

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CIBELE RODRIGUES TOLEDO

**ÁCIDO COROSÓLICO NA OFTALMOLOGIA: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIANGIOGÊNICA, SEGURANÇA E TOXICIDADE OCULAR,
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE IMPLANTE BIODEGRADÁVEL
DE LIBERAÇÃO PROLONGADA**

Belo Horizonte - MG

2018

CIBELE RODRIGUES TOLEDO

**ÁCIDO COROSÓLICO NA OFTALMOLOGIA: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIANGIOGÊNICA, SEGURANÇA E TOXICIDADE OCULAR,
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE IMPLANTE BIODEGRADÁVEL
DE LIBERAÇÃO PROLONGADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:
Prof. Dr. Armando da Cunha Silva Júnior

Coorientador:
Dr. Vinícius Viana Pereira

Belo Horizonte - MG

2018

T649a Toledo, Cibele Rodrigues.
Ácido corosólico na oftalmologia: avaliação da atividade antiangiogênica, segurança e toxicidade ocular, desenvolvimento e caracterização de implante biodegradável de liberação prolongada / Cibele Rodrigues Toledo. – 2018.

126 f. : il.

Orientador: Armando da Cunha Silva Júnior.

Coorientador: Vinícius Viana Pereira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Retina – Vasos sanguíneos – Teses. 2. Toxicidade – Teses. 3. Implante intravítreo – Teses. 4. Angiogênese – Teses. 5. Tratamento oftalmológico – Teses. 6. Neovascularização – Teses. I. Cunha Júnior, Armando da Silva. II. Pereira, V. V. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615.4



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS




FOI.LHA DE APROVAÇÃO

ÁCIDO COROSÓLICO NA OFTALMOLOGIA: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA, SEGURANÇA E TOXICIDADE OCULAR, DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE IMPLANTE BIODEGRADÁVEL DE LIBERAÇÃO PROLONGADA

CIBELE RODRIGUES TOLEDO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Armando da Silva Cunha Júnior - Orientador
UFMG


Dr. Vinicius Viana Pereira - Coorientador
UFMG


Profa. Eltona Cassiana de Lima Gomes
UFMG


Profa. Grasiely Faria de Sousa
UFMG

Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por tantas bênçãos em minha trajetória.

Ao meu pai, Hilarino (*in memoriam*), pelo incentivo, apoio e amor incondicionais e por me ensinar a persistir em meus objetivos.

À minha mãe, Rilza, por ser uma verdadeira mestre em minha vida, pelos ensinamentos valiosos e apoio em todos os momentos.

Ao Professor Armando da Silva Cunha Júnior por ter-me acolhido em seu grupo de pesquisa, pela oportunidade de realizar este trabalho e pela contribuição em minha formação profissional.

Ao Doutor Vinícius Viana Pereira pela coorientação, confiança, apoio e contribuição na realização deste trabalho.

À FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudo e ao programa de Pós-Graduação pela oportunidade.

Aos meus queridos companheiros de laboratório pelos ensinamentos, sugestões, companheirismo, momentos de risadas, descontração, cafés e por tornarem o dia a dia mais agradável.

À Lays, Mayara, Eliza, Raquel e Marcus pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

À Kátia e Carol pela ajuda, companheirismo e pelos momentos de descontração.

Aos professores Maria Irene, Renes e Lili pelos ensinamentos.

À professora Lirlândia pela colaboração e por disponibilizar seu laboratório para a realização de alguns experimentos.

Ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos, em especial à técnica Elaine, por disponibilizar o laboratório para a realização de alguns experimentos.

À Gracielle pela colaboração e ensinamentos.

Ao Batista, Adelaide e Clarete sempre tão solícitos e dispostos a ajudar.

A todos os meus amigos que sempre me incentivaram e tranquilizaram.

Ao Departamento de Química pela doação da matéria-prima.

Aos professores e colegas do LTF e ao Marton pela colaboração.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O processo de angiogênese ocorre em situações patológicas como uma tentativa de reparo de danos teciduais, por meio da formação local de vasos sanguíneos. No entanto, em retinopatias proliferativas, a neovascularização traz efeitos que comprometem a função visual. No controle do processo de neovascularização ocular, a administração intravítrea de fármacos com propriedades antiangiogênicas ainda é preferível dentre os esquemas terapêuticos disponíveis, porém são necessárias injeções frequentes. Portanto, a busca por novas substâncias que possam ser empregadas no tratamento dessas doenças, bem como o desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada, tem sido alvo de grande interesse. Dentro desse panorama, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiangiogênica e a segurança da administração intravítrea do ácido corosólico (AC), bem como desenvolver sistemas de liberação prolongada visando ao tratamento de doenças causadoras de neovascularização da retina. A citotoxicidade do AC em linhagem celular do epitélio pigmentado da retina (ARPE-19) foi determinada para um período de 48 horas pelo método colorimétrico da sulforrodamina B, sendo observada ausência de toxicidade em concentrações inferiores a 35,5 $\mu\text{mol/L}$. A atividade antiangiogênica do AC foi avaliada em um modelo *in vivo* da membrana corioalantoica de embrião de galinha (CAM) e observou-se que concentrações entre 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$ foram capazes de inibir a neovascularização, revelando o AC como uma opção terapêutica promissora para tratamento da angiogênese patológica. Também foi realizada a administração intravítrea de AC em olhos de ratos Wistar e não foram verificados, por avaliação eletrorretinográfica e histológica, sinais de toxicidade da retina por um período de 15 dias. Dessa maneira, o AC em concentrações inferiores a 25 $\mu\text{mol/L}$ foi considerado seguro para uso oftálmico. Para contornar os inconvenientes das administrações intravítreas frequentes, foi desenvolvido um sistema de liberação prolongada biodegradável para carrear o AC. Utilizando-se o método de moldagem a quente, foram preparados implantes de PLGA 50:50 contendo 11% de AC. Foi desenvolvido e validado um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de AC nos sistemas. Os dispositivos foram caracterizados por técnicas de espectroscopia no infravermelho, análise térmica e microscopia eletrônica de varredura e verificou-se a ausência de incompatibilidades

físico-químicas e/ou interações químicas entre o polímero PLGA 50:50 e o AC. Foram conduzidos estudos de liberação *in vitro* e determinou-se a porcentagem de liberação do AC durante 8 semanas, sendo demonstrada a adequabilidade do sistema para uma liberação continuada de AC por um período de 60 dias. A biocompatibilidade preliminar dos implantes foi demonstrada pelo ensaio biológico da CAM. Portanto, a partir dos resultados obtidos, os implantes biodegradáveis contendo AC mostraram-se como uma alternativa promissora para o tratamento de doenças causadoras de neovascularização da retina.

Palavras-chave: Ácido corosólico. PLGA. Implantes biodegradáveis. Angiogênese. Neovascularização da retina.

ABSTRACT

Angiogenesis occurs in pathological conditions as an attempt to repair tissue damage through the local formation of blood vessels. However, in proliferative retinopathies, neovascularization brings effects that impair visual function. In the control of the ocular neovascularization process, the intravitreal administration of drugs with antiangiogenic properties is still preferred among the available therapeutic schemes, although frequent injections are necessary. Therefore, the search for new substances that can be used in the treatment of these diseases, as well as the development of sustained release systems, has been of great interest. Within this scenario, the objective of this study was to evaluate the antiangiogenic activity and the safety of intravitreal administration of corosolic acid (AC), and to develop sustained release systems aiming at the treatment of diseases causing retinal neovascularization. The cytotoxicity of AC in the retinal-pigmented epithelium cell line (ARPE-19) was determined for a period of 48 hours by the colorimetric method of sulforhodamine B, and no toxicity was observed at concentrations below 35,5 $\mu\text{mol/L}$. The antiangiogenic activity of AC was evaluated in an *in vivo* model of the chicken embryo chorioallantoic membrane (CAM) and it was observed that concentrations between 5 and 25 $\mu\text{mol/L}$ were able to inhibit neovascularization, revealing AC as a promising therapeutic option for the treatment of pathological angiogenesis. Intravitreal administration of AC was also performed in eyes of Wistar rats, and retinal toxicity signs for a period of 15 days were not checked by electroretinography and histological evaluation. Thus, AC at concentrations below 25 $\mu\text{mol/L}$ was considered safe for ophthalmic use. To overcome the drawbacks of frequent intravitreal administration, a biodegradable sustained release system has been developed for carrying AC. Using the hot molding technique, 50:50 PLGA implants containing 11% AC were prepared. An analytical method by high performance liquid chromatography was developed and validated for quantification of AC in the systems. The devices were characterized by infrared spectroscopy, thermal analysis and scanning electron microscopy, and it was not verified any incompatibilities and/or interactions between the PLGA 50:50 polymer and AC. *In vitro* release studies were conducted and the percentage of released AC was determined over 8 weeks, demonstrating the suitability of the system for a continued release of AC over a period of 60 days. The biocompatibility of the implants was confirmed by the CAM biological

assay. Therefore, from the obtained results, biodegradable implants containing AC have been shown as a promising alternative for the treatment of diseases causing retinal neovascularization.

Keywords: Corosolic acid. PLGA. Biodegradable implants. Angiogenesis. Retinal neovascularization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema anatômico do bulbo ocular.....	24
Figura 2: Arquitetura celular da retina.....	29
Figura 3: Vias convencionais de administração ocular de fármacos.....	30
Figura 4: Estrutura do PLGA e seus monômetros.....	35
Figura 5: DMRI forma exsudativa e seca.....	39
Figura 6: (A) Imagem do fundo de olho de um paciente com RDNP, apresentando hemorragias e exsudados. (B) Imagem do fundo de olho de um paciente com RDP, apresentando intensa neovascularização e algumas cicatrizes.....	41
Figura 7: Estrutura química do ácido corosólico.....	42
Figura 8: Esquema da placa utilizada no teste de citotoxicidade demonstrando os poços: controle, tris base e as concentrações de AC.....	49
Figura 9: Imagens sequenciais do procedimento da CAM.....	51
Figura 10: Exame de Eletroretinografia. A-Cúpula de Ganzfeld. B- Posicionamento do animal e dos eletrodos e lente.....	53
Figura 11: Viabilidade de células da linhagem ARPE-19 mediante a presença de concentrações crescentes de AC (2,5-320 $\mu\text{mol/L}$) após 48 h.....	55
Figura 12: Curva da viabilidade celular em linhagem ARPE-19 após tratamento com AC por 48 h.....	56
Figura 13: Células da linhagem ARPE-19 coradas com SRB fotografadas em aumento de 5x, em escala de 200 $\mu\text{mol/L}$. (A) Controle (sem tratamento). (B) Tratamento por 48 h com AC 20 $\mu\text{mol/L}$. (C) Tratamento por 48 h com AC 40 $\mu\text{mol/L}$. (D) Tratamento por 48 h com AC 320 $\mu\text{mol/L}$	57
Figura 14: Ensaio da membrana corioalantoica, realizado com PBS, PBS+DMSO (controles), bevacizumabe e suspensões de AC. O percentual de vasos sanguíneos dos grupos tratados foi expresso em função da porcentagem de vasos sanguíneos do grupo controle, fixado em 100%.....	58
Figura 15: Imagens da CAM de embriões de 7 dias submetidos aos diferentes grupos de tratamento avaliados. (A) PBS (B) AC 5 $\mu\text{mol/L}$ (C) AC 10 $\mu\text{mol/L}$ (D) AC 25 $\mu\text{mol/L}$ (E) Bevacizumabe 1 $\mu\text{mol/L}$	59

Figura 16: Cortes histológicos (corados por HE) da CAM de embriões de 7 dias, fotografados em aumento de 10x, em escala de 100 µmol/L. (A) Controle negativo (PBS) – em destaque: (1) sinais de hiperemia (2) formação de vasos sanguíneos (3) presença de elementos inflamatórios. (B) AC 5 µmol/L. (C) AC 10 µmol/L. (D) AC 25 µmol/L. (E) Controle positivo (bevacizumabe 1 µmol/L)....	60
Figura 17: Imagem do fundo de olho de rato macho Wistar. (A) Retina controle (B) Retina 24 h após a administração intravítrea de AC – a seta indica uma região de embaçamento, devido à formação de depósito no local da injeção.....	61
Figura 18: Variação da pressão intraocular dos olhos dos ratos Wistar.....	62
Figura 19: Formas de ondas obtidas de acordo com o estímulo emitido. Parâmetros das ondas do ERG a serem medidos durante a análise. As principais medidas são de amplitude e de tempo implícito das ondas a e b.....	63
Figura 20: ERG escotópico (resposta mista de cones e bastonetes) de rato albino e humano são caracterizadas por padrão similar, diferindo em amplitude e tempo implícito.....	64
Figura 21: Curva do eletrorretinograma (ERG) nas condições escotópica (0,03 e 3,0 cd.s.m ⁻²) e fotópica (3,0 cd.s.m ⁻² ; Flicker 30 Hz) 7 e 15 dias após injeção intravítrea de diferentes doses de AC. As curvas são comparadas àquelas dos olhos em que foram administrados apenas o veículo.....	65
Figura 22: Média ± desvio padrão da amplitude e tempo implícito das ondas a e b nas condições escotópica (0,03 e 3,0 cd.s.m ⁻²) e fotópica (3,0 cd.s.m ⁻² , flicker 30 Hz) 7 e 15 dias após injeção intravítrea de diferentes doses de AC. Os valores de referência utilizados levam em consideração os olhos em que foram administrados apenas o veículo.....	67
Figura 23: Microscopia óptica de retina de rato, 15 dias após a injeção intravítrea de (A) veículo- PBS pH 7,4, (B) suspensão AC 5 µmol/L, (C) suspensão AC 10 µmol/L, (D) suspensão AC 25 µmol/L. Nota-se que a arquitetura da retina está preservada em todas as condições.	70
Figura 24: Implante de AC e PLGA.....	85
Figura 25: Espectro de varredura do AC na região ultravioleta.....	86
Figura 26: Cromatograma do AC 200 µg/mL nas condições cromatográficas preestabelecidas.....	87

Figura 27: Sobreposição dos cromatogramas referentes ao AC (verde), MeOH (marrom), fase móvel (azul), PLGA (florescente), PBS (lilás), placebo contaminado (preto).....	88
Figura 28: Curva analítica para a avaliação da linearidade.....	90
Figura 29: Espectro na região do infravermelho do AC.....	97
Figura 30: Espectro na região do infravermelho do PLGA 50:50.....	98
Figura 31: Espectro na região do infravermelho da mistura física AC:PLGA na proporção de 1:1.....	99
Figura 32: Espectro na região do infravermelho da mistura liofilizada AC:PLGA.....	100
Figura 33: Espectro na região do infravermelho do implante de AC: PLGA.....	100
Figura 34: Sobreposição das curvas de TG do AC, PLGA, mistura física de AC e PLGA 1:1, mistura liofilizada de PLGA e AC e implante de PLGA e AC.....	102
Figura 35: Curvas de DSC do AC (a), PLGA (b), mistura física de AC e PLGA 1:1 (c), mistura liofilizada de PLGA e AC (d) e implante de PLGA e AC (e).....	104
Figura 36: Fotomicrografias dos implantes de PLGA antes do início do teste de liberação <i>in vitro</i> em aumento de 20x (A); 200x (C); 1000x (E). E após 15 dias de incubação em aumento de 20x (G); 200x (I); 1000x (L). Implantes de PLGA+AC antes do início do teste de liberação <i>in vitro</i> em aumento de 20x (B); 200x (D); 1000x (F). E após 15 dias de incubação em aumento de 20x (H); 200x (J); 1000x (M)	106
Figura 37: A) Perfil de liberação do AC a partir dos implantes. B) Perfil de liberação acumulada de AC a partir dos implantes.....	108
Figura 38: A) Alteração de massa dos implantes. B) Absorção de água pelos implantes durante a avaliação <i>in vitro</i>	109
Figura 39: Imagens da CAM de embriões de 7 dias submetidos aos diferentes grupos de tratamento avaliados. (A) PBS. (B) Implante PLGA. (C) Implante PLGA + AC.....	110
Figura 40: Ensaio da membrana corioalantoica, realizado com PBS (controle), bevacizumabe e implante de PLGA e implante de PLGA+AC.....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diluições para realização dos ensaios de CAM.....	50
Tabela 2: Composição do tampão PBS pH 7, 4.....	76
Tabela 3: Diluições para construção da curva analítica para quantificação do AC.....	78
Tabela 4: Condições avaliadas no parâmetro robustez.....	80
Tabela 5: Peso médio dos implantes desenvolvidos.....	85
Tabela 6: Condições cromatográficas estabelecidas para a quantificação de AC.....	87
Tabela 7: Estabilidade das amostras padrão de AC e padrão contaminado em um período de 24 h.....	89
Tabela 8: Repetitividade e precisão intermediária do método de quantificação do AC.....	92
Tabela 9: Valores médios de recuperação aparente nos três níveis de concentração utilizados para a avaliação da exatidão.....	93
Tabela 10: Comparações entre os parâmetros alterados na robustez.....	94
Tabela 11: Teor de AC dosado nos implantes desenvolvidos.....	95
Tabela 12: Bandas de absorção referentes ao AC, PLGA, misturas física, liofilizada e implante.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Ácido corosólico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHR	Barreira hemato-retiniana
CAM	Ensaio em membrana corialantoica
CLAE	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
DMRI	Degeneração Macular Relacionada à Idade
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EPR	Epitélio pigmentar da retina
ERG	Eletrorretinograma
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ITV	Intravítrea
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PIO	Pressão Intraocular
RD	Retinopatia diabética
RDP	Retinopatia diabética proliferativa
SRB	Sulforrodamina B
TG	Termogravimetria
Tg	Transição vítrea
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
1 O OLHO HUMANO	23
1.1 Segmento anterior	24
1.1.1 Córnea.....	24
1.1.2 Íris	25
1.1.3 Corpo Ciliar	25
1.1.4 Cristalino	26
1.2 Segmento posterior	26
1.2.1 Esclera	26
1.2.2 Corpo Vítreo.....	27
1.2.3 Coroide.....	27
1.2.4 Retina	27
1.2.5 Nervo óptico	29
2 ADMINISTRAÇÃO INTRAVÍTREA DE FÁRMACOS.....	30
2.1 Sistemas de liberação modificada.....	32
2.1.1 Implantes não biodegradáveis.....	33
2.1.2 Implantes biodegradáveis.....	33
Copolímero derivado do ácido láctico e glicólico - PLGA.....	34
3 ANGIOGÊNESE.....	37
4 DOENÇAS CAUSADORAS DE NEOANGIOGÊNESE	38
4.1 Degeneração Macular Relacionada à Idade – DMRI	38
4.2 Retinopatia Diabética – RD	40
5 ÁCIDO COROSÓLICO.....	41
OBJETIVOS	43
1 OBJETIVO GERAL	44
2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA, SEGURANÇA E TOXICIDADE DA APLICAÇÃO OCULAR DO ÁCIDO COROSÓLICO	45
1 MATERIAIS.....	46
1.1 Substâncias, reagentes e outros materiais.....	46
1.2 Equipamentos e acessórios	47
1.3 Animais.....	47

2 MÉTODOS	48
2.1 Preparo da solução estoque de AC a 5000 µmol/L	48
2.2 Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade do AC sobre células do epitélio pigmentado da retina (ARPE-19)	48
2.3 Preparo das suspensões de AC	49
2.4 Ensaio de angiogênese em membrana corioalantoica de embrião de galinha....	50
2.3 Avaliação da segurança e toxicidade de injeções intravítreas de AC em modelo <i>in vivo</i>	52
2.3.1 Análise por eletrorretinograma	53
2.3.3 Avaliação histológica	54
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
3.1 Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade do AC sobre células do epitélio pigmentado da retina (ARPE-19)	55
3.2 Ensaio de angiogênese em membrana corioalantoica de embrião de galinha....	57
3.3 Avaliação da segurança e toxicidade de injeções intravítreas de AC em modelo <i>in vivo</i>	61
3.3.1 Análise por eletrorretinograma	62
3.3.3 Avaliação histológica	69
4 CONCLUSÃO.....	71
CAPÍTULO II: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE IMPLANTES INTRAVÍTREOS CONTENDO ÁCIDO COROSÓLICO	72
1 MATERIAIS	73
1.1 Substâncias, reagentes e outros materiais.....	73
1.2 Equipamentos e acessórios	74
2 MÉTODOS	75
2.1 Desenvolvimento de sistemas poliméricos biodegradáveis de implantação intravítrea	75
2.2 Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação do AC....	75
2.2.1 Desenvolvimento do método analítico.....	75
2.2.2 Validação do método analítico	76
Seletividade.....	76
Estabilidade.....	77
Linearidade.....	77
Precisão	78
Exatidão	79
Limite de detecção e de quantificação	79
Robustez	79
2.3 Determinação do teor de AC nos implantes desenvolvidos	80
2.4 Caracterização dos implantes	80
2.4.1 Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier	81

2.4.2 Análise térmica.....	81
Termogravimetria	81
Calorimetria exploratória diferencial	82
2.4.3 Microscopia eletrônica de varredura	82
2.5 Avaliação <i>in vitro</i> da absorção de água, perda de massa e perfil de liberação dos implantes	82
2.6 Avaliação preliminar da biocompatibilidade e atividade antiangiogênica dos implantes desenvolvidos	84
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
3.1 Desenvolvimento de sistemas poliméricos biodegradáveis de implantação intravítrea	85
3.2 Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação do AC.....	85
3.2.1 Desenvolvimento do método analítico.....	85
3.2.2 Validação do método analítico	88
Seletividade.....	88
Estabilidade.....	89
Linearidade.....	89
Precisão	91
Exatidão	92
Limite de detecção e de quantificação	93
Robustez	93
3.3 Determinação do teor de AC nos implantes desenvolvidos	95
3.4 Caracterização dos implantes	96
3.4.1 Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier	96
3.4.2 Análise térmica.....	101
Termogravimetria	101
Calorimetria exploratória diferencial	103
3.4.3 Microscopia eletrônica de varredura	105
3.5 Avaliação <i>in vitro</i> da absorção de água, perda de massa e perfil de liberação dos implantes	107
3.6 Avaliação da preliminar biocompatibilidade e atividade antiangiogênica dos implantes desenvolvidos	110
4 CONCLUSÃO.....	112
CONSIDERAÇÕES FINAIS	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
ANEXOS	125

INTRODUÇÃO

A cegueira é um grave problema de saúde pública. Estimativas mundiais revelam que 217 milhões de pessoas apresentam visão debilitada e 36 milhões são completamente cegas. No Brasil, segundo dados do Censo realizado em 2010 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, há 582 mil cegos e 6 milhões de pessoas apresentam baixa visão (BRASIL, 2015; BOURNE et al., 2017).

Dentre as principais causas da perda irreversível de visão, destacam-se as doenças proliferativas da retina, como a retinopatia diabética e a degeneração macular relacionada à idade. Estas doenças acometem, respectivamente, a população economicamente ativa e idosa, representando um impacto à qualidade de vida e à economia. Um aspecto em comum é a proliferação patológica de novos vasos sanguíneos (DELPLACE; PAYNE; SHOICHET, 2015).

O processo de angiogênese ocorre em situações patológicas como uma tentativa de reparo de danos teciduais. Entretanto, em retinopatias proliferativas, a neovascularização causa efeitos devastadores. Nesses casos, a cascata angiogênica é normalmente desencadeada por hipóxia ou estresse oxidativo. A estimulação excessiva de fatores pró-angiogênicos, como, por exemplo, o fator de crescimento endotelial (VEGF) desencadeia uma multiplicação celular descontrolada e há a formação de neovasos funcionalmente e estruturalmente desordenados. Os vasos sanguíneos formados são fracos e incompetentes, permitindo vazamentos e hemorragias que levam ao edema, o que compromete a integridade da retina e progressivamente, a função visual (BEHL; KOTWANI, 2015).

O tratamento farmacológico dessas debilidades requer uma aplicação local e direta do fármaco no segmento posterior do olho em concentrações terapêuticas, o que é obtido com a administração intravítrea. Entretanto, devido à rápida circulação sanguínea no local, os fármacos administrados por essa via são eliminados rapidamente, exigindo esquemas posológicos de administração frequente.

Diante deste cenário, a busca por substâncias que possam ser empregadas no tratamento dessas doenças, bem como o desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada, tem sido alvo de grande interesse. Desta forma, plantas medicinais compreendem um recurso potencial para a obtenção de novas substâncias que possam ser empregadas no tratamento das doenças causadoras de neovascularização da retina.

Recentemente, o triterpeno pentacíclico denominado ácido corosólico tem atraído atenção, devido à sua extensa atividade biológica antidiabética, antioxidante, anti-inflamatória, antiproliferativa e antitumoral. Além destas, sugere-se que esta substância também atue inibindo a formação de novos vasos sanguíneos (YOO et al., 2015).

Neste contexto, como ainda não existem trabalhos na literatura que avaliam a atividade e a toxicidade ocular do ácido corosólico, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a atividade antiangiogênica e a segurança da administração intravítrea do ácido corosólico, bem como desenvolver sistemas de liberação prolongada visando ao tratamento de doenças causadoras de neovascularização da retina.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 O OLHO HUMANO

O olho é um órgão par, responsável pela captação da luz refletida pelos objetos a sua volta, promovendo alterações nas células nervosas especializadas da retina, nos cones e bastonetes. Isso gera alterações no potencial de ação nos nervos que, subsequentemente será retransmitido para o nervo óptico e, em seguida, para o cérebro, onde ocorrerá a percepção visual, com o reconhecimento da imagem e focalização do objeto localizado (FORRESTER et al., 2016; SBO, 2017).

Aparentemente, o olho humano apresenta-se como uma estrutura globular, com um diâmetro de 24 mm e uma massa de cerca de 7,5 g, o que corresponde a menos de 0,05% da massa corporal total (KIM et al., 2014b). É protegido pelas pálpebras e órbita (cavidade óssea no crânio). Além disso, encontra-se relativamente isolado pelas barreiras hemato-retiniana, hematoaquosa e hematovítrea e portanto, apresenta propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas incomuns (GOODMAN & GILMAN, 2017).

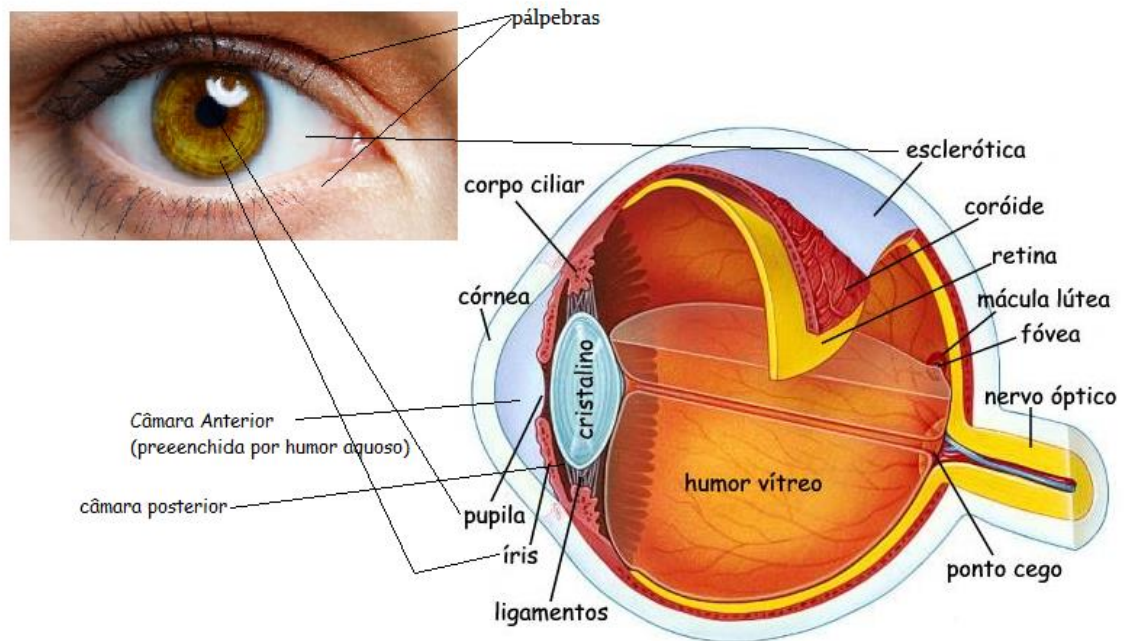
O bulbo ocular é constituído por três túnicas concêntricas, uma lente (cristalino) e dois líquidos (humor aquoso e humor vítreo). As túnicas são classificadas de fora para dentro em:

- túnica fibrosa: camada protetora que provê resistência mecânica, formada pela córnea e esclera;
- túnica vascular (úvea): é uma camada pigmentada, que compreende a íris, o corpo ciliar e a coroide;
- túnica nervosa: formada pela retina (RAWAS-QALAJI; WILLIAMS, 2012).

Anatomicamente, o bulbo ocular é dividido nos segmentos anterior e posterior. O segmento anterior é primariamente responsável por receber e focar a luz, sendo composto pela córnea, esclera, câmaras posterior e anterior, íris, corpo ciliar e cristalino. Já o segmento posterior, responsável pela detecção da luz, é formado pelo corpo vítreo, retina, coroide, nervo óptico e também pela esclera (KIM et al., 2014b).

