/dendrímero (DNA-TAT/PAMAM)	Adsorvido	Não descrita	Não descrita	Skin-PAMPA	Plasmídeo de DNA
(YAVUZ <i>et al.</i> , 2015)	G3, G3.5, G3-OH, G4, G4.5 e G4-OH PAMAM-DEX	Adsorvido	Não descrito	Não descrito	1. ARPE-19 Células 2. Estudos de transporte ex vivo através da córnea de coelho 3. Avaliação	Dexametasona

Estudos de solubilidade e Efeito do pH em Conjugados de Dendrímero-Composto

O desenvolvimento de nanoestruturas dendriméricas pode ser uma importante ferramenta para permitir uma biodisponibilidade adequada para fármacos que possuem baixa solubilidade e/ou baixa permeabilidade, principalmente aqueles pertencentes à classe SCB II (baixa solubilidade, alta permeabilidade), classe SCB III (alta solubilidade, baixa permeabilidade) e SCB classe IV (baixa solubilidade, baixa permeabilidade), especialmente quando a via oral é selecionada como via de administração. Além disso, um dos mecanismos pelos quais os dendrímeros liberam fármacos é em função da alteração do pH do meio (SATHE; BHARATAM, 2022). Assim, nesse sentido, é fundamental avaliar as características biofarmacêuticas (solubilidade aquosa e permeabilidade) de fármacos quando em estruturas dendriméricas.

Para a avaliação da solubilidade em equilíbrio, de acordo com o SCB e conforme recomendado pela maioria das agências reguladoras de medicamentos, o método de agitação orbital, também chamado de Shake-Flask, introduzido há mais de 50 anos, é utilizado e ainda considerado o método mais confiável para caracterizar a solubilidade. Sua técnica constitui as etapas de arranjo da amostra, equilíbrio, separação de fases, solução saturada, análise de sólidos residuais e interpretação dos dados gerados (VESELI *et al.*, 2019).

Para simular as condições fisiológicas do local de liberação e absorção do fármaco, determina-se a solubilidade de equilíbrio de um fármaco a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, em meio aquoso tamponado, sob diferentes condições de pH na faixa de 1 a 6,8. Por exemplo, para um medicamento administrado por via oral, são utilizados pelo menos três meios, que permitem a simulação de fluido gástrico (pH 1,2) e fluido intestinal (pH 4,5 e 6,8) (OMS, 2018). O número de análises de pH para um estudo de solubilidade pode ser baseado nas características de ionização da substância teste, que servem de base para determinar os valores de $\text{pH} = \text{pKa}$, $\text{pH} = \text{pKa} + 1$, $\text{pH} = \text{pKa} - 1$, $\text{pH} = 1$ e $\text{pH} = 6,8$. Ressalta-se que o procedimento para avaliar a solubilidade em equilíbrio pode envolver um tempo prolongado (até 72

horas), portanto, é essencial que a estabilidade do fármaco em estudo seja monitorada ao longo do ensaio e sob diferentes condições de pH (FDA, 2017, 2021).

A análise de publicações que apresentaram estudos de solubilidade simultaneamente com permeabilidade no desenvolvimento de estruturas dendriméricas de PAMAM, demonstra que o método convencional para determinação de solubilidade da abordagem SCB, o Shake-Flask, foi adotado apenas por Najlah, Mohammad *et al.* (2017) (Tabela 1), apesar de ser uma área de estudo em constante desenvolvimento e inovação em nanomedicina (FAN *et al.*, 2017; FDA, 2021; KU, 2008; LIKO *et al.*, 2016). No entanto, não totalmente de acordo com os protocolos recomendados pela SCB, uma vez que foi utilizado apenas o meio com pH 1,2. Os outros 4 trabalhos descreveram métodos completamente sem relação aos modelos padronizados do SCB, utilizando condições diferentes das fisiológicas, incluindo, por exemplo, o metanol como meio de dissolução.

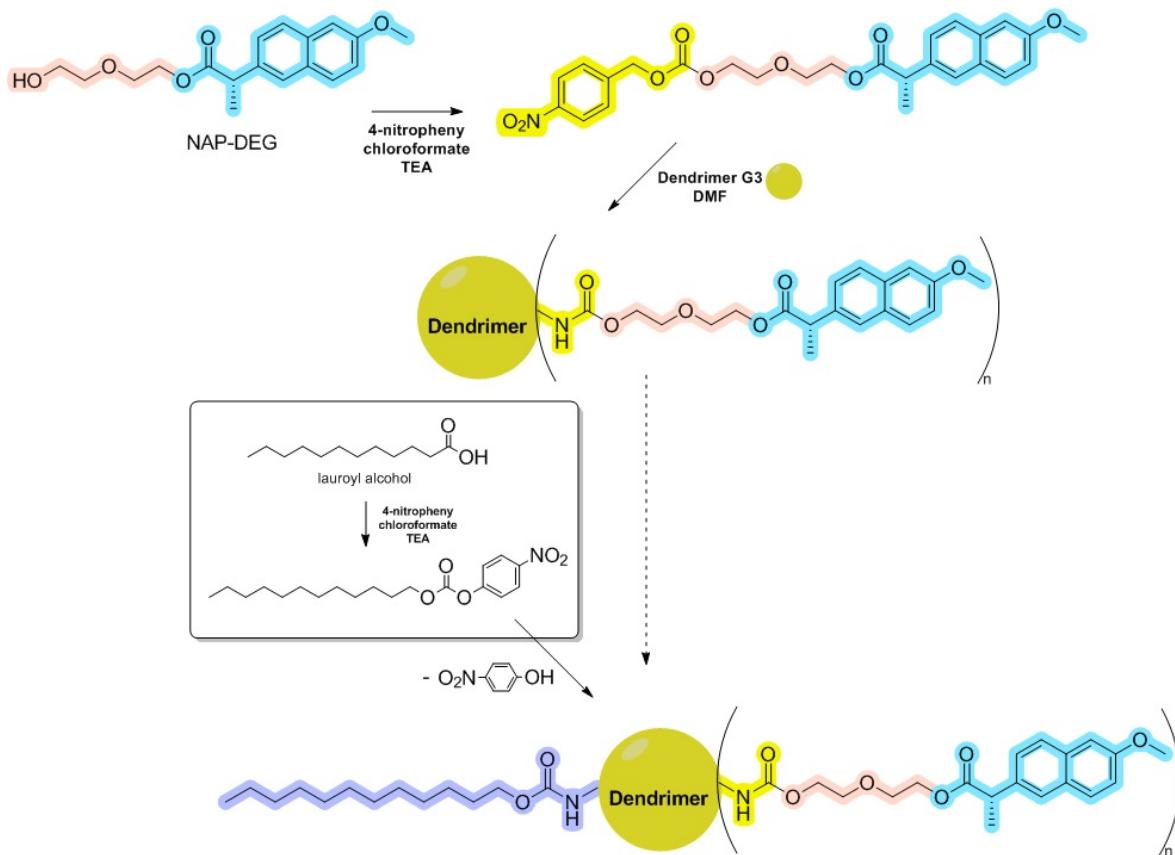


Figura 2. Ilustração da síntese do conjugado G3-PAMAM-NAP.

O grupo de Najlah, Mohammad *et al.* (2017) (NAJLAH *et al.*, 2017) também demonstrou que as gerações G0 e G3 de dendrímeros PAMAM (Figura 2) aumentaram significativamente a solubilidade do naproxeno (SCB classe II). No entanto, os resultados mostraram um produto dendrimérico G3 insolúvel em solução aquosa quando associado a mais de cinco moléculas de naproxeno e 12 cadeias de lauril cloreto (NAJLAH *et al.*, 2017). A conjugação com lauril cloreto é uma estratégia eficaz para reduzir a citotoxicidade de conjugados dendriméricos que aumenta tanto com a concentração quanto com a geração, com maior citotoxicidade dos dendrímeros catiônicos (G2, G3, G4) quando comparados aos dendrímeros aniônicos (G2.5, G3.5) (JEVPRASESPHANT *et al.*, 2003; NAJLAH *et al.*, 2017).

É importante mencionar que a influência dos tamanhos dos dendrímeros em suas respectivas propriedades foi intensamente discutida por Mignani *et al.*

(2019), por exemplo, em relação à biodistribuição e perfil farmacocinético, os dendrímeros catiônicos com geração > 8 têm preferência pelos tecidos do pâncreas, fígado e baço e os de geração < 4 pelo rim. Além disso, após administração parenteral, compostos neutros de baixa geração (<3,5 nm) têm depuração rápida e fácil eliminação na urina, enquanto os derivados maiores e sem carga evitam a filtração renal e permanecem no sangue por mais tempo. Ademais, em relação à administração parenteral, o tamanho do dendrímero pode influenciar na dose aplicada, ou seja, dendrímeros maiores necessitam de uma dose maior. Para a via oral, os dendrímeros de PAMAM podem aumentar a permeabilidade das células Caco-2 na seguinte relação: catiônico > aniônico > não carregado ou PEGuilado. A toxicidade é um parâmetro muito importante no desenvolvimento de novos fármacos e, para os dendrímeros, os catiônicos de geração > 5 são considerados tóxicos e aqueles menores ou iguais a 5, são avaliados como menos ou não tóxicos, assim como os derivados aniônicos e neutros.