As principais estruturas estão representadas na figura 1.

Figura 1: Esquema anatômico do bulbo ocular



Fonte: Adaptado de Grupo Retina, 2017.

1.1 Segmento anterior

1.1.1 Córnea

A córnea é um tecido avascular, transparente, organizado em cinco camadas: epitélio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio (GOODMAN & GILMAN, 2017). A transparência é uma de suas propriedades mais importantes, uma vez que funciona como meio óptico e permite aos raios luminosos que atingem o olho serem refratados e que o foco ocorra, idealmente, no plano da retina (SBO, 2017).

Essa transparência da córnea é o resultado de inúmeros fatores: ausência de vasos sanguíneos, superfície regular e lisa do epitélio que a recobre, organização regular dos componentes extracelulares e celulares do estroma, o que depende do estado de hidratação, metabolismo e nutrição destes elementos (FORRESTER et al., 2016).

Além disso, a camada epitelial hidrofóbica da córnea representa a primeira barreira a substâncias estranhas e, portanto, para a administração tópica de fármacos (HUANG; CHEN; RUPENTHAL, 2017; RAWAS-QALAJI; WILLIAMS, 2012).

1.1.2 Íris

A íris é a parte mais anterior do trato uveal. Caracteriza-se como uma estrutura circular, fina, fortemente pigmentada e contrátil. Encontra-se suspensa no interior do humor aquoso, entre a córnea e o cristalino. O espaço entre a íris e a córnea, denomina-se câmara anterior e o entre a íris e o cristalino, câmara posterior. A superfície anterior da íris é o estroma, uma estrutura que se organiza frouxamente e contém melanócitos, vasos sanguíneos e músculo liso. As diferenças de cor da íris refletem a quantidade de melanócitos no estroma (FORRESTER et al., 2016; GOODMAN & GILMAN, 2017). A íris circunda e controla o tamanho da pupila, pois está conectada a fibras musculares que relaxam e contraem de acordo com uma resposta autônoma à variação de luz recebida (SBO, 2017).

1.1.3 Corpo Ciliar

O corpo ciliar compreende a porção intermediária da úvea. É responsável pela acomodação visual através do músculo ciliar e pela secreção de humor aquoso, um líquido claro, transparente, de consistência aquosa, que preenche a câmara anterior e posterior, atuando na nutrição do segmento anterior e na manutenção da pressão hidrostática (SBO, 2017).

O corpo ciliar é dividido em duas regiões: a anterior ou parte pregueada e a posterior ou parte plana. O músculo ciliar está organizado em camadas longitudinal externa, radial intermediária e circular interna (GOODMAN & GILMAN, 2017).

1.1.4 Cristalino

O cristalino é uma estrutura altamente organizada, cuja principal função é focalizar a passagem da luz até a retina. É avascular, biconvexo, gelatinoso e transparente. Está situado atrás da íris e é anexo ao corpo ciliar pelo ligamento suspensório. De acordo com o tônus da musculatura ciliar, o cristalino é capaz de acomodar-se, ou seja, mudar o seu formato, causando alterações na capacidade refracional do olho (FORRESTER et al., 2016; SBO, 2017).

1.2 Segmento posterior

1.2.1 Esclera

A esclera (ou esclerótica), popularmente conhecida como “branco do olho”, é o revestimento mais externo do olho e está presente, também, no segmento anterior. É formada por tecido conjuntivo denso e histologicamente é dividida em três camadas: lâmina fusca, estroma e episclera. O arranjo irregular das fibras colágenas é responsável pela opacidade da esclera.

A esclerótica tem como funções a proteção das estruturas internas do olho e a manutenção da estrutura ocular, mesmo sob a variação de pressão ou ação de músculos adjacentes (internos ou externos). A sua viscosidade natural (resistência à tração, extensibilidade e flexibilidade) permite uma distensão ou contração limitada para acomodar pequenas variações na pressão intraocular (FORRESTER et al., 2016; SBO, 2017).

Vários vasos sanguíneos perfuram a esclerótica por meio de seus emissários, tanto para irrigar, quanto para drenar a coroide, o corpo ciliar, o nervo óptico e a íris (GOODMAN & GILMAN, 2017).

1.2.2 Corpo vítreo

A cavidade vítrea é a maior cavidade do olho, sendo preenchida pelo humor vítreo. É delimitada anteriormente pela face posterior do cristalino e posteriormente pela retina e nervo óptico. É uma estrutura gelificada, límpida, contendo colágeno tipo II, ácido hialurônico, proteoglicanos e várias macromoléculas, como a glicose, ácido ascórbico, aminoácidos e alguns sais inorgânicos (FORRESTER et al., 2016; GOODMAN & GILMAN, 2017).

Devido à sua grande viscosidade, o humor vítreo é capaz de promover estabilidade aos componentes posteriores do olho, atenuando o estresse que pode ser gerado à retina, devido a movimentos súbitos (LLOYD; FARAGHER; DENYER, 2001).

1.2.3 Coroide

A coroide, juntamente com a íris e o corpo ciliar, forma a túnica vascular. Está situada entre a esclera e a retina, estende-se do corpo ciliar ao nervo óptico, sendo que na região do nervo óptico, as artérias ciliares posteriores e os nervos ciliares penetram no olho. É responsável pela nutrição das células da retina, uma vez que é altamente vascularizada e innervada. É separada da retina pela membrana de Bruch (HUANG; CHEN; RUPENTHAL, 2017; SBO, 2017).

1.2.4 Retina

A retina é uma estrutura fina e transparente formada por neurônios altamente organizados, células gliais e vasos sanguíneos. Externamente é ligada à membrana de Bruch e internamente, ao vítreo. É responsável pela detecção de fótons, processamento das informações da luz e tradução em impulsos elétricos para o cérebro, onde serão interpretados através da formação de imagens (GOODMAN & GILMAN, 2017). A retina é formada por duas regiões: a retina neural e o epitélio pigmentado da retina (EPR) (FORRESTER et al., 2016).

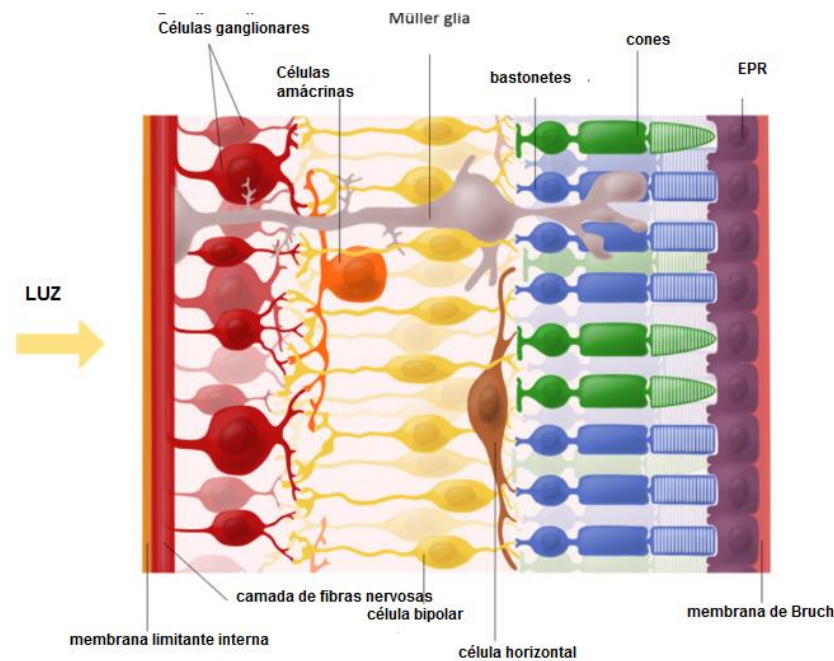
O EPR é a porção mais externa, formada por uma monocamada estratificada de células cuboides pigmentadas. O EPR e os vasos da retina formam a barreira hemato-retiniana (BHR), promovendo a separação entre a porção neurosensorial da retina e a circulação sistêmica, o que representa um controle ao fluxo de fluidos, macromoléculas e metabólitos. Outras funções do EPR incluem: manutenção da adesão da retina neurosensorial, fagocitose de cones e bastonetes, absorção da luz, transporte e armazenamento de metabólitos e vitaminas (especialmente vitamina A). O EPR está em íntimo contato com os segmentos externos da camada neuronal da retina (FORRESTER et al., 2016; PAIVA, 2015).

A porção neurosensorial pode ser dividida em algumas camadas, sendo elas:

- fotorreceptores: bastonetes e cones;
- nuclear externa: exclusivamente composta por corpos celulares de fotorreceptores e fibras de conexão;
- plexiforme externa: local de formação sináptica entre os fotorreceptores e as células bipolares;
- nuclear interna: composta por núcleos das células horizontais, bipolares, amácrinas e das células glias de Muller;
- plexiforme interna: onde ocorrem as formações de conexões sinápticas entre o axônio das células bipolares e os dendritos das células ganglionares;
- células ganglionares;
- fibras nervosas;
- membrana limitante interna: separação entre retina e corpo vítreo.

A organização em camadas da retina pode ser visualizada na figura 2.

Figura 2: Arquitetura celular da retina.



Fonte: Adaptado de DELPLACE; PAYNE; SHOICHET, 2015.

É necessário ressaltar que é a partir dos bastonetes e cones que se inicia o processo visual. Após o estímulo por luz, são gerados sinais elétricos que excitam as fibras do nervo óptico. A função dos bastonetes é a percepção do brilho, contraste e movimento, portanto, são responsáveis pela visão preto-e-branco em condições de baixa luminosidade, denominada visão escotópica. Os cones são responsáveis pela resolução da imagem em cores, chamada de visão fotópica. A densidade de cones e bastonetes varia de acordo com a região da retina (GUYTON et al., 2011).

1.2.5 Nervo óptico

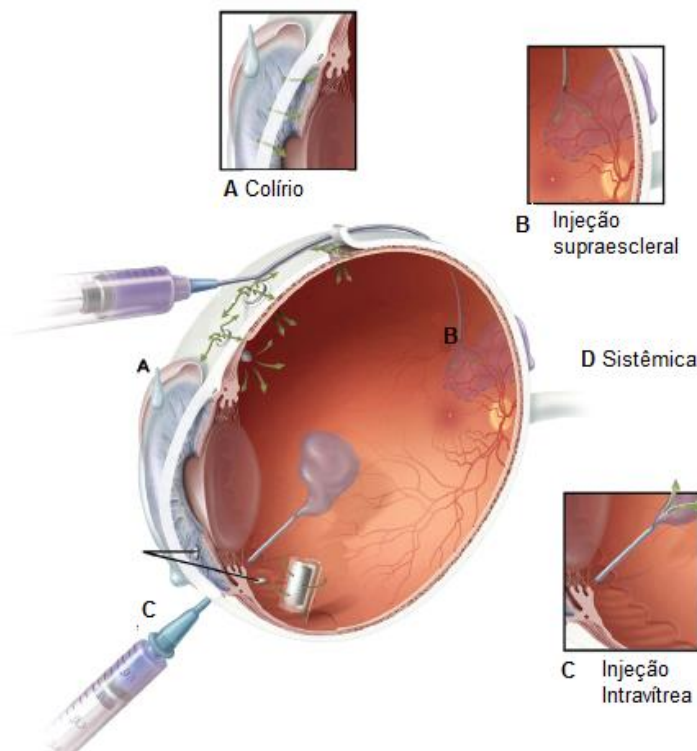
O nervo óptico é um nervo mielinizado responsável pela condução de estímulos da retina ao sistema nervoso central (SNC), sendo formado por: uma parte intraocular (visível como disco óptico na retina); uma parte intraorbitária; uma parte intracanalicular; uma parte intracraniana. É envolvido pelas meninges que se encontram em continuidade com o cérebro (GOODMAN & GILMAN, 2017).

Dessa forma, devido às características anatômicas e fisiológicas do olho, o desenvolvimento de sistemas de administração de fármacos representa um desafio constante (HUANG; CHEN; RUPENTHAL, 2017; KANG-MIELER; OSSWALD; MIELER, 2014).

2 ADMINISTRAÇÃO INTRAVÍTREA DE FÁRMACOS

Os métodos mais comuns de administração de fármacos no tratamento de doenças oculares incluem as vias de administração tópica, sistêmica, intravítrea e periocular, conforme ilustrado na figura 3.

Figura 3: Vias convencionais de administração ocular de fármacos



Fonte: Adaptado de SHORT, 2008.

A administração de uma preparação por via ocular tópica, por meio de colírios, é a mais utilizada em oftalmologia. É a via de primeira escolha para o tratamento de doenças que acometem o segmento anterior do olho, como por exemplo, conjuntivite,

blefarite e olho seco. A aplicação tópica de medicamentos diretamente na córnea e conjuntiva é preferencialmente escolhida, devido à sua simplicidade, eficácia, segurança e comodidade ao paciente (CHENNAMANENI et al., 2013; PATEL et al., 2013). Já para o tratamento de doenças do segmento posterior, as barreiras anatômicas e fisiológicas do olho, incluindo o epitélio corneano, mecanismos de depuração plasmática conjuntival, drenagem nasolacrimal, dinâmica lacrimal, ligação de fármacos a proteínas e a barreira hemato-ocular proporcionam proteção contra a entrada de xenobióticos. Essas barreiras dificultam a passagem de fármacos para o segmento posterior do olho e, para manter um efeito terapêutico mínimo, é necessário realizar aplicações frequentes da formulação (FIALHO; SILVA-CUNHA, 2007; HUANG; CHEN; RUPENTHAL, 2017; LEE et al., 2010). De acordo com Chennamaneni e colaboradores (2013), em até 2 minutos após a aplicação de colírios, 80% do produto é eliminado via drenagem nasolacrimal, limitando a penetração ocular a menos de 1% da dose administrada.

Outra opção para o tratamento de doenças do segmento posterior do olho é a administração sistêmica. No entanto, o acesso aos tecidos oculares é limitado por BHR e barreira hematoaquosa. Como consequência, para que se obtenha uma concentração do fármaco dentro da faixa terapêutica, são administradas altas doses sistêmicas, o que eleva as concentrações do fármaco em tecidos não-oculares e, conseqüentemente, aumentam os riscos de efeitos adversos (FIALHO et al., 2003; KANG-MIELER; OSSWALD; MIELER, 2014).

Injeções intravítreas (ITV) apresentam-se como uma alternativa para a obtenção de concentrações adequadas do fármaco no vítreo e na retina e minimizam os efeitos adversos sistêmicos. Contudo, a meia-vida dos fármacos de baixa massa molecular, administrados via ITV varia entre 2 a 6 horas, o que resulta em uma eficácia transitória e necessidade de injeções repetidas para manter as concentrações do fármaco em nível terapêutico. Fármacos com massa molecular mais elevada, tais como o VEGF e anticorpos, apresentam uma meia-vida maior e, mesmo assim, requerem administrações mensais. No entanto, injeções ITV frequentes aumentam o risco de eventos adversos, tais como infecções, descolamento da retina, endoftalmite, hemorragia do vítreo, catarata e elevação da pressão intraocular, além de desconforto ao paciente (KANG-MIELER; OSSWALD; MIELER, 2014; LEE et al., 2010).

Há também a via periocular, que compreende as regiões subconjuntival, subtenoniana, periobulbar e retrobulbar. A esclera é o tecido de entrada para esta via. O alto grau de hidratação dessa estrutura, favorece a difusão de compostos hidrossolúveis, enquanto a sua hipocelularidade resulta na presença de poucas enzimas proteolíticas, que poderiam degradar o fármaco. Entretanto, esta via não garante a presença e a concentração adequada do fármaco no segmento posterior. Além disso, assim como a ITV, a via periocular apresenta riscos associados à sua administração, tais como: perfuração do bulbo do olho, fibrose de músculos extraoculares e endoftalmite (MELLO et al., 2010).

Devido às desvantagens das vias de administração comumente usadas para o tratamento de doenças do segmento posterior do olho, sistemas de liberação modificados para administração intravítrea vêm sendo desenvolvidos.

2.1 Sistemas de liberação prolongada

Sistemas de liberação prolongada apresentam-se como uma alternativa para que se mantenham níveis terapêuticos do fármaco no meio intraocular por um período prolongado. As vantagens desses sistemas são: (1) possibilidade de menor dose do fármaco para o tratamento, quando comparada a outras formulações oftálmicas; (2) disponibilização do fármaco diretamente no local de ação; (3) redução dos efeitos sistêmicos adversos e da frequência de injeções intravítreas, aumentando o conforto e a adesão do paciente ao tratamento (DELPLACE; PAYNE; SHOICHET, 2015; PATEL et al., 2013). Porém, a administração ocular desses sistemas remete a procedimentos cirúrgicos (MOURA et al., 2011).

Esses sistemas podem ser poliméricos ou lipídicos, dentre os quais, citam-se: microcápsulas, micro e nanopartículas, implantes e lipossomas. Em relação às diferentes formulações de liberação prolongada, neste trabalho pretende-se destacar o uso de implantes.

Os implantes podem ser de dois tipos: matricial (monolítico) e reservatório. No sistema matricial, o fármaco encontra-se disperso na matriz polimérica e sua liberação ocorre a partir da degradação polimérica ou pela difusão a partir dos canais e poros formados na matriz, ou ainda pela combinação desses dois mecanismos. No sistema

reservatório, há uma cavidade em que o fármaco está disperso ou solúvel, sendo liberado a partir da degradação da membrana de revestimento da matriz (FIALHO et al., 2003; SURESH et al., 2014). Além disso, os implantes podem ser constituídos de matrizes poliméricas biodegradáveis ou não biodegradáveis e podem ser aplicados em diferentes regiões do olho: subconjuntival, subtenoniana, esclera, câmara anterior e humor vítreo (DELPLACE; PAYNE; SHOICHET, 2015; KANG-MIELER; OSSWALD; MIELER, 2014).

2.1.1 Implantes não biodegradáveis

Implantes não biodegradáveis normalmente contêm, em seu núcleo, o fármaco rodeado por uma membrana semipermeável, o que permite uma liberação controlada por um período que pode variar de meses a anos (PATEL et al., 2013). Nesse tipo de implante, substâncias como o silicone, polietileno coacetato de vinila (EVA) são empregados como elementos estruturais (KIM et al., 2014b). Atualmente, alguns implantes não biodegradáveis estão disponíveis no mercado, como: Vitrasert® (Bausch & Lomb), Retisert® (Bausch & Lomb), Iluvien® (Alimera Science e pSivida). Além desses, o I-vation® (SurModics) encontra-se em estudos de fase clínica. Os implantes poliméricos não biodegradáveis apresentam inúmeras vantagens, como maior tempo de liberação, melhor controle da cinética de liberação, facilidade de produção e esterilização. Entretanto, eles devem ser removidos após a depleção do fármaco, o que implica um novo procedimento cirúrgico. Consequentemente, são susceptíveis a complicações, como por exemplo, descolamento da retina, irritações crônicas e formação de cicatrizes (CHENNAMANENI et al., 2013; DELPLACE; PAYNE; SHOICHET, 2015).

2.1.2 Implantes biodegradáveis

Polímeros biodegradáveis têm a propriedade de se decompor em monômeros ou em outros subprodutos mais solúveis, através de reações enzimáticas e não enzimáticas que ocorrem no olho, sendo eliminados pelo próprio organismo. O processo de

biodegradação envolve a quebra de cadeia e modificações da massa molecular e da solubilidade do polímero. Durante esse processo de degradação, há a liberação da substância ativa (KIM et al., 2014b; SURESH et al., 2014). A extensa degradação da matriz polimérica, ao mesmo tempo em que representa uma vantagem para este tipo de sistema, pode comprometer o perfil de liberação do fármaco, dificultando a previsão de sua taxa de liberação. Outras dificuldades associadas a esse tipo de implante são a duração da liberação, o estabelecimento da segurança das partículas biodegradáveis e a manutenção da estabilidade da formulação (KIM et al., 2014b; THRIMAWITHANA et al., 2011).

O perfil de liberação dos implantes biodegradáveis segue uma pseudocinética de primeira ordem, com um *burst* inicial, em que há elevada liberação do fármaco em um curto espaço de tempo, seguido de um rápido declínio nos níveis do fármaco (ANDERSON; BAINBRIDGE; SHIMA, 2010; SHORT, 2008). A taxa de liberação pode ser alterada por: quantidade do fármaco no sistema, área superficial e volume do implante, composição e massa molecular do polímero e solubilidade do fármaco (KIM et al., 2014b; LEE et al., 2010). Exemplo de implante oftálmico disponível no mercado é o Ozurdex® ou Posurdex® (Allergan). Já o Brimonidine implante (Allergan) encontra-se em estudo de fase clínica II (BANDELLO et al., 2017).

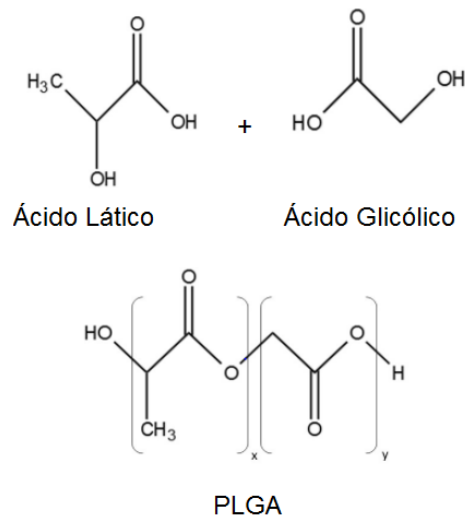
Os polímeros empregados nos implantes biodegradáveis podem ser: (1) naturais, à base de proteínas, como as albuminas bovina e humana, o colágeno e a gelatina, mas apresentam uso restrito, pois a pureza é questionável; (2) sintéticos, representados por poliamidas, poliaminoácidos, polialquilcianacrilatos, poliésteres, poliuretanos e poliacrilamidas. Os polímeros mais utilizados são os poliésteres, tais como: poli- ϵ -caprolactona (PCL), poli(D,L-lático) (PLA), e os copolímeros derivados do ácido lático e glicólico (PLGA) (SURESH et al., 2014).

Copolímero derivado do ácido lático e glicólico - PLGA

O PLGA é um polímero de grande destaque na área farmacêutica para o desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada. Pode ser sintetizado por policondensação do ácido lático e glicólico ou por uma reação de condensação, através da abertura do anel dos dímeros cíclicos (ácido glicólico e ácido lático).

Sucessivas unidades monoméricas de ácido láctico e glicólico são unidas por ligações éster durante o processo de polimerização (GENTILE et al., 2014; LEE et al., 2010). A estrutura do PLGA e seus monômeros estão demonstrados na figura 4.

Figura 4: Estrutura do PLGA e seus monômeros.



Fonte: GENTILE et al., 2014.

O PLGA é considerado um polímero biodegradável, uma vez que a sua hidrólise resulta em duas unidades monoméricas (ácido láctico e ácido glicólico) como metabólitos. Como estes dois monômeros são endógenos, eles são facilmente metabolizados pelo corpo via ciclo de Krebs em CO₂ e H₂O. Dessa forma, uma toxicidade sistêmica mínima é associada ao uso de PLGA para a liberação modificada de fármacos (BOIMVASER et al., 2016).

O PLGA é comercialmente disponível em diferentes massas moleculares e composição de ácido glicólico (PGA) e ácido láctico (PLA). Essas características irão interferir no tempo de degradação, que pode variar de meses a anos. A presença de um grupo metila no polímero derivado do ácido láctico (PLA) confere a este maior hidrofobicidade quando comparado ao derivado do ácido glicólico (PLG). Dessa forma, quanto maior a proporção de ácido láctico, mais hidrofóbico será o copolímero e menor será a velocidade de degradação (DANHIER et al., 2012; GENTILE et al., 2014).

As formas de PLGA são usualmente identificadas pela proporção dos monômeros utilizados. Por exemplo, PLGA 50:50 identifica um copolímero cuja composição é 50% ácido lático e 50% ácido glicólico e seu tempo de degradação é de aproximadamente 1-2 meses. Já o PLGA 75:25, leva um tempo maior para se degradar, de 4-5 meses e o 85:15, 5-6 meses (DANHIER et al., 2012).

Outro fator determinante da velocidade de degradação dos polímeros é a temperatura de transição vítrea (T_g). A T_g está relacionada ao grau de cristalinidade e à organização das cadeias poliméricas. Como a T_g do PLGA encontra-se acima da temperatura fisiológica (37 °C), nessas condições, ele está sob a forma cristalina. Assim, quanto maior a T_g , menor será a velocidade de degradação. Portanto, a cadeia apresenta uma estrutura fortemente rígida, proporcionando uma força mecânica significativa e permitindo que os polímeros sejam moldados como sistemas de liberação de fármacos (KAPOOR et al., 2015). Os implantes normalmente apresentam-se na forma de bastão, discos ou filmes. Os métodos de sua obtenção incluem: a moldagem, a extrusão e a preparação de filmes. Através da moldagem, a mistura de pós (contendo o polímero e o fármaco), previamente liofilizada, é colocada em um molde desenvolvido sob a forma de implante e podem ser utilizados o aquecimento e a pressão. Na extrusão, a mistura de pós é propulsionada continuamente pelo equipamento, passando por regiões de alta temperatura e pressão, onde ela é fundida e compactada na versão final de implante. A preparação de filmes pode ser realizada através da fusão e pressão da mistura de pós ou por adição de solução (FIALHO et al., 2003; KAPOOR et al., 2015). O perfil de liberação do fármaco normalmente segue um padrão trifásico caracterizado por: um *burst* inicial, seguido de uma liberação difusional e início da erosão do polímero e um *burst* final, que é resultado da torção e desintegração das matrizes (MOURA et al., 2011).

A elevada liberação inicial do fármaco, seguida por um período longo de liberação contínua, faz com que esses sistemas de liberação sejam visados no tratamento de doenças de início agudo e que requerem doses mais baixas por certo período de tempo (LEE et al., 2010). Assim, o desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada preparados a partir de polímeros biodegradáveis, especialmente o PLGA, têm ganhado destaque no tratamento de doenças do segmento posterior do olho, como a degeneração macular relacionada à idade (DMRI) e a retinopatia diabética

proliferativa (RDP), que têm como característica comum a proliferação de novos vasos sanguíneos ou neovascularização (ANDERSON; BAINBRIDGE; SHIMA, 2010).

3 ANGIOGÊNESE

A angiogênese ou neovascularização é definida como a formação de novos vasos sanguíneos a partir dos vasos preexistentes. É um processo complexo, que ocorre em resposta à ativação de células vasculares endoteliais por fatores de crescimento, seguida da degradação proteolítica da membrana basal, degeneração da matriz extracelular, realocação de células endoteliais, proliferação vascular, recrutamento de periócitos, deposição de nova membrana basal e formação de novos vasos (BEHL; KOTWANI, 2015).

A angiogênese ocorre tanto em condições fisiológicas quanto em patológicas e está sob o controle de inúmeras moléculas que estimulam (pró-angiogênicos) e inibem (antiangiogênicos) a formação de novos vasos sanguíneos (GACCHE; MESHAM, 2014). Os fatores pró-angiogênicos são responsáveis pela regulação do processo de angiogênese requerido durante o crescimento e desenvolvimento de tecidos do corpo, cicatrização de feridas, reparação de tecidos, regeneração de órgãos e inflamação e desenvolvimento do corpo lúteo durante o ciclo menstrual (FOLKMAN; SHING, 1992). O crescimento e a diferenciação celular estão sob controle dos fatores antiangiogênicos, que são responsáveis por interromper a cascata da angiogênese. Em condições fisiológicas normais, há um balanço dinâmico entre os fatores angiogênicos. Em condições patológicas, o equilíbrio entre os fatores está desregulado por algum estímulo químico, mecânico, degenerativo ou infeccioso. Há uma hiperestimulação de fatores pró-angiogênicos, o que resulta em uma multiplicação celular descontrolada e formação de neovasos funcionalmente e estruturalmente desordenados (BEHL; KOTWANI, 2015).

Dentre os fatores envolvidos na angiogênese destacam-se: o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o fator básico de crescimento dos fibroblastos (bFGF), a interleucina 8 (IL-8) e o fator de necrose tumoral (TNF- α). O VEGF, em razão de sua especificidade pelo endotélio vascular e grande potência, é um dos fatores pró-angiogênicos mais importantes (CAMPOCHIARO; AIELLO; ROSENFELD, 2016).

A família VEGF consiste em 7 fatores homólogos e 5 diferentes isoformas e cada uma desempenha um papel diferente no processo de angiogênese. O VEGF é produzido por macrófagos, linfócitos T, células tumorais e, no olho, pelas células do EPR. O principal fator responsável pela regulação da expressão do VEGF é a disponibilidade de oxigênio. Condições de hipóxia promovem estimulação excessiva do VEGF, resultando em uma angiogênese desregulada, que é um aspecto importante em vários processos patológicos, como no crescimento e metástase de tumores, inflamações crônicas, arteroesclerose, endometriose, isquemia, RD e DMRI (GACCHE; MESHAM, 2014).

4 DOENÇAS CAUSADORAS DE NEOANGIOGÊNESE

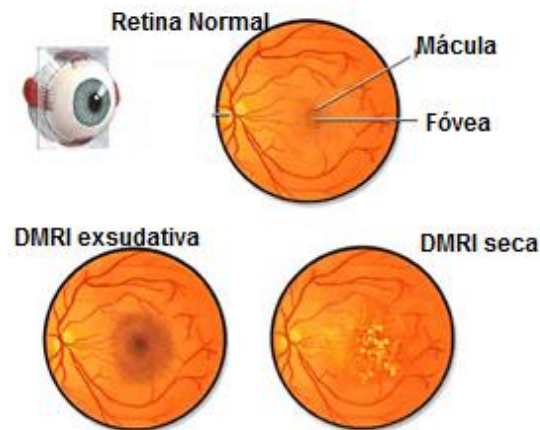
4.1 Degeneração macular relacionada à idade – DMRI

A DMRI ou maculopatia relacionada à idade é uma doença degenerativa que afeta a porção central da retina (mácula). É a causa mais comum de deficiência visual, podendo levar à perda de visão central ou cegueira, acometendo indivíduos com mais de 50 anos. Há estimativas de que sua prevalência para esse grupo dobre até o ano de 2020 (PARANHOS et al., 2013; YASIN et al., 2014).

Nos estágios iniciais da DMRI, os pacientes podem ser assintomáticos. Esta doença é caracterizada por alterações degenerativas envolvendo a parte externa da retina, EPR e membrana de Bruch. Com avanço da idade, as células do EPR tornam-se menos eficientes no desempenho de suas funções e a retina não pode mais receber alimentação adequada e acumula resíduos, o que leva à formação de depósitos denominados drusas amorfas (DELPLACE; PAYNE; SHOICHET, 2015). Dessa forma, as células do EPR lentamente degeneram, culminando com a perda gradativa da visão central. Essa forma de progressão da doença é denominada DMRI forma seca (não-neovascular). Alternativamente, se a integridade da membrana de Bruch é perdida, complexos neovasculares provenientes da coróide surgem nos espaços epiteliais e sub-retinianos. Os neovasos são fracos e incompetentes, permitindo vazamentos e hemorragias, levando, por conseguinte, ao edema que compromete a integridade da retina e a função visual, geralmente de maneira mais rápida e

acentuada do que a forma seca. O resultado final é uma cicatriz fibrovascular densa, que pode envolver toda a área macular (figura 5). Essa forma da doença é a exsudativa (vascular), sendo responsável por 10-15% dos casos de DMRI e por mais de 80% dos casos de cegueira em idosos (PARANHOS et al., 2013; YASIN et al., 2014).

Figura 5: DMRI forma exsudativa e seca.



Fonte: VISIO OFTALMOLOGIA, 2013.

A DMRI é uma doença multifatorial de etiologia desconhecida. Homens caucasianos com mais de 50 anos representam o grupo mais frequentemente comprometido. Outros fatores de risco incluem hipertensão, tabagismo, carências alimentares, distúrbio no metabolismo de lipídios e história familiar positiva. Os sintomas mais comuns são embaçamento da visão central, metamorfopsia (distorção da imagem) e visão reduzida, podendo levar a um escotoma central e perda da visão (PARANHOS et al., 2013; WEBER; HEIER, 2016).

Ainda não há condutas terapêuticas preventivas ou curativas para a maioria dos pacientes. O tratamento é paliativo, a fim de retardar a progressão da doença. Os principais esquemas terapêuticos disponíveis têm como alvo a forma exsudativa e incluem injeção ITV de agentes antiangiogênicos e corticosteroides, fotocoagulação a laser dos vasos anormais, terapia fotodinâmica com verteporfirina e cirurgia vítreoretinal como solução final. Dentre os tratamentos citados, apenas dois são

cobertos pelo Sistema Único de Saúde (SUS): injeção ITV de corticosteroides e fotocoagulação a laser (BRASIL, 2008; LIN et al., 2015).

4.2 Retinopatia diabética – RD

A RD é uma complicação microvascular do diabetes *mellitus*. Assim como a DMRI, consiste em um problema de saúde pública e é uma das principais causas da cegueira na população economicamente ativa com idade entre 30 a 64 anos (AJLAN; SILVA; SUN, 2016). Segundo a Wisconsin Epidemiological Study of Diabetic Retinopathy, os indivíduos que sofrem de diabetes *mellitus* apresentam 100% de chance de desenvolver alguma forma da RD ao longo de 30 anos (YASIN et al., 2014). De acordo com um estudo conduzido com 18.891 pessoas de variadas idades que sofrem de diabetes *mellitus* foi observado que 50,2% dos pacientes apresentavam RD avançada, após sofrer de diabetes por 40 anos e 84,1% dos pacientes sofriam de algum estágio primário da RD (BEHL; KOTWANI, 2015; KAWASAKI et al., 2011).

A RD é iniciada por alterações vasculares nos vasos sanguíneos responsáveis pela nutrição das células da retina. Essas mudanças são decorrentes do alto nível de glicose no sangue, que é responsável por uma série de efeitos sobre as células endoteliais, dentre eles: aumento do fluxo da via do poliol, acúmulo de produtos de glicação, ativação de proteína quinase C, modificações hemodinâmicas envolvendo o sistema renina-angiotensina, estresse oxidativo e ativação/participação de vários fatores de crescimento, principalmente o VEGF (BEHL; KOTWANI, 2015). Estas alterações microvasculares são caracterizadas pela perda funcional dos pericitos e pela oclusão capilar progressiva, ocasionando uma quebra da BHR e isquemia da retina. Isso pode resultar em alterações edematosas ou proliferação de neovasos. A neovascularização é significativa na definição do estágio da RD. De acordo com a classificação clínica, RD é dividida em duas subclasses ou estágios: proliferativa (RDP), caracterizada pela neovascularização e a não-proliferativa (RDNP) (figura 6). Normalmente, a RDNP é um dos estágios iniciais e geralmente progride e torna-se proliferativa (estágio avançado) (SABROSA et al., 2013; STITT et al., 2016).

Figura 6: (A) Imagem do fundo de olho de um paciente com RDNP, apresentando hemorragias e exsudados. (B) Imagem de fundo de olho de um paciente com RDP, apresentando intensa neovascularização e algumas cicatrizes



Fonte: FANTE; DURAIRAJ; OLIVER, 2010.

Quando a RD atinge a mácula, esse processo é chamado de maculopatia diabética (MD). Esse derrame vascular, acompanhado pelo inchaço da mácula, culmina em cegueira. Apesar da MD ocorrer durante qualquer estágio da RD, é mais comum nas fases finais, seguida de danos vasculares e neurológicos (STITT et al., 2016). A perda da visão na RD é causada pela combinação da isquemia da retina, hemorragia vítrea e/ou descolamento de retina tradicional (SABROSA et al., 2013).

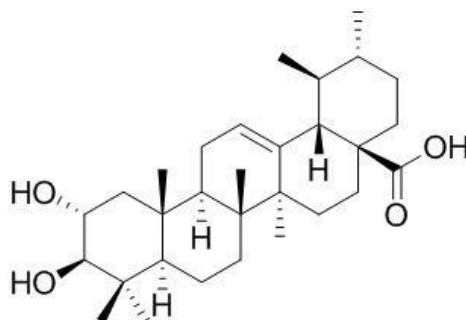
Os principais esquemas terapêuticos disponíveis para tratamento da RD incluem a fotocoagulação a laser, vitrectomia, corticosteroides e antiangiogênicos por meio de injeção ITV. Estes tratamentos são indicados em estágios avançados da RD, mas podem provocar efeitos adversos (STITT et al., 2016).

5 ÁCIDO COROSÓLICO

O ácido corosólico (AC), ácido 2 α -hidroxiursólico (figura 7), é um triterpeno (C₃₀) pentacíclico e normalmente pode ser encontrado na natureza associado ao seu isômero ácido 2 α -hidroxioleanólico. Possui massa molecular de 472,7 g/mol e apresenta-se sob a forma de um pó branco a esverdeado, praticamente insolúvel em

água (4,25 µg/mL) e solúvel em alguns solventes orgânicos como: metanol, éter de petróleo e piridina (CHEMICAL, 2017).

Figura 7: Estrutura química do ácido corosólico.



Trata-se uma substância bem distribuída no reino vegetal, estando presente em muitas plantas medicinais, tais como: *Lagerstroemia speciosa* (banaba) (YANG et al., 2016), *Vaccinium macrocarpon* (amora) (KIM et al., 2011), *Ugni molinae* (murta/goiaba-chilena) (ARANCIBIA-RADICH et al., 2016), *Eriobotrya japonica* (nespereira) (TAN; SONAM; SHIMIZU, 2017), *Perilla frutescens* (shiso/ perrila) (YU et al., 2017), *Malus doméstica* (maçã- golden delicious e mela-rosa) (VERARDO et al., 2017) e *Jacaranda oxyphylla* Cham. (caroba-de-São-Paulo) (PEREIRA et al., 2016). Apesar destas espécies vegetais serem predominantes no continente asiático, algumas também são encontradas na Europa e América.

Recentemente, o AC tem atraído atenção devido às suas atividades biológicas. Tem sido reportada ação antidiabética (NAZARUK; BORZYM-KLUCZYK, 2014; YANG et al., 2016), antioxidante (LI et al., 2016), anti-inflamatória (ARANCIBIA-RADICH et al., 2016), antiproliferativa, antitumoral (CHENG et al., 2017), antiobesidade (KLEIN et al., 2007), inibição da proteína quinase C (KIM et al., 2014a), antisséptica e estimulante de colágeno e ácido hialurônico (TAN; SONAM; SHIMIZU, 2017).

Além das propriedades citadas, há relatos na literatura de que o AC também apresenta atividade antiangiogênica (YOO et al., 2015). Até o presente momento, apenas um estudo demonstrou a potencial ação antiangiogênica do AC e nenhum trabalho avaliou a atividade ocular e a respectiva toxicidade desse triterpeno.

OBJETIVOS

1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antiangiogênica e a segurança da administração intravítrea do ácido corosólico, bem como desenvolver sistemas de liberação prolongada visando ao tratamento de doenças causadoras de neovascularização da retina.

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a citotoxicidade do AC em uma linhagem celular isolada a partir do epitélio pigmentado da retina - ARPE-19;
- ✓ Verificar a atividade antiangiogênica do AC em modelo de membrana corioalantoica do embrião de galinha;
- ✓ Analisar os efeitos retinianos causados pela administração intravítrea de diferentes doses de AC em olhos de ratos com emprego da análise das alterações clínicas e avaliação eletrofisiológica e histopatológica;
- ✓ Desenvolver sistemas de liberação prolongada (implantes) à base de PLGA 50:50 e AC;
- ✓ Desenvolver e validar um método analítico para quantificar o teor de AC nos implantes desenvolvidos;
- ✓ Caracterizar os sistemas poliméricos por técnicas de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, de análise térmica e por microscopia eletrônica de varredura;
- ✓ Avaliar o perfil de liberação *in vitro* do AC a partir dos implantes desenvolvidos;
- ✓ Verificar a biocompatibilidade preliminar e a atividade antiangiogênica dos sistemas desenvolvidos em modelo de membrana corioalantoica do embrião de galinha.

CAPÍTULO I:
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA, SEGURANÇA E
TOXICIDADE DA APLICAÇÃO OCULAR DO ÁCIDO COROSÓLICO

1 MATERIAIS

1.1 Substâncias, reagentes e outros materiais

-Ácido corosólico (massa molar 472,7 g/mol), produto natural cedido pelo Núcleo de Estudo e Pesquisa em Plantas Medicinais do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil.

-Dimetilsulfóxido (DMSO), Synth, Brasil.

-Fosfato de sódio bibásico anidro, Synth, Brasil.

-Fosfato de potássio monobásico anidro, Synth, Brasil.

-Cloreto de sódio, Synth, Brasil.

-Água ultrapurificada – Mili Q plus, Millipore, EUA; Billerica, EUA.

-Meio de cultura DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12), Gibco®, Grand Island, EUA.

-Soro fetal bovino (SFB), Gibco®, Grand Island, EUA.

-Tripsina-EDTA, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA.

-PSA 100 x (penicilina - estreptomicina -anfotericina B), Gibco®, Grand Island, EUA.

-Linhagem celular ARPE-19, BCRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

-Sulforrodamina B (SRB), Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA.

-Tris base, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA.

-Ácido Tricloroacético (TCA), Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA.

-Ácido Acético, Synth, Brasil.

-Ovos embrionados da espécie *Gallus domesticus* e da linhagem Ross, Rivelli, Mateus Leme, MG, Brasil.

-Colírio de tropicamida 1% - Mydriacyl ®, Alcon, Brasil.

-Cetamina – Ketamin ®, Cristália, Brasil.

-Cloridrato de xilasina – Copanize®, Schering-Plough Coopers, Brasil.

-Colírio de cloreto de proximetacaína 0,5%, Anestalcon ®, Alcon, Brasil.

1.2 Equipamentos e acessórios

-Balança analítica, Sartorius.

-Leitor de Elisa Benchmark Plus, Bio-Rad.

-Microscópio óptico, Axio Imager M2, Zeiss.

-Incubadora automática digital, Premium Ecologica®.

-Estereomicroscópio, Motic® equipado com câmera Motic Cam®.

-Eletrorretinograma (ERG), Espion E2; Colordome; Diagnosys LLC.

-Tonômetro veterinário, Tono-PenVet, Reichert.

-Oftalmoscópio binocular indireto, Welch Allin.

1.3 Animais

Ratos adultos machos da espécie Wistar, com aproximadamente 200 g, foram adquiridos do Biotério da Faculdade de Farmácia - UFMG. Durante o período de estudo, os animais foram mantidos no Biotério, dentro de caixas com grades contendo três animais e em estante ventilada, sob condições controladas de temperatura (27 ± 1 °C) e luminosidade (ciclo claro e escuro de 12 horas, com luz iniciando às 7 horas) e com livre acesso à ração e água.

Todos os experimentos com os animais foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG), o qual aprovou a realização do projeto sob o protocolo de número 226/2017 (Anexo 1) e com o Estatuto para o Uso de Animais em Pesquisa Oftálmica e Visão da ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology).

2 MÉTODOS

2.1 Preparo da solução estoque de AC a 5000 µmol/L

Foram pesados $2,36 \pm 0,03$ mg de AC em microtubo, adicionou-se 0,1 mL de DMSO e agitou-se por 1 min em agitador orbital, obtendo-se uma solução de concentração de 50000 µmol/L. Em um criotubo contendo 180 µL de meio DMEM-F12, transferiu-se uma alíquota de 20 µL da solução estoque de AC e homogeneizou-se. A concentração final foi 5000 µmol/L.

2.2 Avaliação *in vitro* da citotoxicidade do AC sobre células do epitélio pigmentado da retina (ARPE-19)

A citotoxicidade promovida pelo AC foi avaliada em uma linhagem celular isolada a partir do epitélio pigmentado da retina humana (ARPE-19) por meio do ensaio colorimétrico de sulforrodamina B (SRB), descrito por Skehan (1990). Este ensaio de citotoxicidade foi realizado no Laboratório de Imunofarmacologia aplicada à Biologia Molecular, Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia, UFMG.

Para a realização desse ensaio, as células ARPE-19 foram cultivadas em meio DMEM-F12 suplementado com 10% de SFB e 1% PSA em atmosfera úmida a 37 °C e 5% de CO₂.

Foram inoculados 100 µL/poço da suspensão celular (10^5 células/mL) em placas 96 poços. As placas foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 h. Após esse período, foram adicionados os tratamentos com doses crescentes de AC (2,5 – 320 µmol/L), preparadas a partir de uma solução estoque de AC na concentração de 5.000 µmol/L (descrito no tópico 2.1). Em seguida, as células foram incubadas por 48 h. Ao final desse tempo, as células foram fixadas com 100 µL de TCA a 10% (v/v) e incubadas por 1 h a 4 °C. As placas foram lavadas e mantidas à temperatura ambiente até secagem completa. A coloração foi realizada pela adição de 100 µL de SRB a 0,057% (p/v) dissolvido em 1% de ácido acético, durante um período de 30 min. As placas foram lavadas com uma solução de ácido acético 1% e secas, novamente, em

temperatura ambiente. Feita a secagem, as placas foram avaliadas e fotografadas por câmara acoplada ao microscópio óptico. Em seguida, o corante ligado às proteínas foi solubilizado com 100 µL de tris base (10 µmol/L, pH 10,5) e os valores de absorvância foram medidos em leitor de microplacas a 510 nm. O estudo foi realizado em triplicata. O desenho das placas está representado na figura 8.

Figura 8: Esquema da placa utilizada no estudo de citotoxicidade, demonstrando os poços: controle, tris-base e as concentrações de AC.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B			320	160	80	40	20	10	5	2.5		
C			320	160	80	40	20	10	5	2.5		
D			320	160	80	40	20	10	5	2.5		
E												
F												
G												
H												

Controle de células (ARPE)
 Poços com células e soluções de AC (umol/L)
 Tris base
 Controle positivo da morte

Foi determinada a porcentagem de células viáveis para as soluções de AC após 48 h, de acordo com a Equação 1.

$$\text{Viabilidade celular} = 100 \times \frac{\text{Absorbância por poço} - \text{Média da absorbância de tris base}}{\text{Média da absorbância do controle} - \text{Média da absorbância da tris base}} \quad (1)$$

Os resultados foram expressos como a média da porcentagem de viabilidade celular \pm desvio padrão. Os dados foram avaliados por meio da análise de variância- ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey, adotando-se um nível de significância de $\alpha < 0,05$. Além disso, determinou-se a concentração inibitória de 50% (IC₅₀), através da curva dose-resposta, calculada pelo programa GraphPad Prism®5.

2.3 Preparo das suspensões de AC

A escolha das concentrações das suspensões de AC foi baseada na avaliação *in vitro* descrita no item 2.2. Para o preparo da solução estoque de AC, foram pesados $5,00 \pm 0,05$ mg de AC, adicionou-se 0,03 mL de DMSO e agitou-se por 1 min em

agitador orbital, foram adicionados 10,0 mL de PBS estéril pH 7,4, obtendo-se uma solução de concentração de 1000 $\mu\text{mol/L}$. A diluição para o preparo das suspensões está descrita na tabela 1.

Tabela 1: Diluições de AC para realização dos ensaios de CAM.

Concentração ($\mu\text{mol/L}$)	Alíquota da solução estoque (μL)	Volume final (mL)
5 $\mu\text{mol/L}$	25	5,0
10 $\mu\text{mol/L}$	50	5,0
25 $\mu\text{mol/L}$	125	5,0

2.4 Ensaio de angiogênese em membrana corioalantoica de embrião de galinha

A avaliação da atividade antiangiogênica do AC foi feita através do ensaio da membrana corioalantoica de embrião de galinha (CAM- *corioalantoic membrane assay*), descrito por Auerbach e colaboradores (1974).

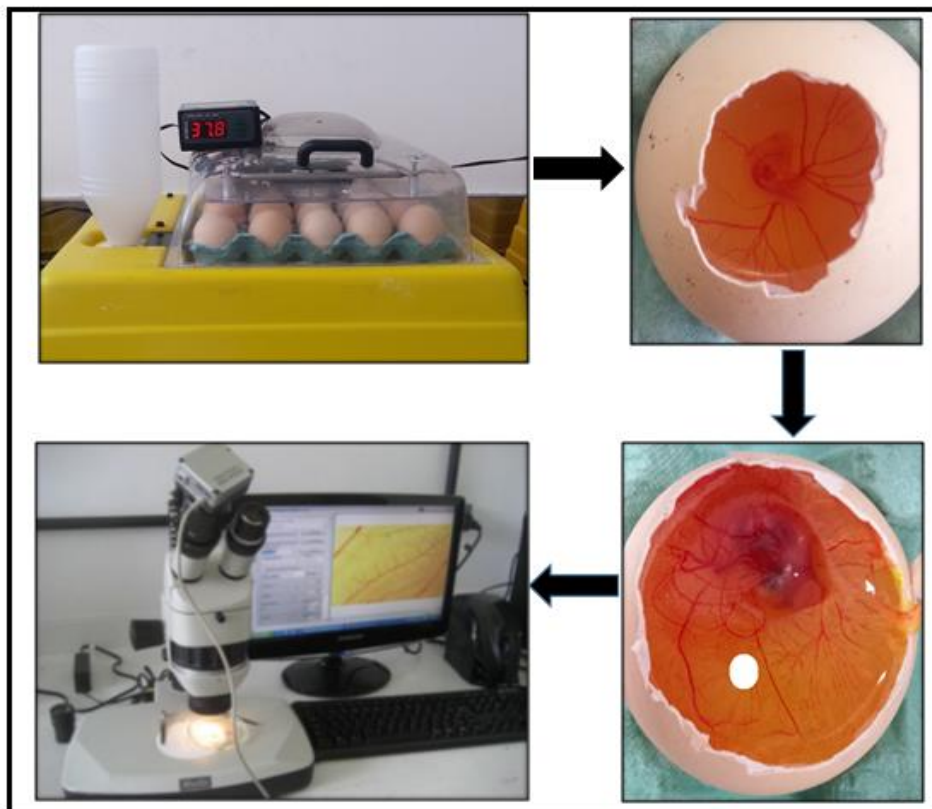
Para a realização da CAM, ovos embrionados da espécie *Gallus domesticus* e da linhagem Ross foram incubados à temperatura de 37 °C e 60% de umidade relativa do ar, na posição horizontal, utilizando uma incubadora automática digital. No 3º dia do desenvolvimento embrionário foi feita uma abertura circular de aproximadamente 1,0 cm de diâmetro na região da câmara de ar da casca dos ovos, descartando-se os ovos inviáveis (não embrionados). A membrana interna da casca foi removida, a fim de expor a membrana corioalantoica e os ovos foram selados com fita adesiva transparente. Com auxílio de um suporte de papel, os ovos foram acondicionados verticalmente na incubadora.

No 5º dia de desenvolvimento, foram colocados sobre a membrana corioalantoica, discos de celulose de tamanho padronizado, em que foram aplicados 20 μL das amostras. Os seguintes grupos de tratamento foram estabelecidos (n=12):

- ✓ controle positivo: solução de bevacizumabe 1 $\mu\text{mol/L}$;
- ✓ controle negativo: solução de PBS pH 7,4 e PBS + DMSO;
- ✓ suspensões de AC (5, 10 e 25 $\mu\text{mol/L}$) (preparo descrito no item 2.3).

Após 24 h, ou seja, no 6º dia de incubação, os grupos foram monitorados e as amostras reaplicadas. No 7º dia de incubação realizou-se a extração das membranas, após prévia fixação com solução de formaldeído a 10% por 10 min, que foram posteriormente fotografadas com uma câmera digital acoplada a um estereomicroscópio, sendo as imagens obtidas pelo *software* Motic Images Plus 2.0, com um aumento padronizado de 20x. As imagens sequenciais ilustrativas do ensaio de angiogênese são mostradas na figura 9.

Figura 9: Imagens sequenciais do procedimento da CAM.



Fonte: Adaptado de VIEIRA, 2011.

Os vasos sanguíneos na região do disco de celulose foram quantificados em função da área (pixels) através do programa ImageJ e os resultados expressos como média percentual \pm desvio padrão. A análise dos resultados encontrados para o grupo controle foi comparada com os diferentes grupos de tratamento. A análise de variância foi feita por ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey, utilizando o programa GraphPad Prism®5 e adotando-se um nível de significância de $\alpha < 0,05$.

A fim de confirmar os resultados obtidos pela análise de imagens, algumas membranas foram selecionadas aleatoriamente e preparadas para análise histológica. As membranas foram fixadas em formol 10%, incluídas em blocos de parafina e os cortes corados por hematoxilina-eosina (HE). Por microscopia óptica, as membranas foram avaliadas quanto à formação de vasos sanguíneos e fotografadas por câmera acoplada ao equipamento.

2.5 Avaliação da segurança e toxicidade de injeções intravítreas de AC em modelo *in vivo*

A avaliação da toxicidade sobre a retina das injeções intravítreas de AC foi realizada em olhos de ratos adultos machos da espécie Wistar. Os animais foram divididos em três grupos contendo quatro animais cada, sendo que, em cada grupo, o olho direito (OD) recebeu por via intravítrea 0,01 mL de uma suspensão de AC, enquanto o olho esquerdo (OE) foi utilizado como controle e recebeu 0,01 mL de PBS pH 7,4 estéril. As concentrações das suspensões de AC testadas foram as mesmas testadas na CAM: 5 µmol/L, 10 µmol/L e 25 µmol/L.

Para a realização das injeções intravítreas, os animais foram previamente anestesiados via injeção intraperitoneal (10 mg/kg de xilasina e 90 mg/Kg de cetamina) e os olhos anestesiados com colírio de cloreto de proximetacaína 0,5%. As injeções foram realizadas com uma seringa de insulina e agulha 30 G, a 2 mm do limbo, com visibilização da agulha na cavidade vítrea e, a fim de evitar vazamentos, esperou-se cerca de 30 segundos para remover a agulha. Fez-se uma avaliação do fundo do olho dos animais por oftalmoscopia binocular indireta, a fim de detectar possíveis alterações oculares que pudessem comprometer os resultados da pesquisa, como por exemplo, hemorragias e/ou descolamento de retina. Além disso, a pressão intraocular foi monitorada durante todo o período de estudo, utilizando-se o tonômetro veterinário.

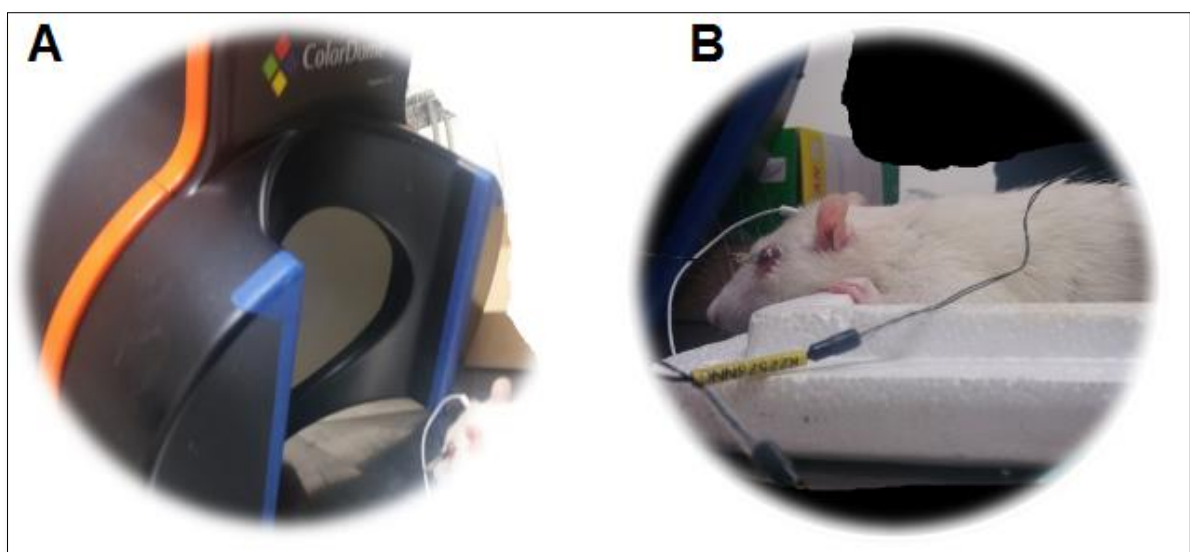
A segurança da administração intravítrea de AC foi avaliada por meio de ensaios eletrorretinográfico e histopatológico dos olhos dos animais.

2.5.1 Estudo funcional da retina por eletrorretinograma

O estudo funcional da retina por eletrorretinograma (ERG) foi realizado antes das injeções intravítreas, 7 e 15 dias após as injeções. Para a sua realização, os animais foram adaptados ao escuro por 12 h, anestesiados via injeção intraperitoneal de 10 mg/Kg de xilasina e 90 mg/Kg de cetamina, as pupilas foram dilatadas com colírio de tropicamida 1% e os olhos anestesiados com colírio de cloreto de proximetacaína 0,5%. Os animais foram posicionados sob um suporte de isopor adaptado à cúpula de Ganzfeld (figura 10 A) e cobertos com uma manta para a manutenção da temperatura corporal.

As respostas ERG foram adquiridas, simultaneamente, nos dois olhos utilizando eletrodo bipolar do tipo lente sobre a córnea (eletrodos ERG Jet, Fabrinal SA, La Chaux-de-Fonds, Suíça); eletrodos do tipo agulha foram fixados subcutâneo na pele, na região frontal, acima dos olhos e o eletrodo-terra foi fixado subcutâneo no dorso do animal (figura 10 B). Os olhos foram estimulados usando um estimulador de LED Ganzfeld (ColorDome™ desktop Ganzfeld, Diagnosys LLC, Littleton, MA).

Figura 10: Exame de eletrorretinografia. (A) Cúpula de Ganzfeld. (B) Posicionamento do animal, dos eletrodos e da lente.