O estudo da solubilidade em diferentes faixas de pH é especialmente importante para dendrímeros PAMAM com terminação amina, pois para este tipo de dendrímero, com interiores contendo aminas terciárias, a região de baixo pH ($\text{pH} < 4$) resulta em repulsão entre as aminas carregadas positivamente na superfície do dendrímero e as aminas terciárias no interior. Além disso, em pH neutro, ocorre o fenômeno de back-folding, que pode ser consequência da interação de hidrogênio entre aminas de superfície que são carregadas positivamente em interação com aminas terciárias que possuem carga neutra dentro do dendrímero. Em uma região de pH mais alto ($\text{pH} \geq 10$), o dendrímero se contrai à medida que a carga da molécula se torna neutra. Nesse ponto, as forças repulsivas entre os ramos do dendrímero e os grupos terminais atingem um mínimo (GUPTA, 2008b; SANTOS *et al.*, 2020).

Estudos de Permeabilidade de Dendrímeros de PAMAM

As vantagens e limitações de cada método de permeabilidade discutido neste estudo são apresentadas na Tabela 2. O modelo *in silico* emprega programas computacionais que consideram as características físico-químicas das moléculas, como peso e tamanho molecular, área de superfície polar, capacidade de ligação de hidrogênio, pKa, lipofilicidade e carga/ionização. Embora essas características estejam relacionadas ao comportamento *in vivo* do fármaco, elas ainda são limitadas e possuem baixo valor preditivo devido à incapacidade de prever as interações entre o fármaco e a membrana biológica, carreadores de influxo e/ou efluxo e a influência de diversos fatores fisiológicos (BALIMANE *et al.*, 2000; BERGSTRÖM, 2005; FAGERHOLM *et al.*, 2021; LEE *et al.*, 2020; SAEIDNIA *et al.*, 2013).

Embora seja um importante método de previsão da permeabilidade, o modelo *in silico* não foi adotado por nenhum grupo de acordo com nossa pesquisa. Isso pode ser um indicativo da complexidade dos estudos computacionais e da falta de softwares dedicados aos dendrímeros de PAMAM e suas propriedades biofarmacêuticas (MARTINHO *et al.*, 2014).

Tabela 2. Resumo das principais vantagens e limitações dos modelos de permeabilidade para avaliação do método mais eficiente.

Método de Permeabilidade	Vantagens	Limitações
Predições <i>In Silico</i>	Modelo rápido que facilita a descoberta e o desenvolvimento de medicamentos.	Modelos complexos podem consumir muitos recursos e tempo para executar e construir, a maioria dos modelos de permeabilidade prevê apenas processos transcelulares passivos. Para melhorar a qualidade dos conjuntos de dados, podem ser necessários valores de solubilidade e permeabilidade gerados experimentalmente.
Membranas Artificiais <i>In Vitro</i>	Triagem de fármacos de alto rendimento, recomendada para descoberta de fármacos nos estágios iniciais, boa correlação com a permeabilidade do intestino humano, sem uso de animais, reproduzível, econômica e permite automação.	Incapacidade de prever o transporte paracelular e ativo, retenção na membrana de compostos lipofílicos, falta de proteínas transportadoras, enzimas ou tight junctions.
Monocamada Celular <i>In Vitro</i>	Estudos mecanísticos, recomendada para descoberta de fármacos nos estágios iniciais, adequado para o estudo da regulação de transportadores e enzimas em linhagens celulares humanas ou animais.	Fraca associação para compostos mediados por carreadores, bem como para compostos transportados paracelularmente, alta variabilidade de resultados, fatores fisiológicos não estão presentes (muco; sais biliares, etc), maior custo, maior mão de obra e mais demorado em comparação com o método de membranas artificiais.
Câmaras de Ussing/Sacos Intestinais <i>Ex Vivo</i>	Diferenciação entre transporte transcelular, paracelular e iônico, retém a arquitetura intestinal, presença de camada de muco, expressão de proteínas de transporte e metabolismo de fármacos.	Viabilidade tecidual limitada, inadequada para avaliação de pró-fármacos com grupos ésteres (principalmente em câmaras de difusão), remoção parcial de camadas musculares, uso animal (embora menor quando comparado aos métodos <i>in situ</i>).
Perfusão de Passagem Única/Métodos Recirculantes <i>In Situ</i>	Mais próximo da anatomia <i>in vivo</i> , ferramenta confiável para prever a permeabilidade segmentar humana no jejun e cólon, suprimento sanguíneo e inervação intactos. Método apropriado para interações medicamentosas, farmacocinética, funcionalidade da glicoproteína-P-CYP e estudos de transporte de influxo/efluxo.	Uso animal, invasivo, viabilidade limitada do tecido, não é uma ferramenta de triagem, baixo rendimento, método com uso intensivo de recursos.

Perfusão Intestinal <i>In Vivo</i>	Cenário da vida real, interações hospedeiro-micrório podem ser consideradas, menos fármacos modelos são recomendados para determinar a classe de permeabilidade da substância medicamentosa.	Consumo de tempo e recursos, complexo, uso de anestesia, introdução de cateter, protocolos arriscados de difícil padronização, diferenças individuais gerais podem ser responsáveis por influenciar os resultados de permeabilidade.
---------------------------------------	--	--

Dentre os estudos analisados, 10 (45%) dos experimentos de permeabilidade foram realizados em modelos animais (Tabela 1), como sapos, camundongos, ratos e coelhos. Apesar de serem metodologias mais próximas da anatomia humana, são mais onerosas, com baixa capacidade de rastreamento e invasivas para os animais envolvidos no estudo (Tabela 2). Isso evidencia a necessidade de redução, refinamento e substituição de métodos de caracterização de permeabilidade baseados principalmente no uso de animais, em favor de ensaios *in vitro* no desenvolvimento e estudo de dendrímeros de PAMAM e suas propriedades.

Metodologias *ex vivo* envolvem ensaios de permeabilidade utilizando tecidos intestinais de animais que apresentam semelhança estrutural com o intestino humano, principalmente em relação à expressão de transportadores de influxo e efluxo encontrados *in vivo*. Esses modelos permitem avaliar e caracterizar os mecanismos envolvidos na permeabilidade do fármaco, incluindo transporte passivo, transporte ativo e presença de glicoproteína-P. Os tecidos podem ser obtidos de diversos animais como porcos, ratos, coelhos, cães e sapos (BALIMANE *et al.*, 2000; YAO; CHIOU, 2006). Segmentos intestinais de ratos têm sido frequentemente utilizados para avaliar a permeabilidade de diversos fármacos e os resultados têm sido altamente correlacionados com os dados de permeabilidade intestinal em humanos (DEZANI *et al.*, 2013; PRETORIUS; BOUC, 2009; TRAPANI *et al.*, 2004; TUKKER, 2000; ŽAKELJ *et al.*, 2006). Dependendo do tecido e segmento a ser utilizado, um animal permite uma série de testes e resultados, o que é eticamente mais adequado e contempla o princípio dos 3Rs (Redução, Refinamento, Reposição), visando reduzir o número de animais em pesquisa. Diferentemente dos métodos *in silico* e *in vitro*, o estudo *ex vivo* apresenta como grande vantagem a expressão da maioria dos carreadores

de influxo e efluxo encontrados no cenário *in vivo*, o que permite obter altos valores de correlação entre este modelo e os ensaios *in vivo* em ratos e humanos. No entanto, a falta de habilidade e a manipulação extensa do segmento intestinal, além de fatores relacionados à técnica, estão relacionados aos resultados divergentes encontrados em alguns trabalhos descritos na literatura (PRETORIUS; BOUIC, 2009; TUKKER, 2000; ŽAKELJ et al., 2006).

Avaliando a formulação do complexo DEX-PAMAM por metodologias de permeabilidade *in vivo* e *ex vivo* Yavuz et al. (2015) indicaram que todas as formulações de complexos dendriméricos foram capazes de permear mais do que a solução do fármaco, e dendrímeros de geração mais alta (PAMAM G4.5, G4–OH e G4) apresentaram maior dexametasona (classe SCB I/III) quando comparado com dendrímeros de gerações mais baixas (PAMAM G3.5, G3–OH e G3). O grupo também mostrou que os complexos dendriméricos aniônicos (G3.5, G4.5, G3–OH e G4–OH) resultaram em um nível de transporte de DEX mais alto do que a solução de fármaco e os dendrímeros catiônicos.

Nesse sentido, o grupo de Omar et al. (2019) conduziu um estudo de permeabilidade *ex vivo* de gel contendo lidocaína (SCB classe III) com dendrímero de PAMAM G3 como um potenciador de permeação. Os resultados indicaram que o sistema dendrimérico foi capaz de melhorar a penetração da lidocaína no tecido cutâneo, de aproximadamente 19,81% para 52,15%. Além disso, atuou como potencializador da retenção do fármaco no tecido estudado, com percentual de 23,31% em relação ao gel contendo lidocaína sem associação com o dendrímero de PAMAM G3 que apresentou percentual de retenção do fármaco na pele de apenas 5,45%.