Para exames do tipo escotópico, flashes de luz branca (6500 K) com duração de 4 ms foram conduzidos em 11 *steps*, sendo dois, os principais: a intensidade luminosa de 0,01 cd.s.m⁻² para avaliação da função dos bastonetes e a intensidade luminosa de 3,0 cd.s.m⁻² para avaliação da função dos cones e bastonetes.

Para a realização do ERG fotópico, os animais foram adaptados à luz (luz de fundo de 3,0 cd.s.m⁻²) por 10 min. Em seguida, foi utilizada a intensidade de 3,0 cd.s.m⁻² com duração de 4 ms, seguidas de um sinal Flicker de 30 Hz da mesma intensidade luminosa e duração.

Finalizado o ERG fotópico, as respostas foram amplificadas (filtragem: 0,3-300 Hz) e armazenadas para análise *off-line* usando o *Espion E³* (Diagnosys LLC, Lowell, MA). Os dados foram avaliados a partir de comparações entre as amplitude e tempos implícitos das ondas a e b, sob as intensidades de estímulo luminoso citadas. As comparações foram realizadas tanto para concentração de AC aplicada, quanto para o intervalo de tempo dos exames.

2.5.2 Avaliação histológica

Para confirmar os resultados obtidos no ERG, após a realização do último exame, todos os animais foram eutanasiados por superdosagem de anestésicos e os olhos preparados para análise histológica.

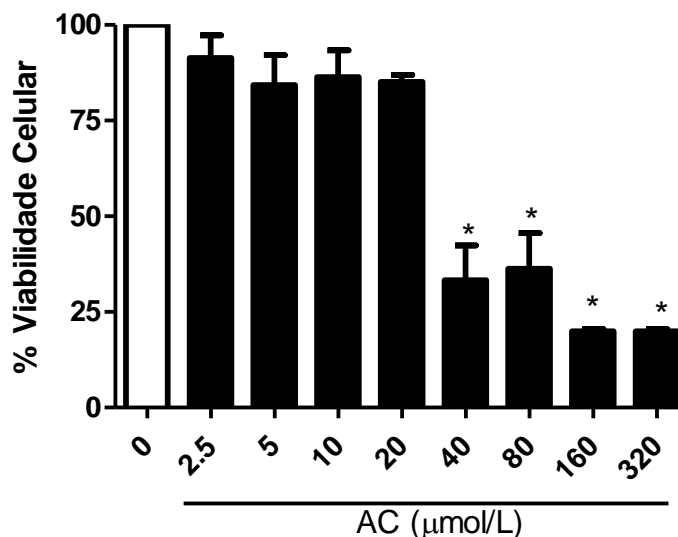
Os olhos foram enucleados e fixados em solução de Davidson (álcool 95%, formaldeído, ácido acético glacial e água destilada) por 24 h. Após este tempo, foram transferidos para uma solução de álcool 70% e foram seccionados próximos ao nervo óptico. As amostras foram incluídas em parafina e os cortes corados com hematoxilina-eosina. Por microscopia óptica, as lâminas foram avaliadas qualitativamente quanto à integridade da retina, levando-se em consideração parâmetros como a espessura e organização de cada camada e comparando-se os olhos que receberam a injeção do AC com o controle.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação *in vitro* da citotoxicidade do AC sobre células do epitélio pigmentado da retina (ARPE-19)

O método da SRB baseia-se na habilidade desse corante ligar-se aos aminoácidos básicos presentes nas proteínas das células viáveis fixadas pelo ácido tricloroacético (TCA). Dessa maneira, quanto maior a quantidade de SRB ligada às proteínas, menor será a citotoxicidade das amostras em teste. A figura 11 apresenta a porcentagem de células viáveis para concentrações crescentes de AC em relação ao grupo controle (tratado com meio de cultura) após 48 h.

Figura 11: Viabilidade de células da linhagem ARPE-19 mediante a presença de concentrações crescentes de AC (2,5-320 $\mu\text{mol/L}$) após 48 h.

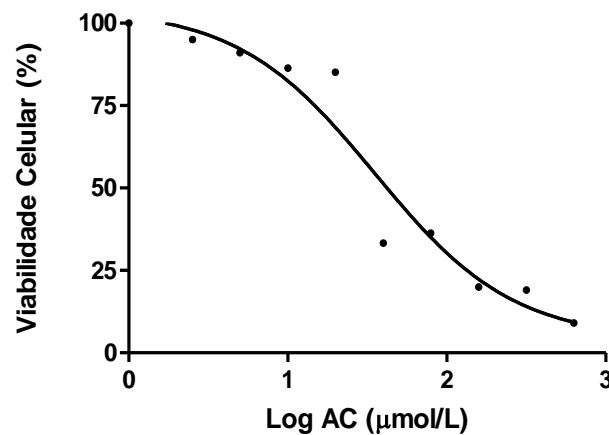


*Significativamente diferente do grupo controle. Valor-p <0.05

De acordo com a análise estatística realizada, não foram observadas diferenças significativas entre o controle e as células tratadas com doses de AC na faixa de 2,5 a 20 $\mu\text{mol/L}$. Entretanto, para os grupos tratados com concentrações superiores a 40

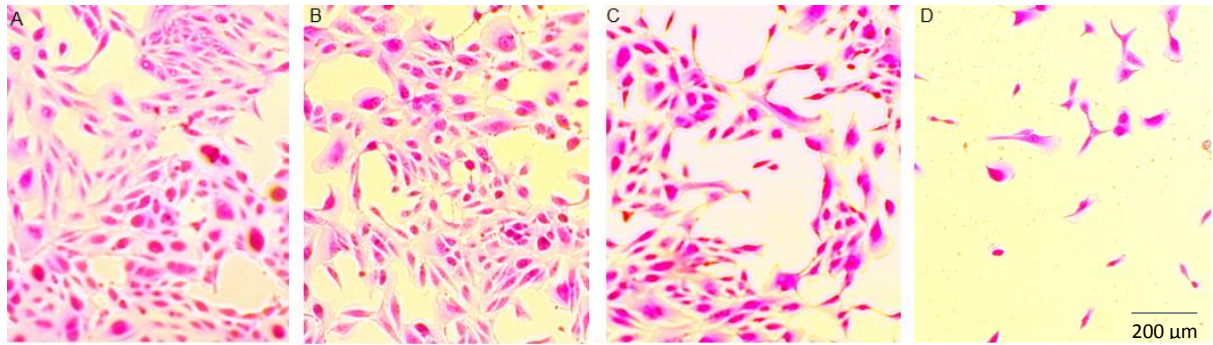
$\mu\text{mol/L}$, notou-se uma inibição do crescimento celular superior a 50%, o que permite afirmar que o AC produziu um efeito citotóxico dose-dependente. Dessa forma, foi possível calcular a IC_{50} a partir da curva dose-resposta (figura 12), obtendo-se um valor de $35,45 \mu\text{mol/L}$, após 48 h de tratamento.

Figura 12: Curva da viabilidade celular em linhagem ARPE-19 após tratamento com AC por 48 h.



Avaliações qualitativas referentes às variações morfológicas e viabilidade na presença de diferentes doses de AC também foram realizadas. Após a coloração por SRB, as células foram fotografadas por câmera acoplada ao microscópio óptico e observou-se uma menor quantidade de células aderidas com o aumento da dose de tratamento, o que corrobora com os resultados provenientes da análise estatística. Além disso, pode-se inferir que não foram visualizadas variações na morfologia celular, para concentrações inferiores à IC_{50} . Entretanto, altas doses de AC resultaram em alterações morfológicas, como diminuição do tamanho, conforme ilustrado na figura 13.

Figura 13: Células da linhagem ARPE-19 coradas com SRB fotografadas em aumento de 5x, em escala de 200 $\mu\text{mol/L}$. (A) Controle (tratamento com meio de cultura). (B) Tratamento por 48 h com AC 20 $\mu\text{mol/L}$. (C) Tratamento por 48 h com AC 40 $\mu\text{mol/L}$. (D) Tratamento por 48 h com AC 320 $\mu\text{mol/L}$.



3.2 Ensaio de angiogênese em membrana corioalantoica de embrião de galinha

A membrana corioalantoica embrionária de galinha (CAM) é um modelo *in vivo* amplamente utilizado, devido ao seu baixo custo, facilidade, simplicidade de execução e por representar uma alternativa ao uso de modelos animais mais onerosos (KUE et al., 2015; MORENO-JIMÉNEZ et al., 2016).

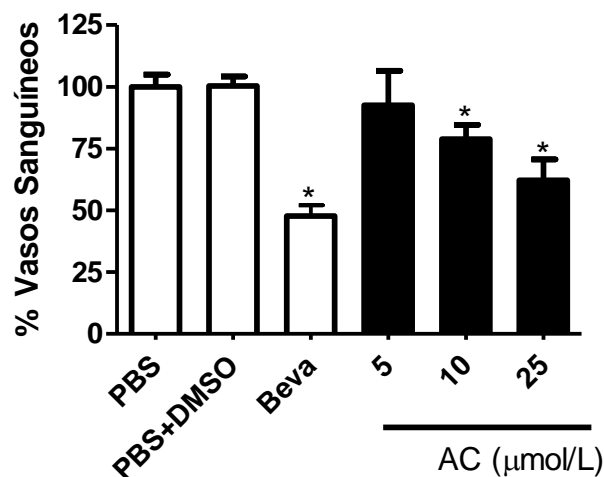
A CAM é bastante vascularizada e se desenvolve em torno do conteúdo interno do ovo, separada da parede interna pela membrana da casca, sendo responsável pela promoção da troca de gases entre o embrião e a atmosfera. Ela é formada entre o 3^o e 6^o dia de desenvolvimento, com a fusão do córion com o alantóide. Os vasos primitivos continuam a proliferar-se e diferenciar-se em um sistema arteriovenoso até o 8^o dia, com proliferação rápida até o 11^o dia, quando o índice mitótico passa a decrescer rapidamente e o sistema vascular atinge a sua disposição final no 18^o dia, pouco antes de sua eclosão (21^o dia) (EGOSHI et al., 2015).

De acordo com o National Institutes of Health (EUA) é permitido o uso de embriões de galinha sem restrições éticas ou prévia aprovação de protocolo, com a justificativa de que os ensaios têm seu início e fim antes do nascimento dos animais. O desenho experimental deve ser cuidadosamente planejado, a fim de reduzir o número de embriões utilizados (KUE et al., 2015).

Com o objetivo de investigar a potencial atividade antiangiogênica do AC, membranas corioalantoicas foram tratadas com suspensões de AC de diferentes concentrações: 5, 10 e 25 $\mu\text{mol/L}$. Essas concentrações foram escolhidas a partir do resultado de IC_{50} encontrado no estudo de citotoxicidade descrito no item 3.1.

Como o AC é uma substância praticamente insolúvel em água e em tampão PBS (pH 7,4), para o preparo da suspensão estoque em tampão PBS pH 7,4, foi necessária a utilização de 0,3% de DMSO (v/v). Diante disso, julgou-se necessário avaliar se soluções compostas de tampão PBS acrescido de 0,3% de DMSO poderiam interferir na análise da atividade antiangiogênica do AC. Comparou-se por ANOVA de uma via (pós-teste de Tukey) os grupos tratados com tampão PBS ($100 \pm 10\%$), e PBS+DMSO ($100,3 \pm 3,8\%$) e verificou-se a inexistência de diferença significativa na quantidade de vasos sanguíneos, eliminando-se o viés da interferência da presença do DMSO nos resultados (figura 14).

Figura 14: Ensaio da membrana corioalantoica realizado com PBS, PBS+DMSO (controles), bevacizumabe e suspensões de AC. O percentual de vasos sanguíneos dos grupos tratados foi expresso em função da porcentagem de vasos sanguíneos do grupo controle, fixado em 100%.



*Significativamente diferente do grupo controle. Valor-p <0.05.

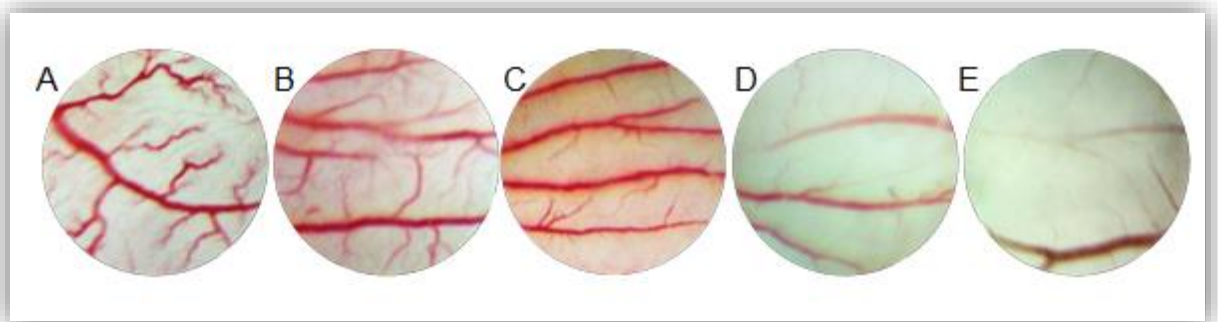
Como controle positivo, foi utilizada a solução de bevacizumabe 1 $\mu\text{mol/L}$, uma vez que se trata de um fármaco de ação antiangiogênica comprovada e utilizado na prática

clínica. O tratamento das membranas corioalantoicas com bevacizumabe provocou uma redução de 52,3% na porcentagem dos vasos sanguíneos em relação ao grupo controle.

Em relação aos grupos tratados com suspensões de AC, observou-se que quanto maior a concentração de AC aplicada, maior foi a redução do percentual de vasos sanguíneos na área de aplicação. Para o grupo que recebeu o tratamento com a dose de 10 $\mu\text{mol/L}$, verificou-se que houve uma redução de cerca de 21,3% na vascularização. No grupo tratado com dose de 25 $\mu\text{mol/L}$, observou-se uma diminuição de aproximadamente 40% da porcentagem de vasos sanguíneos. Ambos grupos foram considerados estatisticamente diferentes do grupo controle.

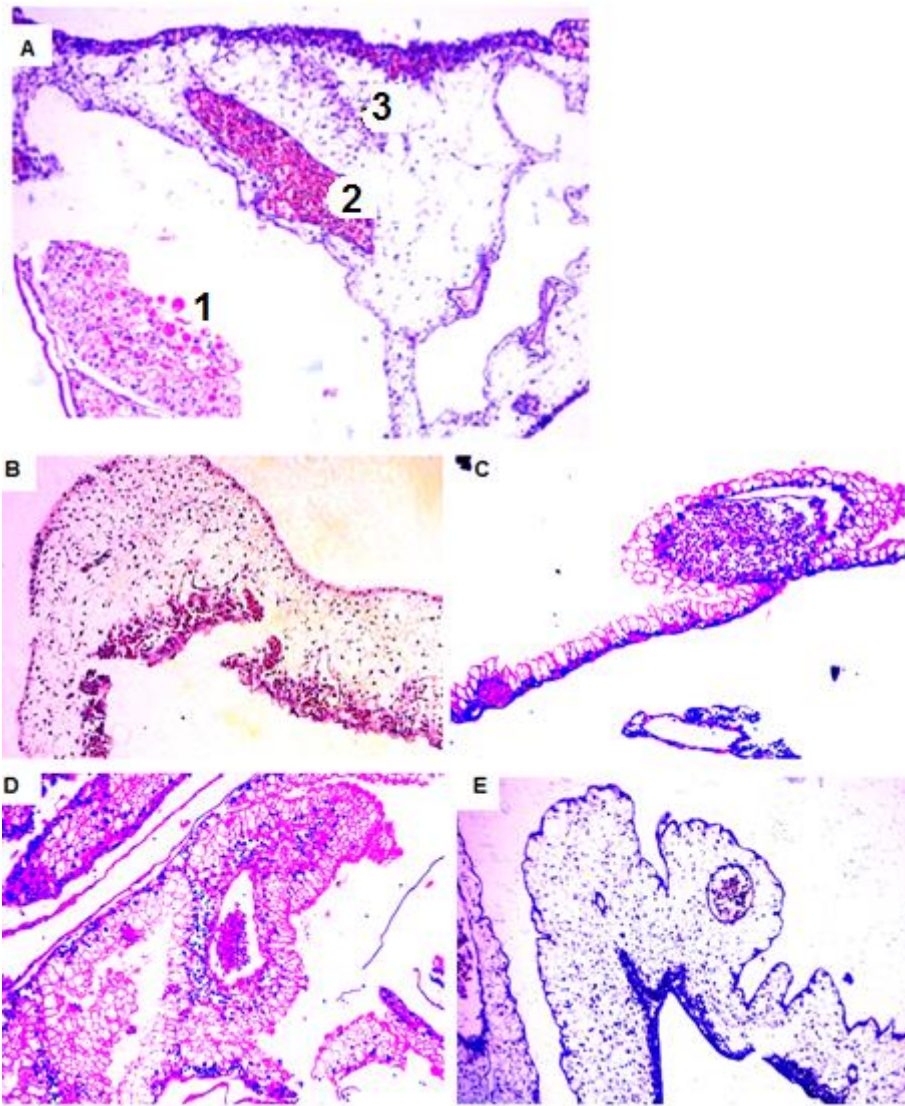
Adicionalmente, além da redução da angiogênese dos pequenos vasos e capilares, houve uma diminuição do diâmetro dos grandes vasos preexistentes (figura 15).

Figura 15: Imagens da CAM de embriões de 7 dias submetidos aos diferentes grupos de tratamento avaliados. (A) PBS (B) AC 5 $\mu\text{mol/L}$ (C) AC 10 $\mu\text{mol/L}$ (D) AC 25 $\mu\text{mol/L}$ (E) Bevacizumabe 1 $\mu\text{mol/L}$.



Os resultados acima descritos foram confirmados pela avaliação histológica das membranas. De acordo com a figura 16, a presença de vasos sanguíneos mais calibrosos, bem como um maior número de processos de angiogênese foram observados nas membranas tratadas com PBS. Para as membranas que foram submetidas ao tratamento com AC, notou-se que quanto maior a dose de AC utilizada, menor a ocorrência de processos de neovascularização. Além disso, não foram observados em nenhum grupo sinais de infecção, fibrose ou necrose.

Figura 16: Cortes histológicos (corados por HE) da CAM de embriões de 7 dias, fotografados em aumento de 10x, em escala de 100 $\mu\text{mol/L}$. (A) Controle negativo (PBS) – em destaque (1) sinais de hiperemia (2) formação de vasos sanguíneos (3) presença de elementos inflamatórios. (B) AC 5 $\mu\text{mol/L}$. (C) AC 10 $\mu\text{mol/L}$. (D) AC 25 $\mu\text{mol/L}$. (E) Controle positivo (bevacizumabe 1 $\mu\text{mol/L}$).



Dessa forma, pontua-se que o ensaio de angiogênese do AC em modelo da CAM apresentou resultados satisfatórios e sugere-se a potencialidade da aplicação desta substância na terapia antiangiogênica.

3.3 Avaliação da segurança e toxicidade de injeções intravítreas de AC em modelo *in vivo*

O sucesso das injeções intravítreas foi comprovado por meio da avaliação clínica do fundo de olho dos animais 24 h após o procedimento. Conforme demonstrado na figura 17, observa-se a ausência de hemorragias, descolamento de retina ou qualquer alteração ocular que possa comprometer os resultados do estudo.

Figura 17: Imagens do fundo de olho de rato macho Wistar. (A) Retina controle (B) Retina 24 h após a administração intravítrea de AC – a seta indica uma região de embaçamento, devido à formação de depósito no local da injeção.

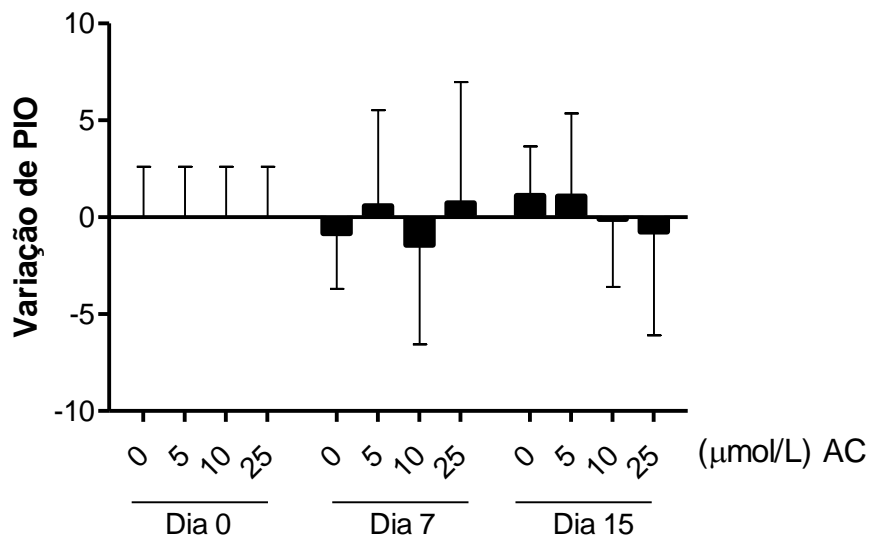


Um aspecto relevante da administração intravítrea do AC foi a formação de um depósito no local da injeção (indicado pela seta - figura 17 B), comportamento que pode ser atribuído à baixa solubilidade do AC em ambiente aquoso (corpo vítreo), o que permitiu presumir que o AC tenha uma ação de longa duração. Resultados semelhantes a esse foram descritos para outros fármacos hidrofóbicos, como a triancinolona acetona (TOTH; SEIDER; CHEN, 2016).

Além da avaliação do fundo de olho, a pressão intraocular (PIO) dos animais também foi monitorada durante todo o experimento. A figura 18 apresenta a variação da PIO dos olhos dos animais em relação à PIO inicial (dia 0 – período anterior à administração intravítrea das suspensões de AC). A variação da pressão foi calculada,

adotando-se como controle (zero) a média da pressão intraocular de todos os animais utilizados no estudo, em momento anterior à administração intravítrea (Dia 0).

Figura 18: Variação da pressão intraocular dos olhos dos ratos Wistar.



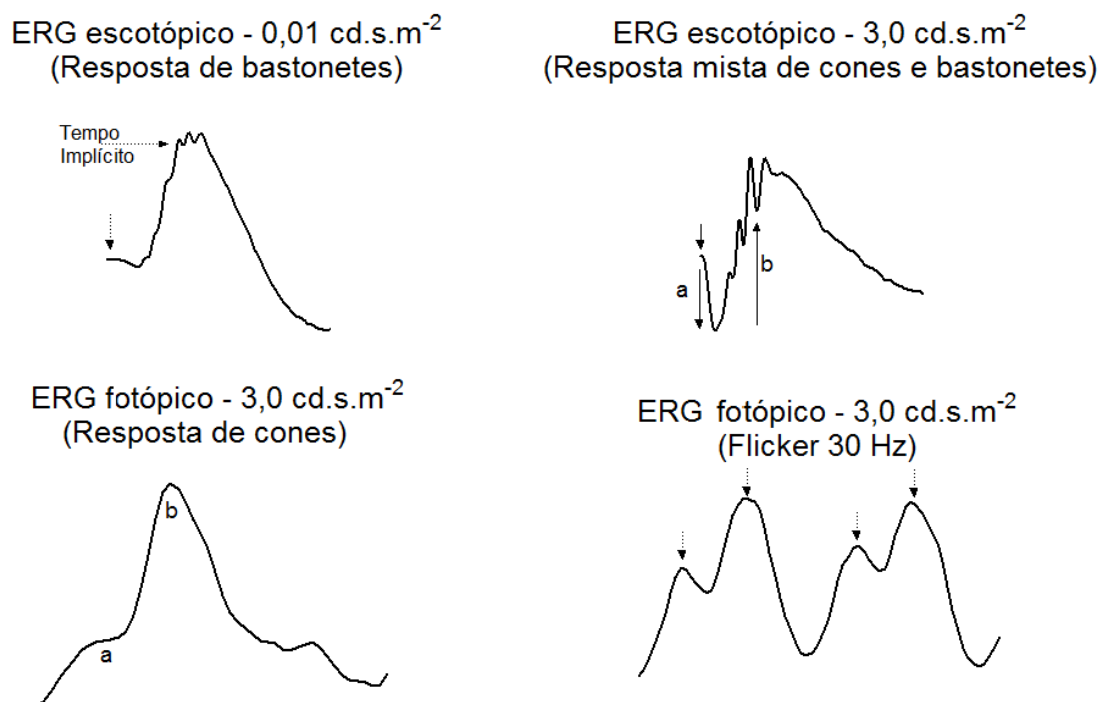
Os dados foram avaliados por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni, utilizando o programa GraphPad Prism®5 e adotando-se um nível de significância de $\alpha < 0,05$. Verificou-se a inexistência de diferença significativa, o que permitiu afirmar que a PIO manteve-se estável durante todo o experimento.

3.3.1 Estudo funcional da retina por eletrorretinograma

O ERG de campo total é um exame não-invasivo e o mais utilizado em experimentação animal para avaliação funcional da retina e no diagnóstico de possíveis alterações da retina (BOYES et al., 2016; HUANG et al., 2015; NGUYEN et al., 2016). O ERG representa a atividade elétrica gerada na retina em resposta ao estímulo luminoso difuso (flashes). Este procedimento permite o registro de uma onda bifásica, sob a forma senoidal, e os dois componentes considerados com maior frequência na avaliação da integridade da retina são as ondas a e b (BENCHORIN et al., 2017; CLARCK; KRAFT, 2012). A onda a é uma deflexão negativa resultante da

hiperpolarização dos fotorreceptores (cones e bastonetes), mensurada da linha de base até o pico da mesma e apresenta dois componentes: um rápido, resultante da reação do fotorpigmento à presença de luz; e um lento que constitui a transmissão do sinal gerado pelo fotorreceptor que resulta da diminuição dos níveis de K^+ nos fotorreceptores pela ação das células de Muller. A onda b é uma deflexão positiva, originada na camada nuclear interna (células bipolares e de Muller) (HUANG et al., 2015). Essas ondas são caracterizadas por elementos temporais (latência, tempo implícito e duração) e bioelétricos (medida de amplitude) (figura 19).

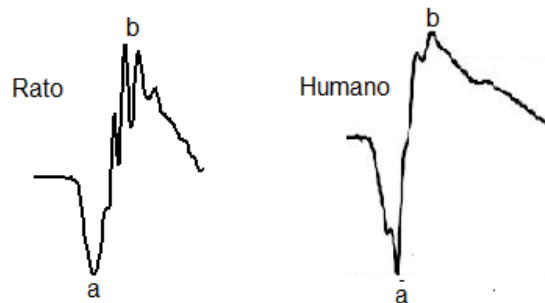
Figura 19: Formas de ondas obtidas de acordo com o estímulo emitido. Parâmetros das ondas do ERG a serem medidos durante a análise. As principais medidas são de amplitude e de tempo implícito das ondas a e b.



Fonte: Adaptado de JACOB et al., 2011.

Além disso, ressalta-se que o padrão de ondas encontrado em ratos é similar ao humano (figura 20), o que viabiliza a aplicação do ERG em modelos murinos para avaliação da toxicidade sobre a retina de candidatos a novos fármacos.

Figura 20: ERG escotópico (resposta mista de cones e bastonetes) de rato albino e humano são caracterizados por padrão similar, diferindo em amplitude e tempo implícito.

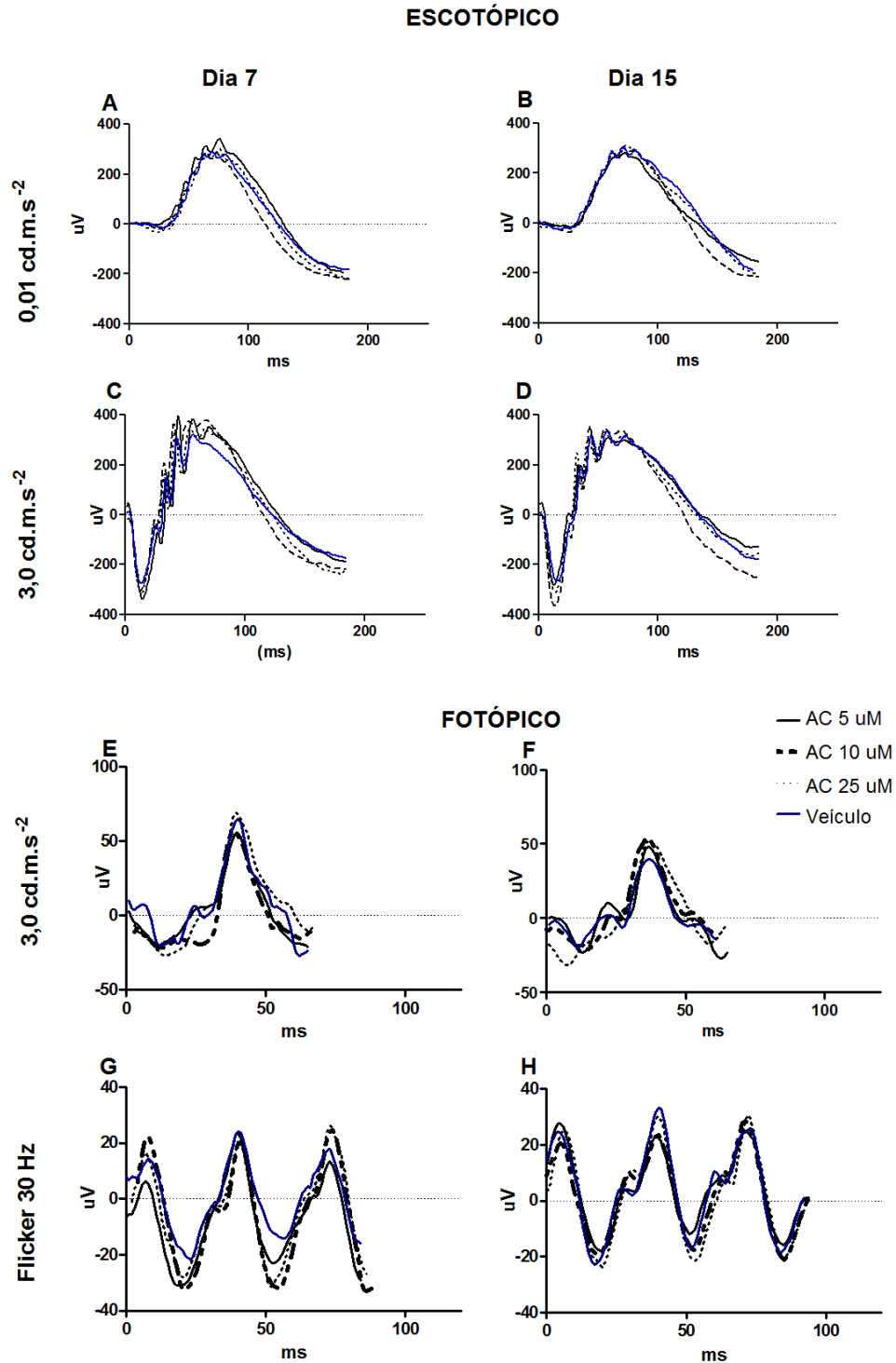


Fonte: Adaptado de GASPARIN, 2013.

As análises do ERG foram realizadas por meio da comparação entre as amplitudes e os tempos implícitos das ondas a e b sob diferentes intensidades de estímulo luminoso e após adaptação ao claro e ao escuro. De acordo com as informações obtidas por análises da onda, foi possível avaliar se houve algum indício de degeneração da retina e, conseqüentemente, a toxicidade da substância administrada.

A figura 21 apresenta a média de respostas escotópicas ($0,01$ e $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$), fotópicas ($3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$) e Flicker ($3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$ e frequência de 30 Hz) obtidas do ERG nos períodos predeterminados.

Figura 21: Curva do eletrorretinograma (ERG) nas condições escotópica (0,03 e 3,0 cd.s.m⁻²) e fotópica (3,0 cd.s.m⁻²; Flicker 30 Hz) 7 e 15 dias após injeção intravítrea de diferentes doses de AC. As curvas são comparadas àquelas dos olhos em que foram administrados apenas o veículo.



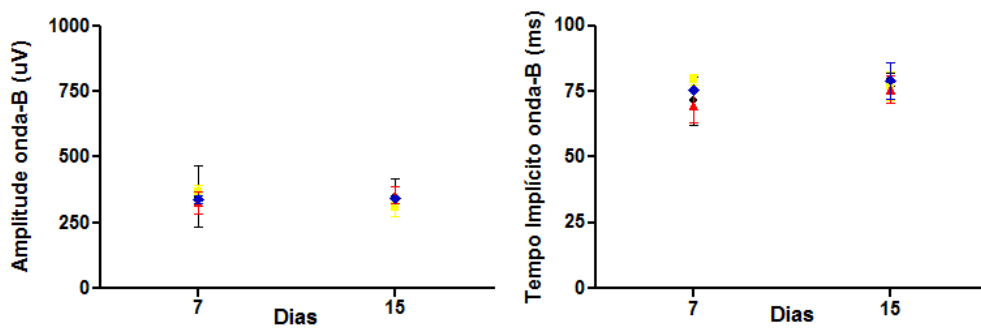
Os dados foram avaliados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk, utilizando o programa GraphPad Prism®5 e adotando-se um nível de significância de $\alpha < 0,05$, obtendo-se um valor de $p < 0,0001$. Além disso, como se tratam de dados não-paramétricos, prosseguiu-se com o teste de Kruskal-Wallis ($\alpha < 0,05$) e pós-teste de Dunn. De acordo com a análise estatística, não foram observadas diferenças significativas nos padrões das curvas eletrorretinográficas em função do dia de experimento.

Desta forma, a fim de avaliar a ocorrência de alterações significativas nas amplitudes e no tempo implícito das ondas a e b nas condições escotópicas e fotópicas, durante os 15 dias de estudo, as variáveis analisadas, expressas sob a forma de média \pm desvio padrão, foram apresentadas na figura 22.

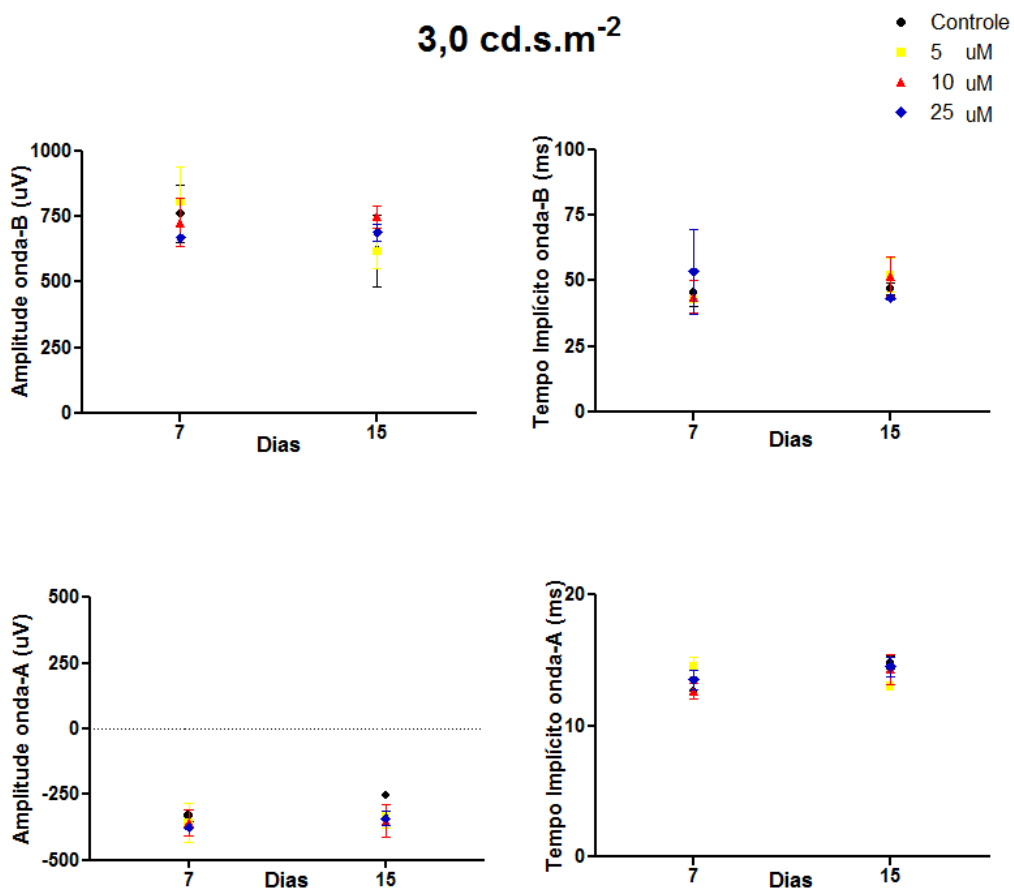
Figura 22: Média \pm desvio padrão da amplitude e tempo implícito das ondas a e b nas condições escotópica ($0,03$ e $3,0$ cd.s.m^{-2}) e fotópica ($3,0$ cd.s.m^{-2} , flicker 30 Hz) 7 e 15 dias após injeção intravítrea de diferentes doses de AC. Os valores de referência utilizados levam em consideração os olhos em que foram administrados apenas o veículo.

ERG ESCOTÓPICO

$0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$

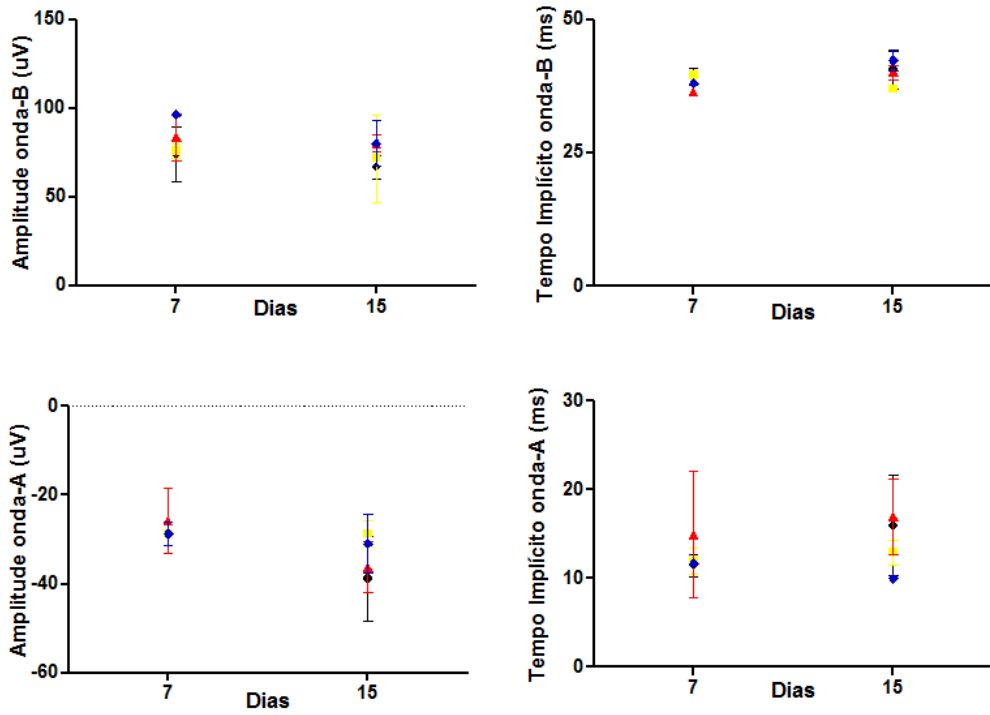


$3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$



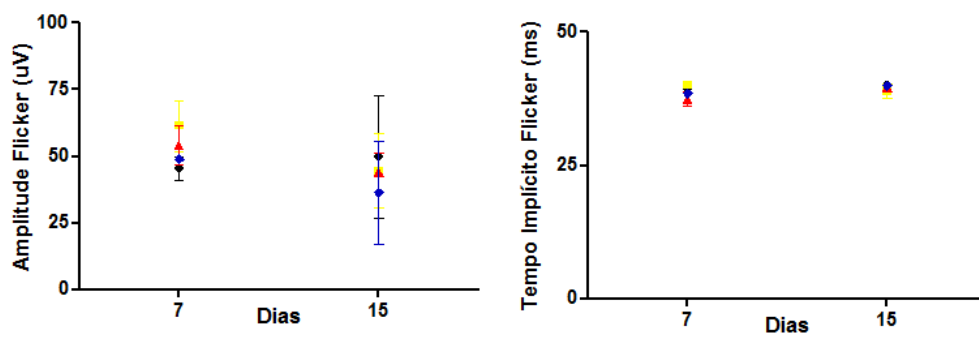
ERG FOTÓPICO

$3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$



FLICKER - 30 Hz

- Controle
- 5 uM
- ▲ 10 uM
- ◆ 25 uM



Os dados foram avaliados por ANOVA de duas vias ($\alpha < 0,05$) com pós-teste de Bonferroni, a fim de se comparar as alterações decorrentes dos dias e das concentrações avaliadas, tendo-se como referência os olhos controles.

Foram encontradas diferenças estatísticas para o tempo implícito da onda a do escotópico do grupo tratado com a dose de 5 $\mu\text{mol/L}$ e para o tempo implícito do Flicker no grupo tratado com a concentração de 10 $\mu\text{mol/L}$. Entretanto, em ambos os casos, a diferença absoluta entre controle e tratamento foi inferior a 20%, podendo-se dizer que não apresenta relevância clínica (PETERS et al., 2017).

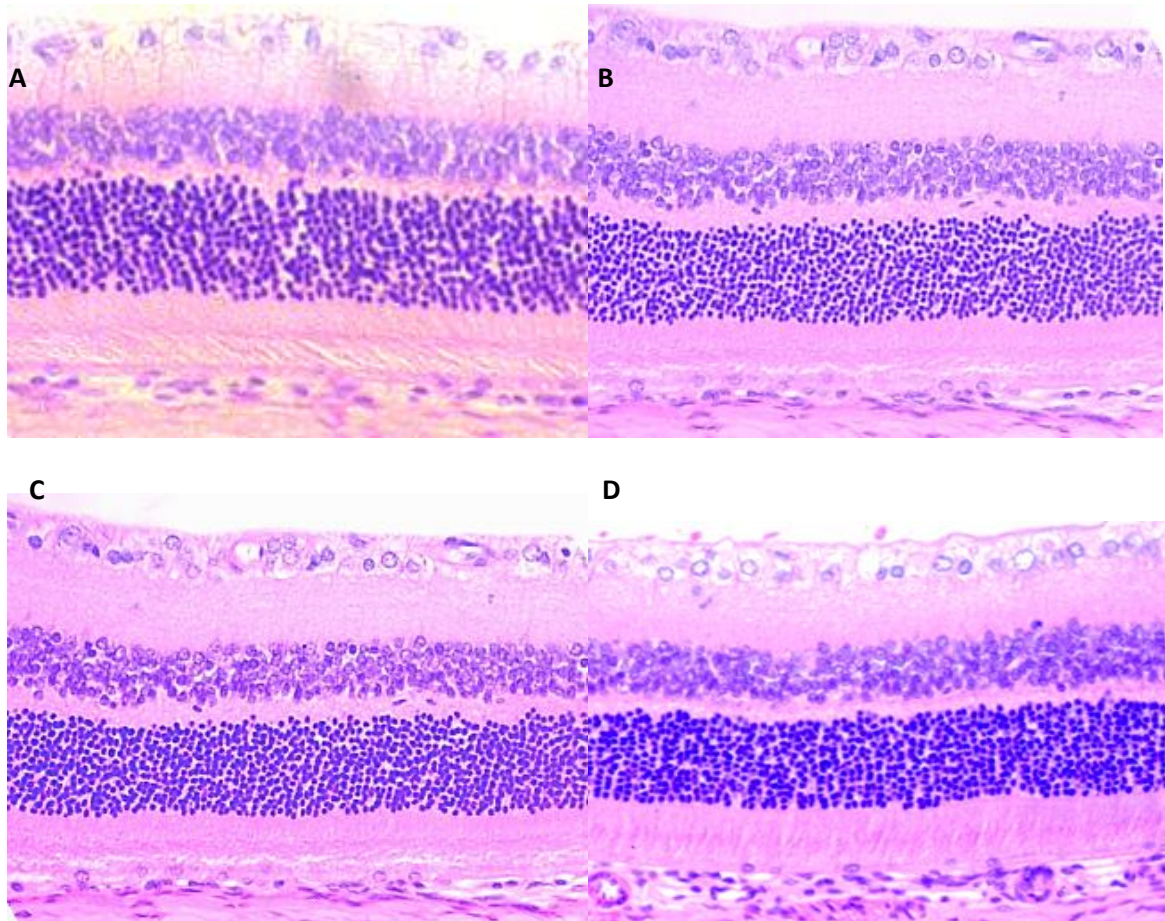
Dessa forma, como as respostas obtidas para os olhos que receberam tratamento não foram diferentes daquelas dos olhos controle, pode-se inferir que a administração intravítrea de AC em concentrações de até 25 $\mu\text{mol/L}$ não apresentou efeitos tóxicos sobre a retina e portanto, podem ser consideradas seguras para uso oftálmico.

3.3.3 Avaliação histológica

A fim de confirmar a ausência da toxicidade relacionada à administração intravítrea de AC observada durante os estudos pré-clínicos e análise de ERG, avaliou-se a estrutura e a organização da retina após 15 dias de estudo (figura 23).

Observou-se que a organização das camadas da retina dos olhos dos animais que receberam suspensões de AC mostrou-se semelhante à observada nos olhos que receberam o veículo. Além do mais, não houve evidências de desalinhamento, de diminuição da espessura ou do número de células das camadas da retina. Também não foram encontrados sinais de necrose, fibrose ou presença de infiltrado inflamatório e notou-se que a estrutura da retina manteve-se preservada em todas as condições analisadas.

Figura 23: Microscopia óptica de retina de rato corada por HE no tempo de 15 dias após a injeção intravítrea de (A) veículo; (B) suspensão AC 5 $\mu\text{mol/L}$; (C) suspensão AC 10 $\mu\text{mol/L}$; (D) suspensão AC 25 $\mu\text{mol/L}$.



4 CONCLUSÃO

A partir da análise dos resultados do ensaio da SRB, foi demonstrado que o AC não apresenta citotoxicidade em concentrações inferiores a 35,5 $\mu\text{mol/L}$ para as células da linhagem ARPE-19 após período de 48 h. Além disso, a ação antiangiogênica do AC foi comprovada em um modelo de estudo *in vivo*, empregando-se membrana corioalantoica do embrião de galinha. Em concentrações superiores a 5 $\mu\text{mol/L}$ e inferiores a 25 $\mu\text{mol/L}$, o AC apresentou ação antiangiogênica e não foi observado nenhum sinal de toxicidade. Além disso, a administração intravítrea de AC em olhos de ratos Wistar não resultou em sinais de toxicidade sobre a retina por um período de 15 dias.

Diante dos resultados obtidos, sugere-se que o AC seja uma alternativa promissora para o tratamento de doenças causadoras de neovascularização da retina. Dessa forma, visando contornar os possíveis eventos adversos que as repetidas administrações intravítreas podem causar, neste trabalho também foram desenvolvidos sistemas de liberação prolongada para carrear o AC.

CAPÍTULO II:
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO
BIOLÓGICA DE IMPLANTES INTRAVÍTREOS CONTENDO ÁCIDO
COROSÓLICO

1 MATERIAIS

1.1 Substâncias, reagentes e outros materiais

-Ácido corosólico (massa molar 472,7 g/mol), teor de pureza de 98%- Sigma Aldrich, St Louis, EUA.

-Ácido corosólico (massa molar 472,7 g/mol), produto natural cedido pelo Núcleo de Estudo e Pesquisa em Plantas Medicinais do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil.

-Ácido poli (D,L-lático-co-glicólico) na proporção de 50:50 – Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Alemanha.

-Metanol grau CLAE – Merck Brasil; Rio de Janeiro, Brasil.

-Acetonitrila grau CLAE – Merck Brasil; Rio de Janeiro, Brasil.

-Água ultrapurificada – Mili Q plus, Millipore, EUA; Billerica, EUA.

-Ácido fórmico grau analítico, Synth, Brasil.

-Dimetilsulfóxido (DMSO), Synth, Brasil.

-Fosfato de sódio bibásico anidro, Synth, Brasil.

-Fosfato de potássio monobásico anidro, Synth, Brasil.

-Cloreto de sódio, Synth, Brasil.

-Tampão salina-fosfato 1M, Sigma Aldrich, St Louis, EUA.

-Ovos embrionados da espécie *Gallus domesticus* e da linhagem Ross foram adquiridos da empresa Rivelli (Mateus Leme, MG, Brasil).

1.2 Equipamentos e acessórios

- Balança Analítica, Sartorius.
- Banho Ultrassônico, Unique.
- Espectrofotômetro UV-Visível, Thermo Scientific® Evolution 201.
- Coluna C18, fase reversa, de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro e tamanho de partículas de 5 µmol/L (LiChrosorb® RP-18 -5 µmol/L, Merck).
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, Agilent® 1260 Infinity Séries bomba G1311B, injetor automático G1329B, detector DAD G4212B e software EzChrom Elite X.
- Membrana de celulose regenerada 0,45 µmol/L, Hexis Científica.
- Liofilizador modelo K105, Biobrás.
- Trocafer Transescleral, Accurus® 25 – Gauge System, Alcon.
- Espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo Frontier Single Range – MIR.
- Termobalança modelo DTG60, Shimadzu.
- Calorímetro modelo DSC50, Shimadzu.
- Microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6360LV.
- Estereomicroscópio (Motic® equipado com câmera Motic Cam®)
- Incubadora TE-424, TECNAL.
- Incubadora automática digital, Premium Ecologica ®.

2 MÉTODOS

2.1 Desenvolvimento de sistemas poliméricos biodegradáveis de implantação intravítrea

Implantes de PLGA 50:50 contendo 15% de AC foram preparados por simples adição de uma dispersão de AC em 90 µL de DMSO a uma solução do polímero PLGA 50:50 em 10 mL acetonitrila, obtendo-se uma suspensão a 1% p/v. Em seguida, esta suspensão foi congelada em nitrogênio líquido por 1 h e submetida ao processo de liofilização por 24 h. A mistura liofilizada foi moldada a quente, de acordo com a metodologia descrita por Fialho e colaboradores (2007). Os implantes foram preparados sob a forma de bastões utilizando-se uma placa de Teflon® na temperatura entre 100 e 120 °C. Também foram preparados implantes sem AC (branco) usando este mesmo procedimento.

O peso médio dos implantes obtidos foi calculado a partir de dez unidades selecionadas aleatoriamente. O resultado foi expresso em função da média ± desvio padrão absoluto.

2.2 Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação do AC

2.2.1 Desenvolvimento do método analítico

O método de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) foi desenvolvido para a determinação do teor de AC nos implantes obtidos e para a avaliação do perfil de liberação *in vitro*.

O desenvolvimento desse método foi baseado na literatura disponível: ALVARADO et al., 2015; FENG et al., 2016; JOSHI et al., 2013; LI, B.; WU; LI, 2014; LI et al., 2014a; LI, J. et al., 2014b, levando-se em consideração as propriedades físico-químicas do AC e do excipiente da formulação (PLGA 50:50).

Primeiramente, foram definidas as condições experimentais, como: comprimento de onda de detecção, composição da fase móvel, fluxo, temperatura de forno, volume de injeção e tempo de corrida. Para esse fim, foi utilizada uma solução padrão de AC na concentração de 200 µg/mL em metanol.

Definidas as condições, a fim de assegurar a confiabilidade dos resultados, o método foi validado de acordo com a RDC 166/2017 (BRASIL, 2017). Os parâmetros avaliados foram: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez.

2.2.2 Validação do método analítico

Seletividade

A seletividade foi avaliada através da comparação dos picos obtidos para a análise de solução de AC a 200 µg/mL, solução diluente (MeOH), fase móvel (MeOH: H₂O: HCOOH), solução do placebo (PLGA) e uma amostra de tampão PBS pH 7,4 (componentes e quantidades na tabela 2), que foi utilizado no teste de liberação *in vitro*.

Tabela 2: Composição do tampão PBS pH 7, 4

Componentes	Quantidade (g)
Cloreto de sódio	6,0
Cloreto de potássio	0,15
Fosfato de sódio dibásico dodecahidratado	1,075
Fosfato de potássio monobásico	0,15
Água destilada	q.s.p 1000 mL

Fonte: Farmacopeia brasileira 5. ed.

As soluções contendo AC e/ou PLGA (50:50) foram preparadas da seguinte forma:

✓ *Solução estoque de AC*

Foram pesados $5 \pm 0,05$ mg do padrão de AC em papel vegetal, utilizando balança analítica. Transferiu-se, quantitativamente, com o auxílio de 3 mL de metanol, para um balão volumétrico calibrado de 5 mL. Posteriormente, agitou-se por 5 min em agitador orbital. Completou-se o volume com solução diluente e homogeneizou. A concentração final obtida foi de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

✓ *Solução placebo PLGA 50:50 estoque*

Foram pesados $10,0 \pm 0,1$ mg do PLGA (50:50) em papel vegetal, utilizando balança analítica. Transferiu-se, quantitativamente, para um balão volumétrico calibrado de 5 mL. Adicionou-se q.s. de acetonitrila, completou-se o volume com solução diluente e homogeneizou-se o conjunto. A concentração final obtida para essa solução foi de 2000 $\mu\text{g/mL}$.

Estabilidade

A fim de verificar a estabilidade do analito, amostras das soluções contendo AC e da solução de placebo fortificado com AC foram armazenadas em temperatura ambiente por 24 h e reinjetadas no cromatógrafo sob as mesmas condições analíticas. Os resultados da análise do padrão de AC e do placebo fortificado com AC foram comparados aos resultados dessas mesmas amostras, analisadas imediatamente após o preparo.

✓ A solução de placebo fortificado foi preparada da seguinte forma:

Um volume de 2,5 mL da solução placebo e de 1,0 mL da solução estoque de AC foram adicionados em um balão volumétrico de 5 mL, sendo obtida uma concentração final do fármaco de 200 $\mu\text{g/mL}$ e do placebo de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (1:5).

Linearidade

Para avaliação da linearidade, foram preparadas, em triplicata, soluções estoque de AC na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ em metanol. A partir dessas soluções e utilizando

a técnica de diluição seriada, foram obtidas novas 6 concentrações teóricas de AC (50, 100, 150, 200, 250 e 300 µg/mL), conforme ilustrado na tabela 3.

Tabela 3: Soluções preparadas para construção da curva analítica e quantificação do AC.

Solução	Balão Volumétrico (mL)	Alíquota da solução estoque (µL)	Concentração teórica final (µg/mL)
25 %	1,0	50,0	50
50 %	1,0	100,0	100
75 %	1,0	150,0	150
100 %	1,0	200,0	200
125 %	1,0	250,0	250
150 %	1,0	300,0	300

Após realizadas as diluições, todas as soluções foram filtradas em membrana de celulose regenerada 0,45 µmol/L e injetadas em triplicata no cromatógrafo, registrando-se os valores das áreas.

Os dados obtidos foram tratados estatisticamente para a determinação da equação da reta (método dos mínimos quadrados) e dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r²), utilizando o programa Action Stat® (EstatCamp, Unicamp, Brasil).

Precisão

A precisão foi determinada através de nove determinações, ou seja, três concentrações (100, 200, 300 µg/mL), com três réplicas para cada concentração. As diluições a partir da solução estoque da amostra foram realizadas de acordo com o descrito na tabela 3.

Foi avaliada a repetitividade (intracorrída) e a precisão intermediária (intercorrída).

Exatidão

A exatidão foi determinada pela relação entre a concentração teórica e a concentração média analisada experimentalmente, determinando a porcentagem de recuperação do analito adicionado ao placebo (PLGA 50:50). Foram realizadas nove determinações, ou seja, três concentrações de AC (100, 200, 300 µg/mL) contaminadas com PLGA 50:50.

Limite de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com as Equações 1 e 2.

$$LD = 3,3x \frac{DPa}{b} \quad (1)$$

$$LQ = 10x \frac{DPa}{b} \quad (2)$$

Em que:

b = inclinação da curva de calibração

DP_a= Desvio padrão, que pode ser calculado a partir:

- a) Do desvio padrão do intercepto com o eixo Y de no mínimo 3 curvas de calibração contendo concentrações próximas ao suposto LD.
- b) Do desvio padrão residual da linha de regressão.
- c) Da estimativa de ruído da análise (BRASIL, 2017).

Robustez

A robustez do método foi avaliada a partir dos parâmetros descritos na tabela 4.

Tabela 4: Condições avaliadas no parâmetro robustez

Condições avaliadas	Alteração
Composição da fase móvel (MeOH: H ₂ O: HCOOH)	85:15
Temperatura de forno	Temperatura ambiente
Fluxo da fase móvel	0,5 mL/min
Volume de injeção	30 µL
Comprimento de onda de detecção	204 nm

A influência de cada parâmetro foi avaliada a partir de alterações na simetria do pico, porcentagem de recuperação do AC, pureza espectrométrica e avaliadas estatisticamente com o emprego do teste t-student.

2.3 Determinação do teor de AC nos implantes desenvolvidos

O teor de AC presente nos implantes obtidos foi determinado pelo método cromatográfico previamente desenvolvido e validado. Dez implantes selecionados aleatoriamente foram pesados individualmente e cada um foi transferido para balão volumétrico de 1 mL e dissolvido em q.s de acetonitrila e, aproximadamente, 1 mL de metanol. O conteúdo de AC foi expresso em função do valor rotulado (15% p/p), sob a forma de média \pm desvio padrão absoluto (DP).

2.4 Caracterização dos implantes

Os implantes desenvolvidos foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), por análise térmica (calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria) e por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

2.4.1 Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier

A análise por FTIR visou identificar cada uma das matérias-primas e detectar possíveis interações entre elas. As amostras avaliadas foram:

- ✓ AC;
- ✓ PLGA 50:50;
- ✓ mistura física não liofilizada (AC:PLGA 1:1);
- ✓ mistura liofilizada (AC 15%:PLGA);
- ✓ implante (AC 15%:PLGA).