Modelos *in situ* permitem estimar a permeabilidade intestinal efetiva de um determinado fármaco (P_{eff}) determinando seu desaparecimento de uma solução de perfusão que passa por um segmento intestinal isolado. A perfusão *in situ* em segmentos intestinais de ratos é o método melhor caracterizado e validado para investigações da permeabilidade intestinal tanto no intestino delgado quanto no grosso e tem sido usado para avaliar a permeabilidade e a cinética de absorção de um fármaco. Uma alta correlação tem sido observada entre o intestino delgado

de humanos e ratos em relação à permeabilidade intestinal de fármacos cujo transporte é mediado por mecanismos que envolvem tanto transportadores quanto difusão passiva. Uma grande vantagem da perfusão *in situ* em comparação com as técnicas *ex vivo* é a existência de nervos e suprimento sanguíneo no segmento intestinal perfundido. No entanto, esta técnica emprega um número maior de animais. Ambas as técnicas permitem a avaliação da permeabilidade em diferentes segmentos do intestino (duodeno, jejuno, íleo e cólon) (ALEJANDRO *et al.*, 2017; BALIMANE *et al.*, 2000; COOK; SHENOY, 2003; DAHAN *et al.*, 2010; DEZANI *et al.*, 2013, 2017; GUERREIRO-TANOMARU *et al.*, 2015).

Métodos *in vivo* permitem estimar a absorção a partir de dados farmacocinéticos e são desenvolvidos por meio de experimentos envolvendo humanos e/ou animais. Eles incluem um número considerável de ensaios e tamanho amostral, pois estão sujeitos a muitas fontes de variação, como variabilidade individual (intra-individuais e interindividuais), e além de terem um alto custo, questões éticas devem ser observadas, pois são desenvolvidos em humanos e/ou animais (CONNELL *et al.*, 2014; HELLRIEGEL *et al.*, 1996; LEIBEL *et al.*, 1995; LI *et al.*, 2018). Tais características não justificam a utilização desses testes nas fases iniciais do desenvolvimento de novos medicamentos.

Com essa abordagem, dois estudos apresentaram ensaios de permeabilidade *in vivo*. No experimento, Yavuz *et al.* (2015) mostraram que os conjugados DEX-PAMAM foram capazes de aumentar a permeabilidade ocular e os níveis de dexametasona (SCB classe I/III) no tecido ocular. Além disso, o grupo relatou que as estruturas dendriméricas prolongaram a presença do fármaco na retina ao prolongar a duração da liberação de DEX, mas alguns conjugados foram depurados em 24h antes de liberar a dexametasona em sua estrutura.

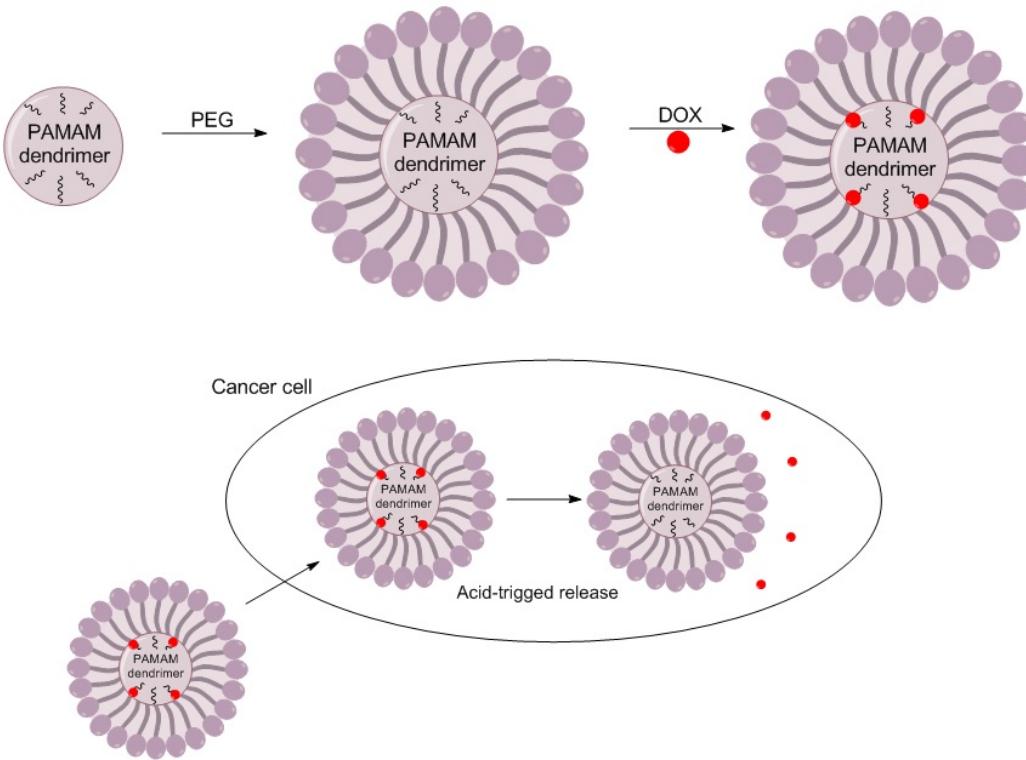


Figura 3. Representação da síntese de PEG-PAMAM-DOX e liberação de doxorrubicia mediada pela alteração do pH do meio na célula cancerosa.

Ademais, Qiu *et al.* (2017) descobriram que o dendrímero PEG-PAMAM foi capaz de facilitar uma penetração mais profunda da doxorrubicia (SCB classe III) na mucosa da bexiga, no entanto, o mecanismo real de aumento da permeabilidade não foi elucidado e ainda não está totalmente compreendido. Apesar disso, o grupo sugeriu que o tamanho de partícula do complexo PEG-PAMAM G5-DOX (cerca de 13 nm) poderia ter uma influência importante na penetração efetiva do urotélio. É relatado na literatura que nanopartículas menores que 50 nm podem penetrar mais facilmente em tecidos mais profundos (KIM *et al.*, 2014). Além disso, o grupo mostra um mecanismo de liberação de PEG-PAMAM-DOX com base no efeito da variação do pH na célula cancerosa (Figura 3).

Por outro lado, 12 (55%) dos experimentos de permeabilidade foram realizados usando técnicas *in vitro*, como membranas artificiais, cultura de células e o uso de organismos menores, como bactérias, demonstrados na Tabela 1.

Métodos *in vitro* para avaliar a permeabilidade geralmente são menos trabalhosos e de menor custo quando comparados aos modelos *in vivo*, *in situ* e *ex vivo*, por essa razão destinam-se a avaliações iniciais de permeabilidade de fármacos. No entanto, não mimetizam completamente as condições fisiológicas presentes *in vivo*, como circulação sistêmica, inervação, fluxo de fluidos, entre outras características. O sucesso do uso de um modelo *in vitro* para prever a absorção *in vivo* dependerá de quão bem o método pode mimetizar as características do epitélio intestinal (ANTUNES *et al.*, 2013; NEUMANN *et al.*, 2021).

Em relação aos modelos *in vitro*, destacam-se aqueles que utilizam monocamadas de células com o intuito de reproduzir o epitélio intestinal. Atualmente, diferentes linhagens estão disponíveis para tais ensaios, sendo as mais difundidas as células Caco-2 (derivadas do adenocarcinoma humano) e as células Madin-Darby Canine Kidney (MDCK), derivadas do rim canino. As células Caco-2, quando cultivadas e mantidas adequadamente, diferenciam-se e formam uma monocamada polarizada de enterócitos, com microvilosidades e expressão de transportadores, incluindo proteínas de influxo chamadas PEPT1 e transportadores de efluxo como P-gp. O tempo necessário para crescer essas células é de 21 dias. No entanto, as células Caco-2 apresentam variações na expressão de carreadores, alto risco de contaminação por microrganismos, longo período de crescimento, variação na idade celular, junções intercelulares mais justapostas e formação de uma camada de água não agitada mais espessa do que no quadro *in vivo*. Tais limitações resultam em uma alta variabilidade de resultados de permeabilidade e a restrição deste modelo em estimar a permeabilidade de fármacos que permeiam pela via paracelular, uma vez que este modelo não desenvolve adequadamente esta via (BALIMANE *et al.*, 2000; BUCKLEY *et al.*, 2012; DAHAN *et al.*, 2010; DEZANI *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2011). As células MDCK são obtidas do rim canino e se diferenciam em células epiteliais colunares quando cultivadas adequadamente em suportes permeáveis. Essas células têm a formação de espaços intercelulares de diferentes maneiras, o que pode representar diferenças nos valores de permeabilidade. Embora o tempo

de cultivo dessas células seja menor em relação às células Caco-2 (3 a 5 dias), esse modelo não é recomendado para avaliar a permeabilidade de fármacos que são transportadosativamente devido a variações na expressão de carreadores e enzimas (BALIMANE *et al.*, 2000; DEFERME *et al.*, 2007; NEWBY *et al.*, 2015). Modelos que incluem linhagens celulares produtoras de muco como HT29 em ensaios celulares com Caco-2 têm sido usados especialmente para avaliar a permeabilidade de fármacos lipofílicos (YAMAZOE *et al.*, 2021).