Para a obtenção dos espectros na região do infravermelho foi empregada a técnica de Reflectância Total Atenuada (ATR), na faixa de 4000-550 cm^{-1} , a partir de 16 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} . A análise de FTIR foi realizada pelo Laboratório de Espectroscopia no Infravermelho do Departamento de Química, UFMG.

2.4.2 Análise térmica

Todas as amostras (AC, PLGA 50:50, mistura física não liofilizada, mistura liofilizada e implante) foram submetidas às técnicas de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). A análise térmica foi realizada pelo Laboratório de Análise Térmica, Departamento de Química, UFMG.

Termogravimetria

Foram pesados cerca de 2,5 mg das amostras de AC, PLGA, mistura física, liofilizada e implante, sendo utilizada uma termobalança. Em sequência, cada amostra foi colocada em cadinhos de alumina (Al_2O_3) e analisada em atmosfera dinâmica de nitrogênio (fluxo de 30 mL/min). O aquecimento foi realizado na faixa de temperatura de 25 °C - 400 °C, com razão de aquecimento de 10 °C/min.

Calorimetria exploratória diferencial

A técnica de DSC foi executada em calorímetro DSC50. Pesou-se cerca de 1 mg das amostras de AC, PLGA, mistura física, liofilizada e implante. Em seguida, as amostras foram seladas em um cadinho de alumínio semi-hermético, submetidas ao aquecimento de 25 a 300 °C, sob atmosfera inerte de nitrogênio (fluxo 50 mL/min), com razão de aquecimento de 10 °C/min.

2.4.3 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6360LV do Centro de Microscopia da UFMG, com detecção de imagens a partir de elétrons secundários e de elétrons retroespalhados. Foram realizadas análises de implantes de PLGA branco e PLGA+AC (15%), imediatamente após o preparo, e de implantes retirados do estudo de liberação *in vitro*, após um intervalo de 2 semanas de incubação.

Os implantes foram montados em suportes de alumínio com o auxílio de fita dupla-face e submetidos ao processo de metalização com ouro, sob atmosfera de argônio, durante 60 segundos. As superfícies dos implantes foram visualizadas nos aumentos de 20x, 200x, 1000x, com uma voltagem de 15 kV.

2.5 Avaliação *in vitro* da absorção de água, perda de massa e perfil de liberação dos implantes

A avaliação *in vitro* dos implantes desenvolvidos foi realizada em incubadora a uma temperatura de 37°C e sob agitação de 30 rpm.

Os implantes (n= 18 / 3 por coleta), previamente pesados, foram colocados em frascos de vidro contendo 4,0 mL de tampão PBS pH 7,4. Em intervalos preestabelecidos (semanas 1, 2, 4, 6, 7, 8), durante 60 dias, os implantes foram coletados e submetidos à avaliação quanto à absorção de água, perda de massa e liberação de AC.

Após a coleta, o excesso de líquido presente na superfície dos implantes foi removido com papel toalha, os implantes foram pesados e a porcentagem de absorção de água foi calculada pela Equação 3.

$$\% \text{ variação de massa} = \frac{(m_o - m_f) \times 100}{m_o} \quad (3)$$

Em que:

m_o : massa inicial; m_f : massa final.

Em seguida, os implantes foram colocados em dessecador de vidro, à temperatura ambiente por 72 h. O peso seco final foi registrado e a porcentagem de perda de massa foi calculada pela Equação 6. Na sequência, esses implantes foram avaliados quanto à liberação de AC para o meio.

A quantificação de AC liberado foi realizada de forma indireta. Quantificou-se o AC residual no implante por CLAE (condições cromatográficas do método validado descritas na tabela 6, p.87). Após a determinação da quantidade de AC restante nos implantes, calculou-se a quantidade liberada através da Equação 4:

$$\% \text{ de AC liberado} = \frac{(Q_o - Q_f) \times 100}{Q_o} \quad (4)$$

Em que:

Q_o = quantidade rotulada de AC; Q_f =quantidade final dosada no implante.

2.6 Avaliação preliminar da biocompatibilidade e da atividade antiangiogênica dos implantes desenvolvidos

Para avaliação preliminar da biocompatibilidade e da atividade antiangiogênica dos implantes desenvolvidos foi realizado o ensaio de angiogênese em membrana corioalantoica de embrião de galinha (CAM), adotando-se a metodologia descrita no Capítulo I, tópico 2.4, p. 50. Foram definidos os seguintes grupos de tratamento (n=12):

- ✓ implantes de AC+PLGA;
- ✓ implantes de PLGA branco;
- ✓ controle positivo: solução de bevacizumabe 1 $\mu\text{mol/L}$;
- ✓ controle negativo: tampão PBS pH 7,4.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desenvolvimento de sistemas poliméricos biodegradáveis de implantação intravítrea

Os implantes desenvolvidos foram moldados na forma de bastão, com aproximadamente 0,45 mm de diâmetro e 6 mm de comprimento (figura 24). O diâmetro e o comprimento dos sistemas foram padronizados com a utilização do trocater transescleral e de paquímetro respectivamente. O peso médio encontrado para os implantes biodegradáveis desenvolvidos foi de $1,21 \pm 0,06$ mg (tabela 5).

Figura 24: Implante de AC e PLGA



Tabela 5: Peso médio dos implantes desenvolvidos

Implante	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Peso (mg)	1,18	1,15	1,08	1,20	1,21	1,24	1,25	1,25	1,27	1,30
Peso Médio = 1,21 mg			DP= 0,06			DPR = 4,96%				

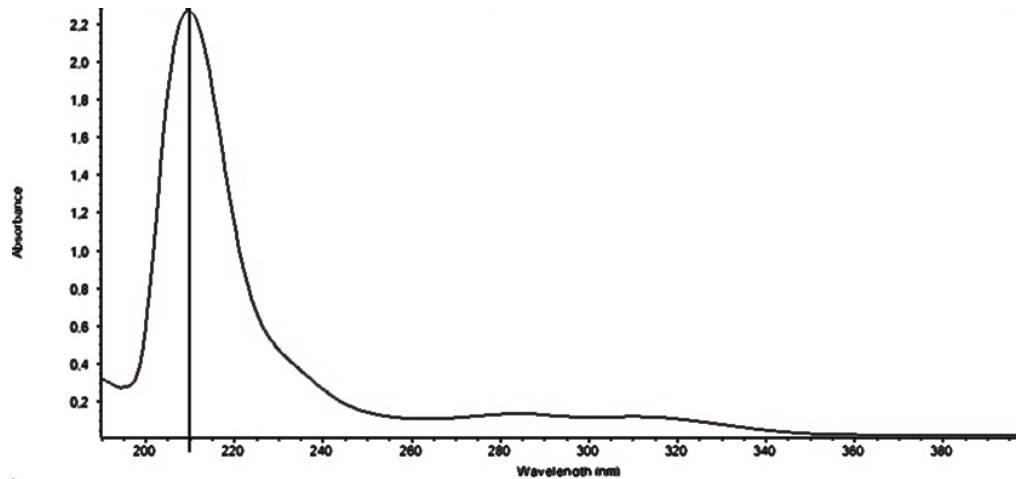
3.2 Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação do AC

3.2.1 Desenvolvimento do método analítico

A fim de determinar o comprimento de onda (λ) adequado para a detecção do AC foi realizada uma varredura na região ultravioleta (190 a 400 nm), utilizando-se espectrofotômetro UV-Visível e uma solução de AC 200 $\mu\text{g/mL}$ em metanol. O λ selecionado para o desenvolvimento do método de quantificação foi o de 210 nm. Este

λ corresponde ao máximo de absorção do AC (figura 25) e corrobora com dados da literatura (JOSHI et al., 2013; LI; LUO; KONG, 2009).

Figura 25: Espectro de varredura do AC na região ultravioleta.



Diferentes solventes e composições da fase móvel foram testadas, dentre elas: acetonitrila: água; metanol: água com ou sem a adição de ácido fórmico. Uma boa simetria de pico foi alcançada utilizando-se metanol/água/ácido fórmico na proporção 88:12:0,1. A presença de ácido fórmico justifica-se pelo aumento da protonação do AC, promovendo uma melhora no formato do pico cromatográfico (LI; WU; LI, 2014)

Uma vez definida a constituição da fase móvel, os outros parâmetros (fluxo do eluente, condições isocrática ou gradiente, temperatura de forno e volume de injeção) foram avaliados no intuito de escolher a melhor condição cromatográfica para a quantificação do AC (figura 26). As condições definidas durante o desenvolvimento do método analítico encontram-se resumidas na tabela 6.

Figura 26: Cromatograma do AC 200 µg/mL nas condições cromatográficas preestabelecidas.

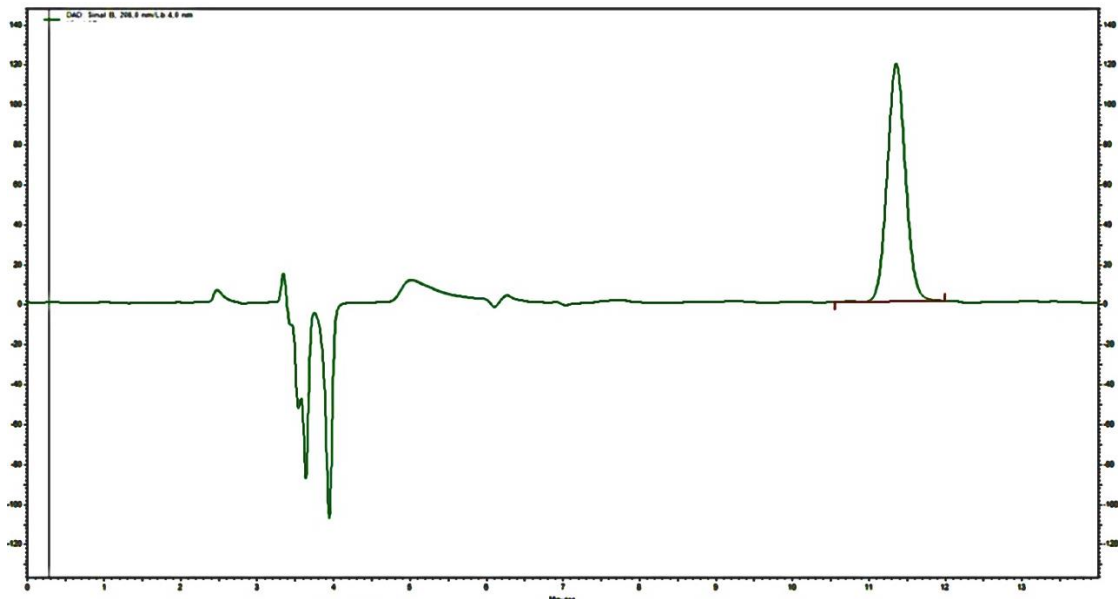


Tabela 6: Condições cromatográficas estabelecidas para a quantificação de AC.

Parâmetros	Condições definidas
Equipamento	Cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent® (UV/VIS- DAD)
Coluna	LiChrosorb® RP-18 -5 µmol/L
Fase Móvel	MeOH:H ₂ O:HCOOH 88:12:0,1
Fluxo	0,8 mL/min
Modo de fluxo	Isocrático
Comprimento de onda	210 nm
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	40°C
Tempo de Corrida	14 min
Solução diluente	Metanol

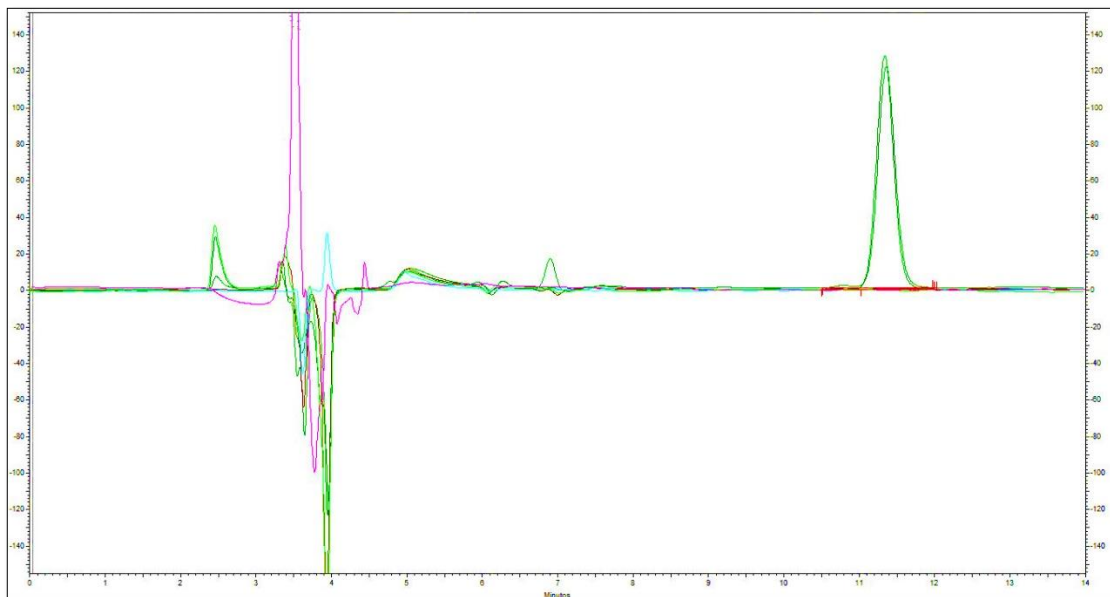
3.2.2 Validação do método analítico

Seletividade

A seletividade refere-se à capacidade que o método possui de identificar exatamente uma substância em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2017). Assim, esse parâmetro foi avaliado pela comparação dos picos obtidos em uma análise de solução de AC, solução diluente (MeOH), fase móvel (MeOH: H₂O: HCOOH), solução do placebo (PLGA) e uma amostra de tampão PBS pH 7,4.

De acordo com os cromatogramas sobrepostos (figura 27), é possível visualizar que nenhuma das amostras analisadas apresentou interferentes no tempo de retenção do AC, demonstrando a seletividade do método desenvolvido.

Figura 27: Sobreposição dos cromatogramas referentes ao AC (verde), MeOH (marrom), fase móvel (azul), PLGA (fluorescente), PBS (lilás).



Estabilidade

Foi avaliada a estabilidade das amostras por um período de 24 h. Ao observar os valores de áreas sob a curva obtidos para as amostras (padrão de AC e placebo contaminado), imediatamente após o preparo, e compará-los com aqueles obtidos depois do armazenamento por 24 h em temperatura ambiente, observa-se que a diferença de teor foi inferior a 1% (tabela 7), o que confirma a estabilidade das amostras avaliadas.

Tabela 7: Estabilidade das amostras padrão de AC e padrão contaminado em um período de 24 h

Amostra	Área (mAU) logo após o preparo	Área (mAU) após 24 horas	Diferença no teor
Padrão AC	271288505	270567554	1,07%
	270534736	264512150	
	269344590	267521169	
	Média=270389277	Média= 267533624,3	
	DPR=0,36%	DPR= 1,00%	
Placebo Contaminado	279209209	280898269	0,65%
	279763495	282775625	
	281021824	281264356	
	Média= 279998176	Média= 281836947	
	DPR=0,33%	DPR= 0,35%	

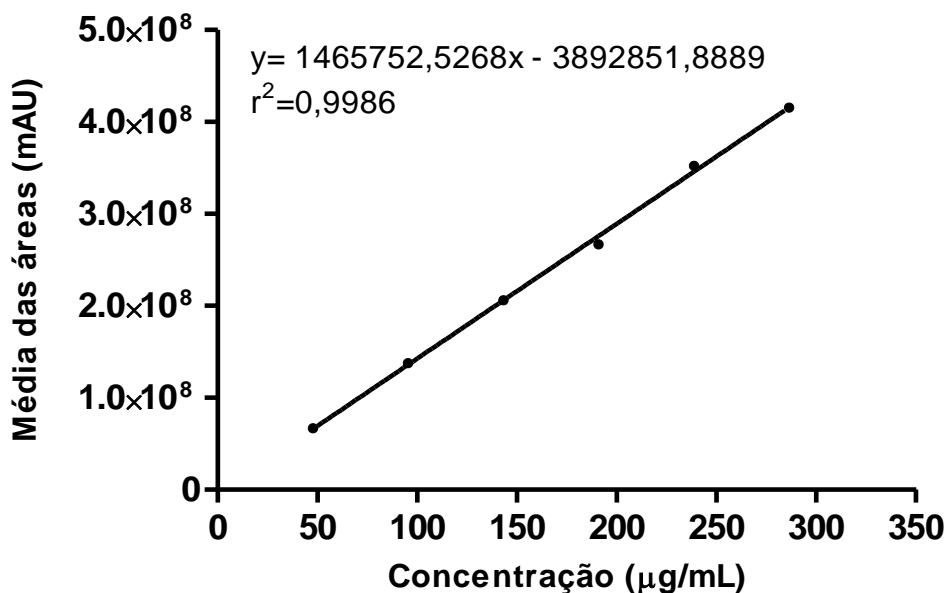
Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são proporcionais (diretamente ou sob transformação dos dados) à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo (alcance) especificado. É recomendado que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes (BRASIL, 2017).

Neste estudo, a linearidade foi determinada a partir de análise de seis concentrações diferentes (faixa de trabalho: 50 – 300 µg/mL). Os dados obtidos foram tratados estatisticamente através do programa ActionStat® (Unicamp, Brasil).

Verificou-se a inexistência de *outliers* pelo Teste de Resíduos Padronizados de Jacknife e os resíduos seguiram as premissas da normalidade pelo Teste de Ryan-Joiner. Porém, através do Teste de Cochran, observou-se uma distribuição heterocedastica dos resíduos (p-valor 0,034) e portanto, a análise da variância foi realizada pelo método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP), utilizando-se o fator de correção de 1/x. A curva média obtida está apresentada na figura 28.

Figura 28: Curva analítica para avaliação da linearidade.



A equação da reta calculada foi $y=1465752,5268x-3892851,8889$, o coeficiente de determinação ($r^2=0,9986$) e o de correlação ($r=0,9993$).

Segundo a RDC 166/2017, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser 0,99 (BRASIL, 2017). Portanto, constata-se a adequação da correlação linear do método para a faixa de concentração estudada (50-300 µg/mL), uma vez que o coeficiente de correlação (r) apresentou um valor de 0,9993, superior ao preconizado

pela legislação brasileira. Além disso, a regressão linear foi significativa e o desvio de linearidade não significativo e portanto, satisfatório.

Precisão

A precisão representa o grau de dispersão entre resultados quando o método é aplicado repetidamente para replicatas de uma amostra homogênea (BRASIL, 2017). Neste trabalho, este parâmetro foi avaliado quanto aos critérios de repetitividade (intracorrída) e precisão intermediária (intercorrída).

A repetitividade demonstra o grau de dispersão entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. Já a precisão intermediária refere-se ao grau de dispersão entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

A precisão é expressa pela porcentagem de desvio padrão relativo (%DPR), segundo as Equações 5 e 6.

$$DPR = 100x \frac{DP}{Y} \quad (5)$$

$$DP = \sqrt{\frac{\sum(X-Y)^2}{n-1}} \quad (6)$$

Em que:

DPR = desvio padrão relativo; DP = desvio padrão; X= área média;

Y= área medida; n= número de amostras

Segundo a RDC 166/2017, o valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método (BRASIL, 2017). Dessa forma, para avaliação do critério de precisão, levou-se em consideração o preconizado pela AOAC (DPR<2,0%) (AOAC,

2016). Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 8 sob a forma de média \pm DPR.

Tabela 8: Repetitividade e precisão intermediária do método de quantificação do AC

Precisão intra-dia			
Concentração teórica de AC ($\mu\text{g/mL}$)	Média das áreas	Concentração real de AC ($\mu\text{g/mL}$)	DPR%
100	137896535,11	96,43	0,26
200	267695128,89	185,37	0,08
300	415686933,56	286,78	0,05
Precisão inter-dia			
100	137704961,8	96,30	1,06
200	265121705,4	183,61	1,55
300	415737610,1	286,81	1,68

A partir dos resultados obtidos, pode-se afirmar que o método foi preciso para os três níveis de concentração avaliados, uma vez que os valores de DPR obtidos não foram superiores a 1,70 %.

Exatidão

A exatidão avalia a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2017). É expressa pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra. A exatidão pode ser calculada por meio da Equação 7 e o DPR para cada concentração também deve ser calculado.

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (7)$$

A exatidão foi avaliada pela porcentagem de recuperação do AC adicionado ao placebo. De acordo com os dados apresentados na tabela 9, observa-se que as recuperações obtidas estão compreendidas no intervalo 98,0-102,0%, recomendado pela AOAC, e os valores de DPR inferiores a 2,0% (AOAC, 2016), o que demonstra a exatidão do método.

Tabela 9: Valores médios de recuperação aparente nos três níveis de concentração utilizados para a avaliação da exatidão.

Concentração teórica de AC ($\mu\text{g/mL}$)	% de Recuperação	%DPR
100	100,85	1,97
200	98,94	0,22
300	101,84	0,13

Limite de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser quantificada (BRASIL,2017). Os valores de LD e de LQ foram calculados considerando o desvio padrão residual da linha de regressão, de acordo com as Equações 1 e 2 (p.79). Os valores estimados para LD e LQ foram 0,91 $\mu\text{g/mL}$ e 2,75 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Robustez

A robustez avalia a capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (BRASIL, 2017).

A robustez do método foi avaliada a partir da influência de cinco variáveis: fase móvel, temperatura, fluxo, volume de injeção e comprimento de onda de detecção, λ (tabela 10). As médias de recuperação do fármaco obtidas após a modificação das condições

cromatográficas foram comparadas com as médias de recuperação em condições padrão determinadas durante o desenvolvimento do método.

Tabela 10: Comparações entre os parâmetros avaliados na robustez.

Parâmetro	Alterações	Recuperação do AC (%)	Tempo de retenção (min)	Pureza do pico
Padrão*	--	100,0	11,36	100 %
Fase Móvel	85:15	94,0	15,45	98,0 %
Temperatura	T. ambiente	99,8	11,54	99,5 %
Fluxo	0,5 mL/min	104,0	18,05	99,2 %
Volume de injeção	30 µL	150,0	11,36	98,6 %
λ(nm)	204 nm	102,0	11,35	94,3 %

*Condições cromatográficas estabelecidas para validação da metodologia analítica: comprimento de onda de 210 nm; volume de injeção de 20 µL; fluxo de 0,8 mL/min; temperatura do forno de 40 °C; fase móvel MeOH:H₂O:HCOOH (88:12:0,1).

Dentre os parâmetros avaliados, verificou-se que as alterações no fluxo e na proporção de fase móvel alteraram o tempo de retenção do fármaco e a simetria do pico. Portanto, esses tipos de alterações devem ser evitados durante as análises por CLAE para não comprometer os resultados.

A alteração no volume de injeção, embora não tenha alterado o tempo de retenção, foi capaz de alterar a recuperação do AC.

A alteração no comprimento de onda promoveu uma redução na pureza espectrométrica do pico, o que pode ser explicado pelo fato do metanol também absorver nessa região, entre 200 e 205 nm.

O método foi considerado robusto apenas para a alteração de temperatura, uma vez que não foram verificadas alterações na taxa de recuperação do AC, na simetria do pico e no tempo de retenção do AC. Além disso, não foi observada diferença estatística por meio do teste t-student.

Dessa forma, pode-se concluir que o método analítico desenvolvido foi seletivo, específico, preciso e exato, sendo, portanto, adequado para quantificação do AC nos implantes desenvolvidos e também durante os estudos de liberação *in vitro*.

3.3 Determinação do teor de AC nos implantes desenvolvidos

O método cromatográfico foi aplicado para a quantificação de AC incorporados aos implantes. O teor de AC nas dez unidades testadas variou de 75,0% a 81,1% (DPR=3,01%) do valor predefinido para a formulação (15,0%), ou seja, a porcentagem média de AC presente nas amostras analisadas foi $11,6 \pm 0,3\%$ (tabela 11).

Tabela 11: Teor de AC dosado nos implantes desenvolvidos

Peso (mg)	Concentração de AC esperada ($\mu\text{g/mL}$)	% de AC dosada
1,18	177,0	78,58
1,15	172,5	78,98
1,08	162,0	77,00
1,20	180,0	81,12
1,21	181,5	79,57
1,24	186,0	75,16
1,25	187,5	75,16
1,25	187,5	75,03
1,27	190,5	75,14
1,30	195,0	74,90
Média da % AC dosada = $77,06 \pm 2,32\%$ (DPR =3,011)		

Supõe-se que a perda de AC durante o processo de desenvolvimento dos implantes esteja relacionada ao fato de parte do AC incorporado fique aderido às vidrarias utilizadas durante o preparo, tanto na etapa de incorporação da solução de AC à solução de PLGA, quanto durante a coleta da massa liofilizada.

É importante ressaltar que, embora ocorra a perda de cerca de 23% do AC incorporado, a distribuição do AC nos implantes obtidos ocorreu de forma uniforme,

indicando que o método de elaboração dos sistemas garante a homogeneidade do AC nestes dispositivos.

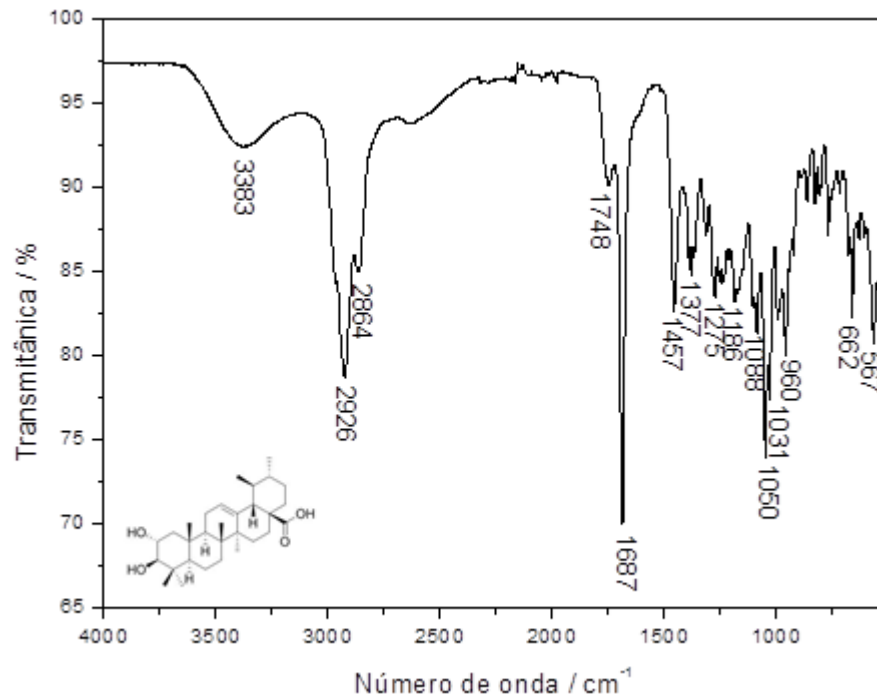
3.4 Caracterização dos implantes

3.4.1 Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica capaz de identificar grupos funcionais de moléculas expostas a uma radiação no infravermelho. Cada material possui grupos químicos específicos que dão origem a diferentes bandas no espectro. Dessa forma, a análise por FTIR visou identificar cada uma das matérias-primas e detectar possíveis interações entre elas.

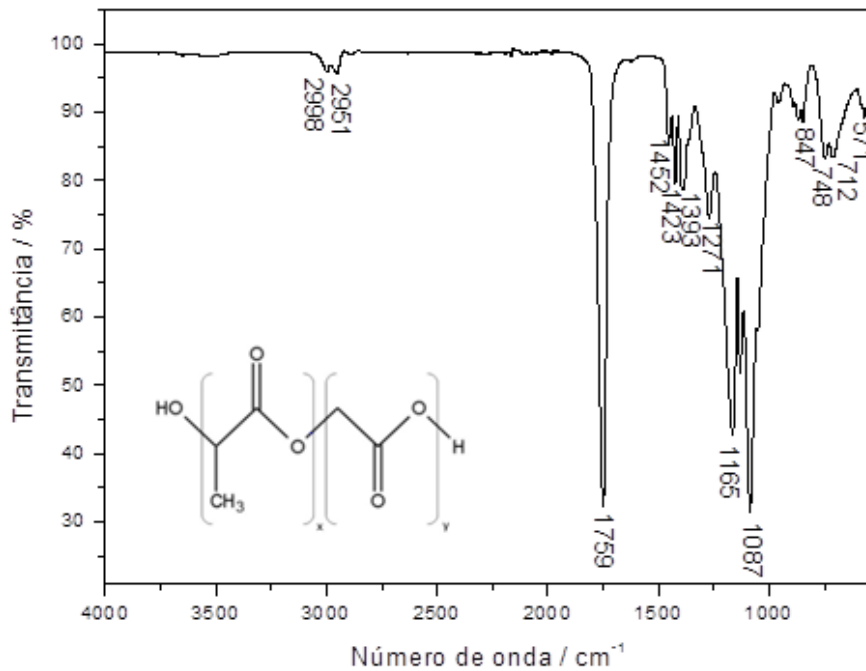
O espectro na região do infravermelho do AC (figura 29) apresentou uma banda larga em 3383 cm^{-1} , correspondente ao estiramento da ligação O-H da hidroxila de álcool e ácido carboxílico, e bandas em 2926 e 2864 cm^{-1} , referentes a estiramentos de ligações C-H. As bandas em 1457 e 1377 cm^{-1} referem-se a deformação angular no plano da ligação simples C-H de grupos alifáticos. As bandas em 1748 e 1687 cm^{-1} são correspondentes ao estiramento da ligação C=O. O aparecimento dessas bandas referentes ao grupo carbonila pode ser explicado pelo fato de boa parte das moléculas de AC encontrarem-se sob a forma de dímeros ou agregados (1687 cm^{-1}) e apenas uma pequena parte sob a forma de monômeros (1748 cm^{-1}) (BARBOSA, 2007; LI *et al.*, 2014; LÓRINCZ *et al.*, 2015).

Figura 29: Espectro na região do infravermelho do AC.



O espectro no infravermelho obtido para polímero PLGA 50:50 (figura 30) apresentou bandas em 2998 e 2951 cm^{-1} , referentes ao estiramento de ligações C-H de grupos CH_2 e CH_3 e em 1450 a 1375 cm^{-1} , correspondentes à deformação angular das ligações C-H. Há, também, uma banda de intensidade forte em 1759 cm^{-1} , atribuída à frequência de estiramento de grupos carbonilas (C=O) de ésteres. As bandas na faixa de absorção entre 1300 a 1000 cm^{-1} são típicas do estiramento de ligações C-O de éster (BARBOSA, 2007; KELES *et al.*, 2014; VEY *et al.*, 2011).

Figura 30: Espectro na região do infravermelho do PLGA 50:50.



Cada substância química possui grupos funcionais com vizinhanças distintas, que apresentam bandas específicas na região do infravermelho. Para o PLGA 50:50, os grupos químicos característicos são os do éster (banda de estiramento C=O e C-O) e no caso do AC, bandas de grupos carbonila e hidroxila (estiramento C=O e O-H). Desta forma, o não aparecimento ou até mesmo o deslocamento e/ou intensificação dessas bandas nas misturas física ou liofilizada e no implante pode ser indicativo de interações químicas entre o polímero e o AC.

As bandas características observadas experimentalmente estão resumidas na tabela 12.

Tabela 12: Principais bandas de absorção referentes ao AC, PLGA, misturas física, liofilizada e implante.

Grupo Químico	Número de onda (cm ⁻¹)				
	AC	PLGA	Mistura física	Mistura liofilizada	Implante
O-H	3383		3376	3444	3446
C=O (COOH)	1748; 1687		1686	1690	1690
C=O (COO)		1759	1752	1752	1752
C-O (COO)		1300-1100	1300-1100	1300-1100	1300-1100

Como pode ser observado nas figuras 31 a 33, os espectros, respectivamente, da mistura física, liofilizada e implante apresentaram bandas de absorção típicas dos grupos funcionais presentes no AC e no PLGA. Ressalta-se ainda que as bandas de absorção referentes ao AC apresentaram-se mais intensas na mistura física em relação à liofilizada e ao implante, devido à maior proporção de AC utilizada (1:1); enquanto na mistura liofilizada e no implante, a porcentagem de AC presente na mistura foi inferior a 15,0%.

Figura 31: Espectro na região do infravermelho da mistura física AC:PLGA na proporção de 1:1.

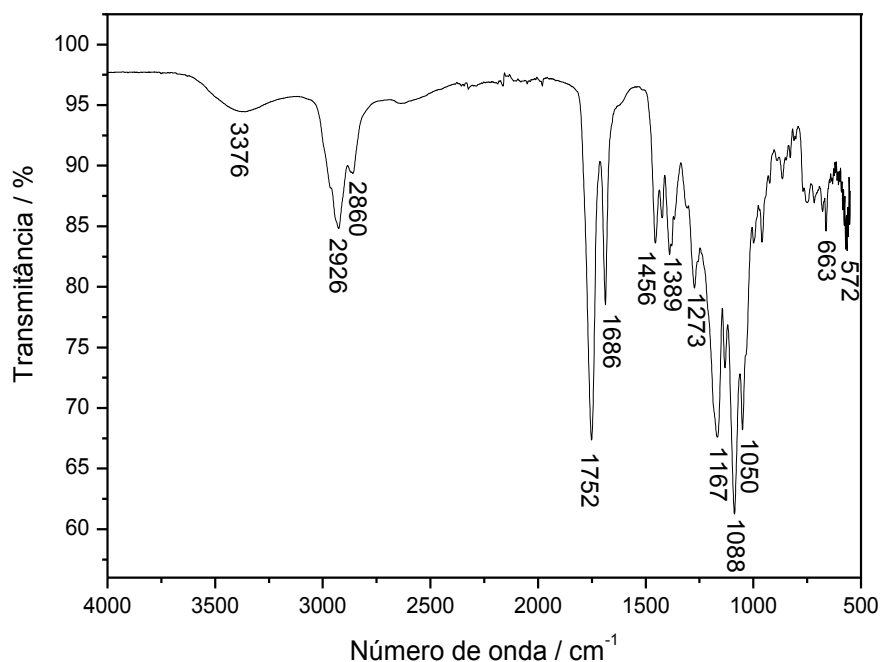
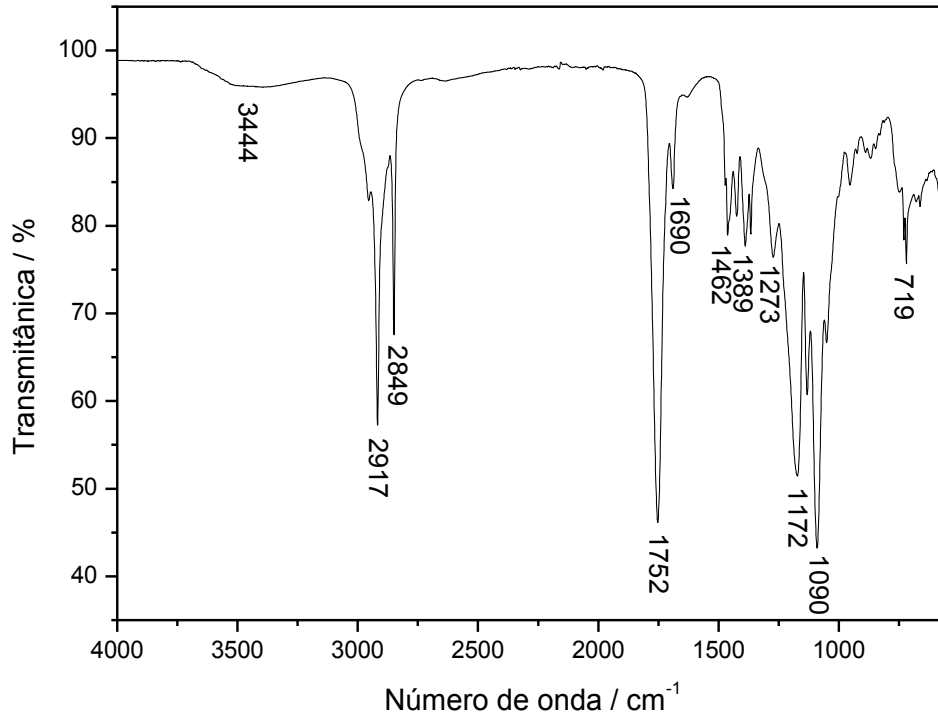
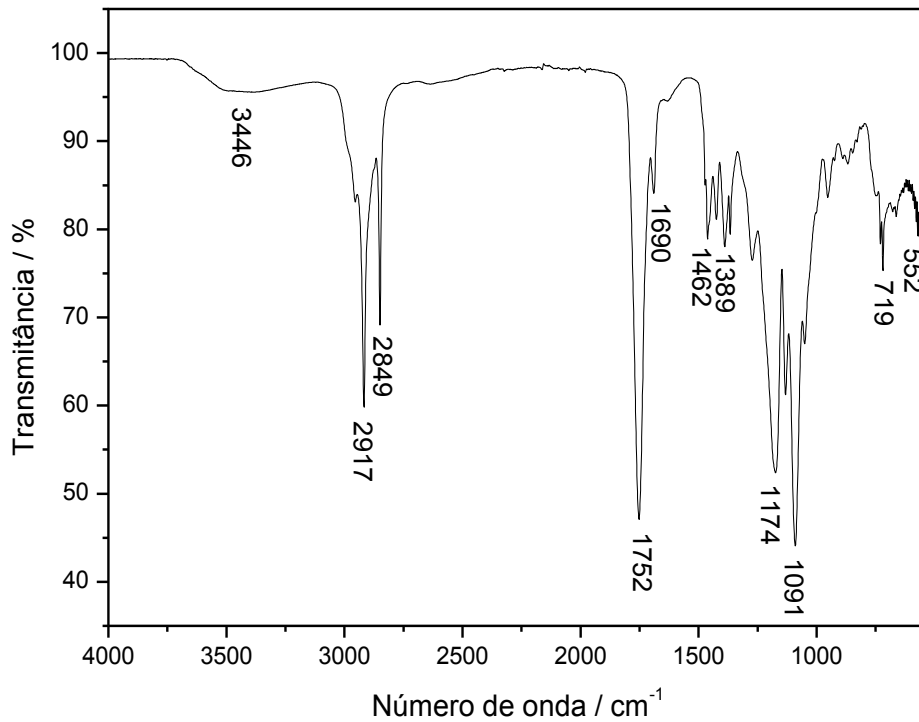


Figura 32: Espectro na região do infravermelho da mistura liofilizada AC:PLGA.**Figura 33: Espectro na região do infravermelho do implante de AC: PLGA**

Além disso, ao analisar as Figuras 32 e 33, não se nota a presença de bandas referentes aos estiramentos S=O ($1060 - 1040 \text{ cm}^{-1}$) ou C≡N ($2260 - 2200 \text{ cm}^{-1}$), correspondentes aos solventes DMSO e acetonitrila, respectivamente, permitindo dizer que o preparo da mistura liofilizada foi adequado e sem a presença de solventes residuais.

Portanto, os resultados de FTIR sugerem que as estruturas químicas do AC e PLGA mantiveram-se preservadas após a incorporação do triterpeno à matriz polimérica.

3.4.2 Análise térmica

A análise térmica baseia-se na avaliação da resposta de um material perante o aquecimento, no intuito de estabelecer uma conexão entre temperatura e propriedades físicas específicas dos materiais (ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S., 2012). Neste trabalho, foram utilizadas as técnicas de DSC e TG.

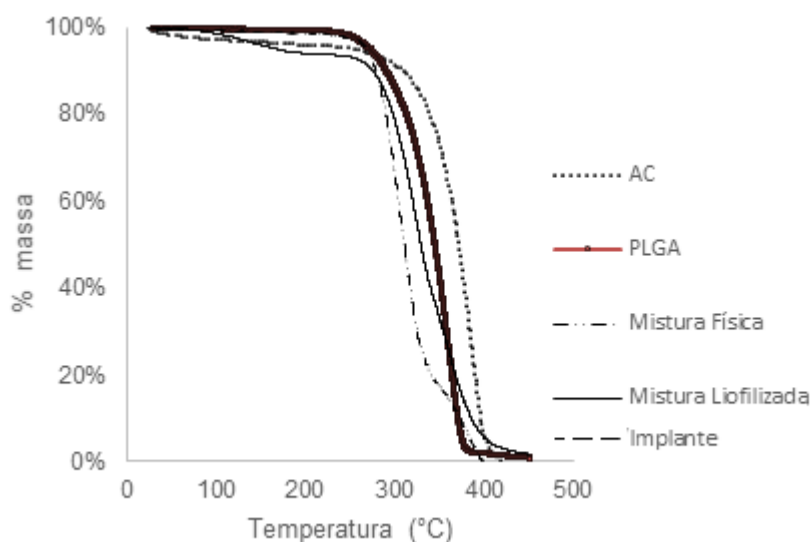
Termogravimetria

A termogravimetria (TG) é uma técnica que avalia a variação de massa de uma amostra em função da variação controlada de temperatura, sob uma atmosfera controlada (ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S., 2012).

Essa técnica foi utilizada com o objetivo de avaliar a estabilidade das matérias-primas dos implantes desenvolvidos.

A figura 34 apresenta a sobreposição das curvas de TG obtidas para as amostras de AC, PLGA, mistura física, mistura liofilizada e implante.

Figura 34: Sobreposição das curvas de TG do AC, PLGA, mistura física de AC e PLGA 1:1, mistura liofilizada de PLGA e AC e implante de PLGA e AC.



Ao analisar a curva TG do AC, nota-se que na faixa de 250 a 400 °C há a decomposição de aproximadamente 90% do AC. Na curva TG do PLGA pode-se observar uma decomposição térmica de evento único que ocorreu a partir de 250 °C, havendo uma perda total (100%) em 390 °C. A curva TG da mistura física apresenta 2 eventos de decomposição, sendo o primeiro referente ao PLGA e o segundo ao AC. O resultado de TG obtido para a mistura liofilizada e para o implante foram semelhantes.

Nas curvas da mistura liofilizada e do implante não foram observados eventos térmicos em temperaturas próximas a 89 e 182 °C, referentes às temperaturas de ebulição da acetonitrila e DMSO, o que reforça o resultado encontrado na análise de FTIR, sugerindo a ausência de solventes residuais.

Além disso, pode-se afirmar que o método de preparo dos implantes parece não ter interferido na estabilidade térmica do polímero ou do AC, uma vez que o início da degradação aconteceu somente em temperaturas superiores àquela aplicada no preparo dos implantes.

Calorimetria exploratória diferencial

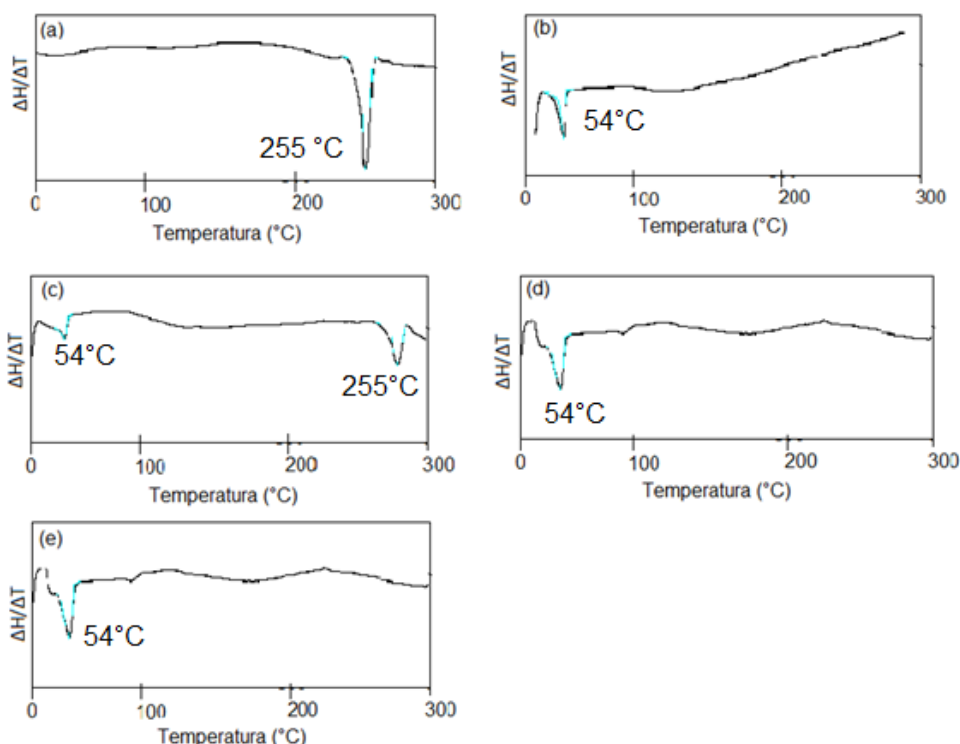
A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica em que a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência é medida em função de uma variação controlada da temperatura. Uma das maiores aplicações dessa técnica são nas áreas farmacêutica e polimérica, sendo utilizada na avaliação de pureza, compatibilidade entre os constituintes de uma formulação, identificação de polimorfismo em matérias-primas, estudo de estabilidade e decomposição de fármacos e medicamentos (ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S., 2012).

A técnica de DSC foi empregada com a finalidade de avaliar a estabilidade do PLGA e do AC na faixa de temperatura de 100-120 °C e verificar a existência interações químicas entre o AC e o PLGA.

As curvas DSC para as amostras testadas estão apresentadas na Figura 35 (a-e). Na curva referente ao AC (figura 35 (a)), nota-se um evento endotérmico próximo a 255 °C (T_{onset} em 251 °C) com uma energia de 42 J/g, referente à fusão do fármaco. Resultados semelhantes foram descritos por Chaturvedula e colaboradores (2013) e El-Moghazy e colaboradores (2016).

Quanto à análise de DSC do PLGA 50:50 (figura 35 (b)), pode-se observar um evento endotérmico em torno de 54 °C, característico da transição vítrea (T_g) do polímero (JAHANGIRI et al., 2014; SUN et al., 2015).

Figura 35: Curvas de DSC do AC (a), PLGA (b), mistura física de AC e PLGA 1:1 (c), mistura liofilizada de PLGA e AC (d) e implante de PLGA e AC (e).



Ao analisar a curva de DSC da mistura física (figura 35(c)), verificou-se a ocorrência de eventos térmicos similares aos identificados para o AC e o polímero puro, sendo o primeiro evento endotérmico atribuído à transição vítrea do PLGA e o segundo referente à fusão do AC.

Para as curvas DSC da mistura liofilizada e implante, há a ocorrência apenas do evento endotérmico para o PLGA. Esse fato pode estar relacionado à completa interiorização do AC nas cadeias poliméricas, uma vez que a porcentagem do triterpeno no dispositivo foi baixa (<15,0%) ou devido à amorfização do AC (ANWER et al., 2016).

Dessa maneira, os resultados de DSC corroboram com aqueles obtidos através da FTIR, indicando a não ocorrência de interações químicas significativas entre o PLGA e o AC. Além disso, é possível afirmar que as matérias-primas mantiveram-se estáveis à faixa de temperatura utilizada na moldagem dos implantes, por não ter sido detectado nenhum evento de degradação abaixo de 120 °C.

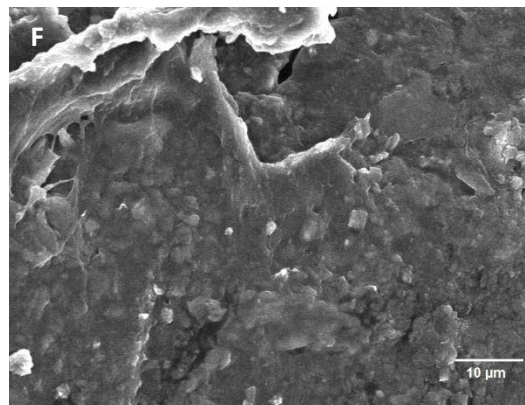
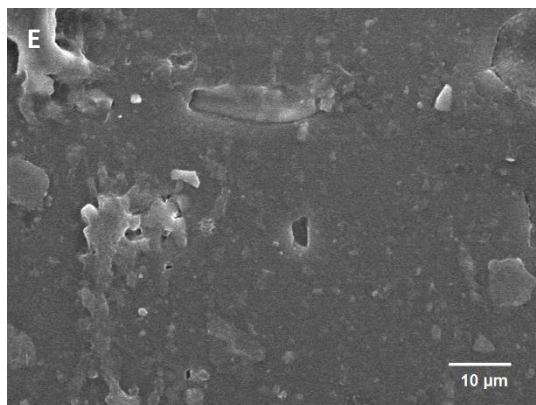
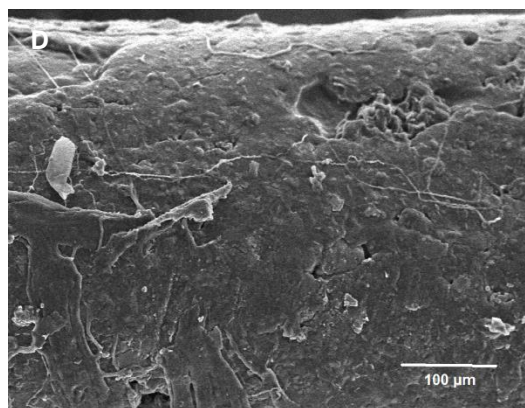
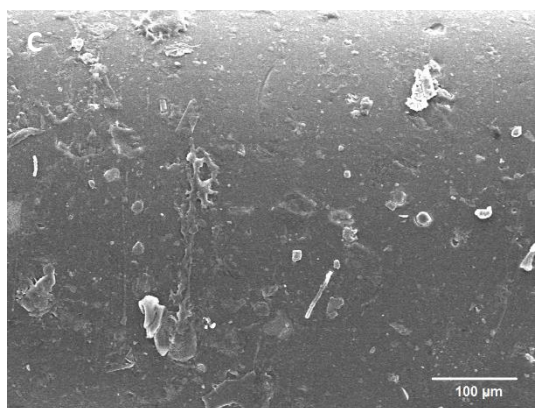
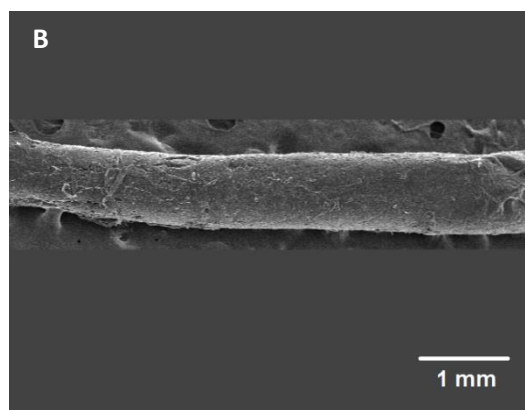
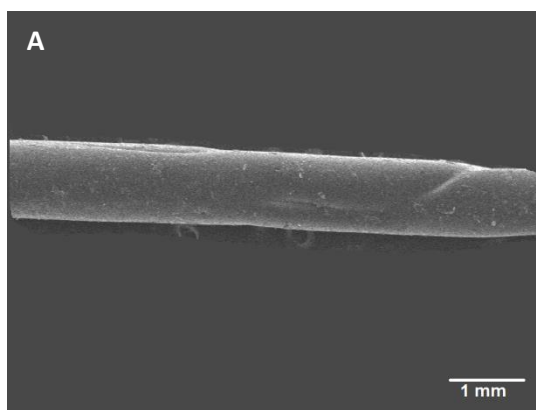
3.4.3 Microscopia eletrônica de varredura

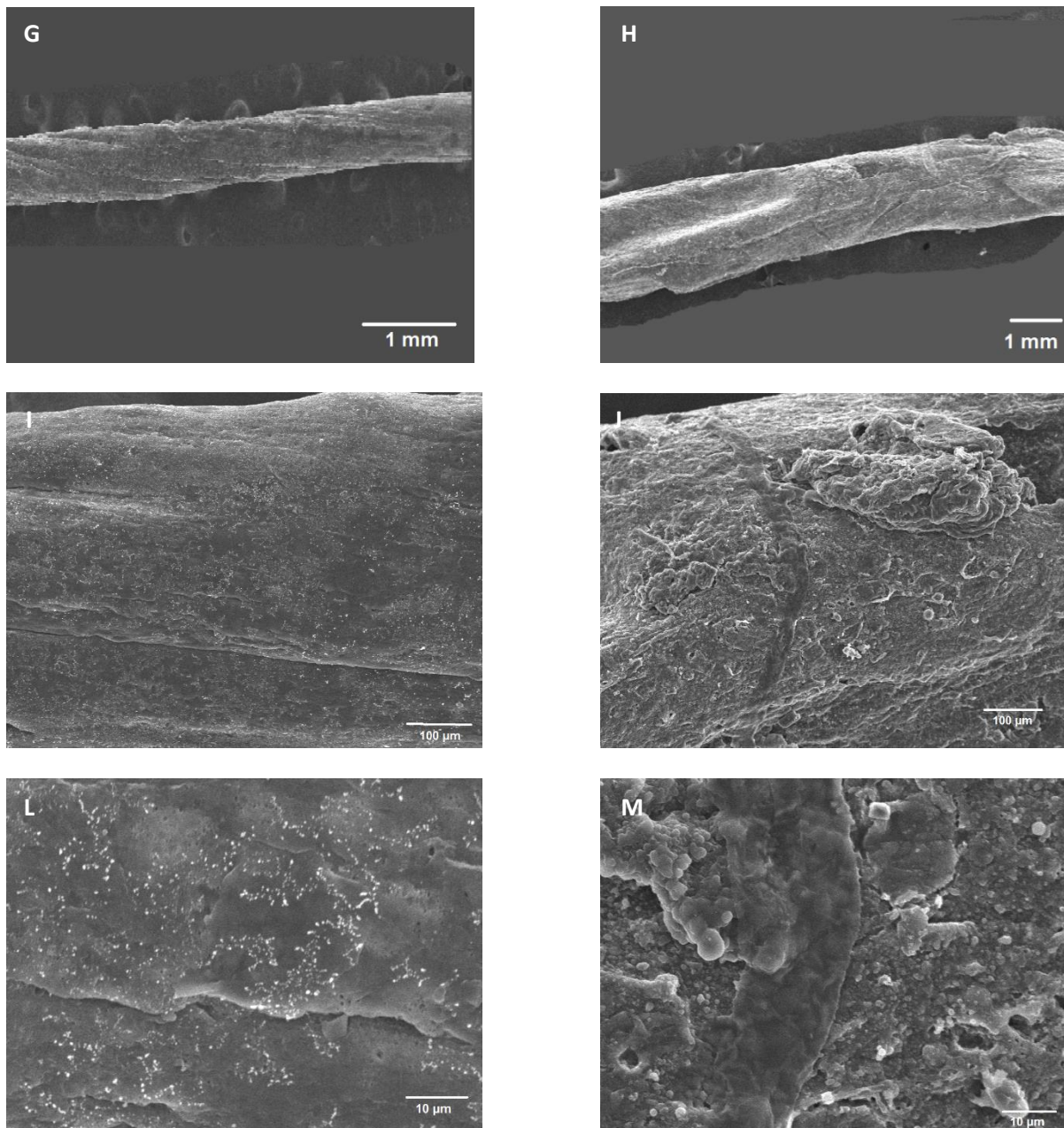
O princípio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) baseia-se na emissão de um feixe de elétrons sobre a amostra, gerando uma imagem ampliada e tridimensional (SUGA, 2014), que possibilita a avaliação da morfologia da superfície dos sistemas em relação à presença de poros e/ou canais na matriz polimérica.

Na figura 36 encontram-se as imagens das fotomicrografias dos implantes de PLGA e PLGA+AC antes do início do estudo de liberação *in vitro* (Figura 36 A-E) e 15 dias após a execução desse teste (Figura 36 F-M).

As superfícies dos implantes de PLGA (figuras 36 A, C e E) e PLGA+AC (figuras 36 B, D e F), antes da execução do teste de liberação *in vitro*, mostraram-se ligeiramente irregulares e morfologicamente semelhantes, havendo uma mínima presença de pequenos poros ou canais. Após 15 dias de execução do estudo de liberação, notou-se um aumento de poros e canais nas superfícies dos implantes. Essas irregularidades foram mais intensas para o dispositivo que continha apenas o polímero (figuras 36 G, I e L), sugerindo que a presença do AC na matriz polimérica possa ter contribuído para o efeito retardado na degradação do implante (figuras 36 H, J e M).

Figura 36: Fotomicrografias dos implantes de PLGA antes do início do teste de liberação *in vitro* em aumento de 20x (A); 200x (C); 1000x (E). E após 15 dias de incubação em aumento de 20x(G); 200x (I); 1000x (L). Implantes de PLGA + AC antes do início do teste de liberação *in vitro* em aumento de 20x (B); 200x (D); 1000x (F). E após 15 dias de incubação em aumento de 20x (H); 200x (J); 1000x (M).



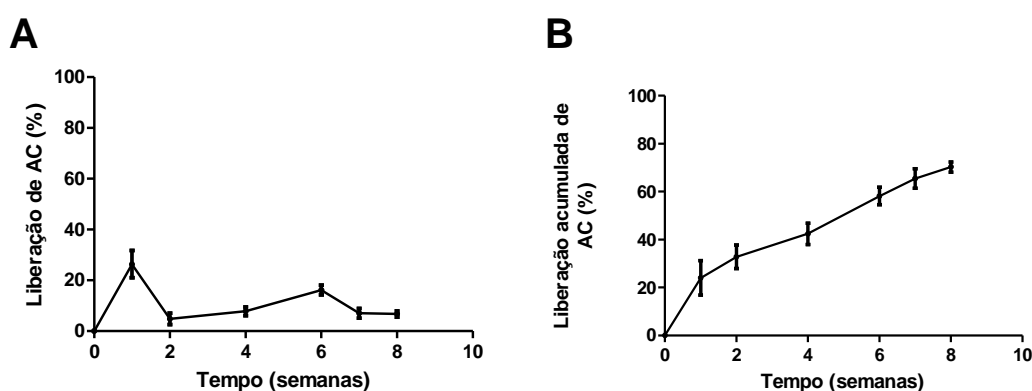


3.5 Avaliação *in vitro* da absorção de água, perda de massa e perfil de liberação dos implantes

O perfil de liberação *in vitro* semanal e acumulado do AC a partir dos implantes encontra-se representado nas figuras 37A e B, na forma de porcentagem de AC liberada em função do tempo em semanas. Foi observado que os implantes promoveram uma liberação prolongada do AC, cujo perfil *in vitro* foi caracterizado por

duas fases: uma etapa inicial, em que cerca de 25% do AC foram liberados durante a 1ª semana de incubação; e uma segunda fase, na qual, aproximadamente, 60% do AC foram liberados entre a 2ª e 8ª semana de estudo, havendo uma taxa de liberação semanal de cerca de 10% de AC.