Dentre os métodos *in vitro* que não são baseados em modelos celulares, os ensaios de permeabilidade utilizando o modelo de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA) (Figura 4), introduzido por Kansy *et al.* (1998), oferece alto rendimento para avaliação da permeabilidade e determinação do potencial de absorção de um fármaco, destacando-se pelo menor custo e eficiência de tempo. Considerando que a maioria dos fármacos é absorvida principalmente ou parcialmente por transporte passivo, a taxa de permeação através de uma membrana artificial simples, que mimetiza o transporte transcelular passivo, pode fornecer uma boa indicação do potencial de absorção de um fármaco. O modelo PAMPA foi desenvolvido como um método rápido, no qual a avaliação da permeabilidade transcelular passiva é realizada *in vitro* em uma placa de 96 poços. A falta de transportadores de fármacos e tight junctions paracelulares no modelo PAMPA o torna inadequado para avaliar a permeabilidade desses fármacos que são absorvidos via transportadores de membrana ou via paracelular. No entanto, estudos com PAMPA são considerados mais fáceis, rápidos e muito mais baratos do que aqueles envolvendo células Caco-2 (M. REIS *et al.*, 2012; TEKSIN *et al.*, 2010). Apesar de limitados ao transporte passivo de compostos, eles servem como ferramentas extremamente importantes, principalmente no desenvolvimento de novas moléculas e candidatos a fármacos, pois permitem um alto volume de compostos caracterizados. Além disso, vale ressaltar que a adoção de metodologias alternativas que substituem *in vivo* corrobora para reduzir o uso de animais em pesquisas, tornando realidade a filosofia do programa 3Rs, desenvolvido por William Russell e Rex Burch, sendo Redução, Refinamento e

Reposição (BERBEN *et al.*, 2018; CAZARIN *et al.*, 2004; DOKE; DHAWALE, 2015; RUSSELL; BURCH, 1959).

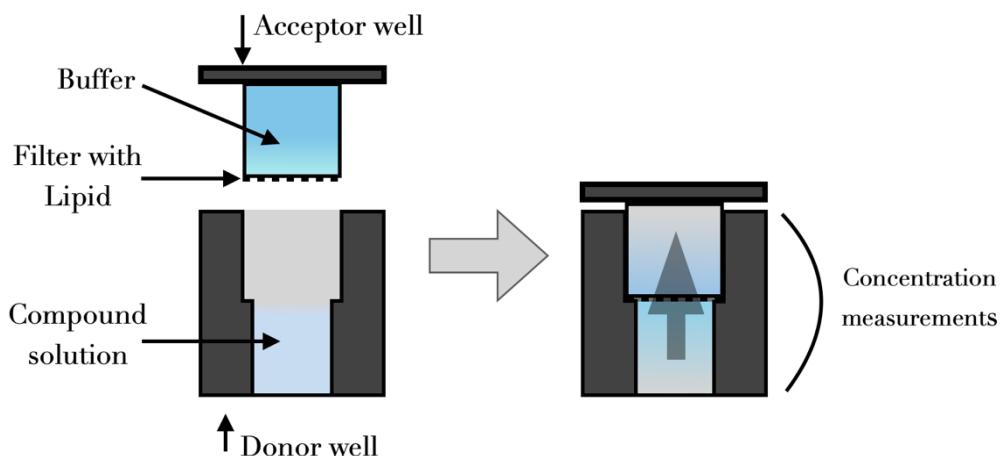


Figura 4. Desenho esquemático de um princípio de funcionamento do modelo PAMPA. Uma placa doadora de 96 poços revestida com uma membrana artificial e uma placa receptora conjugada a ela são usualmente empregadas; A solução contendo os compostos é adicionada aos poços da placa receptora (doador de permeação) e uma solução tampão é adicionada aos poços da placa filtro (aceitor de permeação); as placas são fixadas e incubadas para duração, temperatura e agitação apropriadas. Finalmente, as placas são separadas e as concentrações das soluções doadoras e receptoras são medidas.

Apesar das limitações, como a ausência da camada de muco e a fraca associação para compostos com transporte ativo (Tabela 2), ensaios de permeabilidade *in vitro* (por exemplo PAMPA e Caco-2) podem oferecer dados valiosos em estudos mecanicistas e de permeação dos transportadores dendriméricos em diferentes regiões do TGI quando combinados com métodos mais sofisticados, como mostrado por Hubbard *et al.* (2015) (Tabela 1). Em seu estudo, o grupo utilizou células Caco-2 em conjunto com a técnica *ex vivo* de câmaras de difusão horizontal, neste caso, a câmara de Ussing. Em conclusão, o grupo mostrou que os coeficientes de permeabilidade aparente das células Caco-2 possuem valores consideravelmente equivalentes quando comparados à permeabilidade na porção jejunal do epitélio intestinal de ratos. Além disso, também demonstraram que em altas concentrações ($\geq 10\text{mM}$) dos dendrímeros

PAMAM G3.5 e G4 há um impacto negativo na morfologia da mucosa jejunal e do cólon, indicando doses excessivas na administração oral *in vivo*.

Quanto à análise comparativa e crítica das limitações e vantagens das técnicas disponíveis para a determinação da permeabilidade (Tabela 2), espera-se que metodologias não baseadas no uso de animais sejam cada vez mais utilizadas na síntese de dendrímeros PAMAM como tecnologias de carreadores de fármacos. O modelo *in vitro* PAMPA se destaca por ser uma técnica simples, rápida, de baixo custo e capaz de fornecer resultados conclusivos.

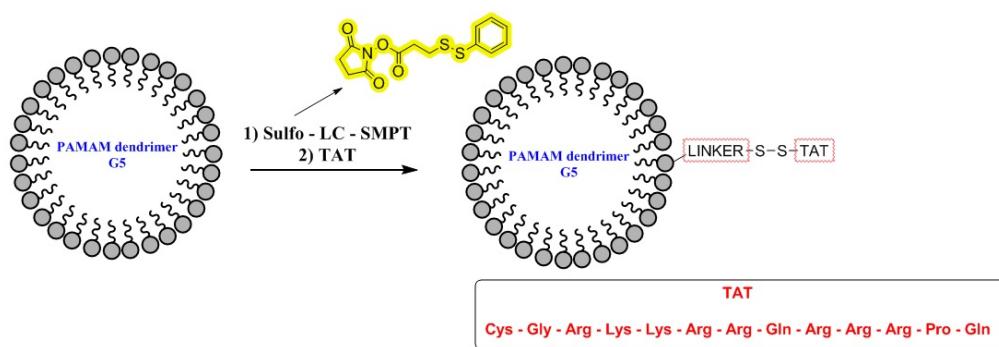


Figura 5. Desenvolvimento do conjugado de dendrímero PAMAM G5-TAT.

Nesse sentido, percebe-se que apenas o grupo de Bahadoran *et al.* (2016) utilizou um modelo de permeação livre de células, neste caso o Skin-PAMPA. A técnica utilizada no experimento tem alta capacidade de rastreamento, fácil reproduzibilidade e baixo custo (Tabela 2). Os resultados obtidos pelo grupo revelaram que o dendrímero PAMAM modificado com peptídeo TAT (Figura 5) é mais eficaz na progressão do plasmídeo de DNA através da membrana artificial, isso pode ser um indicativo de uma captação celular mais facilitada dos poliplexos de pDNA após a inserção do peptídeo TAT no vetor polimérico e deve ser capaz de servir como um método não invasivo para penetrar o plasmídeo de DNA através da pele. Isso demonstra que o PAMPA se apresenta como uma importante ferramenta na avaliação da permeabilidade para a descoberta de novas tecnologias de sistemas de liberação de fármacos, como os dendrímeros de PAMAM.

Conclusão

Nosso estudo mostra que, embora a solubilidade, a permeabilidade e a influência do pH na formulação sejam fundamentais para a compreensão do comportamento de transporte do fármaco-dendrímero no organismo, há poucos estudos que avaliam essas propriedades simultaneamente. Portanto, identifica-se a necessidade de reforçar junto à comunidade científica a importância da realização de estudos de propriedades biofarmacêuticas ao sintetizar novas formulações de dendrimeros de PAMAM. Isto também deve estar associado a uma maior compreensão das limitações e vantagens de cada metodologia disponível, escolhendo a mais adequada a cada situação.

Embora os resultados desta revisão crítica sejam dignos de consideração, as diversas limitações metodológicas dos estudos elegíveis não podem ser negligenciadas. As limitações observadas nesses estudos incluíram a falha em avaliar as propriedades biofarmacêuticas seguindo as metodologias preconizadas pela maioria das agências regulatórias e o Sistema de Classificação Biofarmacêutica já bem estabelecido, descrições insatisfatórias do efeito do pH nas formulações e o uso de meios não fisiológicos inadequados para caracterização da solubilidade. O desenvolvimento de protocolos padronizados e melhores estudos descritivos são necessários para avaliar adequadamente a associação entre o desenvolvimento de conjugados dendrímero-fármaco e o aprimoramento das propriedades biofarmacêuticas.

Referências

ABBASI, E.; AVAL, SF; AKBARZADEH, A.; MILANI, M.; NASRABADI, HT; JOO, SW; HANIFEHPOUR, Y.; NEJATI-KOSHKI, K.; PASHAEI-ASL, R. Dendrimers: Synthesis, applications, and properties. **Nanoscale Research Letters**, [s/], v. 9, n. 1, pág. 1–10, 2014.

ABUHELWA, AY; WILLIAMS, DB; UPTON, RN; FOSTER, DJR Food, gastrointestinal pH, and models of oral drug absorption. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s/], v. 112, p. 234–248, 2017.

ALEJANDRO, RP; ISABEL, LA; MIGUEL, OA; MATILDE, MS; MARTA, G. Á.; ISABEL, G. Á.; MARIVAL, B. Comparison of segmental-dependent permeability in human and in situ perfusion model in rat. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s/], v. 107, p. 191–196, 2017.

AMIDON; LENNERNÄS; SHAH; CRISON. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical research**, [s/], v. 12, n. 3, pág. 413–420, 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7617530/>. Acesso em: 1 ago. 2021.

ANTUNES, F.; ANDRADE, F.; ARAÚJO, F.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B. Establishment of a triple co-culture in vitro cell models to study intestinal absorption of peptide drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s/], v. 83, n. 3, pág. 427–435, 2013.

AVDEEF, A. Absorption and drug development : solubility, permeability, and charge state. [s/], p. 698, 2012.

BABADI, D.; DADASHZADEH, S.; OSOULI, M.; ABBASIAN, Z.; DARYABARI, MS; SADRAI, S.; HAERI, A. Biopharmaceutical and pharmacokinetic aspects of nanocarrier-mediated oral delivery of poorly soluble drugs. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s/], v. 62, p. 102324, 2021.

BAHADORAN, A.; MOEINI, H.; BEJO, MH; HUSSEIN, MZ; OMAR, AR Development of tat-conjugated dendrimer for transdermal DNA vaccine delivery. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, [s/], v. 19, n. 3, pág. 325–

338, 2016.

BALIMANE; CHONG, S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. **Drug discovery today**, [s/], v. 10, n. 5, p. 335–343, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15749282/>. Acesso em: 1 ago. 2021.

BALIMANE, P.; CHONG, S.; MORRISON, R. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, [s/], v. 44, n. 1, pág. 301–312, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11274897/>. Acesso em: 13 ago. 2021.

BALIMANE, P.; HAN, Y.; CHONG, S. Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction. **The AAPS journal**, [s/], v. 8, n. 1, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16584115/>. Acesso em: 1 ago. 2021.

BERBEN, P.; BAUER-BRANDL, A.; BRANDL, M.; FALLER, B.; FLATEN, GE; JACOBSEN, AC; BROUWERS, J.; AUGUSTIJNS, P. Drug permeability profiling using cell-free permeation tools: Overview and applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s/], v. 119, p. 219–233, 2018.

BERGSTRÖM, C. In silico predictions of drug solubility and permeability: two rate-limiting barriers to oral drug absorption. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, [s/], v. 96, n. 3, pág. 156–161, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15733209/>. Acesso em: 31 ago. 2021.

BOHETS, H.; ANNAERT, P.; MANNENS, G.; VAN BEIJSTERVELDT, L.; ANCIAUX, K.; VERBOVEN, P.; MEULDERMANS, W.; LAVRIJSEN, K. Strategies for absorption screening in drug discovery and development. **Current topics in medicinal chemistry**, [s/], v. 1, n. 5, p. 367–383, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11899103/>. Acesso em: 1 ago. 2021.

BUCKLEY, ST; FISCHER, SM; FRICKER, G.; BRANDL, M. In vitro models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: Challenges and perspectives. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s/], v. 45, n. 3, pág. 235–250, 2012.

CALDEIRA, TG; SAÚDE-GUIMARÃES, DA; DEZANI, AB; SERRA, CH dos R.; DE SOUZA, J. In silico and in vitro prediction of gastrointestinal absorption from potential drug eremantholide C. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s/], v. 69, n. 11, p. 1468–1476, 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/jpp/article/69/11/1468/6127838>. Acesso em: 13 ago. 2021.

CAO, J.; WANG, C.; GUO, L.; XIAO, Z.; LIU, K.; YAN, H. Co-administration of a charge-conversional dendrimer enhances antitumor efficacy of conventional chemotherapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s/], v. 127, p. 371–377, 2018.

CAZARIN, KCC; CORRÊA, CL; DUQUE ZAMBRONE, FA Reduction, refinement and replacement of animal use in toxicity testing: An overview. **Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s/], v. 40, n. 3, pág. 289–299, 2004.

CHAUHAN, AS Dendrimers for Drug Delivery. **Molecules**, [s/], v. 23, n. 4, 2018.

COLTESCU, AR; BUTNARIU, M.; SARAC, I. The importance of solubility for new drug molecules. **Biomedical and Pharmacology Journal**, [s/], v. 13, n. 2, pág. 577–583, 2020.

CONNELL, JJ; SUGIHARA, Y.; TÖRÖK, S.; DÖME, B.; TÓVÁRI, J.; FEHNIGER, TE; MARKO-VARGA, G.; VÉGVÁRI, Á. Localization of sunitinib in in vivo animal and in vitro experimental models by MALDI mass spectrometry imaging. **Analytical and Bioanalytical Chemistry 2014 407:8**, [s/], v. 407, n. 8, pág. 2245–2253, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-014-8350-2>. Acesso em: 13 ago. 2021.

COOK, T.; SHENOY, S. Intestinal permeability of chlorpyrifos using the single-pass intestinal perfusion method in the rat. **Toxicology**, [s/], v. 184, n. 2–3, p. 125–133, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12499115/>. Acesso em: 13 ago. 2021.

DA SILVA SANTOS, S.; FERREIRA, EI; GIAROLLA, J. Dendrimer prodrugs.

Molecules, [s/], v. 21, n. 6, 2016.

DAHAN, A.; MILLER, JM The solubility-permeability interplay and its implications in formulation design and development for poorly soluble drugs. **The AAPS journal**, [s/], v. 14, n. 2, pág. 244–251, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22391790/>. Acesso em: 13 ago. 2021.

DAHAN, A.; MILLER, JM; HOFFMAN, A.; AMIDON, GE; AMIDON, GL The solubility–permeability interplay in using cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers: Mechanistic modeling and application to progesterone. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s/], v. 99, n. 6, p. 2739–2749, 2010. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jps.22033>. Acesso em: 13 ago. 2021.

DE ARAÚJO, RV; DA SILVA SANTOS, S.; FERREIRA, EI; GIAROLLA, J. New advances in general biomedical applications of PAMAM dendrimers. **Molecules**, [s/], v. 23, n. 11, 2018.

DEFERME, S.; ANNAERT, P.; AUGUSTIJNS, P. In Vitro Screening Models to Assess Intestinal Drug Absorption and Metabolism. **Drug Absorption Studies**, [s/], p. 182–215, 2007.

DEZANI, TM; DEZANI, AB; DE SILVA, MMC; DOS REIS SERRA, CH In Situ Intestinal Perfusion in Rodents: Future Perspectives for Application on Absorption Studies and Classification of Drugs. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [s/], v. 17, n. 9, p. 746–757, 2017.

DEZANI, AB; PEREIRA, TM; CAFFARO, AM; REIS, JM; SERRA, CH dos R. Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different ex vivo method in Franz cells. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, [s/], v. 67, n. 3, pág. 194–202, 2013.

DI, L.; KERNS, EH Prodrugs. **Drug-Like Properties**, [s/], p. 471–485, 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128010761000393>. Acesso em: 1 ago. 2021.

DIAS, AP; DA SILVA SANTOS, S.; DA SILVA, JV; PARISE-FILHO, R.; IGNE FERREIRA, E.; SEOUD, O. EI; GIAROLLA, J. Dendrimers in the context of

nanomedicine. **International journal of pharmaceutics**, [s/], v. 573, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31759101/>. Acesso em: 21 dez. 2021.

DOKE, SK; DHAWALE, SC Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s/], v. 23, n. 3, pág. 223–229, 2015.

FAGERHOLM, U.; SPJUTH, O.; HELLBERG, S. Comparison between lab variability and in silico prediction errors for the unbound fraction of drugs in human plasma. **Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems**, [s/], p. 1–6, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34346291/>. Acesso em: 13 ago. 2021.

FALCONIERI, MC; ADAMO, M.; MONASTEROLO, C.; BERGONZI, MC; CORONNELLO, M.; BILIA, AR New Dendrimer-Based Nanoparticles Enhance Curcumin Solubility. **Planta Medica**, [s/], v. 83, n. 5, p. 420–425, 2017.

FAN, Y.; SUN, W.; SHI, X. Design and Biomedical Applications of Poly(amidoamine)-Dendrimer-Based Hybrid Nanoarchitectures. **Small Methods**, [s/], v. 1, n. 12, 2017.

FDA. **FDA Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System - ECA Academy**. [S. l.: sn], 2017. Disponível em: <https://www.gmp-compliance.org/guidelines/gmp-guideline/fda-guidance-for-industry-waiver-of-in-vivo-bioavailability-and-bioequivalence-studies-for-immediate-release-solid-oral-dosage-f>. Acesso em: 1 ago. 2021.

FDA. **M9 Biopharmaceutics Classification System- Based Biowaivers**. [S. l.: sn], 2021. Disponível em: <https://www.gmp-compliance.org/guidelines/gmp-guideline/fda-guidance-for-industry-bioavailability-and-bioequivalence-studies-for-orally-administered-drug-products-general-consideration>. Acesso em: 1 ago. 2021.

FOX, LJ; RICHARDSON, RM; BRISCOE, WH PAMAM dendrimer - cell membrane interactions. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s/], v. 257, p. 1–18, 2018.

FRÖHLICH, E.; SALAR-BEHZADI, S. Toxicological assessment of inhaled

nanoparticles: Role of in vivo, ex vivo, in vitro, and in Silico Studies. **International Journal of Molecular Sciences**, [s/], v. 15, n. 3, pág. 4795–4822, 2014.

GALIPEAU, HJ; VERDU, EF The complex task of measuring intestinal permeability in basic and clinical science. **Neurogastroenterology & Motility**, [s/], v. 28, n. 7, p. 957–965, 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/nmo.12871>. Acesso em: 31 ago. 2021.

GAO, Y.; WANG, J.; CHAI, M.; LI, X.; DENG, Y.; JIN, Q.; JI, J. Size and Charge Adaptive Clustered Nanoparticles Targeting the Biofilm Microenvironment for Chronic Lung Infection Management. **ACS Nano**, [s/], v. 14, n. 5, p. 5686–5699, 2020.

GHOSH, Shatadal; GHOSH, Sumit; SIL, PC Role of nanostructures in improvising oral medicine. **Toxicology Reports**, [s/], v. 6, p. 358–368, 2019.

GLISZCZYŃSKA, A.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, E. Dexibuprofen therapeutic advances: Prodrugs and nanotechnological formulations. **Pharmaceutics**, [s/], v. 13, n. 3, 2021.

GREENWOOD-VAN MEERVELD, B.; JOHNSON, AC; GRUNDY, D. Gastrointestinal physiology and function. **Handbook of Experimental Pharmacology**, [s/], v. 239, 2017.

GUERREIRO-TANOMARU, JM; CHÁVEZ-ANDRADE, GM; FARIA-JÚNIOR, NB de; WATANABE, E.; TANOMARU-FILHO, M. Effect of Passive Ultrasonic Irrigation on Enterococcus faecalis from Root Canals: An Ex Vivo Study. **Brazilian Dental Journal**, [s/], v. 26, n. 4, pág. 342–346, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/bdj/a/FPnNQGQwSh3QBcQ4h33xwL/?format=html>. Acesso em: 13 ago. 2021.

HAN, S.; ZHENG, H.; LU, Y.; SUN, Y.; HUANG, A.; FEI, W.; SHI, X.; XU, X.; LI, J.; LI, F. A novel synergetic targeting strategy for glioma therapy employing borneol combination with angiopep-2-modified, DOX-loaded PAMAM dendrimer. **Journal of Drug Targeting**, [s/], v. 26, n. 1, pág. 86–94, 2018.

HELLRIEGEL; BJORNSSON; HAUCK. Interpatient variability in bioavailability is related to the extent of absorption: implications for bioavailability

and bioequivalence studies. **Clinical pharmacology and therapeutics**, [s/], v. 60, n. 6, p. 601–607, 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8988062/>. Acesso em: 13 ago. 2021.

HILLAIREAU, H.; COUVREUR, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, [s/], v. 66, n. 17, p. 2873–2896, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19499185/>. Acesso em: 16 abr. 2022.

HOSHYAR; GRAY; HAN; BAO. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. **Nanomedicine (London, England)**, [s/], v. 11, n. 6, p. 673–692, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27003448/>. Acesso em: 1 ago. 2021.

HUBBARD, D.; BOND, T.; GHANDEHARI, H. Regional Morphology and Transport of PAMAM Dendrimers Across Isolated Rat Intestinal Tissue. **Macromolecular Bioscience**, [s/], v. 15, n. 12, p. 1735–1743, 2015.

JAIN, NK; GUPTA, U. Application of dendrimer-drug complexation in the enhancement of drug solubility and bioavailability. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, [s/], v. 4, n. 8, pág. 1035–1052, 2008a.

JAIN, NK; GUPTA, U. Application of dendrimer-drug complexation in the enhancement of drug solubility and bioavailability. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, [s/], v. 4, n. 8, pág. 1035–1052, 2008b.

JEVPRASESPHANT, R.; PENNY, J.; ATTWOOD, D.; MCKEOWN, NB; D'EMANUELE, A. Engineering of dendrimer surfaces to enhance transepithelial transport and reduce cytotoxicity. **Pharmaceutical research**, [s/], v. 20, n. 10, p. 1543–1550, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14620505/>. Acesso em: 14 nov. 2021.

KALHAPURE; KATHIRAVAN; AKAMANCHI; GOVENDER. Dendrimers - from organic synthesis to pharmaceutical applications: an update. **Pharmaceutical development and technology**, [s/], v. 20, n. 1, pág. 22–40, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24299011/>. Acesso em: 14 ago. 2021.

KALYANE, D.; RAVAL, N.; MAHESHWARI, R.; TAMBE, V.; KALIA, K.; TEKADE, RK Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR):

Nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer. **Materials Science and Engineering C**, [s/], v. 98, p. 1252–1276, 2019.

KANSY; SENNER; GUBERNATOR. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. **Journal of medicinal chemistry**, [s/], v. 41, n. 7, p. 1007–1010, 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9544199/>. Acesso em: 1 ago. 2021.

KIM, J. S.; CHOI, Y. J.; WOO, M. R.; CHEON, S.; JI, S. H.; IM, D.; UD DIN, F.; KIM, J. O.; YOUN, Y. S.; OH, K. T.; LIM, S. J.; JIN, S. G.; CHOI, H. G. New potential application of hydroxypropyl- β -cyclodextrin in solid self-nanoemulsifying drug delivery system and solid dispersion. **Carbohydrate polymers**, [s. l.], v. 271, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34364573/>. Acesso em: 6 maio 2022.

KIM, HJ; TAKEMOTO, H.; YI, Y.; ZHENG, M.; MAEDA, Y.; CHAYA, H.; HAYASHI, K.; MI, P.; PITTELLA, F.; CHRISTIE, RJ; TOH, K.; MATSUMOTO, Y.; NISHIYAMA, N.; MIYATA, K.; KATAOKA, K. Precise engineering of siRNA delivery vehicles to tumors using polyion complexes and gold nanoparticles. **ACS Nano**, [s/], v. 8, n. 9, p. 8979–8991, 2014. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/nn502125h>. Acesso em: 14 nov. 2021.

KITCHENS, K.; FORAKER, A.; KOLHATKAR, R.; SWAAN, P.; GHANDEHARI, H. Endocytosis and interaction of poly (amidoamine) dendrimers with Caco-2 cells. **Pharmaceutical research**, [s/], v. 24, n. 11, p. 2138–2145, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17701324/>. Acesso em: 16 abr. 2022.

KITCHENS, K.; KOLHATKAR, R.; SWAAN, P.; GHANDEHARI, H. Endocytosis inhibitors prevent poly(amidoamine) dendrimer internalization and permeability across Caco-2 cells. **Molecular pharmaceutics**, [s/], v. 5, n. 2, pág. 364–369, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18173246/>. Acesso em: 16 abr. 2022.

KU, MS Use of the biopharmaceutical classification system in early drug development. **AAPS Journal**, [s/], v. 10, n. 1, pág. 208–212, 2008.

LAI, S.; WEI, Y.; WU, Q.; ZHOU, K.; LIU, T.; ZHANG, Y.; JIANG, N.; XIAO, W.; CHEN, J.; LIU, Q.; YU, Y. Liposomes for effective drug delivery to the ocular posterior chamber. **Journal of Nanobiotechnology**, [s/l], v. 17, n. 1, 2019.

LEE, MH; TA, GH; WENG, CF; LEONG, MK In silico prediction of intestinal permeability by hierarchical support vector regression. **International Journal of Molecular Sciences**, [s/l], v. 21, n. 10, 2020.

LEIBEL; ROSENBAUM; HIRSCH. Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. **The New England journal of medicine**, [s/l], v. 332, n. 10, p. 621–628, 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7632212/>. Acesso em: 13 ago. 2021.

LENNERNÄS, H. Animal data: the contributions of the Ussing Chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery in vivo. **Advanced drug delivery reviews**, [s/l], v. 59, n. 11, p. 1103–1120, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17900749/>. Acesso em: 1 ago. 2021.

LENNERNÄS, H.; ABRAHAMSSON, B. The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension†. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s/l], v. 57, n. 3, pág. 273–285, 2010.

LI, HJ; DU, JZ; LIU, J.; DU, XJ; SHEN, S.; ZHU, YH; WANG, X.; YE, X.; NIE, S.; WANG, J. Smart Superstructures with Ultrahigh pH-Sensitivity for Targeting Acidic Tumor Microenvironment: Instantaneous Size Switching and Improved Tumor Penetration. **ACS Nano**, [s/l], v. 10, n. 7, p. 6753–6761, 2016.

LI, J.; LIANG, H.; LIU, J.; WANG, Z. Poly (amidoamine) (PAMAM) dendrimer mediated delivery of drug and pDNA/siRNA for cancer therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, [s/l], v. 546, n. 1–2, p. 215–225, 2018.

LI; WU, J.; LI, H.; JIANG, Z.; ZHOU, X.; XU, C.; DING, N.; ZHA, J.; HE, W. In Vitro and In Vivo Approaches to Determine Intestinal Epithelial Cell Permeability. **Journal of visualized experiments : JoVE**, [s/l], n. 140, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30394372/>. Acesso em: 31 ago. 2021.

LIKÓ, F.; HINDRÉ, F.; FERNANDEZ-MEGIA, E. Dendrimers as Innovative Radiopharmaceuticals in Cancer Radionanotherapy. **Biomacromolecules**, [s/l], v.

17, n. 10, p. 3103–3114, 2016.

LU, J.; LI, Nannan; GAO, Y.; LI, Nan; GUO, Y.; LIU, H.; CHEN, X.; ZHU, C.; DONG, Z.; YAMAMOTO, A. The Effect of Absorption-Enhancement and the Mechanism of the PAMAM Dendrimer on Poorly Absorbable Drugs. **Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, [s/], v. 23, n. 8, 2018. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6222674/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6222674/). Acesso em: 16 abr. 2022.

M. REIS, J.; SINKO, B.; HR SERRA, C. Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) - Is it Better than Caco-2 for Human Passive Permeability Prediction?. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [s/], v. 10, n. 11, p. 1071–1076, 2012.

MA, Q.; HAN, Y.; CHEN, C.; CAO, Y.; WANG, S.; SHEN, W.; ZHANG, H.; LI, Y.; VAN DONGEN, MA; HE, B.; YU, M.; XU, L.; BANASZAK HOLL, MM; LIU, G.; ZHANG, Q.; QI, R. Oral Absorption Enhancement of Probucol by PEGylated G5 PAMAM Dendrimer Modified Nanoliposomes. **Molecular Pharmaceutics**, [s/], v. 12, n. 3, pág. 665–674, 2015.

MARIYAM, M.; GHOSAL, K.; THOMAS, S.; KALARIKKAL, N.; LATHA, MS Dendrimers: General Aspects, Applications and Structural Exploitations as Prodrug/Drug-delivery Vehicles in Current Medicine. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [s/], v. 18, n. 5, p. 439–457, 2017.

MARTINEZ, M.; AMIDON, G. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. **Journal of clinical pharmacology**, [s/], v. 42, n. 6, p. 620–643, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12043951/>. Acesso em: 1 ago. 2021.

MARTINHO, N.; FLORINDO, H.; SILVA, L.; BROCCINI, S.; ZLOH, M.; BARATA, T. Molecular Modeling to Study Dendrimers for Biomedical Applications. **Molecules 2014, Vol. 19, Pages 20424-20467**, [s/], v. 19, n. 12, p. 20424–20467, 2014. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/19/12/20424/htm>. Acesso em: 14 nov. 2021.

MARTINS, T.; BAPTISTA, S.; GONÇALVES, J.; LEAL, E.; MILHAZES, N.; BORGES, F.; RIBEIRO, CF; QUINTELA, O.; LENDOIRO, E.; LÓPEZ-RIVADULLA, M.; AMBRÓSIO, AF; SILVA, AP Methamphetamine transiently increases the

blood-brain barrier permeability in the hippocampus: Role of tight junction proteins and matrix metalloproteinase-9. **Brain Research**, [s/], v. 1411, p. 28–40, 2011.

MELO, KJC; HENOSTROZA, MAB; LÖBENBERG, R.; BOU-CHACRA, NA
Rifampicin nanocrystals: Towards an innovative approach to treat tuberculosis.
Materials Science and Engineering C, [s/], v. 112, 2020.

MIGNANI, S.; RODRIGUES, J.; ROY, R.; SHI, X.; CEÑA, V.; EL KAZZOULI,
S.; MAJORAL, JP Exploration of biomedical dendrimer space based on in-vivo
physicochemical parameters: Key factor analysis (Part 2). **Drug Discovery Today**,
[s/], v. 24, n. 5, p. 1184–1192, 2019.

MITTAL, P.; SAHARAN, A.; VERMA, R.; ALTALBAWY, FMA; ALFAIDI, MA;
BATIHA, GES; AKTER, W.; GAUTAM, RK; UDDIN, MS; RAHMAN, MS
Dendrimers: A New Race of Pharmaceutical Nanocarriers. **BioMed Research International**, [s/], v. 2021, 2021.

NAJLAH, M.; FREEMAN, S.; KHODER, M.; ATTWOOD, D.; D'EMANUELE,
A. In vitro evaluation of third generation PAMAM dendrimer conjugates.
Molecules, [s/], v. 22, n. 10, 2017.

NEUMANN, RF; BARSI-ANDREETA, M.; LUCAS-OLIVEIRA, E.;
BARBALHO, H.; TREVIZAN, WA; BONAGAMBA, TJ; STEINER, MB High
accuracy capillary network representation in digital rock reveals permeability
scaling functions. **Scientific Reports 2021 11:1**, [s/], v. 11, n. 1, pág. 1–8, 2021.
Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-90090-0>. Acesso em:
13 ago. 2021.

NEWBY, D.; FREITAS, A.; GHAFOURIAN, T. Decision trees to characterise
the roles of permeability and solubility on the prediction of oral absorption.
European journal of medicinal chemistry, [s/], v. 90, p. 751–765, 2015.
Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25528330/>. Acesso em: 14 ago.
2021.

O'DRISCOLL, C.; GRIFFIN, C. Biopharmaceutical challenges associated
with drugs with low aqueous solubility--the potential impact of lipid-based
formulations. **Advanced drug delivery reviews**, [s/], v. 60, n. 6, p. 617–624, 2008.
Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18155800/>. Acesso em: 13 ago.

2021.

OMAR, MM; HASAN, OA; EL SISI, AM Preparation and optimization of lidocaine transfersosomal gel containing permeation enhancers: A promising approach for enhancement of skin permeation. **International Journal of Nanomedicine**, [s/], v. 14, p. 1551–1562, 2019.

PAPICH, M.; MARTINEZ, M. Applying Biopharmaceutical Classification System (BCS) Criteria to Predict Oral Absorption of Drugs in Dogs: Challenges and Pitfalls. **The AAPS journal**, [s/], v. 17, n. 4, pág. 948–964, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25916691/>. Acesso em: 13 ago. 2021.

PENTEK, T.; NEWENHOUSE, E.; O'BRIEN, B.; SINGH CHAUHAN, A. Development of a Topical Resveratrol Formulation for Commercial Applications Using Dendrimer Nanotechnology. **Molecules**, [s/], v. 22, n. 1, 2017.

PERUMAL, O.; INAPAGOLLA, R.; KANNAN, S.; KANNAN, R. The effect of surface functionality on cellular trafficking of dendrimers. **Biomaterials**, [s/], v. 29, n. 24–25, p. 3469–3476, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18501424/>. Acesso em: 16 abr. 2022.

POOJA, D.; KULHARI, H.; SINGH, MK; MUKHERJEE, S.; RACHAMALLA, SS; SISTLA, R. Dendrimer-TPGS mixed micelles for enhanced solubility and cellular toxicity of taxanes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s/], v. 121, p. 461–468, 2014.

PRADHAN, D.; TAMBE, V.; RAVAL, N.; GONDALIA, P.; BHATTACHARYA, P.; KALIA, K.; TEKADE, RK Dendrimer grafted albumin nanoparticles for the treatment of post cerebral stroke damages: A proof of concept study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s/], v. 184, 2019.

PRETORIUS, E.; BOUC, P. Permeation of four oral drugs through human intestinal mucosa. **AAPS PharmSciTech**, [s/], v. 10, n. 1, pág. 270–275, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19280345/>. Acesso em: 13 ago. 2021.

QI, R.; LI, YZ; CHEN, C.; CAO, YN; YU, MM; XU, L.; HE, B.; JIE, X.; SHEN, WW; WANG, YN; VAN DONGEN, MA; LIU, GQ; BANASZAK HOLL, MM; ZHANG, Q.; KE, X. G5-PEG PAMAM dendrimer incorporating nanostructured lipid carriers

enhance oral bioavailability and plasma lipid-lowering effect of probucol. **Journal of Controlled Release**, [s/], v. 210, p. 160–168, 2015.

QI, R.; ZHANG, H.; XU, L.; SHEN, W.; CHEN, C.; WANG, C.; CAO, Y.; WANG, Y.; VAN DONGEN, MA; HE, B.; WANG, S.; LIU, G.; BANASZAK HOLL, MM; ZHANG, Q. G5 PAMAM dendrimer versus liposome: A comparison study on the in vitro transepithelial transport and in vivo oral absorption of simvastatin. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, [s/], v. 11, n. 5, p. 1141–1151, 2015.

QIU, X.; CAO, K.; LIN, T.; CHEN, W.; YUAN, A.; WU, J.; HU, Y.; GUO, H. Drug delivery system based on dendritic nanoparticles for enhancement of intravesical instillation. **International Journal of Nanomedicine**, [s/], v. 12, p. 7365, 2017. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5644558/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5644558/). Acesso em: 14 ago. 2021.

RAUTIO, J.; KÄRKÄINEN, J.; SLOAN, KB Prodrugs – Recent approvals and a glimpse of the pipeline. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s/], v. 109, p. 146–161, 2017.

RAUTIO, J.; MEANWELL, NA; DI, L.; HAGEMAN, MJ The expanding role of prodrugs in contemporary drug design and development. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s/], v. 17, n. 8, pág. 559–587, 2018.

RAVINDRAN, S.; SUTHAR, JK; ROKADE, R.; DESHPANDE, P.; SINGH, P.; PRATINIDHI, A.; KHAMBADKHAR, R.; UTEKAR, S. Pharmacokinetics, Metabolism, Distribution and Permeability of Nanomedicine. **Current Drug Metabolism**, [s/], v. 19, 2018.

RAVINDRAN, S.; TAMBE, AJ; SUTHAR, JK; CHAHAR, DS; FERNANDES, JM; DESAI, V. Nanomedicine: Bioavailability, Biotransformation and Biokinetics. **Current Drug Metabolism**, [s/], v. 20, n. 7, p. 542–555, 2019.

RUSSELL; BURCH. **The Principles of Humane Experimental Technique**. [S. l.: sn], 1959. Disponível em: <https://caat.jhsph.edu/principles/the-principles-of-humane-experimental-technique>. Acesso em: 1 ago. 2021.

RUSSIER, J.; GRILLAUD, M.; BIANCO, A. Elucidation of the Cellular Uptake Mechanisms of Polycationic HYDRAmers. **Bioconjugate Chemistry**, [s/],

v. 26, n. 8, pág. 1484–1493, 2015. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.bioconjchem.5b00270>. Acesso em: 16 abr. 2022.

SAEIDNIA, S.; MANAYI, A.; ABDOLLAHI, M. The pros and cons of the in-silico pharmaco-toxicology in drug discovery and development. **International Journal of Pharmacology**, [s/], v. 9, n. 3, pág. 176–181, 2013.

SANCHES, BMA; FERREIRA, EI Is prodrug design an approach to increase water solubility?. **International Journal of Pharmaceutics**, [s/], v. 568, 2019.

SANTOS, A.; VEIGA, F.; FIGUEIRAS, A. Dendrimers as pharmaceutical excipients: Synthesis, properties, toxicity and biomedical applications. **Materials**, [s/], v. 13, n. 1, pág. 65, 2020.

SATHE, R.; BHARATAM, P. Drug-dendrimer complexes and conjugates: Detailed furtherance through theory and experiments. **Advances in colloid and interface science**, [s/], v. 303, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35339862/>. Acesso em: 18 abr. 2022.

SAVJANI, KT; GAJJAR, AK; SAVJANI, JK Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. **ISRN Pharmaceutics**, [s/], v. 2012, p. 1–10, 2012.

SHARGEL, L.; YU, A.; CALVIN SUN, C. Biopharmaceutical Aspects of the Active Pharmaceutical Ingredient and Pharmaceutical Equivalence. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**, [s/], 2016.

SHI, Y.; YE, F.; LU, K.; HUI, Q.; MIAO, M. Characterizations and Bioavailability of Dendrimer-like Glucan Nanoparticulate System Containing Resveratrol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s/], v. 68, n. 23, p. 6420–6429, 2020.

TEKSIN, ZS; SEO, PR; POLLI, JE Comparison of Drug Permeabilities and BCS Classification: Three Lipid-Component PAMPA System Method versus Caco-2 Monolayers. **The AAPS Journal**, [s/], v. 12, n. 2, pág. 238, 2010. Disponível em: [/pmc/articles/PMC2844511/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2844511/). Acesso em: 13 dez. 2021.

TOMALIA, DA; 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 1985 17:1**, [s/], v. 17, n. 1, pág. 117–

132, 1985. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/pj198510>. Acesso em: 1 ago. 2021.

TRAPANI, G.; FRANCO, M.; TRAPANI, A.; LOPEDOTA, A.; LATROFA, A.; GALLUCCI, E.; MICELLI, S.; LISO, G. Frog intestinal sac: A new in vitro method for the assessment of intestinal permeability. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s/], v. 93, n. 12, p. 2909–2919, 2004. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jps.20180>. Acesso em: 13 ago. 2021.

TUKKER. In vitro methods for the assessment of permeability. **CRC Press**, [s/], p. 51–72, 2000. Disponível em: [http://library.navoiy-uni.uz/files/dressman_jb - oral drug absorption, vol. 106 \(1st edition\)\(2000\)\(330s\).pdf#page=66](http://library.navoiy-uni.uz/files/dressman_jb - oral drug absorption, vol. 106 (1st edition)(2000)(330s).pdf#page=66). Acesso em: 13 ago. 2021.

VESELI, A.; ŽAKELJ, S.; KRISTL, A. A review of methods for solubility determination in biopharmaceutical drug characterization. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [s/], v. 45, n. 11, p. 1717–1724, 2019.

VIDAL, F.; VÁSQUEZ, P.; CAYUMÁN, FR; DÍAZ, C.; FUENTEALBA, J.; AGUAYO, LG; YÉVENES, GE; ALDERETE, J.; GUZMÁN, L. Prevention of synaptic alterations and neurotoxic effects of PAMAM dendrimers by surface functionalization. **Nanomaterials**, [s/], v. 8, n. 1, 2018.

VOLPE, DA Application of method suitability for drug permeability classification. **The AAPS journal**, [s/], v. 12, n. 4, pág. 670–678, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20811966/>. Acesso em: 1 ago. 2021.

WALTHER, R.; RAUTIO, J.; ZELIKIN, AN Prodrugs in medicinal chemistry and enzyme prodrug therapies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s/], v. 118, p. 65–77, 2017.

WANG, J.; WILLIAMSON, GS; LANCINA, MG; YANG, H. Mildly cross-linked dendrimer hydrogel prepared via aza-michael addition reaction for topical brimonidine delivery. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, [s/], v. 13, n. 9, p. 1089–1096, 2017.

WEN, Y.; YAO, F.; SUN, F.; TAN, Z.; TIAN, L.; XIE, L.; SONG, Q. Antibacterial action mode of quaternized carboxymethyl chitosan/poly(amidoamine)

dendrimer core-shell nanoparticles against Escherichia coli correlated with molecular chain conformation. **Materials Science and Engineering C**, [s/], v. 48, p. 220–227, 2015.

WHO. Protocol to conduct equilibrium solubility experiment for the purpose of biopharmaceutics classification system-based classification of active pharmaceutical ingredients for biowavier. **World Health Organization**, [s/], n. July, p. 1–22, 2018. Disponível em: http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/guidelines/en/. Acesso em: 15 dez. 2021.

XU, X.; LI, J.; HAN, S.; TAO, C.; FANG, L.; SUN, Y.; ZHU, J.; LIANG, Z.; LI, F. A novel doxorubicin loaded folic acid conjugated PAMAM modified with borneol, a nature dual-functional product of reducing PAMAM toxicity and boosting BBB penetration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s/], v. 88, p. 178–190, 2016.

YAMAZOE, E.; FANG, J.; TAHARA, K. Oral mucus-penetrating PEGylated liposomes to improve drug absorption: Differences in the interaction mechanisms of a mucoadhesive liposome. **International journal of pharmaceutics**, [s/], v. 593, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33290871/>. Acesso em: 14 ago. 2021.

YAN, C.; GU, J.; LV, Y.; SHI, W.; WANG, Y.; LIAO, Y.; DENG, Y. Caproyl-Modified G2 PAMAM Dendrimer (G2-AC) Nanocomplexes Increases the Pulmonary Absorption of Insulin. **AAPS PharmSciTech**, [s/], v. 20, n. 7, 2019.

YAO, H.; CHIOU, W. The complexity of intestinal absorption and exsorption of digoxin in rats. **International journal of pharmaceutics**, [s/], v. 322, n. 1–2, p. 79–86, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16781832/>. Acesso em: 13 ago. 2021.

YAVUZ, B.; PEHLIVAN, SB; VURAL, I.; ÜNLÜ, N. In Vitro/In Vivo Evaluation of Dexamethasone–PAMAM Dendrimer Complexes for Retinal Drug Delivery. **Journal of pharmaceutical sciences**, [s/], v. 104, n. 11, p. 3814–3823, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26227825/>. Acesso em: 13 dez. 2021.

YELLEPEDDI, VK; MOHAMMADPOUR, R.; KAMBHAMPATI, SP; SAYRE, C.; MISHRA, MK; KANNAN, RM; GHANDEHARI, H. Pediatric oral formulation of dendrimer-N-acetyl-L-cysteine conjugates for the treatment of neuroinflammation. **International Journal of Pharmaceutics**, [s/], v. 545, n. 1–2, p. 113–116, 2018.

YOUHANNA, S.; LAUSCHKE, VM The Past, Present and Future of Intestinal In Vitro Cell Systems for Drug Absorption Studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s/], v. 110, n. 1, pág. 50–65, 2021.

ŽAKELJ, S.; ŠTURM, K.; KRISTL, A. Ciprofloxacin permeability and its active secretion through rat small intestine in vitro. **International Journal of Pharmaceutics**, [s/], v. 313, n. 1–2, p. 175–180, 2006.

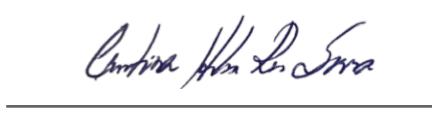
ZAWILSKA, JB; WOJCIESZAK, J.; OLEJNICZAK, AB Prodrugs: A challenge for the drug development. **Pharmacological Reports**, [s/], v. 65, n. 1, pág. 1–14, 2013.

ZENG, X.; ZHANG, Y.; NYSTRÖM, A. Endocytic uptake and intracellular trafficking of bis-MPA-based hyperbranched copolymer micelles in breast cancer cells. **Biomacromolecules**, [s/], v. 13, n. 11, p. 3814–3822, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23035906/>. Acesso em: 16 abr. 2022.

ZHU, L.; LU, L.; WANG, S.; WU, J.; SHI, J.; YAN, T.; XIE, C.; LI, Q.; HU, M.; LIU, Z. Oral absorption basics: Pathways and physicochemical and biological factors affecting absorption. **Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice: Second Edition**, [s/], p. 297–329, 2017.



Felipe Guizze de Souza



Cristina Helena dos Reis Serra