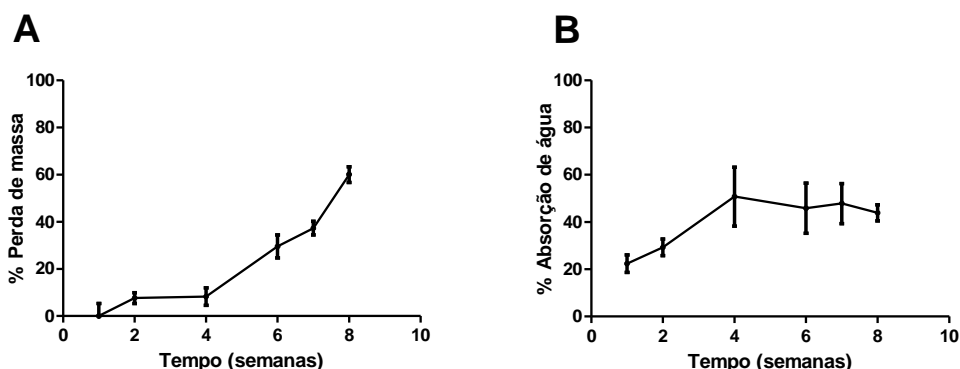
Figura 37: A) Perfil de liberação do AC a partir dos implantes. B) Perfil de liberação acumulada de AC a partir dos implantes.



**** Resultados apresentados como média \pm DP.**

Em um sistema matricial, como o desenvolvido neste trabalho, a liberação do ativo é controlada por um dos três mecanismos: difusão pelos poros da matriz, degradação do polímero ou por uma combinação desses fatores. Diante disso, para avaliar a possível contribuição da degradação da matriz polimérica no processo de liberação do fármaco, procedeu-se com o perfil de perda de massa e absorção de água dos implantes, conforme ilustrado na figura 38.

Figura 38: A) Alteração de massa dos implantes. B) Absorção de água pelos implantes durante a avaliação *in vitro*.



**** Resultados apresentados como média \pm DP.**

*****Os resultados de absorção de água estão representados como porcentagem em relação à massa seca dos implantes.**

De acordo com a Figura 38 A, observou-se durante as quatro primeiras semanas, que praticamente não houve perda de massa dos sistemas poliméricos. Essa etapa pode ser atribuída à fase inicial do processo de degradação do PLGA, em que há uma taxa significativa de absorção de água pelo sistema (Figura 38 B), promovendo a hidrólise das ligações éster na estrutura do polímero (BOIMVASER et al., 2016; SOLANO et al., 2013). Entre a 4^a e 6^a semana, notou-se uma perda pronunciada na massa dos implantes, cerca de 20% que pode ser atribuído tanto à liberação de mais de 50% do conteúdo de AC, como à erosão da matriz polimérica. Após a 6^a semana, o AC liberado parece ter sido responsável por uma perda de massa de 8,2%. Nesse mesmo período, a perda de massa total do sistema foi cerca de 30%, indicando que 21,8% desse valor foi decorrente da degradação polimérica.

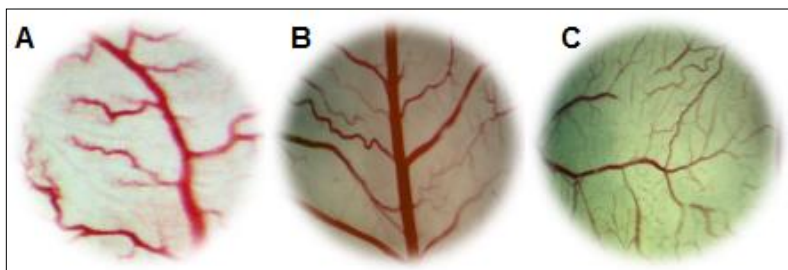
A erosão do PLGA pode ser explicada pela difusão dos seus produtos de degradação para o meio de liberação. Isso promove o aparecimento de poros na matriz que entumecem devido ao contato com a água, promovendo um ciclo de hidrólise do polímero e conseqüentemente, geração de monômeros ácidos. Então, a acidificação do meio atua como catalisador da reação de degradação do PLGA, o que resulta em perda de massa da matriz polimérica (ANDERSON; SHIVE, 2012; BOIMVASER et al., 2016; COSSÉ et al., 2017).

A liberação de AC a partir dos implantes apresentou um perfil bifásico, em que a primeira etapa foi caracterizada por um pequeno *burst* inicial, provavelmente devido à presença de AC associada à superfície da matriz polimérica. Enquanto na segunda etapa, houve uma liberação lenta do AC por um período prolongado, comportamento atribuído à difusão do AC pelos poros iniciais já presentes na matriz polimérica e pelos novos canais formados durante o processo de erosão do PLGA. Embora existam esses canais na matriz polimérica, ressalta-se que a liberação do AC para o meio ocorre de maneira lenta devido à natureza hidrofóbica deste triterpeno, o que contribui para que ele apresente maior afinidade pela matriz e uma reduzida taxa de difusão. Logo, sugere-se que o sistema polimérico desenvolvido mostrou-se adequado para uma liberação continuada de AC por um período de 60 dias.

3.6 Avaliação preliminar da biocompatibilidade e da atividade antiangiogênica dos implantes desenvolvidos

Para a avaliação preliminar da biocompatibilidade dos sistemas desenvolvidos pelo ensaio da CAM, as imagens foram inicialmente avaliadas qualitativamente quanto à ocorrência de lise vascular, inflamação aguda e eventos de neovascularização. As membranas submetidas ao tratamento com os implantes desenvolvidos foram comparadas àquelas que receberam apenas veículo (PBS pH 7,4). Imagens representativas de cada um dos grupos podem ser visualizadas na figura 39.

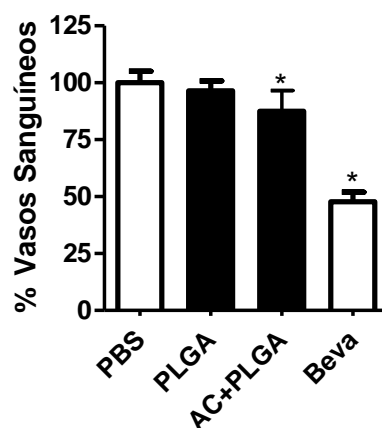
Figura 39: Imagens da CAM de embriões de 7 dias submetidos aos diferentes grupos de tratamento avaliados: (A) PBS; (B) Implante PLGA; (C) Implante PLGA + AC.



É possível notar a ausência de respostas de neovascularização, inflamação aguda e lise vascular. Dessa maneira, os resultados obtidos podem ser considerados como um indício da biocompatibilidade dos sistemas desenvolvidos.

Além disso, avaliou-se a atividade antiangiogênica dos implantes contendo AC. Para isso, a quantificação dos vasos foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item 2.4 do Capítulo I (p. 50). Os dados foram avaliados por ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. Foi observada diferença significativa na quantidade de vasos sanguíneos nos grupos tratados com veículo e implante PLGA+AC (figura 40).

Figura 40: Ensaio da membrana corioalantoica, realizado com PBS (controle), bevacizumabe 1 $\mu\text{mol/L}$, implante de PLGA (branco) e implante de PLGA+AC. O percentual de vasos sanguíneos dos grupos tratados foi expresso em função da porcentagem de vasos sanguíneos do grupo controle, fixado em 100%.



*Significativamente diferente do grupo controle (Valor-p <0.05).

Foi possível notar uma redução de cerca de 15% dos vasos sanguíneos em relação ao grupo controle. É importante ressaltar que, de acordo com a metodologia adotada, os implantes permaneceram em contato com a membrana corioalantoica por 72 h e portanto, uma quantidade mínima de AC foi liberada durante este período, de acordo com o que foi demonstrado pelo teste de liberação *in vitro* (item 3.5, p. 108), o que parece justificar a pequena redução observada na porcentagem de vasos.

4 CONCLUSÃO

Por meio das diferentes técnicas de caracterização empregadas verificou-se a ausência de incompatibilidades físico-químicas e/ou interações químicas entre o polímero PLGA 50:50 e o AC, fato que foi ratificado pelos estudos de liberação *in vitro*, no qual foi possível determinar a porcentagem de liberação do AC durante 8 semanas. Além disso, o índice de biocompatibilidade e da atividade antiangiogênica dos sistemas PLGA+AC foram sugeridas pelo ensaio biológico da CAM. Dessa maneira, os implantes biodegradáveis carreadores de AC consistem em uma alternativa a ser investigada quanto ao seu potencial no tratamento de doenças causadoras de neovascularização da retina.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, avaliou-se a potencialidade da aplicação ocular do AC, um triterpeno pentacíclico que, recentemente, tem atraído atenção em virtude de suas promissoras atividades biológicas. Foram realizados testes de avaliação da citotoxicidade do AC em uma linhagem celular isolada do epitélio pigmentado da retina (ARPE-19); ensaio da membrana corioalantoica do embrião de galinha para comprovação da ação antiangiogênica desse triterpeno; avaliação clínica, eletrorretinografia e análise histopatológica de olhos de ratos Wistar, em que foram administradas suspensões de AC.

Com a realização desses ensaios, foi possível confirmar que o AC apresenta-se como uma substância promissora para o tratamento de doenças causadoras de neovascularização da retina. Adicionalmente, conhecendo-se as vantagens de um sistema de liberação prolongada perante a administração intravítrea, foi proposto o desenvolvimento de implantes biodegradáveis de PLGA 50:50 como uma alternativa para carrear o AC. Esses sistemas foram avaliados quanto ao processo de produção e foram caracterizados por técnicas de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, análise térmica, microscopia eletrônica de varredura, estudo de liberação *in vitro* e avaliação de biocompatibilidade preliminar e atividade antiangiogênica, comprovando-se que os dispositivos desenvolvidos apresentaram características adequadas para um sistema de liberação prolongada.

Diante dos resultados obtidos, têm-se como perspectivas, otimizar o dispositivo em relação ao método de preparo, no intuito de reduzir a perda de AC durante o processo de produção e aprimorá-lo em relação à dose de triterpeno utilizada, bem como a realização de estudos pré-clínicos a fim de avaliar a segurança e a viabilidade do sistema de liberação em relação à disponibilização de dose efetiva do AC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJLAN, R. S.; SILVA, P. S.; SUN, J. K. Vascular Endothelial Growth Factor and Diabetic Retinal Disease. **Seminars in Ophthalmology**, v. 31, n. 1–2, p. 40–48, 2016.

ALVARADO, H. L. et al. Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the quantification of ursolic/oleanic acids mixture isolated from *Plumeria obtusa*. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 983–984, p. 111–116, 2015.

ANDERSON, J. M.; SHIVE, M. S. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 72–82, 2012.

ANDERSON, O. A.; BAINBRIDGE, J. W. B.; SHIMA, D. T. Delivery of anti-angiogenic molecular therapies for retinal disease. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 7–8, p. 272–282, 2010.

ANWER, M. K. et al. Development and evaluation of PLGA polymer based nanoparticles of quercetin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 213–219, 2016.

AOAC. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. **AOAC official methods of analysis**, 2016. Disponível em www.eoma.aoac.org/app_f.pdf. Acesso em 22 out. 2017.

ARANCIBIA-RADICH, J. et al. Comparative study of anti-inflammatory activity and qualitative-quantitative composition of triterpenoids from ten genotypes of *Ugni molinae*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 15, n. 5, p. 274–287, 2016.

AUERBACH, R. et al. A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos. **Developmental Biology**, v. 41, n. 2, p. 391–394, 1974.

BANDELLO, F. et al. Recent advances in the management of dry age-related macular degeneration: A review. **F1000Research**, v. 6, p. 245, 2017.

BARBOSA, L.C. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: Editora UFV, 2007.

BEHL, T.; KOTWANI, A. Possible role of endostatin in the antiangiogenic therapy of diabetic retinopathy. **Life Sciences**, v. 135, p. 131–137, 2015.

BENCHORIN, G. et al. Assessment of Murine Retinal Function by Electroretinography. **Bio-protocol**, v. 7, n. 7, p. 1–11, 2017.

BOIMVASER, S. et al. In vitro bulk/surface erosion pattern of PLGA implant in physiological conditions: a study based on auxiliary microsphere systems. **Polymer Bulletin**, v. 73, n. 1, p. 209–227, 2016.

BOURNE, R. R. A. et al. Magnitude , temporal trends , and projections of the global prevalence of blindness and distance and near vision impairment : a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 9, p. e889–e897, 2017.

BOYES, W. K. et al. Toluene inhalation exposure for 13 weeks causes persistent changes in electroretinograms of Long–Evans rats. **NeuroToxicology**, v. 53, p. 257–270, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Poder Executivo, de 25 julho de 2017.

BRASIL. **Braile aumenta a inclusão de cegos na sociedade**, 2015. Disponível em :<<http://www.brasil.gov.br/cidadania-e-justica/2015/01/braile-aumenta-inclusao-de-cegos-na-sociedade>>. Acesso em 02 maio 2017.

BRASIL. Inibidores da angiogênese para o tratamento da degeneração macular relacionada à idade. **Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde**, n. 6, p. 1–13, 2008.

CAMPOCHIARO, P. A.; AIELLO, L. P.; ROSENFELD, P. J. Anti–Vascular Endothelial Growth Factor Agents in the Treatment of Retinal Disease: **Ophthalmology**, v. 123, n. 10, p. S78–S88, 2016.

CHATURVEDULA, P.; PRAKASH, I. Isolation and Structure Elucidation of Two Triterpene Acids from the Leaves of *Perilla frutescens*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 1, n. 6, p. 49–53, 2013.

CHEMICAL book. **Corosolic acid**. Disponível em:http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB9466988.htm. Acesso em 12 dez.2017.

CHENG, Q. et al. CRA (Crosolic Acid) isolated from *Actinidia valvata* Dunn. Radix induces apoptosis of human gastric cancer cell line BGC823 in vitro via down-regulation of the NF- κ B. **Food and Chemical**, v. 105, p. 475–485, 2017.

CHENNAMANENI, S. R. et al. Development of a novel bioerodible dexamethasone implant for uveitis and postoperative cataract inflammation. **Journal of Controlled Release**, v. 167, n. 1, p. 53–59, 2013.

CLARCK, M. E.; KRAFT, T. W. Measuring Rodent Electroretinograms to Assess Retinal Function. **Methods Molecular Biology**, v. 884, p. 265–286, 2012.

COSSÉ, A. et al. Hot Melt Extrusion for Sustained Protein Release: Matrix Erosion and In Vitro Release of PLGA-Based Implants. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 1, p. 15–26, 2017.

DANHIER, F. et al. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 505–522, 2012.

DELPLACE, V.; PAYNE, S.; SHOICHET, M. Delivery strategies for treatment of age-related ocular diseases: From a biological understanding to biomaterial solutions. **Journal of Controlled Release**, v. 219, p. 652–668, 2015.

EGOSHI, C. T. et al. QUANTIFICATION OF TUMOR-INDUCED ANGIOGENESIS ON CHICKEN EMBRYO CHORIOALLANTOIC MEMBRANE. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 1, p. 303–310, 2015.

EL-MOGHAZY, A. M. et al. Chemical constituents of ornamental pomegranate and its antioxidant and anti-inflammatory activities in comparison with edible pomegranate. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 5, n. 4, p. 88–94, 2016.

FANTE, R. J.; DURAIRAJ, V. D.; OLIVER, S. C. N. Diabetic retinopathy: An update on treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 123, n. 3, p. 213–6, 2010.

FARMACOPEIA Brasileira, 5. ed. Brasília, DF: Anvisa, 2010, v.1, p.66 -72.

FENG, X. et al. Microbial transformation of the anti-diabetic agent corosolic acid by *Cunninghamella echinulata*. **Journal of Asian Natural Products Research**, 2016.

FIALHO, S. L. et al. Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, n. 6, p. 891–896, 2003.

FIALHO, S. L.; SILVA-CUNHA, A. D. S. Drug delivery systems for the posterior segment of the eye: fundamental basis and applications. **Arquivos brasileiros de oftalmologia**, v. 70, n. 1, p. 173–179, 2007.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **The Journal of biological chemistry**, v. 267, n. 16, p. 10931–4, 1992.

FORRESTER, J. V. et al. **The eye: basic sciences in practice**. 4.th. Elsevier, 2016.

GACCHE, R. N.; MESHRAM, R. J. Angiogenic factors as potential drug target: Efficacy and limitations of anti-angiogenic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1846, n. 1, p. 161–179, 2014.

GASPARIN, F. **Estudo farmacológico, eletrofisiológico e morfológicodos efeitos da injeção intravítrea de ácido micofenólico em coelhos**. 2013.155 f. Dissertação (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. São Paulo.

GENTILE, P. et al. An overview of poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 3, p. 3640–3659, 2014.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 13. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2017.

GRUPO retina. **O olho**. Disponível em: <<http://www.gruporetina.org.br/img/olho.jpg>>. Acesso em 22 abr. 2017.

GUYTON, A.C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 7.ed. São Paulo: Elsevier, 2011.

HUANG, D.; CHEN, Y.-S.; RUPENTHAL, I. D. Overcoming ocular drug delivery barriers through the use of physical forces. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2017.

HUANG, W. et al. Application of electroretinography (ERG) in early drug development for assessing retinal toxicity in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 289, n. 3, p. 525–533, 2015.

JACOB, M. . et al. Eletrorretinograma de campo total : das origens celulares à aplicação clínica . **Neurociências**, v. 7, p. 107–117, 2011.

JAHANGIRI, A. et al. Application of electrospraying as a one-step method for the fabrication of triamcinolone acetonide-PLGA nanofibers and nanobeads. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 219–224, 2014.

JOSHI, N. P. et al. Development and validation of hplc method for simultaneous determination of bio-active markers corosolic acid , asiatic acid and β -sitosterol from leaves of *lagerstroemia speciosa* linn . and from marketed formulation. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 4, p. 223–226, 2013.

KANG-MIELER, J. J.; OSSWALD, C. R.; MIELER, W. F. Advances in ocular drug delivery: emphasis on the posterior segment. **Expert opinion on drug delivery**, v. 5247, n. November, p. 1–14, 2014.

KAPOOR, D. N. et al. PLGA: a unique polymer for drug delivery. **Therapeutic Delivery**, v. 6, n. 1, p. 41–58, 2015.

KAWASAKI, R. et al. Incidence and progression of diabetic retinopathy in Japanese adults with type 2 diabetes: 8 year follow-up study of the Japan Diabetes Complications Study (JDCS). **Diabetologia**, v. 54, n. 9, p. 2288–2294, 2011.

KELES, H. et al. Studying the release of hGH from gamma-irradiated PLGA microparticles using ATR-FTIR imaging. **Vibrational Spectroscopy**, v. 71, p. 76–84, 2014.

KIM, E. et al. Isolation and Identification of Intestinal CYP3A Inhibitors from Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) Using Human Intestinal Microsomes. **Planta Medica**, v. 77, n. 3, p. 265–270, 17 fev. 2011.

KIM, J. H. et al. Ursolic acid and its natural derivative corosolic acid suppress the proliferation of APC-mutated colon cancer cells through promotion of β -catenin degradation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 67, p. 87–95, 2014a.

KIM, Y. C. et al. Ocular delivery of macromolecules. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 172–181, 2014b.

KLEIN, G. et al. Antidiabetes and anti-obesity activity of *Lagerstroemia speciosa*. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 4, n. 4, p. 401–407, 2007.

KUE, C. S. et al. Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM): an alternative predictive model in acute toxicological studies for anti-cancer drugs. **Esperimental Animals**, v. 64, n. 2, p. 129–138, 2015.

LEE, S. S. et al. Biodegradable implants for sustained drug release in the eye. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 10, p. 2043–2053, 2010.

LI, B. et al. Application of High-Speed Counter-Current Chromatography for Isolation of Triterpenes from Schisandra Chinensis (Turcz .) Baill and Induction Apoptosis Mechanism of. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v. 24, p. 969–977, 2014a.

LI, B.; WU, J.; LI, X. Quantitative determination of corosolic acid in rat plasma by LC-MS / MS-ESI : Application to a pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 3, p. 511–516, 2014.

LI, E. N.; LUO, J. G.; KONG, L. Y. Qualitative and quantitative determination of seven triterpene acids in Eriobotrya japonica Lindl. by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection and mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v. 20, n. 4, p. 338–343, 2009.

LI, J. et al. Simultaneous determination of corosolic acid and euscaphic acid in the plasma of normal and diabetic rat after oral administration of extract of *Potentilla discolor* Bunge by high- performance liquid chromatography / electrospray ionization mass spectromet. **Biomedical Chromatography**, v. 28, p. 717–724, 2014b.

LI, Y. et al. Inhibition of Mitochondrial Fission and NOX2 Expression Prevent NLRP3 Inflammasome Activation in the Endothelium: The Role of Corosolic Acid Action in the Amelioration of Endothelial Dysfunction. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 24, n. 16, p. 893–908, 2016.

LIN, T. C. et al. Nanotechnology-based drug delivery treatments and specific targeting therapy for age-related macular degeneration. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 78, n. 11, p. 635–641, 2015.

LLOYD, A. W.; FARAGHER, R. G. A.; DENYER, S. P. Ocular biomaterials and implants. **Biomaterials**, v. 22, p. 769–785, 2001.

LŐRINCZ, A. et al. Effects of ursolic acid on the structural and morphological behaviours of dipalmitoyl lecithin vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1848, p. 1092–1098, 2015.

MELLO, P. A. D. A. et al. Farmacologia ocular aplicada no tratamento de doenças do vítreo, retina e coróide. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 73, n. 3, p. 294–299, 2010.

MORENO-JIMÉNEZ, I. et al. The chorioallantoic membrane (CAM) assay for the

study of human bone regeneration : a refinement animal model for tissue engineering. **Nature**, n. April, p. 1–12, 2016.

MOURA, S. A. L. et al. Local Drug Delivery System: Inhibition of Inflammatory Angiogenesis in a Murine Sponge Model by Dexamethasone-Loaded Polyurethane Implants. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 7, p. 2886–2895, 2011.

NAZARUK, J.; BORZYM-KLUCZYK, M. The role of triterpenes in the management of diabetes mellitus and its complications. **Phytochemistry Reviews**, p. 675–690, 2014.

NGUYEN, C. T. et al. Simultaneous Recording of Electroretinography and Visual Evoked Potentials in Anesthetized Rats. **Journal of Visualized Experiments**, n. 113, p. e54158–e54158, 2016.

ORÉFICE, R.L., PEREIRA, M.M., MANSUR, H.S., **Biomateriais – Fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, 2012

PAIVA, M.R.B. **Desenvolvimento de implantes intravítreos contendo sirolimus visando o tratamento de uveíte autoimune**. 2015. 142f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

PARANHOS, F. R. L. et al. Degeneração macular relacionada à idade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 2, p. 106–111, 2013.

PATEL, A. et al. Ocular drug delivery systems: an overview. **World Journal of Pharmacology**, v. 2, n. 2, p. 47–64, 2013.

PEREIRA, V. V. et al. Chemical constituents of Jacaranda oxyphylla and their acetylcholinesterase inhibitory and antimicrobial activities. **Records of Natural Products**, v. 10, n. 3, p. 392–396, 2016.

PETERS, T. et al. Evaluation of polyesteramide (PEA) and polyester (PLGA) microspheres as intravitreal drug delivery systems in albino rats. **Biomaterials**, v. 124, p. 157–168, 2017.

RAWAS-QALAJI, M.; WILLIAMS, C.-A. Advances in ocular drug delivery. **Current eye research**, v. 37, n. 5, p. 345–56, 2012.

SABROSA, N. A. et al. Tratamento cirúrgico da retinopatia diabética. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 72, n. 3, p. 204–209, 2013.

SBO - Sociedade brasileira de oftalmologia. **O olho**. Disponível em: <<http://www.sboportal.org.br/glossario.aspx>>. Acesso em: 18 abr. 2017.

SHORT, B. G. Safety evaluation of ocular drug delivery formulations: techniques and practical considerations. **Toxicologic pathology**, v. 36, n. 1, p. 49–62, 2008.

SKEHAN, P., STORENG, R., et al. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. **Journal of National Cancer Institute**, 82, 1107-1112, 1990.

SOLANO, A. G. R. et al. Development and Evaluation of Sustained-Release Etoposide-Loaded Poly(ϵ -Caprolactone) Implants. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 14, n. 2, p. 890–900, 2013.

SUGA, M. *et al.* Recent progress in scanning electron microscopy for the characterization of fine structural details of nano materials. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 42, n. 1, p. 1-21, 2014.

STITT, A. W. et al. The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 51, p. 156–186, 2016.

SUN, S.-B. et al. Formulation and evaluation of PLGA nanoparticles loaded capecitabine for prostate cancer. **International Journal Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 10, p. 19670–19681, 2015.

SURESH, P. K. et al. Ocular implants as drug delivery device in ophthalmic therapeutics: An overview. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 7, n. 6, p. 665–676, 2014.

TAN, H.; SONAM, T.; SHIMIZU, K. The potential of triterpenoids from loquat leaves (*Eriobotrya japonica*) for prevention and treatment of skin disorder. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, 2017.

THRIMAWITHANA, T. R. et al. Drug delivery to the posterior segment of the eye. **Drug Delivery to the posterior segment of the eye**, v. 16, n. 5–6, p. 270–277, 2011.

TOTH, C. A.; SEIDER, M. I.; CHEN, X. Intravitreal Triamcinolone Deposition Mimicking Frosted Branch Angiitis: Optical Coherence Tomography Findings. **Retina, The Journal of Retinal and Vitreous Diseases**, v. 36, p. 41–42, 2016.

VERARDO, G. et al. High Triterpenic Acids Production in Callus Cultures from Fruit Pulp of Two Apple Varieties. **Phytochemical Analysis**, v. 28, n. 1, p. 5–15, 2017.

VEY, E. et al. Degradation kinetics of poly (lactic-co-glycolic) acid block copolymer cast films in phosphate buffer solution as revealed by infrared and Raman spectroscopies. **Polymer Degradation and Stability**, v. 96, p. 1882–1889, 2011.

VIEIRA, L. C. **Desenvolvimento de Sistemas de Liberação Prolongada de Ácido Rosmarínico para o tratamento de doenças oculares causadoras de neovascularização**: obtenção e caracterização dos sistemas. 2011. 140f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

VISIO oftalmologia. **Degeneração macular relacionada à idade**. Disponível em: <<http://www.clinicavisio.com.br/tratamentos-detalhes/7/degeneracao-macular-relacionada-a-idade>>. Acesso em 24 out. 2017.

WEBER, M. L.; HEIER, J. S. Choroidal Neovascularization Secondary to Myopia, Infection and Inflammation. **Developments in ophthalmology**, v. 55, p. 167–75, 2016.

YANG, J. et al. Corosolic acid inhibits adipose tissue inflammation and ameliorates insulin resistance via AMPK activation in high-fat fed mice. **Phytomedicine**, v. 23, n. 2, p. 181–190, 2016.

YASIN, M. N. et al. Implants for drug delivery to the posterior segment of the eye: A focus on stimuli-responsive and tunable release systems. **Journal of Controlled Release**, v. 196, p. 208–221, 2014.

YOO, K. H. et al. Corosolic Acid Exhibits Anti-angiogenic and Anti-lymphangiogenic Effects on In Vitro Endothelial Cells and on an In Vivo CT-26 Colon Carcinoma Animal Model. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 5, p. 714–723, 2015.

YU, H. et al. Phytochemical and phytopharmacological review of *Perilla frutescens* L. (Labiatae), a traditional edible-medicinal herb in China. **Food and Chemical Toxicology**, v. 108, p. 375–391, 2017.

ANEXOS

Anexo I – Certificado de aprovação - CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da segurança da administração intravítrea de ácido corosólico em olhos de ratos.", protocolo do CEUA: 226/2017 sob a responsabilidade de Armando da Silva Cunha Junior que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 18/09/2017.

Vigência da Autorização	18/09/2017 a 17/09/2022
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/inhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	4
Peso/idade	200g / 7(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério da Faculdade de Farmácia -UFMG
*Espécie/inhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	4
Peso/idade	200g / 7(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério da Faculdade de Farmácia -UFMG
*Espécie/inhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	4
Peso/idade	200g / 7(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério da Faculdade de Farmácia -UFMG

Considerações posteriores:

18/09/2017	Aprovado na reunião do dia 18/09/2017. Validade: 18/09/2017 à 17/09/2022
------------	--

Belo Horizonte, 03/10/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha