

Diogo de Sousa Martins

**O USO DE LUTEÍNA E ZEAXANTINA COMO  
CORANTES INTRAOCULARES PARA  
CIRURGIA OFTALMOLÓGICA**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola  
Paulista de Medicina, para obtenção  
do título de Doutor em Ciências.

SÃO PAULO

2013

Diogo de Sousa Martins

**O USO DE LUTEÍNA E ZEAXANTINA COMO  
CORANTES INTRAOCULARES PARA  
CIRURGIA OFTALMOLÓGICA**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola  
Paulista de Medicina, para obtenção  
do título de Doutor em Ciências.

**Orientador:**

Prof. Dr. Rubens Belfort Junior

**Co-Orientadores:**

Prof. Dr. Maurício Maia

Prof. Dr. Acácio Alves de Souza Lima Filho

SÃO PAULO

2013

Sousa-Martins, Diogo

**O uso de Luteína e Zeaxantina como corantes intraoculares para cirurgia oftalmológica**/Diogo Sousa-Martins. -- São Paulo, 2013.  
xxi. 134f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina.

Título em inglês: The use of Lutein and Zeaxanthin as intraocular dyes in ophthalmic surgery.

1. Luteína. 2. Azul de Trypan. 3. Corantes. 4. Oftalmopatias/cirurgia. 5. Corpo vítreo/cirurgia.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGIA

**Chefe do Departamento:**

Profa. Dra. Denise de Freitas

**Coordenador do Curso de Pós-Graduação:**

Prof. Dr. Mauro Silveira de Queiroz Campos

Diogo de Sousa Martins

**O USO DE LUTEÍNA E ZEAXANTINA COMO  
CORANTES INTRAOCULARES PARA  
CIRURGIA OFTALMOLÓGICA**

**BANCA EXAMINADORA**

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

**SUPLENTES**

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Aprovada em: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2013.

**Este trabalho deu origem às publicações:**

Barroso L, Sousa-Martins D, Maia M, Moraes M, Lima-Filho AA, Rodrigues EB, Belfort Jr R. et al. Toxicity analysis of Lutein and Zeaxanthin associated to brilliant blue in a rabbit model. *Retina*. 2012 (in Press)

Caseli L, Sousa-Martins D, Maia M, Lima-Filho AA, Rodrigues EB, Belfort Jr, R. Physical interaction between an intraocular dye solution based on Lutein and Zeaxanthin in a surrogate internal limiting membrane model. *Biophys. Chem.* 2012 (in Press)

Sousa-Martins D, Maia M, Lima-Filho A.A.S, Rodrigues E.B, Martínez-Conesa, EM, Casaroli-Marano R.P, Belfort Jr R. Cytotoxicity profile of an intraocular dye solution based on lutein and zeaxanthin in human cell culture model. *IOVS*. 2012 (Submitted)

Sousa-Martins D, Maia M, Moraes M, Lima-Filho AA, Rodrigues EB, Belfort Jr R., et al. Use of lutein and zeaxanthin alone or combined with brilliant blue to identify intraocular structures intraoperatively. *Retina*. 2012;32(7):1328–36.

# **DEDICATÓRIA**

A minha esposa, **Carla**,

Aos meus filhos, **Diogo e Carlota**,

A minha mãe, **Profa. Dra. Ana Maria Sousa-Martins** e meu irmão, **Dr Manuel Sousa-Martins**.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha esposa, **Carla**, cujo espírito superior mantém-me constantemente fascinado. Pelo muito amor, apoio e companheirismo que me motiva a ser cada vez melhor e merecer. Sempre.

Aos meus filhos, **Diogo** e **Carlota**, por representarem o que de melhor eu fiz na vida.

A minha mãe, **Profa. Dra. Ana Maria Sousa-Martins**, por me ter apoiado em toda a minha vida e me ter ensinado sempre a lutar. E, sobretudo, a acreditar.

Ao meu irmão, **Dr Manuel Sousa Martins**, pela coragem e determinação e por mostrar-me que “confiança” pode ser algo natural e tangível.

Aos meus sogros, **Sr. João de Albuquerque** e **Sra. Maria de Lourdes F. Albuquerque**, pelo apoio que me deram.

A minha “**família brasileira**” (Nuno, Jaime, Ricardo, David e famílias) e aos meus queridos amigos de Portugal pela amizade e carinho que sempre procurarei retribuir.

A **Nação Brasileira** e à **Cidade de São Paulo**, lugares que me acolheram com carinho e me trataram como igual, e pelos quais sinto um orgulho enorme de me ter naturalizado. Vou tentar sempre fazer mais por esta bela Nação e Cidade.

Ao **Prof. Dr. Rubens Belfort Jr**, pelo exemplo de liderança, visão e resiliência que ultrapassa, em muito, as fronteiras da oftalmologia ou medicina. Pela força e retidão, pela atenção ao detalhe sem perder a visão do todo, pela paixão em avançar e melhorar sempre e pela confiança depositada nos outros. Permaneço eternamente grato por me ter acolhido em si e nos seus desde ainda antes de ter chegado ao Brasil. Não me esqueço disso e sinto-me honrado por poder continuar a aprender consigo. Inclusivamente, oftalmologia.



Ao **Prof. Dr. Maurício Maia**, meu co-orientador, pelo apoio, amizade e ajuda incansável nos trabalhos, apresentações em congressos e escrita de artigos, muitas vezes em horas impróprias. Sou muito agradecido pela orientação constante, dinamismo e entreaajuda sempre demonstradas.

Ao **Prof. Dr. Acácio Souza Lima Filho**, meu co-orientador, pelos vários ensinamentos e apoio, pelos conselhos e pela disponibilidade sempre presente. Pela sabedoria, orientação e bom-senso na execução dos projetos e pela amizade demonstrada quando cheguei ao Brasil.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Pedro Casaroli Marano**, pela disponibilidade, ajuda e sabedoria cedidas e pelo rigor humano e intelectual em prol da ciência. Pela amizade e retribuição.

Ao **Prof. Dr. Eduardo Buchele Rodrigues**, pela disponibilidade e ajuda prestadas e pelos vários ensinamentos e orientações oferecidos e que fizeram avançar este projeto no caminho correto.

A **Universidade Federal de São Paulo** e ao **Departamento de Oftalmologia** da Universidade Federal de São Paulo, por me acolherem como aluno e me darem todos os recursos necessários em termos de capital intelectual, humano ou infraestrutura para a execução deste e outros projetos. A minha admiração e respeito por esta instituição são diretamente proporcionais à gratidão que sinto.

Aos meus colegas de projeto, residentes, pós-graduandos e fellows de pesquisa da Universidade Federal de São Paulo, em especial Dr Emmerson Badaró, pelo companheirismo, entreaajuda e dedicação na execução da componente de pesquisa desta tese.

A empresa **Ophthalmos SA**, pelo empenho constante e ajuda prestada no desenvolvimento das formulações e pelos ótimos conselhos e orientação dados, por intermédio da administração geral, centralizado na pessoa do seu dono, Prof. Dr. Acácio Souza Lima Filho e do departamento de produção, brilhantemente comandados pela Dra. Andréia Lourenço.

A empresa **Kemin Industries, Inc.**, pela idoneidade, ajuda e compromisso em melhorar a qualidade de vida das pessoas através de produtos e serviços. Pelas amostras e recursos partilhados. Principalmente, por acreditar na ciência.

# Lista de Figuras

Figura 1. Capsulotomia circular contínua .....	2
Figura 2. O Vítreo e suas subdivisões anatômicas .....	5
Figura 3. Tomografia de coerência óptica das camadas retinianas .....	7
Figura 4. Histologia da membrana limitante interna removida em humanos.....	7
Figura 5. Membranas epirretiniana e limitante interna analisadas por microscopia eletrônica .....	8
Figura 6. Descolamento regmatogênico da retina.....	9
Figura 7. Histopatologia da membrana limitante interna em paciente com defeito de campo visual	10
Figura 8. Técnicas da remoção da membrana epirretiniana na cromovitrectomia .....	21
Figura 9. Técnicas cirúrgicas da remoção da membrana limitante interna .....	23
Figura 10. Autofluorescência e Tomografia de Coerência Ótica em cirurgia de buraco macular.....	24
Figura 11. Angiografia fluoresceínica em olhos de coelhos submetidos à injeção sub-retiniana de indocianina verde, azul de trypan e solução salina balanceada .....	25
Figura 12. Visão intraoperatória da remoção da hialóide posterior com triancinolona acetônida .....	27
Figura 13. Triancinolona Acetonida injetada no espaço subretiniano de coelhos.....	28
Figura 14. Fórmula molecular da Luteína .....	29
Figura 15. Fórmula molecular da Zeaxantina .....	30
Figura 16. Mecanismo de captação do estado tripleto dos fotossensibilizadores e do oxigênio singleto pela luteína e zeaxantina.....	31
Figura 17. Mecanismo de ação antioxidante da luteína e zeaxantina .....	32
Figura 18. Frequência acumulada do tamanho de partícula inicial de Luteína e Zeaxantina cristal ....	65
Figura 19. Frequência acumulada do tamanho de partícula após micronização de Luteína e Zeaxantina cristal com moinho de bolas planetário.....	66
Figura 20. Tingimento da Cápsula Anterior de olhos humanos com Luteína e Zeaxantina 0,3% + Azul Brilhante 0,025% .....	69
Figura 21. Tingimento do Vítreo obtido após a injeção de 0,3 mL de Luteína e Zeaxantina 20% .....	70
Figura 22. Tingimento da membrana limitante interna obtido após a injeção de 0,3 mL de solução de Luteína e Zeaxantina 0,3% + Azul Brilhante 0,025% .....	71
Figura 23. Histologia de retina 7 dias após injeção intravítrea no grupo controle .....	76
Figura 24. Histologia de retina 7 dias após injeção intravítrea no grupo 1 .....	77
Figura 25. Histologia de retina 7 dias após injeção intravítrea no grupo 2 .....	77
Figura 26. Histologia de retina 7 dias após injeção intravítrea no grupo 3 .....	78
Figura 27. Histologia de retina 7 dias após injeção intravítrea no grupo 4 .....	78
Figura 28. Citotoxicidade das formulações-corantes testadas em células do epitélio pigmentado da retina usando os modelos WST-1 e CVDE.....	79

<b>Figura 29. Concentração inibitória máxima a 50% de cada formulação-corante em células do epitélio pigmentado da retina .....</b>	<b>80</b>
<b>Figura 30. Citotoxicidade das formulações-corantes testadas em células do epitélio corneano humano usando os modelos WST-1 e CVDE .....</b>	<b>81</b>
<b>Figura 31. Concentração inibitória máxima a 50% de cada formulação-corante em células do epitélio corneano humano .....</b>	<b>82</b>

# Lista de Tabelas

Tabela 1 – Substâncias utilizadas atualmente para a cromovitrectomia .....	35
Tabela 2 – Especificações da água para injetáveis usada nas formulações .....	39
Tabela 3A – Dados farmacotécnicos das formulações em Álcool Polivinílico a 1,4%. .....	40
Tabela 3B – Dados farmacotécnicos das formulações em Álcool Polivinílico a 1,4% associado a outros solventes .....	41
Tabela 3C – Dados farmacotécnicos das formulações em Cremophor EL™ .....	41
Tabela 4 – Parâmetros de validação do método analítico para a luteína e zeaxantina por cromatografia líquida de alta eficiência .....	45
Tabela 5 – Parâmetros de validação do método analítico do azul brilhante por cromatografia líquida de alta eficiência .....	46
Tabela 6 – Parâmetros de validação do método analítico do azul de trypan por cromatografia líquida de alta eficiência .....	47
Tabela 7 – Composição, pH e Osmolaridade das formulações-corantes usadas .....	55
Tabela 8 – Solubilidade da Luteína em diferentes solventes orgânicos com valor correspondente de absorvância e concentração .....	59
Tabela 9 – Solubilidade da Zeaxantina em diferentes solventes orgânicos com valor correspondente de absorvância e concentração .....	60
Tabela 10 – Solubilidade da trans-Luteína em diferentes solventes orgânicos com valor correspondente de absorvância e concentração .....	61
Tabela 11 – Características físico-químicas de formulações-corantes verde escuras .....	62
Tabela 12 – Características físico-químicas de formulações-corantes verde claras .....	63
Tabela 13 - Características físico-químicas de formulações-corantes azuis .....	64
Tabela 14 - Características físico-químicas de formulações-corantes de outras cores .....	64
Tabela 15 – Grau de tingimento do Vítreo, Cápsula Anterior e Membrana Limitante Interna com as diferentes formulações usadas .....	68
Tabela 16 – Diferença porcentual de amplitude de ondas entre tempo 0 e 7 dias após injeção do corante .....	72
Tabela 17 – Diferença porcentual de amplitude de ondas entre tempo 0 e 24 horas após injeção do corante .....	73
Tabela 18 – Análise descritiva da média e desvio-padrão de cada olho testado .....	74
Tabela 19 – Indicações da facovitrectomia .....	94

# **Lista de Quadros**

Quadro 1 – Descrição do processo laboratorial para formulações-corantes dispersas em álcool polivinílico .....	43
Quadro 2 – Descrição do processo laboratorial para formulações-corantes dispersas em Cremophor EL™ .....	44
Quadro 3 – Descrição do processo laboratorial para formulações-corantes em complexos de inclusão com hidroxipropilbetaciclodextrina .....	44
Quadro 4 – Cronograma de desenvolvimento da formulação intraocular .....	47
Quadro 5 – Cronograma do estudo em olhos cadavéricos .....	50
Quadro 6 – Cronograma do estudo de toxicidade intravítrea em coelhos.....	54
Quadro 7 – Cronograma do estudo de citotoxicidade e proliferação celular.....	58

## **Lista de Abreviaturas**

AB..... Azul Brillhante

AP..... Azul Patente

APV..... Álcool Polivinílico

ARPE-19..... Linha Celular do Epitélio Pigmentado Retiniano Humano

AT..... Azul de Trypan

CA..... Cápsula Anterior

CI<sub>50</sub>..... 50% da Concentração Máxima Inibitória

CVDE..... Eluição de Corante Cristal de Violeta

EPR..... Epitélio Pigmentado da Retina

ERG..... Eletrorretinografia

HCE..... Células do Epitélio Corneano Humano

HP..... Hialóide Posterior

IfCV..... Infracianina Verde

ICV..... Indocianina Verde

Kg..... Quilograma

L/Z..... Luteína e Zeaxantina

MER..... Membrana Epirretiniana

mg..... Miligrama

mg/mL..... Miligramas Por Mililitro

MLI..... Membrana Limitante Interna

nm..... Nanômetros

N/A..... Não Aplicável

OCT..... Tomografia de Coerência Óptica

SSB..... Solução Salina Balanceada

TA..... Triancinolona Acetonida

UNIFESP..... Universidade Federal de São Paulo

µg..... Microgramas

%..... Porcentagem



## Resumo

**Objetivo:** Criar formulações intraoculares contendo Luteína e Zeaxantina, isolada ou combinada com Azul Brilhante ou Azul de Trypan, e estudar a segurança e eficácia destas formulações em cirurgia de catarata e vitreoretiniana. **Desenho:** Desenvolvimento farmacotécnico e estudo experimental pré-clínico. **Métodos:** O estudo foi desenvolvido em quatro fases: (I) desenvolvimento farmacotécnico: foram criadas formulações intraoculares com base na escolha do veículo, técnicas de micronização, manipulação, enchimento e esterilização e estabilidade das matérias-primas e produtos finais; (II) estudo em olhos cadavéricos: foram realizadas cirurgias de catarata e vitreoretiniana de céu aberto em 102 olhos cadavéricos humanos, com um máximo de 12 horas após óbito, fazendo uso de uma escala de graduação previamente validada para avaliação da capacidade de tingimento dos tecidos e estruturas corneanas e retinianas; (III) estudo experimental “in-vivo” de toxicidade intravítrea: 26 coelhos *dutch-belt* usaram as formulações preparadas em (I) e realizou-se eletrorretinografia e análise histológica através de microscopia óptica e eletrônica, e (IV) estudo em cultura celular: foi feita avaliação citotóxica e da proliferação celular tanto em células do epitélio corneano humano como células do epitélio pigmentado retiniano humano. **Resultados:** Soluções-corantes que fazem uso de óleo de rícino polietoxilado (Cremophor EL™) como veículo, não apresentam afinidade corante para a Cápsula Anterior, Vítreo, Hialóide Posterior, Membrana Limitante Interna e Membrana Epirretiniana. Adicionalmente, as soluções contendo Cremophor EL™ mostraram-se citotóxicas e inibiram a proliferação celular. Pelo contrário, soluções-corantes contendo álcool polivinílico como veículo mostraram-se eficazes e seguras nos modelos testados. Os testes de eficácia em olhos cadavéricos mostraram apenas cinco formulações (sem Cremophor EL™) que coraram o vítreo menos de +++/4. Quanto à Cápsula Anterior e Membrana Limitante linternas, duas formulações atingiram a máxima coloração com os níveis mais baixos de Azul de Trypan e Azul Brilhante, respectivamente: a primeira, Luteína e Zeaxantina a 0,5% associada a Azul de Trypan a 0,04%, e a segunda, Luteína e Zeaxantina a 0,3% associada a Azul Brilhante a 0,025%. O estudo de toxicidade intravítrea mostrou que nenhuma formulação testada exibe toxicidade “in-vivo” no vítreo e retina. Estes resultados foram corroborados com o teste de citotoxicidade e proliferação celular, o qual demonstra a ausência estatisticamente significativa de toxicidade celular nas formulações de Luteína e Zeaxantina isolada ou combinada com Azul de Trypan ou Azul Brilhante testadas, usando álcool polivinílico como veículo. **Conclusões:** As

soluções-corantes Luteína e Zeaxantina a 0,3% associada a Azul Brilhante a 0,025% e Luteína e Zeaxantina a 0,5% associada a Azul de Trypan a 0,04%, ambas em álcool polivinílico, foram as melhores fórmulas em termos de estabilidade, pH e osmolaridade. Estas mesmas formulações atingiram os melhores resultados na coloração da Cápsula Anterior, Vítreo e Membrana Limitante Interna de olhos humanos cadavéricos. Os testes de toxicidade em coelhos e em cultura celular mostram que estas formulações são seguras para uso em estudos clínicos em pacientes. As soluções-corantes à base de Luteína e Zeaxantina poderão ser uma alternativa segura e eficaz em cirurgia de catarata e vitreoretiniana.

# Sumário<sup>1</sup>

Dedicatória .....	VII
Agradecimentos.....	VIII
Sumário .....	X
Lista de Figuras .....	XI
Lista de Tabelas .....	XIII
Lista de Quadros .....	XIV
Lista de Abreviaturas .....	XV
Resumo .....	XVII
<b>1 Introdução e revisão de literatura .....</b>	<b>1</b>
1.1 CAPSULOTOMIA EM CIRURGIA DE CATARATA .....	2
1.2 VITRECTOMIA EM CIRURGIA VITREORRETININA .....	4
1.2.1 Vítreo .....	5
1.2.2 Membranas retinianas .....	6
1.2.3 Complicações na remoção do Vítreo .....	9
1.2.4 Complicações na remoção da Membrana Limitante Interna .....	10
Defeitos de campo visual .....	10
Anormalidades no Epitélio Pigmentado da Retina .....	11
1.3 CROMOVITRECTOMIA .....	11
1.3.1 História do uso de corantes vitais na cirurgia de catarata e vitreorretiniana .....	11
1.3.2 Mecanismos de toxicidade dos corantes .....	15
1.3.3 Biocompatibilidade retiniana .....	17
1.3.4 Técnicas Cirúrgicas para aplicação intraoperatória .....	18
Como a cavidade vítrea deve ser preenchida no momento da injeção: .....	18
De que forma o cirurgião pode melhorar o controle da injeção para reduzir o risco de migração do .....	19
corante subretiniano .....	19
1.4 Corantes Vitais .....	20
1.4.1 Generalidades .....	20
1.4.2 Bioquímica e farmacologia de Corantes Vitais .....	20
Corantes de Azo .....	21
Corantes de Tiazina .....	22
Corantes de Arilmetano .....	22
Corantes de Cianinas .....	23
Corantes de Xantenos .....	26
Corticóides .....	26
Xantofilas .....	28
1.5 Resumo dos princípios e indicações .....	34
1.6 FACOVITRECTOMIA .....	36
<b>2 Métodos .....</b>	<b>37</b>
2.1 ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO INTRAOCULAR .....	37
2.1.1 Desenho do estudo .....	37
2.1.2 Determinação do Veículo Adequado para a Preparação do Corante .....	37
2.1.3 Manipulação e Produção das Diferentes Formulações .....	39
1. Obtenção da água para injetáveis .....	39

2. Planejamento de produção das formulações .....	40
3. Criação de Sistemas Líquidos .....	42
Sumário do processo de produção .....	43
Álcool Polivinílico .....	43
Cremophor EL™ .....	43
Hidroxipropilbetaciclodextrina .....	44
Luteína e Zeaxantina .....	45
Azul Brillante .....	46
Azul de Trypan .....	46
2.1.4 Cronograma .....	47
2.2 ESTUDO EM OLHOS CADAVERÍCOS .....	47
2.2.1 Desenho do Estudo .....	47
2.2.2 Tipos de Corantes e Preparação .....	48
2.2.3 Olhos Cadavéricos .....	49
2.2.4 Injeção sobre a Cápsula Anterior, Vítreo, Hialóide Posterior, Membrana Limitante Interna e Membrana Epirretiniana - técnica cirúrgica .....	49
2.2.5 Análise Histológica .....	50
2.2.6 Cronograma dos Experimentos .....	50
2.3 ESTUDO DE TOXICIDADE EM COELHOS .....	51
2.3.1 Desenho do Estudo .....	51
2.3.2 Tipos de Corantes .....	51
2.3.3 Animais e Constituição dos Grupos .....	52
2.3.4 Injeção Intravítrea e Técnica Cirúrgica .....	52
2.3.5 Fundoscopia e Angiografia Fluoresceínica .....	53
2.3.6 Histologia .....	53
2.3.7 Cronograma dos experimentos .....	54
2.4 ESTUDO DE CITOTOXICIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR .....	55
2.4.1 Desenho do estudo .....	55
2.4.2 Tipos de corantes usados .....	55
2.4.3 Metodologia .....	56
Culturas de células e meios .....	56
Métodos .....	56
Modelo WST-1 .....	57
Método de Eluição de Corante com Cristal de Violeta (CVDE) .....	58
2.4.4 Cronograma dos experimentos .....	58
<b>3 Resultados .....</b>	<b>59</b>
3.1 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO INTRAOCULAR .....	59
3.2 ESTUDO EM OLHOS CADAVERÍCOS .....	67
3.3 ESTUDO DE TOXICIDADE EM COELHOS .....	71
3.3.1 Exame Ocular .....	71
3.3.2 Eletrorretinografia .....	72
3.3.3 Histologia .....	74
3.4 ESTUDO DE CITOTOXICIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR .....	79
3.4.1 Em células do epitélio pigmentado retiniano humano .....	79
3.4.2 Em células do epitélio corneano humano .....	81
<b>4 Discussão .....</b>	<b>83</b>
4.1 ESTUDO DE DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO, ESTUDO EM OLHOS CADAVERÍCOS, ESTUDO DE TOXICIDADE INTRAVÍTREA EM COELHOS E ESTUDO DE CITOXICIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR .....	83
4.2 USO POTENCIAL DE CORANTES CONTENDO LUTEÍNA E ZEAXANTINA .....	96

<b>5 Conclusões</b> .....	<b>97</b>
A. Comportamento farmacotécnico de formulações-corantes contendo Luteína e Zeaxantina para uso em cirurgia de catarata e vitreorretiniana: .....	97
B. Eficácia corante das formulações contendo Luteína e Zeaxantina nas membranas e estruturas relevantes para a cirurgia de catarata e vitreorretiniana: .....	97
C. Toxicidade intravítrea das formulações contendo Luteína e Zeaxantina em coelhos: .....	98
D. Citotoxicidade e Proliferação Celular das formulações contendo Luteína e Zeaxantina em cultura celular corneana e retiniana: .....	98
<b>6 Anexo</b> .....	<b>99</b>
<b>7 Referências</b> .....	<b>101</b>
<b>Abstract</b> .....	

<sup>1</sup> Este trabalho foi elaborado conforme as normas do acordo ortográfico entre os países de língua portuguesa e de acordo com as normas de Vancouver.

# 1 Introdução e revisão de literatura

A cirurgia ocular é um dos ramos da cirurgia que testemunhou profundos e importantes avanços nos últimos anos. Procedimentos de cirurgia ocular estão se tornando cada vez mais complexos, ainda que a recuperação esteja cada vez mais rápida e eficiente<sup>(1)</sup>.

Existem diversos procedimentos essenciais na cirurgia oftalmológica atual. A cirurgia de catarata e vitreoretiniana são exemplos de procedimentos importantes, dos quais depende a qualidade de vida de milhares de pacientes<sup>(2, 3)</sup>.

De forma a auxiliar e contribuir para o sucesso destas cirurgias, usa-se, desde há vários anos, substâncias corantes, de forma a identificar estruturas intraoperatórias a serem removidas<sup>(4-6)</sup>.

Controvérsias sobre a necessidade e situações de uso dos corantes têm sido debatidas na literatura, à medida que se desenvolvem novas substâncias com melhores perfis de toxicidade e eficácia<sup>(7-9)</sup>.

Este trabalho possui quatro objetivos:

- A. Caracterizar o comportamento farmacotécnico de formulações-corantes contendo Luteína e Zeaxantina para uso em cirurgia de catarata e cirurgia vitreoretiniana;
- B. Demonstrar a eficácia corante das formulações contendo Luteína e Zeaxantina nas membranas e estruturas relevantes para a cirurgia de catarata e vitreoretiniana, em modelo de olhos cadavéricos;
- C. Avaliar a toxicidade intravítrea das formulações-corantes contendo Luteína e Zeaxantina em olhos de coelhos;
- D. Quantificar a citotoxicidade e proliferação celular das formulações-corantes contendo Luteína e Zeaxantina em cultura celular corneana e retiniana.

## 1.1 Capsulotomia em Cirurgia de Catarata

A criação da capsulotomia circular contínua, introduzida por Gimbel e Neuhann em 1990<sup>(10)</sup>, na cápsula anterior (CA) do cristalino, é considerada uma etapa crítica na cirurgia de catarata, realizada pela técnica da facoemulsificação, e também oferece vantagens para o implante da lente intraocular no saco capsular. Para um bom controle durante a realização da capsulotomia circular contínua, a visualização da aba da CA é necessária e a ausência de reflexo vermelho adequado pode fazer a técnica muito difícil <sup>(11)</sup> (figura 1).

Figura 1. Capsulotomia circular contínua

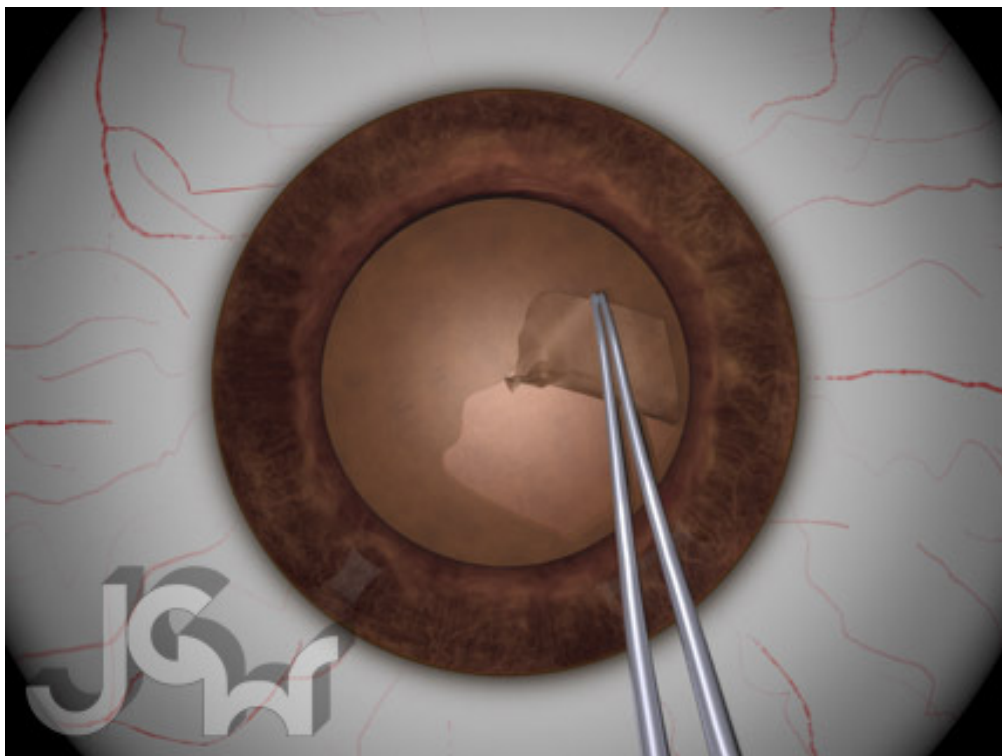


Diagrama esquemático representando a capsulorrexia auxiliada por forceps, no qual se vê a cápsula anterior sendo removida em um movimento circular contínuo.

É fundamental que a capsulorrexia seja contínua nos casos de catarata mais avançada, que pode requerer maior energia de facoemulsificação, maior manipulação no saco cápsular e vigorosa quebra e/ou corte no saco cápsular<sup>(12)</sup>.

A visualização da CA pode ser difícil em muitas circunstâncias, como catarata madura, onde não se observa o reflexo vermelho; catarata traumática, catarata com córtex branco ou opalescente e catarata em olhos com opacidades corneanas<sup>(2)</sup>.

Melhorar a visualização da CA também pode ser de grande valor para aqueles que estão aprendendo a técnica da capsulorrexis e da facoemulsificação<sup>(2)</sup>. A melhora da visualização da cápsula pode ser uma vantagem também na extração de catarata pediátrica, porque a CA da população pediátrica pode ser particularmente fina e elástica, tornando a capsulotomia circular contínua um desafio particular<sup>(13)</sup>.

Em 1993, Hoffer et al., publicaram um relato de caso do uso da fluoresceína em catarata madura para melhorar a visualização durante a capsulorexis. Nesse relato, a fluoresceína foi instilada sob a CA na câmara anterior preenchida com viscoelástico<sup>(14)</sup>. Desde então, o uso de outros corantes e técnicas alternativas para corar a CA e melhorar a visualização desta durante a cirurgia de catarata vêm sendo relatados.

Os corantes que receberam as maiores atenções foram: Indocianina Verde (ICV), Azul de Trypan (AT), Fluoresceína, Violeta cristal e Violeta genciana. Desses cinco corantes disponíveis na literatura, somente três ( ICV, fluoresceína e AT) foram aprovados pelo “Food and Drug Administration”\* (FDA) nos Estados Unidos da América. De igual forma, somente o AT está aprovado para uso na cirurgia de catarata<sup>(15, 16)</sup>.

O procedimento usual para corar a CA do cristalino durante a cirurgia de catarata consiste em injetar o corante na câmara anterior após a realização da paracentese inicial. 1 ou 2 gotas do corante são instiladas na câmara anterior, diretamente na superfície da CA, após a câmara anterior ser preenchida com ar. As bolhas de ar limitam o contato do corante com a íris e com a CA<sup>(2, 12, 15, 17)</sup>. Alternativamente, o corante pode ser misturado com viscoelástico, injetado sob o viscoelástico, ou injetado em solução salina balanceada (SSB), sob o viscoelástico. Cânulas especiais foram desenvolvidas para facilitar a introdução do corante<sup>(2)</sup>.

---

\* A Food and Drug Administration ou “FDA” é a agência que regulariza os medicamentos, produtos de saúde e alimentos em geral nos Estados Unidos da América.



Vários corantes são usados em cirurgia oftalmológica visando identificar estruturas visualmente difíceis de identificação e análise e, entre eles, estão corantes utilizados na capsulotomia do cristalino durante a cirurgia da catarata e também os utilizados em cirurgia vitreorretiniana<sup>(18, 19)</sup>.

## 1.2 Vitrectomia em Cirurgia Vitreorretiniana

A vitrectomia via pars plana, introduzida na década de 70 por Machemer, inicialmente era indicada apenas para casos complicados de descolamento da retina com a presença de proliferação vitreorretiniana. Já na década de 80, com o aperfeiçoamento dos aparelhos e melhor conhecimento da técnica, as indicações ficaram mais amplas. O termo “vitrectomia primária” foi introduzido por Klöti em 1983, entretanto ganhou mais força nos últimos anos com o desenvolvimento de sondas com maior velocidade de corte, controle da aspiração, e também com a cirurgia de menor calibre. A cirurgia vitreorretiniana tornou-se mais segura, reprodutível e previsível, com excelentes resultados anatômicos e funcionais<sup>(20)</sup>.

A vitrectomia consiste na retirada do gel intraocular vítreo alterado, na remoção de membranas pré-retinianas, e restabelecimento do volume ocular com SSB, gases, ou óleo de silicone.

O uso de corantes a fim de identificar estruturas durante a cirurgia vitreorretiniana, a cromovitrectomia, tornou-se uma técnica popular por facilitar a visualização de estruturas pré-retinianas<sup>(20)</sup>. A cromovitrectomia permite ao cirurgião uma identificação mais adequada das estruturas oculares, tornando a cirurgia vitreorretiniana mais fácil de ser realizada e otimizando os resultados<sup>(21)</sup>.

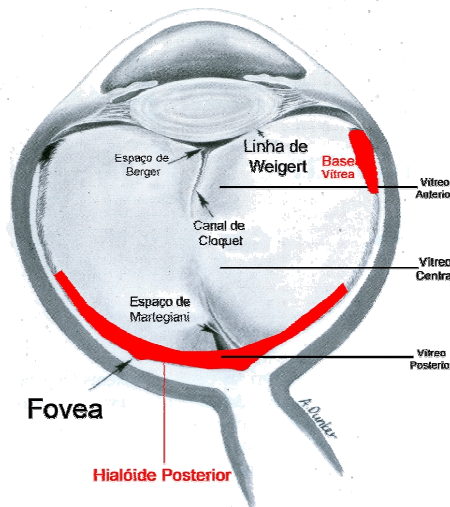
O termo cromovitrectomia foi introduzido em 2000, quando foi descrito que a ICV se mostrou capaz de corar a membrana limitante interna (MLI)<sup>(22-24)</sup>. Dados clínicos e experimentais, porém, mostraram um potencial de toxicidade retiniana que estimulou o aumento de pesquisa neste campo<sup>(22)</sup>.

## 1.2.1 Vítreo

Trata-se de estrutura anatômica fundamental para a cromovitrectomia, sendo removido durante este procedimento; por isto, será descrito em detalhes. É uma estrutura transparente de característica anatômico-gelatinosa que ocupa 80% do volume do olho, totalizando em média cerca de 4 gramas (ao redor de 4 mL em olhos com diâmetro anteroposterior do bulbo normal), sendo em menor quantidade nos hipermetropes e maior quantidade nos míopes. O Vítreo é derivado da retina e da mesoderme do sistema hialoideo-embrionário. É composto por ácido hialurônico e glicoproteínas, sendo mais aderido à retina na base vítrea, nos vasos retinianos <sup>(25)</sup>.

Ao ser removido, o Vítreo é substituído por SSB. O conhecimento anatômico dos seus pontos de adesão principais, bem como sua anatomia microscópica e a adesão do Vítreo posterior - também chamado de hialóide posterior (HP) - são fundamentais para o cirurgião vitreoretiniano (Figura 2) <sup>(5)</sup>.

Figura 2. O Vítreo e suas subdivisões anatômicas



O Vítreo apresenta divisão cirúrgica em: vítreo anterior; vítreo central e vítreo posterior ou hialóide posterior. Há aderências importantes do vítreo na base vítrea - em vermelho - (localizada no vítreo anterior) e na hialóide posterior - em vermelho - (localizada no vítreo posterior) Os espaços virtuais remanescentes da embriologia também são demonstrados: espaço de Berger (justaposto à face posterior do cristalino); linha de Weigert (justaposta a toda extensão do cristalino); canal de Cloquet (remanescente dos vasos hialoideos embrionários) e o espaço de Martegiani (justaposto ao nervo óptico). *Fonte: Green <sup>(26)</sup> Modificado e re-impresso com permissão.*

A remoção da Hialóide Posterior (HP) é um dos pontos principais e mais difíceis da vitrectomia. É importante ressaltar que, em razão das características anatômicas de transparência e forte adesão à retina, muitas vezes essa estrutura é de difícil identificação (Figura 1)<sup>(25, 27)</sup>. Portanto, a cromovitrectomia (remoção do vítreo e de estruturas intraoculares do segmento posterior do bulbo facilitada por corantes) torna o procedimento mais exequível. Algumas outras estruturas como microespaços (na prática, virtuais) de Berger e Martegiani, assim como o canal de Cloquet e a linha de Weigert também são estruturas importantes para o cirurgião (Figura 2)<sup>(25)</sup>.

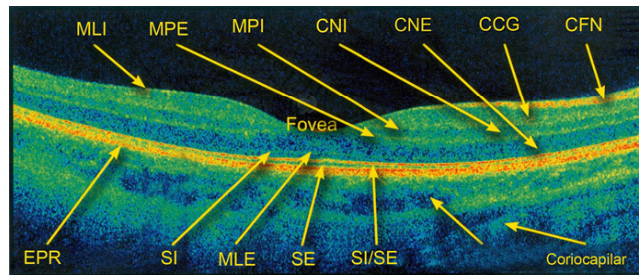
Por fim, o conhecimento da base vítrea e a dificuldade da sua identificação adequada é um notável desafio para os cirurgiões vitreoretinianos pois a sua remoção pode levar a rasgos iatrogênicos da frágil retina periférica durante a vitrectomia, em especial nos pacientes míopes (onde ela é extremamente delgada, até com menos de 100 micrômetros de espessura)<sup>(28, 29)</sup>.

## **1.2.2 Membranas retinianas**

A retina é composta por onze camadas celulares distribuídas de forma muito complexa, sendo a camada mais interna a MLI. Esta última é extremamente importante durante a cirurgia vitreoretiniana e será descrita com detalhes<sup>(30)</sup>.

Atualmente, o exame da tomografia de coerência óptica (OCT) permite a realização de um corte histológico da retina “in-vivo” (Figura 3). Esta tecnologia facilita a identificação de anormalidades anatômicas como edema na retina, e em especial, a observação da interface vitreoretiniana e subsequente identificação da MLI – 1ª camada da retina – e sua relação com a formação de tecidos patológicos como a membrana epirretiniana (MER), que prolifera sobre a membrana plexiforme interna (MLI) e a tração vitreomacular<sup>(31)</sup>.

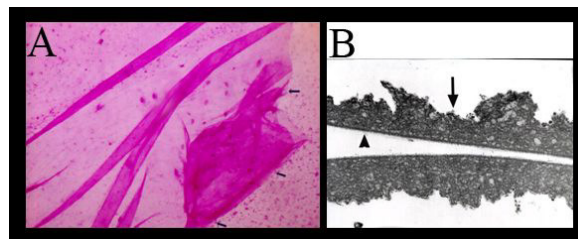
Figura 3. Tomografia de coerência óptica das camadas retinianas



MLI: membrana limitante interna; MPE: membrana plexiforme externa; MPI: membrana plexiforme interna; CNI: camada nuclear interna; CNE: camada nuclear externa; CCG: camada de células ganglionares; CFN: camada de fibras nervosas; EPR: epitélio pigmentado da retina; SI: segmentos internos; MLE: membrana limitante externa; SE: segmentos externos; SI/SE: segmentos internos/externos. *Fonte: Maia, M<sup>(30)</sup>. Re-impreso com permissão do autor.*

A membrana plexiforme (MLI) é uma estrutura de 1-3 micrômetros de espessura, com bordas brilhantes e delicadas, e que tem uma superfície regular na sua porção interna (superfície em contato com o vítreo) e uma superfície irregular na sua porção externa (superfície em contato com a retina) (Figura 4)<sup>(32)</sup>. É composta por colágeno tipo IV, sendo responsável pela aparência brilhante da retina.

Figura 4. Histologia da membrana limitante interna removida em humanos

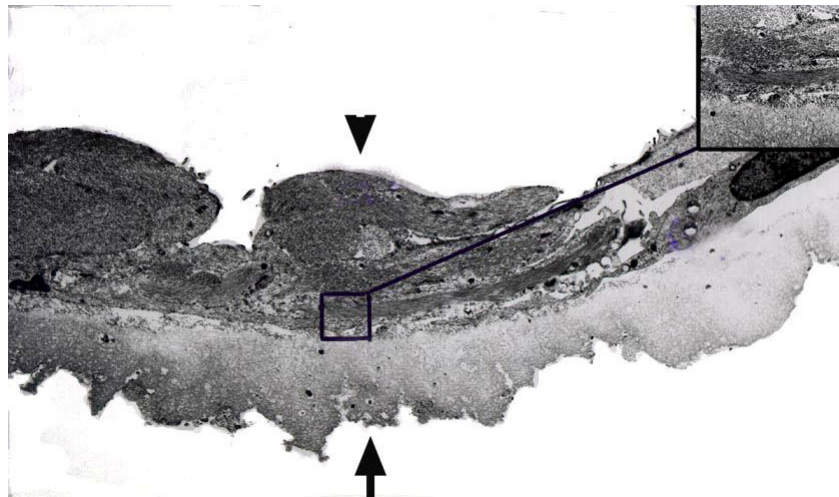


A - Histologia demonstrando a MLI. As bordas da MLI são demonstradas (setas) e os pontos (em plano posterior) correspondem ao filtro miliporoso (hematoxilina-eosina 40x). B - Microscopia eletrônica mostrando uma MLI dobrada. Ambas as superfícies da MLI, previamente em contato com a cavidade vítreo, estão quase se tocando (ponta de seta). Notam-se discretos debrís celulares na superfície oposta da membrana, previamente em contato com a retina (seta) - (MET 13000x). *Fonte: Maia, M<sup>(30)</sup>. Re-impreso com permissão do autor.*

A MLI não é facilmente observada durante a cirurgia de remoção, e, por esta razão, técnicas que facilitem sua identificação podem melhorar os resultados cirúrgicos<sup>(15, 33, 34)</sup>, sobretudo nos pacientes portadores de buracos maculares ou membranas epirretinianas (Figura 5).

A dificuldade parece ser mais importante em idosos, existindo indícios de que a MLI é gradualmente mais frágil quanto maior for a idade do paciente e/ou em diabéticos. Um forte brilho é visto na superfície da retina onde a MLI está presente, e um reflexo pobre é visto sobre a retina desprovida da MLI<sup>(15, 33)</sup>. Microaderências do vítreo à MLI podem causar pequenos pontos de rotura da mesma, resultando em proliferação astrocitária, de miofibroblastos e crescimento glial sobre a MLI, o que caracteriza a membrana epirretiniana (MER)<sup>(15)</sup>. Como ambas as estruturas - MER e MLI - são extremamente delgadas, muitas vezes é difícil ou até mesmo impossível para o cirurgião ter a certeza de qual estrutura está sendo manipulada. Por esse motivo, o uso dos corantes é extremamente importante para se ter certeza das estruturas intraoperatórias que o cirurgião vitreoretiniano está manipulando nas doenças da interface vitreoretiniana como o buraco macular, membrana epirretiniana, tração vitreomacular, dentre outras<sup>(15)</sup>.

Figura 5. Membranas epirretiniana e limitante interna analisadas por microscopia eletrônica

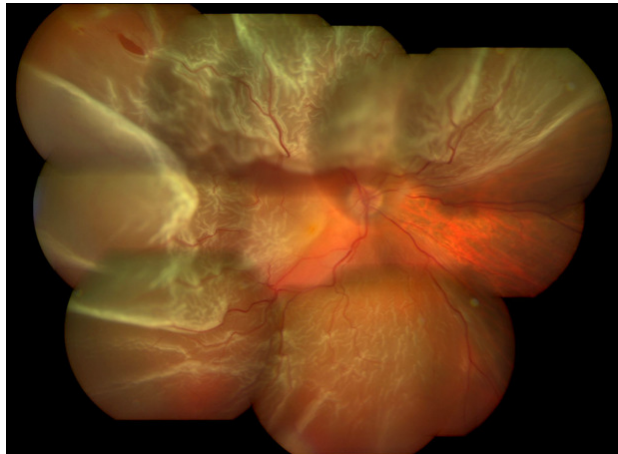


Microscopia eletrônica mostrando um segmento da membrana limitante interna (seta) e membrana epirretiniana (ponta de seta). A matriz ao redor de uma das superfícies é composta por moderada quantidade de colágeno com fibrilas de colágeno nativo (quadro em destaque superior direito). (MET 3800x; quadro superior direito MET 24000x). Fonte: Maia, M. Impresso com permissão do autor<sup>30</sup>.

### 1.2.3 Complicações na remoção do Vítreo

O descolamento de retina é consequente à rotura retiniana (devido à tração vitreoretiniana), que leva ao acúmulo de líquido no espaço sub-retiniano e à separação da retina neurosensorial do EPR (Figura 6).

Figura 6. Descolamento regmatogênico da retina



Descolamento regmatogênico da retina. Note-se a presença da rotura retiniana às 11 horas do relógio do olho direito e presença de fluido sub-retiniano com descolamento da mácula. *Fonte: Dr. Rafael Ernane. Impresso com permissão do autor. No prelo.*

As manobras cirúrgicas de remoção da HP e do vítreo periférico devem ser executadas em todos os casos, pois remanescentes vítreos são o estímulo básico para a formação de proliferação vitreoretiniana<sup>†</sup>. Algumas vezes há a presença de vitreosquise, onde camadas remanescentes do vítreo não são identificadas e adequadamente removidas, sobretudo nos pacientes jovens, alto míopes e/ou diabéticos. Para isso, o uso de corantes é especialmente benéfico, especificamente neste tipo de pacientes <sup>(29)</sup>.

---

<sup>†</sup> Complicação do descolamento de retina ou pós-operatória na qual células do EPR – por um estímulo ainda desconhecido – proliferam-se e resultam em descolamentos recorrentes da retina por tração.

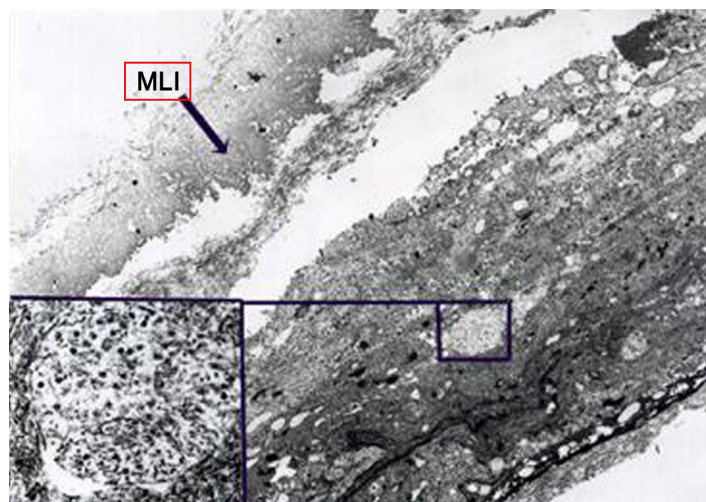
## 1.2.4 Complicações na remoção da Membrana Limitante Interna

### Defeitos de campo visual

A incidência de defeitos de campo visual, após cirurgia de vitrectomia é muito variável. Por exemplo, na cirurgia de buraco macular sem remoção da MLI, esta incidência é estimada em cerca de 7%, variando de 2 a 17%<sup>(30, 35)</sup>.

O escotoma absoluto que está relacionado ao defeito da retina neurossensorial (buraco macular) não é observado no pós-operatório, quando há fechamento do buraco, estando o tamanho do escotoma diretamente relacionado à duração dos sintomas e à acuidade visual pré-operatória<sup>(36, 37)</sup>. Há muitos fatores que podem estar envolvidos nos defeitos de campo visual: o trauma cirúrgico<sup>(38)</sup>, a desidratação retiniana, o descolamento posterior do vítreo induzido cirurgicamente, a pressão intraocular durante a troca fluido gasosa e o trauma cirúrgico iatrogênico (Figura 7)<sup>(32, 39, 40)</sup>.

Figura 7. Histopatologia da membrana limitante interna em paciente com defeito de campo visual



Microscopia eletrônica da membrana epirretiniana (MER) e MLI após procedimento de remoção em um olho com buraco macular. Apesar da cuidadosa manobra durante a cirurgia usando o escarificador de membrana revestido por diamante, uma porção da camada de fibras nervosas (quadro inferior esquerdo) foi inadvertidamente retirada com a MLI e a MER (MET X 8.00 – quadro inferior-esquerdo: MET x 24.000). *Fonte: Maia, M. Impresso com permissão do autor. No prelo.*

## Anormalidades no Epitélio Pigmentado da Retina

Anormalidades do EPR acontecem por múltiplos mecanismos (trauma pela manipulação cirúrgica, fototoxicidade da fibra óptica ou trauma aos segmentos externos dos fotorreceptores)<sup>(41)</sup>. A taxa de anormalidades no EPR, após cirurgia de buraco macular, gira em torno de 5%. Porém, é aconselhável que a fibra óptica seja mantida não muito próxima da área macular, porque a distância entre a ponta da fibra óptica e a retina é um dos fatores mais importantes relacionados aos defeitos no EPR no pós-operatório<sup>(41)</sup>.

## 1.3 Cromovitrectomia

### 1.3.1 História do uso de corantes vitais na cirurgia de catarata e vitreoretiniana

O desenvolvimento de corantes influenciou muito a Medicina antiga e a moderna. Por exemplo, antes do século XIX, os neuroanatomistas usaram corantes químicos para tingir e definir discretas áreas fisiológicas e anormais no cérebro; imunologistas demonstraram fascínio pela afinidade de tinturas a tecidos e sua reação química subjacente, o que resultaria depois na principal base da formulação de alguns princípios fundamentais da imunologia<sup>(9, 28, 29, 42)</sup>. No ano de 1906, foram introduzidos pela primeira vez meios de contraste no campo da radiologia para identificação de vasos sanguíneos e órgãos. O uso de agentes de contraste ganhou mais popularidade nas últimas décadas, pois eles permitiram a observação exata e detalhada de tecidos doentes em seres vivos<sup>(3)</sup>.

Na oftalmologia, os corantes são usados como agentes adjuntos para diagnósticos. Por exemplo, o corante de fluoresceína pode ser colocado na superfície corneana para identificar áreas epiteliais lesionadas durante ocorrência de defeitos epiteliais corneanos, enquanto o rosa bengala pode tingir de maneira efetiva sobras celulares e restos de células epiteliais danificadas<sup>(28)</sup>.

No campo do diagnóstico retiniano, a fluoresceína sódica e a ICV podem ser injetadas endovenosamente para observação e contraste de vasos sanguíneos e tecidos<sup>(29)</sup>.



Na capsulotomia circular contínua, usam-se corantes vitais para identificar a cápsula anterior em alguns tipos de cataratas. A cromovitrectomia surgiu devido à dificuldade na observação de vários tecidos finos e transparentes na interface vitreoretiniana, como a MLI, MER, ou a superfície posterior do córtex vítreo<sup>(6, 7, 43-48)</sup>. Na cirurgia vitreoretiniana, a remoção da MLI para tratar buracos da mácula permite maiores taxas de fechamento. Contudo, a retirada cirúrgica incompleta ou traumática da MLI podem levar a dano retiniano anatômico e funcional, manifestado clinicamente, por exemplo, por defeitos do campo visual ou EPR<sup>(4, 48-51)</sup>.

O uso de corantes vitais durante a vitrectomia previne complicações oculares relacionadas à remoção da MLI<sup>(51, 52)</sup>. O Vítreo e as MERs gliais também se tornaram novos alvos para a aplicação de corantes vitais durante a cirurgia vitreoretiniana<sup>(9, 28, 29)</sup>. Os corantes permitem uma melhor observação de membranas durante a vitrectomia em casos de proliferação vitreoretiniana e de MER idiopática; corar as membranas pode minimizar o trauma mecânico durante a sua retirada, pois permite o reconhecimento da sua extensão completa<sup>(6, 43, 44, 46)</sup>.

Finalmente, a natureza incolor e transparente do gel vítreo prejudica frequentemente a sua clara identificação durante a cirurgia vitreoretiniana. O vítreo desempenha um papel muito ativo e importante em várias doenças, incluindo buraco macular, edema macular e retinopatia diabética. Na cirurgia vitreoretiniana, a retirada completa do gel vítreo pode influenciar decisivamente nos resultados cirúrgicos, em especial, casos de descolamento da retina, podendo ser a chance para o sucesso cirúrgico, evitando-se a perda visual irreversível<sup>(28, 29)</sup>.

Lobeck et al., executaram a primeira aplicação intravítrea de corantes vitais para identificar estruturas pré-retinianas em 1932<sup>(52)</sup>. Desde então, inúmeros pesquisadores analisaram a utilização de corantes através da via endovenosa, sub-retiniana, e intravítrea para identificar tecidos e estruturas vitreoretinianas durante o século XX<sup>(28)</sup>. Um trabalho importante realizado por Kutschera, em 1969, mostrou que, entre vários corantes, o Azul Patente forneceu excelente reconhecimento de tecidos retinianos na terapia de descolamento de retina quando injetado dentro do vítreo<sup>(51)</sup>.

Mais tarde, Burk et al., descreveram em 2000 o uso de ICV como corante eficaz para a MLI<sup>(24)</sup>. Há um consenso geral de que a remoção da MLI assistida pelo corante ICV é tecnicamente mais fácil, uma vez que o cirurgião consegue identificar facilmente as margens durante a réxis da MLI, obtendo conseqüentemente a remoção completa desta estrutura. No entanto, o entusiasmo inicial foi substituído por preocupação após estudos clínicos demonstrarem complicações clínicas pós-operatórias relacionadas ao uso de ICV, como alterações de campo visual e do EPR<sup>(30, 54)</sup>. Estudos “in-vitro” e “in-vivo” em diferentes modelos animais como ratos, coelhos e porcos determinaram toxicidade dose-dependente de ICV nas células retinianas<sup>(30, 55, 56)</sup>. O efeito nocivo de ICV durante a cromovitrectomia motivou a comunidade científica a pesquisar corantes vitais menos tóxicos.

O AT e o AP surgiram como alternativas para a ICV<sup>(28, 49, 57)</sup>. No entanto, a aceitação destes corantes tem sido limitada, pois ambos possuem baixa afinidade química pela MLI, e não apresentam indicadores precisos de biosegurança em seu uso<sup>(29)</sup>. Além disso, o risco e a toxicidade dos corantes AP e AT, no que se refere ao tecido retiniano, permanecem sob avaliação<sup>(49)</sup>.

Posteriormente, a Triancinolona Acetonida (TA) foi introduzido como corante alternativo para a cromovitrectomia, por facilitar a identificação do vítreo e fornecer contraste com a MLI, pela deposição de seus cristais na superfície da mesma<sup>(28-30)</sup>. Mais recentemente foi iniciado o uso do corante infracianina verde (IfCV), com propriedades semelhantes ao ICV, porém não contém iodo em sua composição, o que o torna menos tóxico à retina humana<sup>(29, 58, 59)</sup>.

Até o momento não há um corante ideal que promova ao mesmo tempo um bom contraste para as estruturas pré-retinianas e não tenha toxicidade retiniana. O modelo de avaliação da toxicidade às células retinianas através de cultura de células do EPR está bem estabelecido na literatura, e consiste na primeira linha de pesquisa na busca de novas terapêuticas na clínica ou na cirurgia vitreoretiniana. Dessa maneira, é importante a avaliação da toxicidade de novos corantes vitais em contato com células de EPR em cultura<sup>(28-30)</sup>. Recentemente, alguns grupos de pesquisa divulgaram seus resultados preliminares acerca de novos corantes vitais para a cromovitrectomia, indicando conclusões favoráveis ao uso dos corantes vitais AB e azul de bromofenol<sup>(28)</sup>.

### 1.3.2 Mecanismos de toxicidade dos corantes

Um dos corantes cuja toxicidade retiniana foi bem estabelecida, sendo alvo de vários artigos específicos publicados na literatura médica, é a ICV. Dado que os mecanismos de toxicidade podem ser comuns a alguns grupos de corantes, baseia-se na toxicidade da ICV como forma de estudar mecanismos possíveis de toxicidade em outros corantes<sup>(51)</sup>. A análise detalhada dos mecanismos de toxicidade da ICV ao EPR demonstra que os danos retinianos causados por ICV envolvem várias hipóteses, e podem ser divididos da seguinte maneira:

**A.** Osmolaridade de soluções de ICV: injeções intravítreas de ICV podem modificar a osmolaridade na superfície da retina, danificando a retina neurosensorial ou atingindo diretamente as células do EPR. Além disto, estudos “in-vivo” e “in-vitro” propuseram efeitos nocivos de soluções ICV hipo-osmóticas: Penha et al., publicaram recentemente em um modelo animal de toxicidade sub-retiniana, que o dano induzido por soluções hipo-osmolares foi muito mais significativo do que o causado pelas soluções que contêm ICV ou AT<sup>(60)</sup>. O mecanismo do dano por soluções de ICV hipo-osmóticas implica vários eventos moleculares como, por exemplo, um influxo de cálcio aumentado com redução secundária da atividade enzimática em células do EPR<sup>(60)</sup>. As soluções de ICV usadas em cromovitrectomia são geralmente hipo-osmolares, porque o corante verde deve ser diluído em água destilada para prevenir a precipitação gerada pela diluição inicial em soluções salinas. Portanto, deve ser executada uma seleção cuidadosa dos solventes quando se aplicam corantes vitais como a ICV em cirurgia vitreoretiniana<sup>(60)</sup>. A preferência deve ser dada à diluição inicial com pequeno volume de água destilada (1ml) para se evitar precipitação de 1 frasco de 5mg de ICV liofilizada, o que torna a solução temporariamente hipo-osmolar e imprópria para o uso; em seguida, aspira-se 0,1mL dessa solução (hipo-osmolar) e acrescenta-se 0,9mL de SSB (iso-osmolar), o que resulta em uma solução final de 0,5mg/mL e 270mOsm/Kg. Para prevenir este efeito hipo-osmótico em células de EPR, também foi proposto que o ICV pode ser substituído por IfCV, pois, para este corante, o diluente indicado é a glicose 5%, que gera uma solução iso-osmótica de 294-314 mOsm/kg<sup>(61)</sup>.

**B.** Lesão direta causada pela molécula de ICV: várias investigações em diversos modelos de animais mostraram que o corante ICV por si próprio pode ser tóxico ao EPR ou célula neuroretiniana.

Os experimentos em ratos realizados por Enaida et al., mostraram que moderadas e altas doses (2.5 ou 25 mg/mL) de ICV intravítreo são tóxicas para as células coroidoretinianas<sup>(80)</sup>. Além disso, a função da retina foi prejudicada mesmo em baixas doses de ICV (0,025 mg/mL)<sup>(62)</sup>. O efeito de várias concentrações de ICV nas células retinianas internas e externas foi também estudado em coelhos e observou-se o dano na retina externa em altas concentrações (5mg/mL) com exposição de uma semana<sup>(50)</sup>. Foi demonstrado que o ICV danifica diretamente a retina, sobretudo quando aplicado na neurorretina ou EPR tanto em concentrações, quanto em concentrações menores como 0,5mg/mL<sup>(50)</sup>.

**C. Modificação bioquímica na MLI:** o corante ICV exposto à luz também pode causar um aumento significativo na rigidez da MLI e, por meio disso, facilitar a adesão da MLI à pinça cirúrgica e prevenir sua rotura durante a remoção<sup>(62)</sup>. Em contraponto, esta modificação na estrutura bioquímica do corante pode aprofundar o plano de clivagem da MLI, eventualmente induzindo a remoção concomitante de fragmentos celulares retinianos<sup>(29)</sup>. Contudo, tais mecanismos permanecem hipotéticos e são necessárias investigações mais consistentes neste campo.

**D. Íons:** A ICV pode conter iodo na sua solução final resultante do processo de síntese. Ho et al., mostraram que a retirada de sódio da solução salina usada para diluir o corante pode reduzir o risco do dano ao EPR<sup>(63)</sup>. O IfCV é um corante verde que não contém nenhum iodo na sua formulação. Tal informação foi recentemente revista em cooperação com um laboratório bioquímico especializado (Departamento Fotoquímico, Universidade de São Paulo, Brasil). Acredita-se que a IfCV tenha menor potencial de toxicidade ao EPR, uma vez que o iodo e seus derivados são tóxicos ao EPR<sup>(61)</sup>. Contudo, uma desvantagem do IfCG é seu custo maior do que o da ICV<sup>(61)</sup>.

**E. Toxicidade de ICV potencializada pela luz:** tem sido especulado que o corante ICV aplicado na cavidade vítrea pode absorver a luz e que, com esta interação, pode causar dano retiniano<sup>(28)</sup>. Maia et al., demonstraram que a injeção de ICV sub-retiniana, associada a exposição leve à luz em coelhos podem resultar em modificações atróficas, e danificar o EPR<sup>(53)</sup>, assim como causar modificações no ERG<sup>(50)</sup>. Esta hipótese foi inicialmente explicada por um efeito fotodinâmico em células retinianas coradas por ICV, depois de exposição leve à luz<sup>(28)</sup>. Contudo, alguns dados não apoiam esta hipótese como único mecanismo fisiopatogênico para o dano ao EPR após exposição intraoperatória ao ICV seguido da exposição à luz da

fibra óptica da endoiluminação. Há 3 argumentos contra o efeito fotodinâmico como único envolvido no dano ao EPR : Primeiro, a cavidade vítrea tem uma concentração de Oxigênio muito mais baixa do que a circulação sistêmica, e um alto nível de oxigênio é uma exigência para o efeito fotodinâmico ocorrer em células<sup>(28, 29)</sup>. Segundo, as fontes de iluminação de vitrectomia tem somente uma pequena irradiação dentro da absorbância de luz do ICV necessária para a terapia fotodinâmica, normalmente em volta da região infravermelha<sup>(47)</sup>.

Terceiro, Kadonosono et al., compararam o efeito da luz com comprimentos de ondas curtas em ICV diluído em SSB, e concluíram que os coeficientes de absorção não foram maiores nas soluções que continham ICV, em comparação com a solução de controle salina<sup>(64)</sup>. Desta forma, algum outro mecanismo induzido pela luz sobre a molécula do ICV poderia explicar a lesão da retina.

**F. Produtos de decomposição de solução ICV:** uma vez diluído em qualquer solvente e exposto à luz, o corante ICV pode sofrer várias reações químicas pela oxidação autossensibilizada, pois ele é quimicamente muito instável; tais fenômenos também podem ser chamados de "decomposição". O mecanismo e a natureza da interação da luz com ICV e a sua decomposição estavam pouco nítidos, até uma recente publicação<sup>(65)</sup>. Os autores demonstraram que, independentemente da exposição leve à luz aplicada, o oxigênio singleto (reação tipo fotodinâmico tipo 2) é gerado pelo ICV, levando a formação de dioxetanos pela cicloadição de oxigênio singleto. Ademais, dioxetanos decompõem-se termicamente em vários compostos carbonílicos<sup>(65)</sup>, dioxetanos e as moléculas carbonílicas são os produtos de decomposição do ICV<sup>(28, 29)</sup> <sup>(65)</sup>. A incubação do EPR de retinas de porcos cultivadas com produtos de decomposição provenientes de ICV reduziram significativamente a viabilidade celular em comparação com células controle<sup>(65)</sup>. A decomposição do ICV foi bloqueada pela presença de azida de sódio, um quelante de oxigênio singleto<sup>(65)</sup>. É relevante observar que as células não foram danificadas devido à oxidação do oxigênio singleto dentro das células (o mecanismo de dano macular de terapia fotodinâmica), tal como foi anteriormente proposto pela comunidade científica. Esse trabalho também explica por que o ICV, associado à exposição à luz, é mais tóxico à retina do que a luz ou o ICV isoladamente, e fornece o racional para estudos futuros sobre o uso de quelantes quando se aplica o ICV em cromovitrectomia<sup>(65)</sup>.

### 1.3.3 Biocompatibilidade retiniana

Os experimentos de pesquisa de novos corantes devem demonstrar uma alta biocompatibilidade sem efeitos nocivos à retina no meio intraocular antes de considerá-los para a aplicação em pacientes<sup>(28, 29)</sup>. A coloração e características de segurança de seis novos corantes potenciais para cirurgia intraocular foram recentemente descritos, incluindo o verde brilhante, azul de bromofenol, azul de evans e rodamida nas concentrações de 0,2% e 0,02%<sup>(66)</sup>.

Rodrigues et al., demonstraram que se observou boa biocompatibilidade da retina com 0,05% de AB em olhos de coelhos; porém, foram observados também efeitos danosos nos fotorreceptores<sup>(9)</sup>. Esses resultados antagônicos dificultam afirmar se o AB, na concentração comercialmente disponível, é um agente seguro, ou se tem riscos potenciais<sup>(9)</sup>. Em um paciente submetido à cirurgia de MER, houve uma migração não intencional de AB para o espaço sub-retiniano, levando a defeitos em janela na angiografia por provável atrofia do EPR<sup>(42)</sup>. Por esse motivo, sugere-se fortemente que, mesmo com o uso do AB (com perfil de toxicidade menor que a ICV), sejam tomados cuidados em se evitar a injeção do corante diretamente sobre o EPR<sup>(42)</sup>.

Experimentos pré-clínicos demonstraram que, dentre seis corantes, o azul de bromofenol corou melhor a MER e MLI, e não induziu nenhuma lesão "in-vitro" tanto para células ARPE-19 ou células do EPR em concentrações de 0,2% e 0,02%<sup>(42)</sup>. Estudos posteriores "in-vitro" em olhos de ratos e porcos demonstraram que o azul de bromofenol, em concentrações de 0,5% e 0,02%, não promoveu toxicidade significativa na retina, de acordo com o exame de histologia<sup>(67)</sup>.

Em contraste a esses estudos, foi demonstrado, que o azul de bromofenol provocou uma toxicidade significativa na retina, manifestada por lesão celular, como a vacuolização citoplásmica e picnose esparsa, além de disfunção de eletrorretinografia (ERG), principalmente na alta dose de 0,5%<sup>(42)</sup>. Estes diferentes resultados podem ser explicados pelos diferentes modelos de animais utilizados ou pelos fatores bioquímicos, como solventes ou fonte industrial dos corantes<sup>(28, 29)</sup>.

Para aplicação em cromovitrectomia, Haritoglou et al., pesquisaram a toxicidade do Verde Brilhante "in-vitro", em geral não encontrando efeitos tóxicos em seus estudos em ARPE-19 e proliferação de células primárias do EPR; no entanto, a viabilidade celular foi afetada na concentração de 0,2%<sup>(66)</sup>. O Verde Brilhante, quando usado em altas doses, induziu consideráveis anormalidades histológicas e funcionais na retina, especialmente na alta concentração de 0,5%<sup>(42)</sup>. Em conclusão, o estudo mostrou que novos corantes podem ser tóxicos aos tecidos da retina de coelhos, dependendo do tipo e da dose aplicada<sup>(42)</sup>.

### **1.3.4 Técnicas Cirúrgicas para aplicação intraoperatória**

Várias técnicas cirúrgicas foram usadas para injetar corantes na cavidade vítrea durante a cromovitrectomia. É importante descrever como a cavidade vítrea deve ser preenchida no momento da injeção e de que forma o cirurgião pode melhorar o controle da injeção no sentido de reduzir o risco de migração do corante para a região subretiniana e evitar sua dispersão excessiva<sup>(4, 28, 29)</sup>.

Como a cavidade vítrea deve ser preenchida no momento da injeção:

**A** - Método seco” ou “cavidade vítrea preenchida por ar”. Esta técnica consiste na retirada do fluido da cavidade vítrea por uma troca fluido gasosa, antes da injeção de corante. Enquanto a técnica tem a vantagem de concentrar o corante no polo posterior e evitar o contato com a cápsula posterior do cristalino, ela pode expor a superfície retiniana a uma concentração mais alta do corante, aumentando a chance de toxicidade<sup>(28, 29, 48)</sup>.

**B** - “Método molhado” ou “cavidade vítrea preenchida por fluido”. A SSB é deixada dentro da cavidade vítrea, enquanto o cirurgião injeta o corante lentamente, com a infusão de SSB fechada para o olho. A quantidade de corante em contato com a superfície retiniana fica muito menor, por ter sido diluído previamente e imediatamente após pelo fluido na cavidade vítrea. A desvantagem desta técnica é a possível dispersão do corante, colorindo a retina em outras áreas não desejadas<sup>(28, 29, 42)</sup>. Czajka et al., compararam os dois métodos em um modelo de porco e concluíram que a técnica preenchida por ar induz uma mais alta incidência de atrofia de EPR e degeneração retiniana externa<sup>(68)</sup>. Certamente essa é a causa de atrofia do

EPR que recentemente foi publicada após migração sub-retiniana tanto do AT<sup>(55)</sup> quanto do AB<sup>(42)</sup> em humanos.

De que forma o cirurgião pode melhorar o controle da injeção para reduzir o risco de migração do corante subretiniano

Esse objetivo pode ser alcançado por meio da aplicação de alguma substância sobre o buraco macular, como perfluorocarbonos, sangue autólogo ou hialuronato sódico, ou ainda pela coloração seletiva da superfície retiniana através de instrumentos especiais<sup>(69)</sup>.

**A** - Perfluorocarbonos: Scupola et al., apresentaram os resultados de pacientes operados de buraco macular idiopático, com perfluorocarboneto líquido injetado antes da instilação dos corantes<sup>(70)</sup>. Não foram revelados quaisquer sinais de toxicidade ao EPR e houve melhor acuidade visual corrigida<sup>(6,7)</sup>. Apesar da segurança desta técnica, o uso de manentes<sup>(28, 29)</sup>.

**B** - Sangue autólogo: Dados preliminares descrevem o uso do sangue autólogo como um agente protetor da retina durante a cirurgia de buraco macular assistida<sup>(71)</sup>. Clinicamente, uma pequena série de casos não-comparativa mostraram que o sangue usado em vitrectomia na cirurgia de buraco macular é seguro, pois nenhum sinal de dano retiniano ou residual foi observado depois de um mês do uso de ICV após a proteção do buraco com sangue autólogo. O sangue pode proteger o contato físico da ICV com o EPR do buraco macular, e também reduzir o tempo de retenção da ICV, levando à diminuição do risco da toxicidade<sup>(71)</sup>.

**C** - Viscoelásticos: Também podem ser usados na cromovitrectomia: como veículos do corante para direcioná-lo à retina central, evitando a coloração fora da mácula, e para evitar a penetração do corante dentro do buraco macular<sup>(72)</sup>. Embora bons resultados visuais e anatômicos possam ser realizados com a primeira técnica, ela apresenta desvantagens, como a dificuldade em se obter uma diluição precisa do corante e uma eventual alteração na capacidade de coloração do corante quando usado com viscoelástico<sup>(72)</sup>. Da mesma forma que os perfluorocarbonos, o viscoelástico pode induzir toxicidade ao EPR<sup>(73)</sup>.

**D** - Novos instrumentos: podem impedir uma coloração exagerada da retina, garantindo um tingimento limitado do tecido alvo cirúrgico na cromovitrectomia. Para



evitar uma coloração desnecessária e não seletiva de toda a retina, Meyer e Rodrigues desenvolveram recentemente um novo aplicador chamado VINCE<sup>(69)</sup>.

Tal instrumento de coloração permite que cirurgiões coram a superfície retiniana limitada à borda planejada da membrana rhexis e pode fornecer uma melhor identificação dos delicados e semitransparentes tecidos pré-retinianos, evitando a coloração descontrolada do EPR no buraco macular e retina periférica<sup>(69)</sup>. Outros instrumentos como o escarificador de membranas revestido por diamante ou o “Peyman’s adjustable brush” foram desenvolvidos para a retirada de MER. Resultados preliminares favoráveis foram observados, com a coloração seletiva da retina, superfície limitada à área de interesse cirúrgico, diminuindo, assim, o risco potencial de efeitos tóxicos secundários. Em resumo, independente da técnica utilizada, deve-se evitar o contato da ICV com o EPR<sup>(28, 29)</sup>.

## **1.4 Corantes Vitais**

### **1.4.1 Generalidades**

Corantes são compostos químicos que se agregam a várias substâncias “in natura” para produzir cor<sup>(74)</sup>. Quando os corantes coram tecidos ou células vivas, são chamados de corantes vitais<sup>(75)</sup>. Os corantes vitais emergiram recentemente como adjuvantes em cirurgias oftalmológicas para melhorar a visualização de tecidos oculares. A aplicação intraoperatória de corantes vitais foi recentemente indicada para cirurgias oculares corneanas, glaucoma, estrabismo, conjuntiva e vitreoretinianas<sup>(29)</sup>.

### **1.4.2 Bioquímica e farmacologia de Corantes Vitais**

Os corantes vitais podem ser classificados segundo o seu pH, solubilidade, fonte, e propriedades de tingimento. São apresentados em soluções de concentrações diversas, medidas em miligrama por mililitros (mg/mL) ou em porcentagem (%)<sup>(28, 51)</sup>.

Os corantes que têm seu uso em cirurgia de catarata e vitreoretiniana serão apresentados segundo sua classificação química<sup>(29)</sup>:

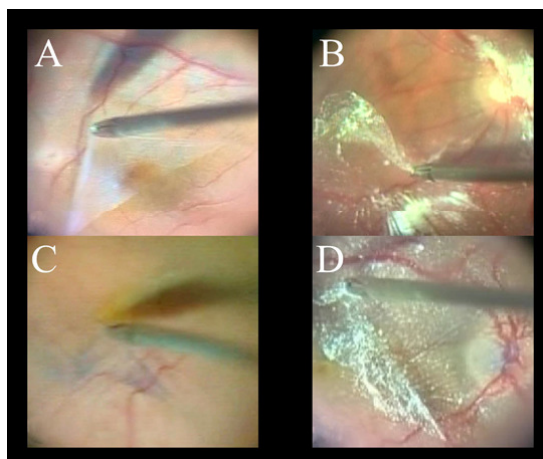
## Corantes de Azo

São um grupo químico de corantes contendo um grupo azo (-N=N-), ligando benzeno, naftaleno ou anéis heterocíclicos aromáticos<sup>(29)</sup>. Os corantes de azo originam cores intensas e existe grande oferta e disponibilidade. Destacam-se: o AT, o Azul Evans e o Verde Janus<sup>(9, 29)</sup>.

Este corante pode não permitir uma identificação precisa da MLI quando comparado com a imagem da ICV; entretanto, o corante permanece uma alternativa interessante para essa finalidade, apesar de não ser o corante de escolha para corar a MLI<sup>(28, 29, 4)</sup>. Com objetivo de se tentar potencializar a capacidade de tingimento do AT, o corante às vezes é misturado à glicose de 5% a 10% para se criar um corante azul "pesado", que seja mais denso que a SSB e com consequente capacidade de mais fácil migração ao polo posterior. Porém, altas concentrações de glicose devem ser evitadas, pois sabe-se que têm um elevado potencial de toxicidade devido à osmolaridade de 505mOsm/L (glicose a 10%) e pode chegar até a 2020 mOsm/L<sup>(60, 4)</sup>.

O AT é utilizado como um corante padrão para a membrana epirretiniana<sup>(28, 29, 4)</sup> (Figura 8) e tem afinidade com tecidos de proliferação epirretiniana<sup>(28, 29)</sup>.

Figura 8. Técnicas da remoção da membrana epirretiniana na cromovitrectomia



**A** - Remoção da MER sem uso de corantes. **B** - Remoção da MER guiada pela TA 40 mg/mL. **C** - Remoção da MER guiada pelo AT 1,5 mg/mL. **D** - Remoção da MER guiada pelo AT 1,5 mg/mL e TA 40 mg/mL, técnica denominada duplo-tingimento.<sup>(28)</sup>

## Corantes de Tiazina

São moléculas pequenas e catiônicas contendo o cromóforo chamado tiazina. Azul de Metileno é um corante de tiazina que apresenta anéis aromáticos heterocíclicos, e utilizado na oftalmologia em cirurgias da órbita e palpebral e com algumas menções à sua utilização em cirurgia de catarata. Azul de toluidina é um composto químico metacromático azul eficaz na oftalmologia quando usado para o diagnóstico de tumores da conjuntiva<sup>(29)</sup>.

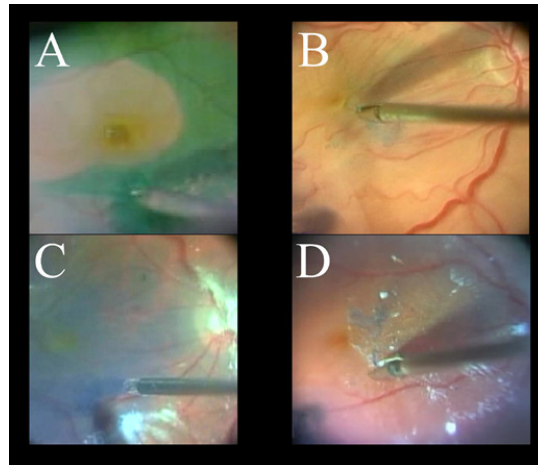
## Corantes de Arilmetano

Pertencem a um grupo químico de corantes que possui um carbono ligado a dois benzenos, uma metade de N ou O, e um grupo amino. Violeta de genciana, também conhecido como violeta cristal ou metil violeta, é um arilmetano catiônico solúvel em água, usado na oftalmologia para a observação de CA, além de ser ainda um demarcador do tecido corneano e conjuntivo<sup>(29)</sup>. Para a cirurgia ocular, a coloração azul-escura do Azul de Bromofenol pode representar um adjuvante útil tanto para a cirurgia de catarata quanto para a vitreorretiniana, embora nenhum produto disponível comercialmente contendo azul de bromofenol esteja ainda disponível. O corante arilmetano foi certificado em 2003 na Europa para uso na coloração da cápsula do cristalino durante a cirurgia de catarata, normalmente a 0,24%<sup>(28, 29)</sup>.

Em humanos, o AB causa adequado tingimento da MLI quando utilizado em uma solução iso-osmolar a 0,50 mg/mL (0,05%), e consequentes bons resultados clínicos, além de toxicidade baixa avaliada por eletrorretinograma multifocal<sup>(4)</sup>. Esse corante tem se tornado uma alternativa ao ICV e IfCV durante a cromovitrectomia, pelo fato da sua boa afinidade pela MLI (Figura 9)<sup>(4)</sup>. No entanto, dados sobre toxicidade são limitados. Maia et al., recentemente demonstraram que a migração sub-retiniana do AB pode resultar em danos atróficos ao EPR<sup>(42)</sup>. Por este motivo, sugere-se evitar o contato do AB com o EPR durante a cromovitrectomia. Tal corante é utilizado mundialmente, apesar de não existirem muitos ensaios clínicos suportando seu uso<sup>(28, 29)</sup>. Esse corante deve ser utilizado sob fluido na cavidade vítrea, ou seja, sem troca fluido gasosa temporária. Além disso, não é necessária a diluição com glicose, o que é comumente realizado com alguns corantes (como o AT) durante a cromovitrectomia, com o objetivo de se manter a solução mais densa que a SSB, facilitando assim a deposição do corante no pólo posterior.

Isso otimiza a capacidade de tingimento tissular pelo aumento do contato físico do corante com a superfície retiniana mas é uma manobra contraindicada na cirurgia de buraco macular pois pode levar à migração inadvertida de corante ao espaço subretiniano e resultar em anormalidades do EPR<sup>(68)</sup>.

Figura 9. Técnicas cirúrgicas da remoção da membrana limitante interna



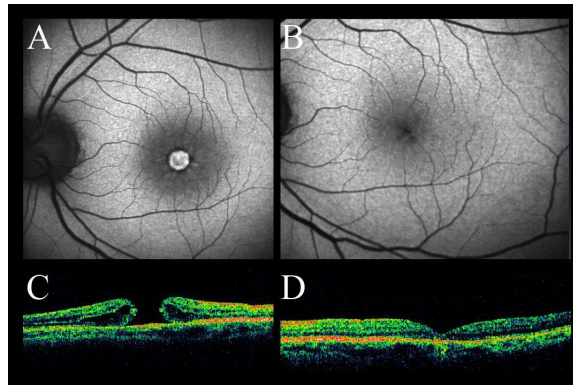
**A** - Remoção da MLI auxiliada pela ICV 0,5 mg/mL. **B** - Remoção da MLI guiada pelo AB 0,5 mg/mL. **C** - AB aplicado sobre buraco macular. **D** - Remoção da MLI guiada pela técnica do tingimento duplo. Tingimento foi realizado com 0,2 mL de TA 40 mg/mL associado a 0,2 mL de AB 0,25% <sup>(28)</sup>.

### Corantes de Cianinas

É uma classe de corantes contendo um grupo -CH = que liga dois anéis heterocíclicos com nitrogênio; o grupo químico cianina faz parte de um grande grupo de corantes chamados polimetina. Os corantes de cianina são compostos orgânicos altamente coloridos, frequentemente usados para aumentar a variedade de comprimentos de onda da luz<sup>(28, 29)</sup>. ICV é um corante do grupo tricarbocianino aniônico com propriedades ambivalentes, pois ele pode se ligar tanto a elementos celulares quanto a acelulares em tecidos vivos. O produto comercial final do corante ICV contém iodo na concentração aproximada de 5%, que provavelmente representa resíduos do processo de síntese de corante, pois sua estrutura química não contém iodo<sup>(49)</sup>. Recomenda-se que o ICV seja inicialmente diluído em água destilada antes da diluição em solução salina, devido ao maior risco da precipitação na solução salina. ICV é um agente de contraste muito útil em angiografia para permitir a observação de tecido coriorretiniano<sup>(28, 29)</sup>.

A ICV é considerado o corante padrão para o tingimento e identificação da MLI durante a cirurgia para buracos maculares e edema macular diabético. Esses corantes têm uma grande utilidade no manejo tanto no buraco macular quanto no edema macular diabético refratário à terapia clínica com esteróides ou anti-VEGF (figuras 9 e 10)<sup>(77)</sup>.

Figura 10. Autofluorescência e Tomografia de Coerência Óptica em cirurgia de buraco macular



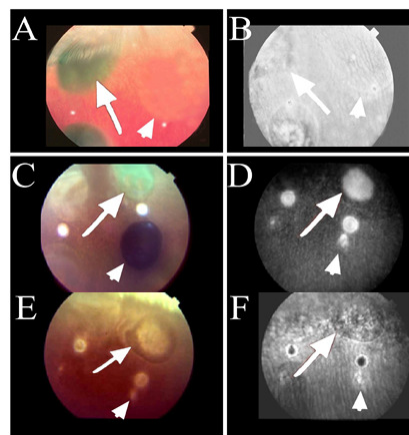
**A** - Autofluorescência antes da cirurgia de buraco macular mostrando imagem hiperautofluorescente na região do buraco macular **B** - Autofluorescência após a cirurgia de buraco macular, com remoção da MLI, guiada pelo tingimento com ICV 0,05%, mostrando ausência de hiperautofluorescência **C** - OCT antes da cromovitrectomia mostrando o buraco macular **D** - OCT após a cromovitrectomia com remoção da MLI, utilizando-se ICV 0,05%, mostrando o buraco macular fechado. Acuidade Visual melhorou de 20/200 antes da cirurgia para 20/30 após o procedimento<sup>(77)</sup>.

Estes corantes apresentam afinidade pelos principais componentes da matriz da MLI, como o colágeno tipo 4 e a laminina<sup>(75, 78)</sup>. Entretanto, estudos subsequentes revelaram que a ICV pode ser tóxica a algumas células retinianas. Dados clínicos demonstraram que a ICV pode permanecer na cavidade vítrea ou se depositar persistentemente no nervo óptico após a cirurgia de buraco macular<sup>(30, 45)</sup>. Estudos também sugeriram que a ICV pode migrar para o espaço sub-retiniano através do buraco macular, causando dano ao EPR<sup>(30, 45)</sup>. Tem sido postulado que o uso de ICV em concentrações baixas para a remoção da MLI pode ser uma alternativa mais segura pelo fato de que menores taxas de anormalidades no EPR têm sido observadas após o uso de ICV a uma concentração de menor ou igual a 0,5mg/mL(0,05%) e osmolaridade ao redor de 270 a 290mOsm/Kg<sup>(30, 45, 50)</sup>.

Entretanto, também podem ser encontradas anormalidades do EPR mesmo após o uso dessa baixa concentração e da osmolaridade fisiológica.

Há muitas hipóteses sobre como o corante ICV pode induzir dano retiniano. A injeção intravítrea de ICV pode modificar a osmolaridade da cavidade vítrea e resultar em dano tanto na retina neurosensorial quanto ao EPR diretamente<sup>(30, 44, 45, 61, 62, 79)</sup>. Doses moderadas a elevadas (2,5mg/mL a 25 mg/mL) de ICV intravítrea foram tóxicas para as células retinianas e EPR com anormalidades na função retiniana descritas (Figura 11)<sup>(30, 44, 45, 61, 62, 79, 80)</sup>. A molécula de ICV tem aproximadamente 5% de iodo e ausência de sódio ou cálcio na sua composição final<sup>(29, 45, 62, 66)</sup>. O iodo e seus derivados podem ser tóxicos ao EPR<sup>(61)</sup>. Entretanto, sugere-se que a remoção do sódio da solução salina – utilizada para se diluir o corante – possa minimizar o dano ao EPR<sup>(65)</sup>. Está bem definido que a ICV na cavidade vítrea também é capaz de absorver a luz; tal interação pode resultar em um efeito fotodinâmico com consequente dano retiniano. Foi demonstrado que a injeção subretiniana de ICV associada à exposição da luz em coelhos pode resultar em anormalidades no EPR<sup>(7, 30, 51, 75)</sup>.

Figura 11. Angiografia fluoresceínica em olhos de coelhos submetidos à injeção sub-retiniana de indocianina verde, azul de trypan e solução salina balanceada



**A** - Fotografia do fundo de olho 1 hora após a injeção sub-retiniana de 0,5% de ICV (seta) e SSB (cabeça de seta). **B** - Angiografia fluoresceínica 1 semana após a injeção sub-retiniana de ICV (seta) e de SSB (cabeça de seta), mostrando anormalidades atróficas nas posições relacionadas à injeção prévia de ICV no espaço sub-retiniano (seta) e nenhuma anormalidade na posição prévia de SSB (cabeça de seta). **C** - Fotografia de fundo de olho 1 hora após a injeção sub-retiniana de ICV (seta) e AT (cabeça de seta). **D** - Angiografia fluoresceínica mostra dano importante ao EPR nas posições relacionadas às injeções prévias de ICV (seta), me é muito maior quando comparada à injeção sub-retiniana de AT (cabeça de seta). **E** - Fotos do fundo de olho 1 semana após injeção sub-retiniana de ICV (seta) e AT (cabeça de seta). **F** - Angiografia fluoresceínica mostra defeitos em janela, provavelmente conseqüentes a dano importante ao EPR nas posições relacionadas com a presença de ICV no espaço sub-retiniano prévio (seta), comparados ao dano leve causado pelo AT (cabeça de seta)<sup>(30)</sup>.

Uma vez diluído em qualquer solvente e exposto à luz, o corante ICV pode sofrer várias reações químicas pela oxidação e autossensibilização, por ser quimicamente instável. Tal fenômeno é chamado de decomposição molecular<sup>(65)</sup>. Foi demonstrado que, independentemente da exposição à luz, a liberação de oxigênio singlete (reação fotodinâmica tipo 2) é gerada pelo ICV, resultando em formação dos dioxetanos pela cicloadição do oxigênio singlete<sup>(65, 81, 82)</sup>. Além disso, os dioxetanos se decompõem termicamente em vários complexos carbonílicos. A decomposição da ICV é normalmente bloqueada pelo sódio azido, um quelante do oxigênio singlete<sup>(80)</sup>. Isto gera os fundamentos para o racional da utilização dos quelantes como agentes úteis na cromovitrectomia, no futuro<sup>(80)</sup>.

A IfCV é um corante verde com a mesma fórmula química do ICV e possui duas diferenças farmacológicas em comparação com ICV: ele não contém iodo na solução final e recomenda-se sua diluição em glicose 5%, gerando uma solução iso-osmótica<sup>(44)</sup>. Entretanto, é considerado como tendo um menor potencial de toxicidade ao EPR que o ICV<sup>(4)</sup>.

## Corantes de Xantenos

Constituem a base de uma classe de corantes com o mesmo nome da molécula. Por exemplo, fluoresceína, eosina e rodamina são obtidas a partir desta estrutura<sup>(29)</sup>. Os corantes de xantenos tendem a ser fluorescentes; sua cor varia entre o amarelo e o cor-de-rosa, podendo até mesmo apresentar tonalidades vermelho-azuladas.

A Fluoresceína é um xanteno fluoróforo com uma propriedade de fluorescência muito alta, apresentando um máximo de absorção e excitação a 494 nm. A fluoresceína sódica é usada extensivamente como um instrumento de diagnóstico no campo da oftalmologia, enquanto, para a cirurgia ocular, o composto avermelhado escuro, na forma de sódio ou sais diacetatos, é eficaz no tingimento do gel vítreo<sup>(9, 29)</sup>.

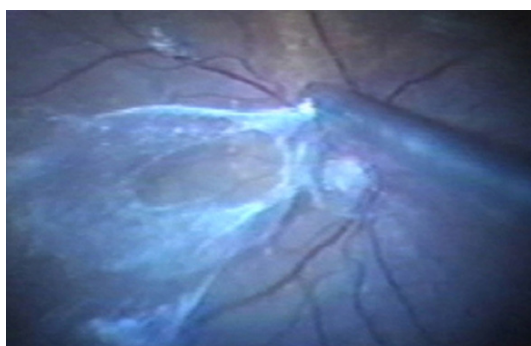
## Corticóides

É um grupo de hormônios naturalmente produzidos no córtex adrenal. Drogas sintéticas com efeito corticosteroide são usadas no tratamento de várias doenças oculares, como a dexametasona, a TA ou a fluorometolona<sup>(29)</sup>.

A TA é um corticosteroide insolúvel sintético, ao passo que o acetonido de fluormetolona é um glicocorticoide sintético-fluorado. Na cirurgia ocular, tanto a TA quanto o acetonido de fluormetolona têm grande afinidade ao gel vítreo<sup>(46, 59)</sup>. Os cristais do esteróide branco TA são o agente padrão para a identificação do vítreo. Estes cristais permitem a identificação de um contraste nítido entre porções vazias da cavidade vítrea e as áreas nas quais as fibras do vítreo estão ainda presentes, as quais são de difícil identificação durante a cirurgia<sup>(28, 29, 46, 59)</sup>.

A TA é injetada através da cavidade vítrea em direção à área em que se deseja obter a identificação. Tem-se usado 0,1 a 0,3 mL na concentração de 40 mg/mL [4%]<sup>(59)</sup>. A injeção desse esteróide durante a vitrectomia para o manejo do descolamento da retina pode também prevenir a reação fibrinóide e a vitreoretinopatia proliferativa no pós-operatório<sup>(66, 84)</sup>. O esteróide permite a identificação dos tecidos através da deposição dos cristais, propriedade que auxilia o cirurgião a conseguir um descolamento e remoção da HP e melhorar os resultados da vitrectomia primária para o manejo do descolamento da retina e da retinopatia diabética, em especial nos pacientes jovens (Figura 12)<sup>(64)</sup>. Além disso, é útil para se otimizar as técnicas cirúrgicas de identificação da MLI (Figura 9) e da MER (Figura 8).

Figura 12. Visão intraoperatória da remoção da hialóide posterior com triancinolona acetônida

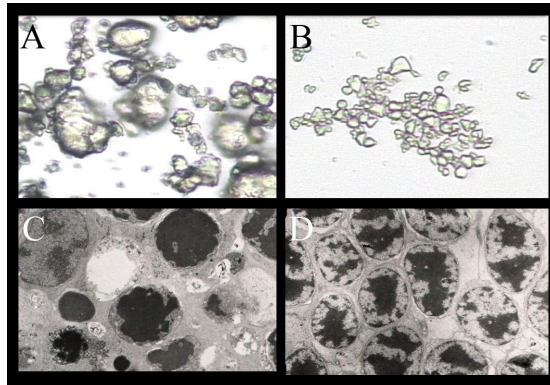


Nota-se a presença do anel de Weiss induzido cirurgicamente, que se refere a um opérculo na HP em local que esta era previamente aderida ao nervo óptico<sup>(46)</sup>.



A TA é disponível em várias formulações. A TA sem preservativos (sem álcool benzílico) e micronizada (submetida à clivagem molecular em micropartículas), é uma forma menos tóxica<sup>(46)</sup> (Figura 13 e tabela 1).

Figura 13. Triancinolona Acetonida injetada no espaço subretiniano de coelhos



**A** - TA sem micronização e com álcool benzílico (MET 5000x). **B** - TA sem álcool benzílico e submetida à micronização farmacêutica (MET 5000x). **C** - Histopatologia em olhos de coelhos submetidos à injeção sub-retiniana de TA sem micronização farmacêutica e com álcool benzílico, mostrando picnose celular na camada nuclear externa (MET 8000x). **D** - Patologia em olhos de coelhos submetidos à injeção sub-retiniana de TA com micronização e sem álcool benzílico, mostrando a camada nuclear externa normal (MET 8000x)<sup>(46)</sup>.

Os achados histopatológicos após a injeção subretiniana de TA com preservativo alcoólico demonstram que este esteróide tem potencial de toxicidade em olhos de 12 coelhos<sup>(46)</sup>.

Tais dados são clinicamente relevantes porque a comparação da evolução clínica de 646 injeções de TA na cavidade vítrea de olhos humanos demonstrou que a TA com álcool benzílico causa mais pseudoendoftealmite que a TA sem conservantes<sup>(59)</sup>.

## Xantofilas

As Xantofilas são uma família do grupo dos carotenóides, um conjunto de pigmentos fotossintéticos tipicamente lipófilos que existem em abundância na natureza<sup>(85)</sup>. Os carotenóides são encontrados em animais e principalmente em vegetais<sup>(86)</sup>.

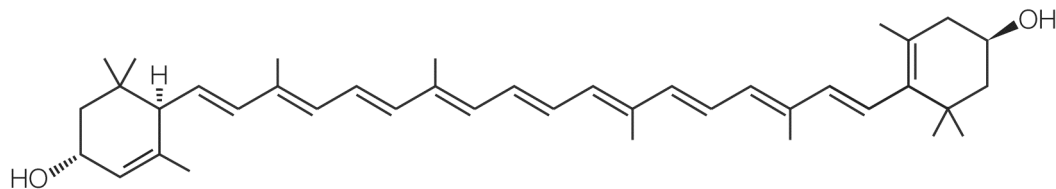
Nas plantas, encontram-se em todos os cloroplastos, intervindo no processo fotossintético como pigmentos acessórios, e em cromoplastos, conferindo uma cor específica às estruturas onde ocorrem<sup>(87)</sup>. A cor dos carotenóides é mascarada nas plantas verdes porque as clorofilas são mais abundantes<sup>(88, 89)</sup>.

As xantofilas possuem especificamente dois grupos hidroxilo na parte terminal da molécula, característica que confere polaridade às moléculas das xantofilas e permite também explicar a coloração intensa que apresentam<sup>(90)</sup>.

Contrariamente, os carotenos como o licopeno, embora também pertencentes ao grupo dos carotenóides, não possuem oxigênio, logo, são desprovidos de grupos hidroxilo terminais<sup>(91)</sup>.

A Luteína e Zeaxantina (L/Z) são membros da família das xantofilas e são diastereoisómeros cis-trans entre si<sup>(1)</sup>. Isto significa que as duas moléculas possuem exatamente a mesma estrutura, em que os átomos são ligados na mesma ordem, mas não são imagens especulares entre si. Isto torna muito difícil a sua separação (figura 14 e figura 15)<sup>(92, 93)</sup>.

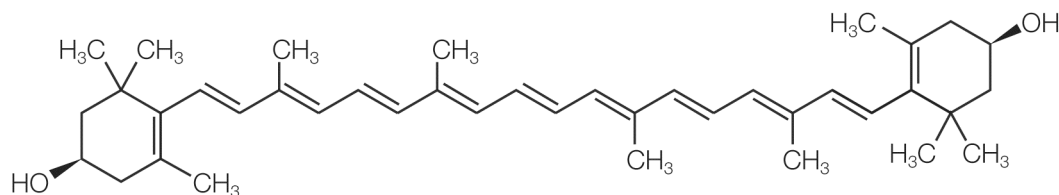
Figura 14. Fórmula molecular da Luteína<sup>‡</sup>



---

<sup>‡</sup> Representação esquemática da molécula de Luteína, na qual se consegue ver uma polaridade conferida pelo grupo –OH na parte terminal da molécula, importante para explicar a sua ação tintorial.

Figura 15. Fórmula molecular da Zeaxantina<sup>§</sup>



A L/Z são os dois maiores componentes do pigmento macular da retina<sup>(94)</sup>. De fato, de todos os carotenóides encontrados no soro humano, apenas estes dois são encontrados na mácula lutea<sup>(95)</sup>. Esta distribuição específica e selectiva da L/Z na mácula sugere que eles desempenham uma função importante nessa região, tanto como filtro da luz azul que tipicamente induz a formação de espécies radicalares de oxigênio, como antioxidante, sequestrando-as<sup>(96)</sup>. A atividade antioxidante da L/Z consiste na inativação dos radicais livres, na complexação dos íons metálicos ou na redução dos hidroperóxidos<sup>(97)</sup>.

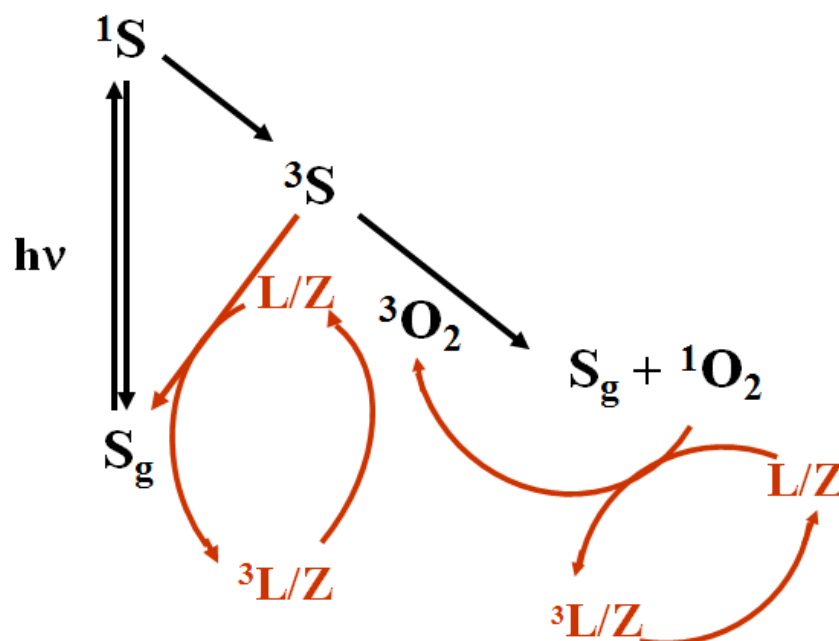
El-Agamey et al., afirmaram que as propriedades antioxidantes da L/Z são atribuídas à sua estrutura com várias duplas ligações alternadas, as quais permitem a absorção da energia das espécies radicalares de oxigênio, canalizando-a através da longa cadeia de duplas ligações, que se encontram em ressonância<sup>(98)</sup>.

Desta forma, o princípio de fotoproteção conferida pela L/Z baseia-se num mecanismo de transferência de energia, que devolve o oxigênio singleto ao seu estado basal. O retorno da L/Z tripleto ao seu estado original, pela dissipação de energia sob a forma de calor, torna possível a reação com outro oxigênio singleto (figuras 16 e 17)<sup>(99)</sup>.

---

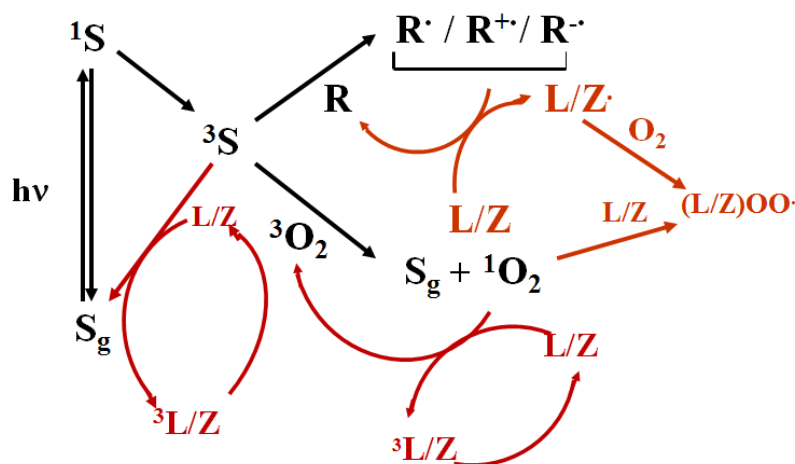
<sup>§</sup> Representação molecular esquemática da Zeaxantina, muito semelhante à da Luteína, em termos de polaridade, solubilidade e pureza.

Figura 16. Mecanismo de captação do estado tripleto dos fotossensibilizadores e do oxigênio singleto pela luteína e zeaxantina



$S_g$ : Fotossensibilizador no estado basal;  $^1S$ : Fotossensibilizador singleto;  $^3S$ : Fotossensibilizador tripleto;  $h$ : constante de Planck;  $\nu$ : Frequência da energia;  $^1O_2$ : Oxigênio singleto;  $^3O_2$ : Oxigênio tripleto;  $^3L/Z$ : L/Z tripleto. Os fótons de energia que atingem fotossensibilizadores comuns como fotorreceptores causam a excitação dos mesmos a estados superiores de energia, singleto ou tripleto, através de absorção de energia. O estado tripleto é transiente e rapidamente o fotossensibilizador (a) volta ao estado basal, através de emissão de energia ( $h\nu$ ) ou (b) se une a uma molécula de oxigênio tripleto (também excitado pela ação fotônica) e volta ao estado basal, liberando, no entanto, uma espécie radicalar de oxigênio, o oxigênio singleto, altamente oxidante de tecidos biológicos. A presença de L/Z permite doar um elétron ao (a) fotossensibilizador no estado tripleto, estabilizando-o e permitindo que regresse ao estado basal e (b) ao oxigênio singleto permitindo estabilizá-lo e evitar a cascata oxidativa. Em ambos casos, a L/Z eleva-se ao estado tripleto, o qual se estabiliza por intermédio de oxigênio, originando um metabolito inativo de um ponto de vista biológico.

Figura 17. Mecanismo de ação antioxidante da luteína e zeaxantina



R: Radical químico; R: Radical molecular não pareado ou livre; R<sup>+</sup>: Radical molecular catiónico não pareado ou livre; R<sup>-</sup>: Radical molecular aniónico não pareado ou livre; L/ZOO: Peróxido de L/Z. O fotossensibilizador tripleto pode ainda se unir a um radical molecular de uma molécula vizinha, a qual doa ou recebe um elétron e torna-se instável quimicamente, sendo susceptível de atacar tecidos biológicos para se estabilizar. A L/Z doar um elétron tornando-se ela própria instável. No entanto, a sua instabilidade faz com que procure moléculas de oxigênio (molecular ou singlete) para se estabilizar, formando-se peróxido de L/Z, o qual é eliminado fisiologicamente pelo organismo.

A função da L/Z no olho é um perfeito exemplo de como o organismo humano pode-se defender de um processo oxidativo já instalado<sup>(100)</sup>: A passagem da luz ultravioleta e azul através da retina gera espécies radicalares de oxigênio<sup>\*\*</sup>(101). A conversão do estímulo luminoso para eléctrico resulta na produção de mais radicais livres, os quais estão ávidos de elétrons provenientes de moléculas vizinhas, para juntar aos seus “spins”<sup>††</sup> não pareados<sup>(102)</sup>. Quando estas moléculas “doadoras” são um dos membros da reserva antioxidante no olho, perfeitamente capazes de sequestrar os radicais livres eventualmente formados, não existem consequências oxidantes<sup>(103)</sup>.

\*\* Grupo de substâncias instáveis que atacam frequentemente substratos com revestimento lipófilo, como os fotorreceptores, conduzindo à sua degradação.

†† Estado energético da nuvem eletrônica de cada molécula.

Contudo, se um dos lípideos nas membranas do fotorreceptor servir de molécula “doadora”, então ocorrerá lipoperoxidação, num processo de regulação positiva, e a mácula tenderá a degenerar<sup>(102)</sup>. Os fotorreceptores podem ter ajuda de uma fonte exógena de antioxidantes como a L/Z, que subsequentemente sequestrariam os radicais livres formados, evitando o ataque à integridade e fluidez da membrana<sup>(103-105)</sup>.

É interessante notar o mecanismo de ação duplo e sinérgico da L/Z na mácula: a L/Z estão presentes na região amarela central, a fóvea, possuindo um máximo de absorção a 446 nm, coincidentemente na mesma gama que a luz azul no espectro eletromagnético, portanto absorvendo o excesso de energia fotônica<sup>(106, 107)</sup>. Mas, assumindo que alguma parte da luz azul que chega à mácula não seria filtrada por estas xantofilas, a lipoperoxidação eminente pelos radicais livres formados, como consequência do dano direto da radiação nos fotorreceptores, seria ainda impedida pela atividade antioxidante da L/Z<sup>(96)</sup>.

A suportar estas noções, vários estudos epidemiológicos sugerem que a deposição de L/Z na mácula está associada a um risco reduzido de cataratas e degeneração macular relacionada à idade<sup>(90, 91, 108-110)</sup>. Exatamente como acontece com outros antioxidantes, como as vitaminas E e C e beta-caroteno, o corpo humano não consegue sintetizar estes dois carotenóides, pelo que uma obtenção e suplementação externa desta xantofila seria necessária para veicular as doses requeridas<sup>(85-87, 90, 91, 103)</sup>.

Foi igualmente demonstrado experimentalmente que uma deposição de luteína na mácula aumenta a densidade do pigmento macular, o que pode reduzir o risco de agravamento da degeneração macular relacionada à idade<sup>(111)</sup>. Estas observações são válidas para a L/Z livre, ou seja, não esterificada, dado que esta é a forma em que se encontra nos tecidos alvo e, para a qual foi aprovada na monografia da USP 35-NF<sup>††</sup> <sup>(94)</sup>. Por outro lado, vários estudos e modelos de testes de toxicidade demonstram a segurança do consumo oral de L/Z, quando provenientes de L/Z purificada e não esterificada<sup>(108, 112-116)</sup>.

---

<sup>††</sup> USP - United States Pharmacopoeia

Um dos efeitos secundários da L/Z, após consumo oral, é uma coloração alaranjada da pele, quando se consomem mais de 30mg diários<sup>(107)</sup>. Neste sentido, a ideia deste trabalho foi aproveitar esse efeito indesejável associado à L/Z para pesquisar uma forma diferente de veiculação. Ao longo deste trabalho, descobriu-se que uma mistura da L/Z com um corante azul, produzia um corante final verde intenso, parecido com a ICV. Ao observar-se os relatos de toxicidade associados à ICV como a outros corantes sintéticos, resolveu-se pesquisar o uso da L/Z como corante intraocular potencialmente eficaz e seguro<sup>(7, 30, 51, 75)</sup>. A somar a isto, contribui o fato da L/Z ter um vasto acervo de literatura como um possível agente benéfico na mácula<sup>(85-87, 90-92, 103, 108-110)</sup>. Mais, como a forma natural de L/Z purificada é cristal, estendeu-se, também, o estudo de uma formulação para corar o vítreo, e assim, poder ser uma alternativa natural para sua visualização.

O fato de que a L/Z são (a) moléculas GRAS (Generally Recognized As Safe) e com perfil de segurança, (b) reconhecidas pela FDA (Food & Drug Administration), (c) amplamente estudadas, (iv) associadas com um potencial efeito benéfico na prevenção de maculopatias relacionadas à idade e (v) um corante natural, endógeno do ambiente retiniano e não um corpo estranho, sintético, tornam-as substâncias interessantes para estudar de forma a permitir a visualização de membranas e estruturas intraoculares, assim como o seu efeito benéfico em cromovitrectomia<sup>(108, 112-116)</sup>.

O uso combinado de L/Z, isolada ou em combinação com AB e AT, como corante de estruturas oculares como endotélio corneano, CA, Vítreo, HP, MLI e MER pode revelar-se uma opção eficaz e segura para substituir corantes sintéticos<sup>(117)</sup>. Adicionalmente, a combinação de L/Z com AB ou AT poderia reduzir a concentração de AB ou AT normalmente usada, mantendo-se uma capacidade corante eficaz<sup>(117)</sup>.

## 1.5 Resumo dos princípios e indicações

Na técnica de cromovitrectomia, a TA é o padrão para identificação do Vítreo; a ICV, a lfcv e o AB são os corantes de escolha para a identificação da MLI e o AT é o padrão para MER e CA (tabela 1)<sup>(28)</sup>.

Tabela 1 – Substâncias utilizadas atualmente para a cromovitrectomia

<b>Substância</b>	<b>Diluição/Dose Osmolaridade</b>	<b>Afinidade Intraocular</b>	<b>Técnicas para se evitar toxicidade ao EPR</b>	<b>Propriedades químicas</b>
Triancinolona Acetonida 40mg/mL (4%) Cristais	Sem diluição	Vítreo	Usar uma solução sem preservativo	Esteróide sintético não-solúvel (C <sub>24</sub> H <sub>31</sub> FO <sub>6</sub> ; 434 daltons)
Azul de Trypan 1,2mg/mL (0,12%)	Sem diluição ou misturar com glicose 1,2mg/mL (0,12%) 310 mOsm/L	MER	Usar sem diluição ou misturar 0,3mL com 0,1mL de glicose 5% para melhorar identificação da MER	Corante hidrofílico aniônico Azo (C <sub>34</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> Na <sub>4</sub> O <sub>14</sub> S); 960 daltons)
Azul Patente 2,5mg/mL (0,25%)	Sem diluição ou misturar com glicose 2,5mg/mL (0,25%) 290mOsm/L	MER	Usar sem diluição ou misturar 0,3mL com 0,1mL de glicose 5% para melhorar identificação da MER	Triarilmetano (C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>6</sub> S <sub>2</sub> ); 582 daltons)
Azul Brilhante 0,25mg/mL (0,025%) ou 0,5mg/mL (0,05%)	Sem diluição 280mOsm/L	MLI	Usar sem diluição	Corante azul aniônico aminotriaril metano (C <sub>47</sub> H <sub>48</sub> N <sub>3</sub> S <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Na; 854 daltons)
Indocianina Verde 5mg (0,5%)	≤5mg (0,5%): diluir em pequena quantidade de água destilada e, na segunda diluição, com maior quantidade de SSB	MLI	Adicionar 1mL de água destilada a 1 frasco de 5mg. Retirar 0,1mL dessa solução e misturar com 0,9mL de SSB	Corante tricarbocianínico (C <sub>43</sub> H <sub>47</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>6</sub> S <sub>2</sub> ; 775 daltons) e contém 3 a 5% de iodo
Infracianina Verde 5mg (0,5%)	≤5mg (0,5%) dissolver em glicose 5% 290 mOsm/L	MLI	Adicionar 1 ou 2mL de glicose 5% a 1 frasco de 25mg	Mesma fórmula química da Indocianina Verde mas não contém iodo na sua formulação



## 1.6 Facovitrectomia

Pacientes que apresentam patologias cirúrgicas da retina e vítreo frequentemente também apresentam opacidades do cristalino (catarratas). Nestes casos, a cirurgia combinada (facoemulsificação e vitrectomia “via pars plana”) pode ser considerada em casos selecionados, como de pacientes que forem manejados com implante de gás e/ou óleo ao fim da cirurgia, em especial os diabéticos e sobretudo acima de 50 anos de idade, cuja taxa de formação de catarata é maior que 70% em 1-2 anos de seguimento<sup>(118, 119)</sup>.

A remoção da catarata no mesmo procedimento é indicada em casos nos quais se necessita obter uma melhor observação de detalhes do polo posterior, quando se quer um acesso e remoção mais amplos da base vítrea e também para se evitar a formação de catarata subsequente à cirurgia, a qual diminui a acuidade visual do paciente e prejudica a avaliação e o posterior tratamento de complicações pósoperatórias<sup>(120-124)</sup>. Após a introdução da vitrectomia via “pars plana” por Machemer e Kasner nos anos 70<sup>(125, 126)</sup>, a extração da catarata no mesmo procedimento passou a ser uma opção considerada antes e durante o procedimento<sup>(76)</sup>.

Nos anos seguintes, Peyman et al., desenvolveram as técnicas de remoção da catarata através de incisões na córnea ou no “pars plana”<sup>(127)</sup>. Essa técnica tinha a vantagem de evitar as grandes incisões utilizadas nas cirurgias de catarata intra e extracapsular, que causavam vazamentos e deiscência da sutura durante a vitrectomia<sup>(118)</sup>.

## **2 Métodos**

### **2.1 Estudo do Desenvolvimento da Formulação Intraocular**

#### **2.1.1 Desenho do estudo**

Este estudo apresenta um desenho experimental de investigação laboratorial em tecnologia farmacêutica. O estudo foi realizado no Departamento de Oftalmologia da Universidade Federal de São Paulo e com o apoio da Ophthalmos SA.

O Comité de Ética da Universidade Federal de São Paulo avaliou este estudo e aprovou a sua execução através do número 0589/10<sup>§§</sup>. O mesmo foi realizado de acordo com as normas da Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) e os princípios da Declaração de Helsínqui.

Este estudo tem o objetivo de desenvolver soluções ou dispersões líquidas de corantes à base de L/Z, isolada ou em combinação com AB ou AT, para uso posterior nas fases subsequentes do projeto em cirurgia de catarata e vitreoretiniana.

#### **2.1.2 Determinação do Veículo Adequado para a Preparação do Corante**

A preparação da formulação-corante contendo apenas corantes sintéticos AB e AT está bem descrita na literatura <sup>(5, 7, 42, 46, 49, 51, 57, 128)</sup> e envolve uma solubilização simples em qualquer solvente hidrossolúvel reconhecidamente seguro em oftalmologia, como água para injetáveis, SSB ou poliálcoois de cadeia longa como o álcool polivinílico (APV) ou benzílico.

Já para a preparação da formulação-corante contendo L/Z, a L/Z foi pesada e dispersa em soluções de diferentes veículos de forma a testar solubilização, côm, pH, osmolaridade e citotoxicidade do veículo.

---

<sup>§§</sup> Protocolo e Carta de Aprovação do Comité de Ética encontram-se em anexo no final do trabalho.

A L/Z são moléculas lipossolúveis que existem na forma de cristais ou em pó dispersível em água. Ambas as formas foram testadas neste estudo e cedidas pela Kemin Industries, Inc. e suas parceiras.

Para determinar o melhor veículo para a solubilização da L/Z e, de acordo à polaridade das moléculas, testou-se a solubilidade da L/Z em solventes orgânicos tradicionais, surfactantes não-iônicos, lípidos insolúveis em água, ciclodextrinas e poliálcoóis de cadeia longa.

Os solventes orgânicos testados foram a acetona, éter dietílico, etanol, acetato etílico, HEAT, hexano, isopropanol, cloreto de metileno, propilenoglicol e tetrahidrofurano. Para este estudo, testou-se apenas a solubilização da L/Z e fez-se dois testes para cada solvente. Uma alíquota de 0,5 a 1mL de cada solução foi retirada para análise de absorvância por espectroscopia de UV/Visível (Thermo Spectronic, Aquuamate, Inglaterra) e também da concentração de luteína, zeaxantina e carotenóides totais por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC, Agilent 1260 AutoSampler, Agilent Technologies, EUA).

Dentro dos surfactantes não-iônicos, escolheu-se o óleo de rícino polietoxilado (Cremophor EL™ EL, BASF, Inc., Alemanha), pelo poder teórico de coadjuvante de solubilização de moléculas apolares. Procedeu-se também à análise da concentração de L/Z por HPLC e colorimetria (Beckman-Coulter, USA).

Testou-se também a solubilidade da L/Z em surfactantes iônicos (Span 80), lípidos insolúveis em água (óleo de sésamo e óleo de milho), solventes apróticos (dimetilsulfóxido - DMSO), ciclodextrinas (HP-β-CD) e poliálcoóis. Dentro deste último grupo, testou-se uma fórmula de APV tamponado, descrita a seguir: Fosfato de sodio monobásico 0,004%; Fosfato de sodio dibásico 0,028%; Cloreto de sodio 0,85%; Povidona 0,4%; APV 1,4%; Água para injetáveis q.s.p 2000 mL.

Em seguida, fez-se uma análise prévia de literatura para excluir testes adicionais com os veículos que, à partida, representariam uma toxicidade potencial significativa para aplicação oftalmológica. Com base nessa análise, excluíram-se todos os solventes orgânicos cujo risco inviabilizava a sua aplicação intraocular.

## 2.1.3 Manipulação e Produção das Diferentes Formulações

### 1. Obtenção da água para injetáveis

Procedeu-se com a quantidade necessária de água apenas do aparelho Milli-Q<sup>®\*\*\*</sup>, de forma a que esta esteja dentro dos parâmetros indicados na tabela 2.

Tabela 2 – Especificações da água para injetáveis usada nas formulações

TESTES	ESPECIFICAÇÕES	REFERÊNCIAS
Descrição	Líquido límpido, incolor, inodoro e insípido	USP 35 NF 23
pH	Entre 5,0 - 7,0	USP 35 NF 24
TOC	≤ 500ppb	USP 35 NF 25
Condutividade (estágio 1)	≤1,3 µmHo a 25C	USP 35 NF 26
Condutividade (estágio 2)	≤ 2,1 µmHo a 25C	USP 35 NF 27
Condutividade (estágio 3)	Dependente do pH	USP 35 NF 28
Cloreto	≤ 0,5mg/L	USP 35 NF 29
Cálcio	Ausente	USP 35 NF 30
Sulfatos	Ausentes	USP 35 NF 31
Pesquisa de Endotoxinas	≤ 0,25UE/mL	USP 35 NF 32
Substâncias oxidáveis	Ausentes	USP 35 NF 33
Dióxido de carbono	Ausente	USP 35 NF 34
Amônia	≤ 0,6 mg/L	USP 35 NF 35

pH: escala de potencial de hidrogênio; TOC: contagem de orgânicos totais; ppb: partes por bilhão; µmho: micro-Ohms, medida de condutividade elétrica; EU/L: medida de unidades de Endotoxinas por Litro; USP: farmacopeia dos EUA. UE: unidades de endotoxinas

---

\*\*\* Marca referência no mercado de aparelho purificador de água para desenvolvimento farmacotécnico.

## 2. Planejamento de produção das formulações

Com base na solubilidade da L/Z nos diferentes veículos testados, procedeu-se à formulação de diferentes misturas de L/Z - isolada ou combinada com outros corantes sintéticos – em diferentes combinações de veículos, agitação e aquecimento. Um total de setenta e oito formulações (F1 a F78) foram criadas e, em todas elas, foram analisados o pH (Quimis, Q400MI, Brasil), osmolaridade (Advanced Instruments 3300, USA) e c $\hat{o}$ r final por colorimetria (Beckman-Coulter, USA). A tabela 3 (A-D) resume a composição e principais variáveis de produção (concentração dos constituintes, tempo e temperatura) das formulações criadas em escala laboratorial.

Tabela 3A – Dados farmacotécnicos das formulações em Álcool Polivinílico a 1,4%.

Formulação	L/Z (%)	AB (%)	AT (%)	Tempo agitação (h)	Temperatura (°C)	Tempo Aquecimento (h)
F1	0,3	0,025	-	20	25	0
F2	0,3	-	0,1	20	25	0
F50	0,3	0,01	-	5	60	0,5
F51	0,15	-	0,05	5	60	0,5
F52	0,01	-	-	5	60	0,5
F53	0,05	-	-	5	60	0,5
F54	0,1	-	-	5	60	0,5
F55	0,2	-	-	5	60	0,5
F56	0,25	-	-	5	60	0,5
F57	0,5	-	-	5	60	0,5
F58	1	-	-	5	60	0,5
F59	2	-	-	5	60	0,5
F60	5	-	-	5	60	0,5
F61	10	-	-	5	60	0,5
F62	20	-	-	5	60	0,5
F63	0,1	0,0125	-	20	60	0,5
F64	0,2	0,0125	-	20	60	0,5
F65	0,5	0,0175	-	20	60	0,5
F66	1	0,025	-	20	60	0,5
F67	0,25	0,05	-	20	60	0,5
F68	0,2	0,025	-	20	60	0,5
F69	0,2	-	0,05	20	60	0,5
F70	0,3	-	0,05	20	60	0,5
F71	0,7	-	0,05	20	60	0,5
F72	0,5	-	0,075	20	60	0,5
F73	0,4	-	0,09	20	60	0,5
F74	1	-	0,04	20	60	0,5
F75	0,1	0,05	-	20	60	0,5
F76	0,1	0,1	-	20	60	0,5
F77	0,2	-	0,1	20	60	0,5
F78	0,3	-	0,025	20	60	0,5

% L/Z, %AB, %AT: porcentagem, respectivamente, de Luteína e Zeaxantina, Azul Brilhante e Azul de Trypan; °C: graus centígrados; h: horas

Tabela 3B – Dados farmacotécnicos das formulações em Álcool Polivinílico a 1,4% associado a outros solventes

Veículo	Formulação	L/Z (%)	AB (%)	AT (%)	Tempo agitação (h)	Temperatura (°C)	Tempo Aquecimento (h)
1,4% APV/1% AIP	F3	0,5	0,0125	-	20	25	0
1,4% APV/1% AIP	F4	0,5	-	0,05	20	25	0
1,4% APV/10% Cremophor EL™	F5	0,5	0,0125	-	20	60	0,5
1,4% APV/10% Cremophor EL™	F6	0,5	-	0,05	20	60	0,5
1,4% APV/16% Cremophor EL™/8% PEG300/12% Span80	F11	0,5	0,0125	-	20	60	0,5
1,4% APV/16% Cremophor EL™/8% PEG300/12% Span80	F12	0,5	-	0,05	20	60	0,5
1,4% APV/20% Cremophor EL™	F7	0,5	0,0125	-	20	60	0,5
1,4% APV/20% Cremophor EL™	F8	0,5	-	0,05	20	60	0,5
1,4% APV/20% Cremophor EL™/4% Span 80	F13	0,5	0,0125	-	20	60	0,5
1,4% APV/20% Cremophor EL™/4% Span 80	F14	0,5	-	0,05	20	60	0,5

AIP (Álcool isopropílico): solvente orgânico. Polietilenoglicol: polímero denso frequentemente usado como veículo farmacêutico; Veículo tensoativo, ie, capaz de diminuir a tensão superficial da água e que auxilia na formação de emulsões.

Tabela 3C – Dados farmacotécnicos das formulações em Cremophor EL™

Formulação	L/Z (%)	AB (%)	AT (%)	Tempo agitação (h)	Temperatura (°C)	Tempo Aquecimento (h)
F9	0,5	0,0125	-	20	60	0,5
F10	0,5	-	0,05	20	60	0,5
F28	0,9	-	0,01	20	60	0,5
F29	0,9	-	0,03	20	60	0,5
F30	0,7	-	0,02	20	60	0,5
F31	0,7	-	0,03	20	60	0,5
F32	0,7	-	0,04	20	60	0,5
F33	0,6	-	0,05	20	60	0,5
F34	0,5	-	0,05	20	60	0,5
F35	0,5	-	0,075	20	60	0,5
F36	0,5	-	0,06	20	60	0,5
F37	0,7	-	0,05	20	60	0,5
F38	0,5	0,0175	-	20	60	0,5
F39	0,4	-	0,075	20	60	0,5
F40	0,3	-	0,075	20	60	0,5
F41	0,3	0,025	-	20	60	0,5
F42	0,2	0,025	-	20	60	0,5
F43	0,2	0,02	-	20	60	0,5
F44	0,2	0,019	-	20	60	0,5
F45	0,4	0,0175	-	20	60	0,5
F46	0,3	0,0175	-	20	60	0,5
F47	0,4	-	0,05	20	60	0,5
F48	0,3	-	0,03	20	60	0,5
F49	0,4	-	0,04	20	60	0,5

% L/Z, %AB, %AT: porcentagem, respectivamente, de Luteína e Zeaxantina, Azul Brilhante e Azul de Trypan; °C: graus centígrados; h: horas

Tabela 3D – Dados farmacotécnicos das formulações em Cremophor EL™ associado a outros solventes

Veículo	Formulação	L/Z (%)	AB (%)	AT (%)	Tempo agitação (h)	Temperatura (°C)	Tempo Aquecimento (h)
14% Cremophor EL™/7% PEG 302/5% Óleo Sésamo	F21	0,5	0,0125	-	20	60	0,5
14% Cremophor EL™/7% PEG 302/5% Óleo Sésamo	F22	0,5	-	0,05	20	60	0,5
16% Cremophor EL™/8% PEG 300	F17	0,5	0,0125	-	20	60	0,5
16% Cremophor EL™/8% PEG 300	F18	0,5	-	0,05	20	60	0,5
16% Cremophor EL™/8% PEG 302/5% Óleo Sésamo	F19	0,5	0,0125	-	20	60	0,5
16% Cremophor EL™/8% PEG 302/5% Óleo Sésamo	F20	0,5	-	0,05	20	60	0,5
20% Cremophor EL™/20% DMSO	F24	0,5	0,0125	-	20	25	0
20% Cremophor EL™/4% Span 80	F15	0,5	0,0125	-	20	60	0,5
20% Cremophor EL™/4% Span 80	F16	0,5	-	0,05	20	60	0,5
25% Cremophor EL™/5% Óleo Milho	F23	0,5	0,0125	-	20	60	0,5
25% Cremophor EL™/50% Acetona	F26	0,5	0,0125	-	20	25	0
25% Cremophor EL™/50% THF	F25	0,5	0,0125	-	20	25	0
25% Cremophor EL™/50% THF/5% HP-β-CD	F27	0,5	0,0125	-	20	25	0

Dimetilsulfóxido: potente solvente aprótico e polar usado como tensoativo. Hidroxipropilbetaciclodextrina: complexo de inclusão usado como forma de solubilização de veículos não miscíveis; THF: Tetrahydrofurano, solvente orgânico usado para solubilizar moléculas apolares.

Antes de ser usada como matéria-prima para as formulações-corantes, a L/Z em forma de cristal obtida a partir do fabricante (Kemin, EUA) foi micronizada por pistilo.

### 3. Criação de Sistemas Líquidos

Com as setenta e oito formulações testadas, formulou-se:

1. uma dispersão química através do uso do APV a 1,4%
2. uma emulsão O/A, através do uso do Cremophor EL™
3. uma micro-emulsão, através do uso do Cremophor EL™ acompanhado de um óleo e co-surfactante (Span 80 ou PEG300)
4. um complexo de inclusão, através do uso de Hidroxipropilbetaciclodextrina (HP-β-CD)

## Sumário do processo de produção

### Álcool Polivinílico

A seguir descreve-se o processo de produção laboratorial padrão para as formulações dispersas em APV, para um volume final de um litro.

Quadro 1 – Descrição do processo laboratorial para formulações-corantes dispersas em álcool polivinílico

Passo	Descrição
1	Pesou-se os constituintes de cada formulação na forma sólida usando uma balança analítica (Mettler Toledo H33AR, Suíça)
2	Adicionou-se fosfato de sódio monobásico a 0,04 mg/mL, fosfato de sódio dibásico a 0,28 mg/mL e Cloreto de Sódio a 8,5mg/mL em quantidade suficiente de água para injetáveis
3	Aqueceu-se a solução anterior à temperatura de 60° C durante 15 minutos
4	Adicionou-se a povidona a 4 mg/mL e APV a 14 mg/mL
5	Agitou-se a solução resultante em agitador magnético (Quimis Q298-1, Brasil) até dissolução total (solução-tampão)
6	Mediu-se pH e Osmolaridade da solução-tampão
7	Pesou-se a quantidade necessária de AB ou AT (conforme cada formulação) e dissolveu-se em volume apropriado de solução-tampão (conforme cada formulação), utilizando-se almofariz e pistilo
8	Caso necessário, fez-se as diluições para chegar na concentração de AB ou AT apropriada
9	Pesou-se a quantidade necessária de L/Z e dissolveu-se em volume definido da solução 7, 8 ou 5, utilizando-se almofariz e pistilo, conforme a concentração e composição de cada formulação
10	Esta solução foi aquecida, sob agitação, à temperatura e por um tempo definido em cada formulação e sumarizado na tabela 2
11	Acondicionou-se 2mL em frasco-ampola âmbar de vidro tipo I (Schott, Swisse) e autoclavou-se a uma temperatura de 121° C por 30 minutos (Wilson autoclaves, vertical, Odt74 2.0)
12	Analisou-se de novo o pH e Osmolaridade

### Cremophor EL™

No caso das formulações emulsificadas em óleo de rícino polietoxilado (Cremophor EL™), os passos gerais de produção laboratorial das formulações encontra-se descrito a seguir:



Quadro 2 – Descrição do processo laboratorial para formulações-corantes dispersas em Cremophor EL™

Passo	Descrição
1	Pesou-se os constituintes de cada formulação na forma sólida usando uma balança analítica (Mettler Toledo H33AR, Suíça) para dentro de um balão volumétrico
2	Uma quantidade apropriada (conforme cada formulação) de Cremophor EL™ foi adicionada ao balão e aquecida, sob agitação, a 60° C usando um banho de água durante 30 minutos
3	Perfez-se a quantidade necessária de solução com água para injetáveis
4	A solução é agitada durante o tempo indicado em cada formulação presente na tabela 4

No que respeita as formulações que formaram micro-emulsões, o procedimento de produção laboratorial das mesmas é em tudo semelhante ao descrito relativo à emulsão em Cremophor EL™, apenas com a ressalva que o surfactante e co-surfactante devem ser pesados e adicionados à fase oleosa. Com a adição cuidadosa e lenta de água para injetáveis (preparada com descrita anteriormente), forma-se uma emulsão A/O, a qual depois muda para O/A, formando uma microemulsão.

### **Hidroxipropilbetaciclodextrina**

Finalmente, no que concerne as formulações que formaram um complexo de inclusão usando HP-β-CD, os passos de produção laboratorial destas formulações detalham-se em seguida:

Quadro 3 – Descrição do processo laboratorial para formulações-corantes em complexos de inclusão com hidroxipropilbetaciclodextrina

Passo	Descrição
1	Formação de uma solução aquosa saturada de HP-β-CD
2	Solubilização de L/Z com THF num balão volumétrico à parte
3	Adicionar a solução 1 à solução 2
4	Evaporar a solução resultante com auxílio de um evaporador rotativo (Buchi, Suíça), de forma a eliminar o THF
5	Dissolver em água para injetáveis para formar o complexo de inclusão

THF: Tetrahydrofurano, solvente orgânico usado para solubilizar princípios ativos

## Desenvolvimento do Método Analítico

Foram desenvolvidos métodos analíticos para a L/Z, AB e AT, de forma a quantificar o ativo e poder fazer o controle de qualidade das formulações finais.

### Luteína e Zeaxantina

Usou-se padrões puros de L/Z e veículos. Neste método, fez-se a titulação dos ativos-corante, a partir de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC<sup>+++</sup>). Como existe uma diferença de polaridades entre a L/Z e o veículo, o método foi feito em fase reversa. As colunas C18 não foram suficientes para dar uma boa resolução, logo, usou-se colunas C30, específicas para carotenóides. Usou-se uma coluna C30, 5 $\mu$ , 4,6 x 250 mm (Develosil, EUA), a fase móvel foi composta por Acetonitrilo, Metanol e Trietilamina e o tempo de corrida foi de cerca de 25 minutos. A tabela 4 apresenta os principais parâmetros de validação do método.

Tabela 4 – Parâmetros de validação do método analítico para a luteína e zeaxantina por cromatografia líquida de alta eficiência

Parâmetros de Validação	Medidas	Critério de Aprovação
Adequabilidade do Sistema/ Seletividade	Resolução	$R_s > 1.5$
	Matriz Branca	Sem interferência
	Precisão do Injector	RSD < 1%
Alcance do Instrumento/Linearidade/ Intervalo de Trabalho	Regressão Linear	$R^2 > 0,999$
	RSD	< 1%
Precisão	Inter-Analista	N/A
	Entre dias	RSD < 5%
	Inter-Amostra	RSD < 5%
	Total	RSD < 5%
Rigor/Acurácia	L/Z	95-102% 90-110%
Limites de Determinação	Limite de Detecção	LOD > 2.6E-05% (Luteína) LOD > 5.9E-05% (Zeaxantina)
	Limite de Quantificação	LOQ > 7.8E-05% (Luteína) LOQ > 1.8E-04% (Zeaxantina)

R: Resolução; RSD: Desvio-Padrão Relativo ;  $R^2$ : Coeficiente de correlação; LOD: Limite de Detecção; LOQ: Limite de Quantificação

<sup>+++</sup> HPLC: Método específico para fazer doseamento de produtos.

## Azul Brilhante

Usou-se padrões puros de AB e veículos. Neste método, fez-se a titulação dos ativos-corante, a partir de HPLC, em fase normal. No entanto, usou-se hexanosulfonato de sódio como par iônico, uma vez que o AB tem grupos sulfonados/aminados. Usou-se uma coluna C18e, 5 $\mu$ , 4 x 250 mm (Purospher Star RP, EUA), a fase móvel foi composta por Acetonitrilo, Ácido Fosfórico, Hexasulfonato de Sódio e Trietilamina e o tempo de corrida foi de cerca de 25 minutos. A tabela 5 apresenta os principais parâmetros de validação do método.

Tabela 5 – Parâmetros de validação do método analítico do azul brilhante por cromatografia líquida de alta eficiência

Parâmetros de Validação	Medidas	Critério de Aprovação
Adequabilidade do Sistema/ Seletividade	Resolução	$R_s > 1.5$
	Matriz Branca	Sem Interferência
	Precisão do Injector	RSD < 1%
Alcance do Instrumento/Linearidade/ Intervalo de Trabalho	Regressão Linear	$R^2 > 0,999$
	RSD	< 1%
Precisão	Inter-Analista	N/A
	Entre-Dias	RSD < 5%
	Inter-Amostras	RSD < 5%
	Total	RSD < 5%
Rigor/Acurácia	AB	95-102%
Limites de Determinação	Limite de Detecção	LOD > 3.96E-06%
	Limite de Quantificação	LOQ > 1.2E-05%

R: Resolução; RSD: Desvio-Padrão Relativo ;  $R^2$ : Coeficiente de correlação; LOD: Limite de Detecção; LOQ: Limite de Quantificação

## Azul de Trypan

Usou-se padrões puros de AT e veículos. Neste método, fez-se a titulação dos ativos corante, a partir de HPLC, em fase normal. No entanto, usou-se hexanosulfonato de sódio como par iônico, uma vez que o AT tem grupos sulfonados/aminados. Usou-se uma coluna C18e, 5 $\mu$ , 4 x 250 mm (Purospher Star RP, EUA), a fase móvel foi composta por Acetonitrilo, Ácido Fosfórico, Hexasulfonato de Sódio e Trietilamina e o tempo de corrida foi de cerca de 25 minutos. A tabela 6 apresenta os principais parâmetros de validação do método.

Tabela 6 – Parâmetros de validação do método analítico do azul de trypan por cromatografia líquida de alta eficiência

Parâmetros de Validação	Medidas	Critério de Aprovação
Adequabilidade do Sistema/ Seletividade	Resolução	$R_s > 1.5$
	Matriz Branca	Sem Interferência
	Precisão do Injector	RSD < 1%
Alcance do Instrumento/Linearidade/ Intervalo de Trabalho	Regressão Linear	$R^2 > 0,999$
	RSD	< 1%
Precisão	Inter-Analista	N/A
	Entre-Dias	RSD < 5%
	Inter-Amostras	RSD < 5%
	Total	RSD < 5%
Rigor/Acurácia	AB	95-102%
Limites de Determinação	Limite de Detecção	LOD > 3.96E-06%
	Limite de Quantificação	LOQ > 1.2E-05%

R: Resolução; RSD: Desvio-Padrão Relativo ;  $R^2$ : Coeficiente de correlação; LOD: Limite de Detecção; LOQ: Limite de Quantificação

## 2.1.4 Cronograma

Quadro 4 – Cronograma de desenvolvimento da formulação intraocular

Etapa	Descrição
Pré-procedimento	Aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa Obtenção do corante
Tempo Zero	Desenvolvimento da formulação do corante.
Pós-procedimento	Coleta de dados Análise dos resultados

## 2.2 Estudo em Olhos Cadavéricos

### 2.2.1 Desenho do Estudo

Este estudo apresenta um desenho experimental de investigação laboratorial em olhos humanos cadavéricos. O estudo foi realizado pelo Departamento de Oftalmologia da Universidade Federal de São Paulo com cooperação com o Banco de Olhos do Hospital São Paulo, onde os olhos cadavéricos para transplante de córnea foram preparados.

O Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo avaliou este estudo e aprovou a sua execução através do número 0589/10, Uma cópia do protocolo e da carta de aprovação do Comitê de Ética encontra-se em anexo a este trabalho. O mesmo foi realizado de acordo com as normas da Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) e os princípios da Declaração de Helsínqui.

O objetivo deste estudo foi a obtenção de eficácia de tingimento de membranas e estruturas intraoculares com as formulações-corantes fabricadas de acordo com o processo comentado na seção anterior.

### **2.2.2 Tipos de Corantes e Preparação**

Foi preparada uma solução-tampão em água para injetáveis, contendo tampão-fosfato monobásico a 0,04 mg/mL, tampão-fosfato dibásico a 0,28 mg/mL, cloreto de sódio a 8,5mg/mL, povidona a 4 mg/mL e APV a 14 mg/mL. Esta solução foi aquecida a 75° C por 2h e submetida a agitação mecânica por 24h. Posteriormente, em uma das formulações, 0,5g de L/Z em forma solúvel foram colocadas num frasco de 50mL juntamente com 20 mg de AT. Em outra formulação, 0,5g de L/Z em forma solúvel foram colocadas num frasco de 50mL juntamente com 12,5 mg de AB. Estas duas formulações específicas continham, respetivamente, L/Z 1% + AT 0,04% e L/Z 1% + AB 0,025%. O mesmo processo foi seguido para preparação de todas as soluções analisadas neste estudo. Um resumo das características das soluções-corantes usadas está presente na tabela 3. 50mL da solução-tampão foram, então, adicionados para cada frasco (correspondente a cada formulação) e sujeitos a agitação em agitador magnético (Quimis Q298-1, Brasil) por 24h. Finalmente, 2mL de cada formulação-corante formulada foram transferidos para frascos-ampola de 4mL de capacidade e sujeitos a um processo de esterilização por calor húmido usando autoclave regulada a 121°C por 30 minutos, após o qual, estavam prontos a ser usados.

### **2.2.3 Olhos Cadavéricos**

Foram utilizados 102 olhos cadavéricos de doadores humanos de córneas. Adotou-se o critério de aceitar apenas bulbos oculares com menos de 12 horas após o óbito. A córnea, foi removida por incisão límbica 360 graus a 2mm da esclera e preservada para transplante de córnea.

### **2.2.4 Injeção sobre a Cápsula Anterior, Vítreo, Hialóide Posterior, Membrana Limitante Interna e Membrana Epirretiniana - técnica cirúrgica**

Logo após a remoção da córnea, 0,3 mL de cada solução-corante foram aplicados sobre a CA. Após 30 segundos o corante foi removido com leve irrigação com 10 mL de solução de SSB. Em seguida a CA foi retirada com pinça Utrata de capsulorrexis, com movimento circular em 360 graus, e foi avaliado se a capsulorrexis foi contínua e curvilínea. Após remoção do excesso de corante, a intensidade de coloração foi avaliada por uma escala graduada que mede o grau de coloração em quartos de tecido corneano corado <sup>(3, 7, 9, 28, 75, 128)</sup> de acordo com a seguinte graduação: grau 0 (sem corar), grau 1 (corando até  $\frac{1}{4}$ ), grau 2 (corando entre  $\frac{1}{4}$  e  $\frac{1}{2}$ ), grau 3 (corando entre  $\frac{3}{4}$  e  $\frac{1}{2}$ ) e grau 4 (corando maior que  $\frac{3}{4}$ ). Três cirurgiões vitreoretinianos experientes, que não conheciam as substâncias a ser utilizadas e de forma independente, aplicaram a escala<sup>(117)</sup>. As cápsulas anteriores removidas foram avaliadas por meio de microscopia eletrônica de varredura.

A seguir, o cristalino foi removido para os experimentos com o vítreo por excisão em bloco, com pinça cirúrgica. O vítreo foi todo imerso em 1 mL de cada solução-corante durante 1 minuto e seguido da imersão do mesmo em 1 mL de solução SSB por 30 segundos, após a qual foi removido com vitreófago (Accurus, Alcon, EUA).

A capacidade de ligação do corante com a MLI foi avaliada após injeção intravítrea sobre a mesma. Um total de 0,1 mL de cada solução-corante foi injetado dentro da cavidade vítrea, sobre a MLI. O excesso de corante foi removido por infusão de 0,1 mL de SSB.

Depois da remoção do excesso de corante, a intensidade de coloração na MLI e Vítreo foram avaliados por 3 cirurgiões vitreoretinianos experientes que não conheciam as substâncias utilizadas, de forma independente, e de acordo com a escala seguinte: grau 0 (nenhuma coloração), + (corando fracamente), ++ (corando moderadamente), +++ (corando bem), ++++ (corando intensamente). Em seguida, uma agulha dobrada de calibre 27 gauge foi usada para criar uma aba na MLI, e uma pinça de cirurgia vitreoretiniana 20 gauge foi utilizada para remover delicadamente a MLI. As MLIs removidas foram avaliadas por meio de técnica de microscopia ótica e eletrônica de transmissão, de forma a confirmar que realmente se trata de MLI e não de outra membrana.

## 2.2.5 Análise Histológica

As MLIs e as CAs do cristalino removidas foram fixadas em uma solução de formalina tamponada a 10% por 24 horas, para microscopia ótica, e em solução de glutaraldeído a 5% e paraformaldeído a 5% por 2 horas, para microscopia eletrônica de transmissão. Este processo foi seguido de imersão dos tecidos em araldite para cortes histológicos. O material foi coletado de três áreas diferentes nos locais de injeções prévias do corante. Todas as amostras foram coletadas em áreas separadas 500 µm umas das outras. Para microscopia ótica, os cortes histológicos finos foram analisados após coloração com corante de azul de toluidina a 1% (Optiphot-2TM). Para microscopia eletrônica, cortes ultrafinos foram colocados em microsuportes de cobre, corados com acetato de uranil e citrato de prata, e examinados com microscópio eletrônico Jeol JX 1500TM (Jeol Ltd., Tóquio, Japão).

## 2.2.6 Cronograma dos Experimentos

Quadro 5 – Cronograma do estudo em olhos cadavéricos

Etapa	Descrição
Pré-procedimento	Aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa Obtenção do corante
Tempo Zero	Aplicação do corante sobre a MLI, o Vítreo, e a CA do cristalino
Pós-procedimento	Coleta de dados e análise de resultados

## **2.3 Estudo de Toxicidade em Coelhos**

### **2.3.1 Desenho do Estudo**

Este estudo apresenta um desenho experimental de investigação laboratorial em animais. O estudo foi realizado pelo Departamento de Oftalmologia da Universidade Federal de São Paulo com cooperação com o Biotério CEDEME da mesma Universidade. O Comité de Ética da Universidade Federal de São Paulo avaliou este estudo e aprovou a sua execução através do número 0589/10, Uma cópia do protocolo e da carta de aprovação do Comité de Ética encontra-se em anexo a este trabalho. O mesmo foi realizado de acordo com as normas da Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) e os princípios da Declaração de Helsínqui.

O objetivo deste estudo foi a caracterização do perfil de toxicidade intravítrea das formulações-corantes contendo L/Z, isolada ou em combinação com AB ou AT.

### **2.3.2 Tipos de Corantes**

Foi preparada uma solução-tampão em água para injetáveis, contendo tampão-fosfato monobásico a 0,04 mg/mL, tampão-fosfato dibásico a 0,28 mg/mL, cloreto de sódio a 8,5mg/mL, povidona a 4 mg/mL e APV a 14 mg/mL. Esta solução foi aquecida a 75° C por 2h e submetida a agitação mecânica por 24h.

Posteriormente, em uma das formulações, 0,25g de L/Z em forma de cristal são micronizadas em almofariz e colocadas num frasco de 50mL juntamente com 20 mg de AT. Em outra formulação, 0,15g de L/Z em forma de cristal são micronizadas em almofariz e colocadas num frasco de 50mL juntamente com 12,5 mg de AB. Finalmente, 50mL da solução-tampão foram adicionados para cada frasco (correspondente a cada formulação) e sujeitos a agitação em agitador magnético (Quimis Q298-1, Brasil) por 24h.

Para este estudo, foram escolhidas as soluções F1, F3, F57 e F67 (tabela 3A-B) além da solução controle, composta por SSB.



### **2.3.3 Animais e Constituição dos Grupos**

Vinte e seis coelhos Dutch-belted pesando de 1,5 até 2 Kg foram usados. Todos os procedimentos cirúrgicos e exames foram feitos sob anestesia após injeção intramuscular de 35mg/Kg de hidrocloreto de ketamina (Phoenix Scientific Inc., EUA) e 5 mg/Kg de hidrocloreto de xylazina (Phoenix Scientific Inc., EUA). A pupila foi dilatada antes dos procedimentos através da instilação de hidrocloreto de ciclopentolato 1% e fenilefrina 5% (Bausch & Lomb Pharmaceuticals Inc., EUA).

Os coelhos foram agrupados em grupos de 5, como segue:

Grupo 1 – submetidos à injeção intravítrea de L/Z 0,5%;

Grupo 2 – submetidos à injeção intravítrea de L/Z 0,5% + AB 0,0125%;

Grupo 3 - submetidos à injeção intravítrea de L/Z 0,3% + AB 0,025%;

Grupo 4 - submetidos à injeção intravítrea de L/Z 0,25% + AB 0,05%;

### **2.3.4 Injeção Intravítrea e Técnica Cirúrgica**

A anestesia foi feita através da injeção intramuscular de 35 mg/Kg de Hidrocloreto de Xilazina e 5 mg/kg de Hidrocloreto de Ketamina, seguida do posicionamento de um blefarostato no olho direito dos animais. Foi aplicada uma gota de iodopovidona 5% tópica para preparação do olho para vitrectomia, com 3 esclerotomias. O total de 0,1 mL de corante foi injetado dentro da cavidade vítrea do olho direito dos animais. No olho contra-lateral dos animais foi injetado 0,1 mL de SSB (290 mOsm/Kg), usado como grupo controle. A técnica de injeção intravítrea seguiu os padrões internacionais<sup>22</sup>. Sob o microscópio cirúrgico, uma agulha 27 gauge conectada a uma seringa de 1 mL contendo o corante ou SSB foi injetada via intravítrea na região escleral superotemporal a 2 mm posterior ao limbo. Os olhos foram examinados para excluir descolamento de retina, hemorragia vítrea, ou lesão do cristalino; no fim do procedimento uma gota de colírio estéril com antibióticos e corticóides foram aplicadas.

Os coelhos foram sacrificados com injeção endovenosa de 2 mL de fenobarbital e os olhos foram removidos por técnica de enucleação, 24 horas após a injeção intravítrea.

### **2.3.5 Fundoscopia e Angiografia Fluoresceínica**

Angiografia fluoresceínica foi realizada pela injeção intravenosa durante 30 segundos de 0,3 mL de fluoresceína sódica 10% (Ophthalmos, São Paulo, Brasil) em veia auricular magna do animal. A retinografia foi realizada usando uma câmera específica de fundo de olho (Topcon TRC; Topcon, Tokyo, Japão), a cada 20 segundos até 5 minutos após a injeção inicial. O exame de angiofluoresceinografia foi realizado 6 horas e 24 horas após a aplicação do corante intravítreo. A injeção do corante foi realizada de forma lenta, para evitar quebra da barreira hematorretiniana iatrogênica causada pela rápida injeção em bolo que pode acontecer nesses animais.

### **2.3.6 Histologia**

Os olhos foram enucleados e fixados em uma solução de formalina tamponada a 10% por 24 horas, para microscopia ótica, e uma solução de glutaraldeído a 5% e paraformaldeído a 5%, para microscopia eletrônica. Este processo foi seguido de imersão dos tecidos em araldite para cortes histológicos. O material foi coletado de três áreas diferentes nos locais de injeções prévias do corante. Todas as amostras foram coletadas em áreas separadas 500 µm umas das outras. Para microscopia ótica, os cortes histológicos finos foram analisados após coloração com corante de azul de toluidina a 1% (Optiphot-2TM). Para microscopia eletrônica, o bulbo ocular foi imerso em um fixador Karnovski composto por glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% em solução-tampão de cacodilato de sódio 0,1M, mantendo a solução a pH 7,2. A solução foi mantida por 24h e seguidamente procedeu-se aos cortes ultrafinos. Em seguida, deu-se uma primeira lavagem, repetida 3 vezes, usando a mesma solução-tampão de cacodilato de sódio a 0,1M. Uma segunda lavagem foi feita "overnight" com o mesmo tampão. O segundo processo de fixação foi conduzido com tetróxido de ósmio a 2% na solução-tampão anterior durante 2h, seguido por uma lavagem posterior com o mesmo tampão. O material foi sujeito a uma desidratação e secagem com etanol a 70% (15', duas vezes), 90% (15', 2 vezes) e a 100% (15', 4 vezes), finalizando com óxido de propileno (30', 3 vezes).

O material foi então submetido a uma infiltração com resina “epon” em uma solução 1:1 de epon:óxido de propileno “overnight”. No dia seguinte, o material foi re-infiltrado com epon durante 4h em condições de vácuo. Após isto, o material foi incluído em um molde e levado a polimerizar a 60° C durante 48h. Cortes ultrafinos foram feitos com cerca de 40 µm de espessura num micrótomo Leyca Reichert Ultracut 702501, colocados em microsuptores de cobre, corados com acetato de urânio e citrato de prata, e examinados com microscópio eletrônico de Jeol JX 1500TM (Jeol Ltd., Tóquio, Japão). Os dados foram apresentados como descritivos.

### 2.3.7 Cronograma dos experimentos

Quadro 6 – Cronograma do estudo de toxicidade intravítrea em coelhos

Etapa	Descrição
Pré-procedimento	Aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa Desenvolvimento da formulação do corante Obtenção de 26 coelhos fêmeas da raça dutch-belted
Tempo Zero	Antissepsia e anestesia do animal Injeção intravítrea / subretiniana de corante (no grupo experimental) Injeção intravítrea / subretiniana de SSB (no grupo controle)
Tempo 6h	Fundoscopia e angiofluoresceinografia retiniana
Tempo 24h	Fundoscopia e angiofluoresceinografia retiniana Assepsia e anestesia do animal Sacrifício do animal com overdose de pentobarbital
Após o procedimento	Coleta de dados de electroretinografia e histologia Análise estatística dos resultados
Tempo 7 dias	Fundoscopia e angiofluoresceinografia retiniana Assepsia e anestesia do animal Sacrifício do animal com overdose de pentobarbital
Após o procedimento	Coleta de dados de electroretinografia e histologia Análise estatística dos resultados

## 2.4 Estudo de Citotoxicidade e Proliferação Celular

### 2.4.1 Desenho do estudo

Este estudo apresenta um desenho experimental de investigação laboratorial “in-vitro” e foi realizado no Departamento de Biologia da Universidade de Barcelona, com o apoio do grupo Cell Tec, liderado pelo Prof. Dr. Ricardo Casaroli-Marano.

O objetivo foi o de quantificar a citotoxicidade de quatro formulações-corantes produzidas no âmbito deste projeto.

### 2.4.2 Tipos de corantes usados

Os corantes foram preparados de acordo com a técnica detalhada na seção anterior. A tabela 7 apresenta a lista dos corantes que foram usados neste estudo:

Tabela 7 – Composição, pH e Osmolaridade das formulações-corantes usadas

Formulação	[ ] mg/mL(%)				pH	Osm mOsm/Kg
	L/Z	AB	AT	APV		
<b>A*</b>	10,00 (1%)		0,40 (0,04%)		6,8	295
<b>B*</b>	10,00 (1%)	0,25 (0,025%)			7,1	290
<b>C#</b>	3,00 (0,3%)	0,25 (0,025%)		14,00 (1,4%)	7,0	302
<b>D#</b>	20,00 (2%)			14,00 (1,4%)	6,8	305

L/Z: Luteína e Zeaxantina; AB: Azul Brillhante; AT: Azul de Trypan; APV: Álcool Polivinílico. \*: L/Z na forma solúvel; #: L/Z na forma cristal.

## 2.4.3 Metodologia

### Culturas de células e meios

As células do epitélio pigmentado retiniano (ARPE-19, CRL-2302) foram obtidas da “American Type Culture Collection” (ATCC, VA, EUA) e cultivadas no meio modificado de Dulbecco (DMEM): mistura nutricional F12 (Ham’s F12, vol:vol; Lonza, Colônia, Alemanha) com soro bovino fetal a 10%, inativado por calor, (FBS, Lonza, Colônia, Alemanha), tampão HEPES a 15mM<sup>+++</sup>, piruvato de sódio a 0,5mM, L-glutamina a 2mM, estreptomicina a 100 µg/mL e penicilina a 100 UI<sup>\$\$\$</sup>/mL (todos da Gibco, NY, EUA).

As células do epitélio corneano humano (HCE) foram descritas e cedidas pela Dra. Elisa Toropainen e Dr. Arto Urtti, da Universidade de Helsínqui, na Finlândia. O meio de cultura foi composto de DMEM/Ham’s F12 (vol:vol, Lonza, Colônia, Alemanha), soro FBS inativado pelo calor (Lonza, Colônia, Alemanha), L-glutamina a 2mM (Gibco, NY, EUA), insulina a 5 mg/mL (Sigma-Aldrich, MO, EUA), fator de crescimento epidérmico humano recombinante a 10 ng/mL (Sigma-Aldrich), dimetilsulfóxido a 0,5% (DMSO; Sigma), estreptomicina a 100 µg/mL e penicilina a 100 UI/mL (ambos da Gibco, NY, EUA).

As células foram cultivadas a 37°C em ar umidificado com dióxido de carbono a 5% e o meio de cultura foi substituído a cada 48–72 horas.

### Métodos

Para realizar este estudo, utilizou-se duas metodologias para identificar e caracterizar citotoxicidade (modelo WST-1) e proliferação celular (modelo CVDE) em cultura de células “in-vitro”. Para cada modelo, usaram-se células do epitélio corneano humano (HCE), para avaliação de toxicidade do segmento anterior, e células do epitélio pigmentado da retina (ARPE-19), para avaliação de toxicidade retiniana.

---

<sup>+++</sup> mM: milimolar. Concentração de uma solução mil vezes menor que 1mol/L.

<sup>\$\$\$</sup> UI: Unidades Internacionais. Unidade de medida de diversas substâncias biológicas.

## Modelo WST-1

Utilizou-se o modelo colorimétrico WST-1 (“Cell Proliferation Reagent” WST-1, Roche, Mannheim, Alemanha) para avaliar a citotoxicidade das formulações. Este modelo baseia-se na utilização de um sal de tetrazol, mais propriamente, o (4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazol]-1,3-dissulfonato de benzeno, o qual é transformado em “Formazan” mediante a redução do sal, a partir do complexo enzimático mitocondrial succinato-redutase.

Este complexo apenas se encontra ativo em células viáveis metabolicamente. Deste modo, a quantidade de “Formazan” que foi produzida durante o estudo foi avaliada por medidas de absorbância (Lei de Beer) e está diretamente ligada ao número de células viáveis fisiologicamente ativas<sup>(129)</sup>.

As células ARPE-19 e HCE foram cultivadas a uma densidade de  $10-12 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> e  $8-10 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>, respetivamente, em placas de 96 alvéolos. Após 12 horas de crescimento, aplicaram-se quatro diluições (1/15, 1/30, 1/60 and 1/120) de soluções-mãe de formulações-corantes. As culturas celulares foram lavadas cinco vezes com meio de cultura após 24, 48 e 72 horas e adicionou-se um meio de cultura novo contendo 10% de WST-1. Após 3 horas de incubação, a absorbância do meio foi quantificada por meio de um leitor ELISA\*\*\*\*. (ELx800; Bio-Tek Instruments Inc., VT, EUA) com um filtro calibrado a 450 nm.

Como controle positivo para a citotoxicidade, utilizou-se o dodecilsulfato de sódio ao meio, de forma a estabelecer o que representa 100% de toxicidade celular. Já como controle negativo, utilizou-se o meio completo de crescimento celular.

Foram realizados três experimentos independentes, cada um, em triplicado.

---

\*\*\*\* ELISA: “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” é um teste imunoenzimático de grande seletividade que deteta anticorpos específicos pela ligação a um antígeno. A adição de substrato ao complexo enzima-anticorpo-antígeno resulta num produto colorido.

### **Método de Eluição de Corante com Cristal de Violeta (CVDE)<sup>†††</sup>**

Esta técnica foi primeiramente publicada por Gillies et al., em 1986<sup>(129)</sup> e, mais tarde, aperfeiçoada por Merritt et al., em 1998<sup>(130)</sup>. Nesta técnica, as células ARPE-19 e HCE foram cultivadas a uma densidade de  $8-10 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> em placas de 96 alvéolos e após 12 horas de crescimento, aplicaram-se quatro diluições (1/15, 1/30, 1/60 and 1/120) de soluções-mãe de formulações-corantes. Após 24, 48 e 72 horas as culturas celulares foram fixadas com paraformaldeído a 3% por 30 minutos e lavadas com água destilada. Depois de fixadas, as células foram coradas com uma solução aquosa de cristal de violeta a 0,25% durante 20 minutos e, após várias lavagens, fez-se a eluição do corante durante 30 minutos em 100 microlitros de uma solução de ácido acético a 33%. Determinou-se a absorbância a 590 nm, utilizando-se um leitor de ELISA (ELx800; Bio-Tek Instruments Inc., VT, EUA) com um filtro calibrado a 590 nm. O método CVDE é um ensaio colorimétrico (seguindo igualmente a lei de Beer), no qual, a leitura da absorbância é diretamente proporcional ao número de células tingidas e aderidas ao plástico das placas de cultivo celular. Para cada resultado, foram executados três experimentos independentes, cada um em triplicado.

Independentemente das especificidades de cada método usado, ambos os métodos foram realizados tanto em células HCE bem como em células ARPE-19. Os dados foram analisados por meio de GraphPad Prism (versão 4, GraphPad Software, Inc, CA, EUA). A significância estatística foi determinada pelo teste de variância ANOVA a fator único, seguida pelo teste de comparações múltiplas post-hoc de Bonferroni.

## **2.4.4 Cronograma dos experimentos**

Quadro 7 – Cronograma do estudo de citotoxicidade e proliferação celular

Etapa	Descrição
Pré-procedimento	Aprovação do protocolo, obtenção do corante e preparação das células
Tempo Zero	Incubação dos meios de cultura com formulações-corantes
Pós-procedimento	Coleta de dados e análise dos resultados

---

<sup>††††</sup> Cristal de Violeta é um corante usado para tingimento biológico geral.

### 3 Resultados

#### 3.1 Desenvolvimento da formulação Intraocular

As tabelas 8, 9 e 10 mostram a solubilidade da L/Z isolada em vários veículos testados.

Tabela 8 – Solubilidade da Luteína em diferentes solventes orgânicos com valor correspondente de absorvância e concentração

Solvente	Vol (ml)	Peso (g)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (mL)	Etanol (mL)	A <sub>446</sub>	Carotenóides (mg/mL)	% Área HPLC	Luteína (mg/mL)
Acetona	1	0,7875	25	50	0,66650	3,267	90.0251	2,941
Acetona	1	0,7796	25	50	0,67336	3,301	90.0251	2,972
Éter Dietílico	1	-	25	50	0,41266	2,023	90.0251	1,821
Éter Dietílico	1	-	25	50	0,45892	2,250	90.0251	2,025
Etanol	1	0,7658	25	50	0,29673	1,455	90.0251	1,309
Etanol	1	0,7632	25	50	0,59584	1,460	90.0251	1,315
Acetato Etilico	1	0,8750	25	50	0,64409	3,157	90.0251	2,842
Acetato Etilico	1	0,8740	25	50	0,65741	3,223	90.0251	2,901
HEAT	0,5	0,3631	100	50	0,47421	18,596	90.6998	16,867
HEAT	0,5	0,3642	100	50	0,48099	18,862	90.9365	17,153
Hexano	1	0,6636	-	25	0,10211	0,010	90.0251	0,009
Hexano	1	0,6623	-	25	0,10826	0,011	90.0251	0,010
Isopropanol	1	0,7656	25	50	0,19965	0,979	90.0251	0,881
Isopropanol	1	0,7598	25	50	0,22351	1,096	90.0251	0,986
Cloreto de Metileno	0,5	-	100	50	0,47013	18,436	90.0251	16,597
Cloreto de Metileno	0,5	-	100	50	0,46525	18,245	90.0251	16,425
Propilenoglicol	1	0,9120	-	25	0,24475	0,024	90.0251	0,022
Propilenoglicol	1	0,9319	-	25	0,24553	0,024	90.0251	0,022
Tetrahidrofurano	0,1	0,0885	100	50	0,31212	122,400	90.0251	110,191
Tetrahidrofurano	0,1	0,0894	100	50	0,31170	122,235	90.0251	110,042

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (ml): Volume de diclorometano usado na amostra; A<sub>448</sub>: Absorvância a 448nm; % Área HPLC: porcentagem de corante proporcional à concentração na amostra



Tabela 9 – Solubilidade da Zeaxantina em diferentes solventes orgânicos com valor correspondente de absorvância e concentração

Solvente	Ensaio	Vol (mL)	Peso (g)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (mL)	Aliquota (mL)	Etanol (mL)	A <sub>450</sub>	Zeaxantina (mg/mL)
Acetona	1	1	-	25	1	50	0,31523	1,551
Acetona	2	1	-	25	1	50	0,31879	1,569
Éter Dietílico	1	1	-	25	1	50	0,25796	1,269
Éter Dietílico	2	1	-	25	1	50	0,24652	1,213
Etanol	1	1	0,7772	25	1	50	0,16802	0,827
Etanol	2	1	0,7819	25	1	50	0,18606	0,916
Acetato Eílico	1	1	0,8974	25	1	50	0,36707	1,806
Acetato Eílico	2	1	0,8996	25	1	50	0,37195	1,830
HEAT	1	0,5	0,3718	50	1	50	0,17380	3,421
HEAT	2	0,5	0,3709	50	1	50	0,17250	3,396
Hexano	1	1	0,6668	-	-	10	0,07323	0,003
Hexano	2	1	-	-	-	10	0,08019	0,003
Isopropanol	1	1	0,7762	25	1	50	0,20576	1,013
Isopropanol	2	1	0,7682	25	1	50	0,20019	0,985
Cloreto de Metileno	1	0,5	-	100	1	50	0,18549	7,303
Cloreto de Metileno	2	0,5	-	100	1	50	0,18539	7,299
Tetrahidrofurano	1	0,1	-	100	1	50	0,16954	33,374
Tetrahidrofurano	2	0,1	-	100	1	50	0,16877	33,222

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (ml): Volume de diclorometano usado na amostra; A448: Absorvância a 448nm.

Tabela 10 – Solubilidade da *trans*-Luteína em diferentes solventes orgânicos com valor correspondente de absorvância e concentração

<i>trans</i> -Luteína				
Solvente	Carotenóides (mg/mL)	Carotenóides (ppm)	Luteína (mg/mL)	Luteína (ppm)
Acetona	3,284	3284	2,956	2956
Éter Dietílico	2,136	2136	1,923	1923
Etanol	1,457	1457	1,312	1312
Acetato Etílico	3,190	3190	2,872	2872
HEAT	18,729	18729	17,010	17010
Hexano	0,010	10	0,009	9
Isopropanol	1,037	1037	0,934	934
Cloreto de Metileno	18,341	18341	16,511	16511
Propilenoglicol	0,024	24	0,022	22
Tetrahidrofurano	122,318	122318	110,117	110117

Concentração de *trans*-Luteína em vários solventes; *trans*-Luteína: luteína presente no isômero geométrico *trans*.

Excluíram-se os solventes orgânicos acetona, éter dietílico, acetato etílico, HEAT<sup>\*\*\*\*</sup>, hexano, isopropanol, cloreto de metileno e tetrahidrofurano de testes adicionais.

Das 78 formulações criadas e produzidas, as formulações F4-F7, F24 e F51-78 mostraram sinais de precipitação imediata após a produção das soluções enquanto as soluções F8, F9, F12-15, F18-23, F25-27, F29-34 e F38-39 apenas apresentaram sedimentação após 48 horas.

O pH e Osmolaridade de todas as formulações esteve dentro do intervalo [2,79-7,64] e [104-432] mOsm/Kg, respectivamente.

Apenas 15 das 78 formulações (F59-70, F75 e F77-78) demonstraram valores de pH abaixo de 6. Por outro lado, apenas 2 (F15-16) das 78 formulações assumiram valores abaixo de 273 mOsm/Kg.

---

<sup>\*\*\*\*</sup> HEAT: solvente orgânico comum para solubilizar carotenóides.

Um resumo dos resultados obtidos relativos à cor, grau de solubilização, pH e Osmolaridade de cada formulação encontra-se nas tabelas 11-14.

Tabela 11 – Características físico-químicas de formulações-corantes verde escuras

Côr	Formulação	Grau Solubilização (0 h)	Grau Solubilização (48 h)	PH	Osmolaridade (mOsm/Kg)
Verde Escuro	F2	100%	100%	6,85	295
Verde Escuro	F4	Precipitado (++)	Precipitado (++)	6,84	289
Verde Escuro	F6	Precipitado (+)	Precipitado (+)	6,91	294
Verde Escuro	F8	100%	Precipitado	6,96	299
Verde Escuro	F10	100%	100%	7,18	N/A
Verde Escuro	F12	100%	Precipitado	N/A	310
Verde Escuro	F14	100%	Precipitado	N/A	322
Verde Escuro	F16	100%	100%	6,39	113,3
Verde Escuro	F18	100%	Precipitado	6,88	324
Verde Escuro	F20	100%	Precipitado	6,91	310
Verde Escuro	F22	100%	Precipitado	6,45	308
Verde Escuro	F50	Precipitado (++)	Precipitado (++)	6,82	305
Verde Escuro	F51	Precipitado (++)	Precipitado (++)	7,04	306
Verde Escuro	F67	Precipitado	Precipitado	7,36	284
Verde Escuro	F70	Precipitado	Precipitado	5,04	316
Verde Escuro	F72	Precipitado	Precipitado	7,61	289
Verde Escuro	F73	Precipitado	Precipitado	7,47	294

Resultados de solubilidade, pH e osmolaridade para cada formulação final verde escura; N/A – dados não disponíveis

Tabela 12 – Características físico-químicas de formulações-corantes verde claras

Côr	Formulação	Grau Solubilização (0 h)	Grau Solubilização (48 h)	PH	Osmolaridade (mOsm/Kg)
Verde Claro	F1	100%	100%	6,6	290
Verde Claro	F5	Precipitado (+)	Precipitado (+)	6,84	302
Verde Claro	F7	100%	Precipitado	6,76	309
Verde Claro	F9	100%	100%	7	302
Verde Claro	F11	100%	Precipitado	6,81	288
Verde Claro	F13	100%	Precipitado	6,93	315
Verde Claro	F15	100%	100%	6,32	104
Verde Claro	F17	100%	Precipitado	6,78	311
Verde Claro	F19	100%	Precipitado	6,69	303
Verde Claro	F21	100%	Precipitado	6,67	306
Verde Claro	F23	Precipitado++	Precipitado	6,77	314
Verde Claro	F24	100%	Precipitado	6,25	318
Verde Claro	F25	100%	Precipitado	7,64	310
Verde Claro	F26	100%	Precipitado	6,89	302
Verde Claro	F27	100%	100%	6,34	299
Verde Claro	F28	100%	Precipitado	6,56	307
Verde Claro	F29	100%	Precipitado	6,47	305
Verde Claro	F30	100%	Precipitado	6,5	303
Verde Claro	F31	100%	Precipitado	6,41	311
Verde Claro	F32	100%	Precipitado	6,55	315
Verde Claro	F33	100%	Precipitado	6,63	312
Verde Claro	F34	100%	100%	6,61	301
Verde Claro	F35	100%	100%	6,7	313
Verde Claro	F36	100%	100%	6,68	311
Verde Claro	F37	100%	Precipitado	6,65	305
Verde Claro	F38	100%	Precipitado	6,78	320
Verde Claro	F39	100%	100%	6,9	309
Verde Claro	F40	100%	100%	6,91	319
Verde Claro	F41	100%	100%	6,98	298
Verde Claro	F42	100%	100%	7	299
Verde Claro	F43	100%	100%	7,21	297
Verde Claro	F44	100%	100%	6,93	295
Verde Claro	F45	100%	100%	6,82	294
Verde Claro	F46	100%	100%	6,75	296
Verde Claro	F47	100%	100%	6,77	299
Verde Claro	F48	100%	100%	6,71	293
Verde Claro	F49	100%	100%	6,79	295
Verde Claro	F63	Precipitado	Precipitado	5,59	300
Verde Claro	F64	Precipitado	Precipitado	5,08	307
Verde Claro	F66	100%	100%	6,9	288
Verde Claro	F68	Precipitado	Precipitado	5,4	295
Verde Claro	F71	Precipitado	Precipitado	6,56	308
Verde Claro	F74	100%	100%	7,51	299
Verde Claro	F78	Precipitado	Precipitado	5,14	308

Resultados de solubilidade, pH e osmolaridade para cada formulação final verde clara

Tabela 13 - Características físico-químicas de formulações-corantes azuis

Côr	Formulação	Grau Solubilização (0 h)	Grau Solubilização (48 h)	PH	Osmolalidade (mOsm/Kg)
Azul Claro	F69	Precipitado	Precipitado	5,35	309
Azul Claro	F75	Precipitado	Precipitado	5,89	309
Azul Escuro	F76	Precipitado	Precipitado	6,08	306
Azul Escuro	F77	Precipitado	Precipitado	5,64	314

Resultados de solubilidade, pH e osmolaridade para cada formulação final de cor azul

Tabela 14 - Características físico-químicas de formulações-corantes de outras cores

Côr	Formulação	Grau Solubilização (0 h)	Grau Solubilização (48 h)	PH	Osmolalidade (mOsm/Kg)
Creme	F65	Precipitado	Precipitado	7,32	290
Amarelo	F52	Precipitado	Precipitado	7,3	290
Amarelo	F53	Precipitado	Precipitado	6,98	288
Laranja	F54	Precipitado	Precipitado	6,91	275
Laranja	F55	Precipitado	Precipitado	6,89	274
Laranja	F56	Precipitado	Precipitado	6,71	273
Laranja	F57	Precipitado	Precipitado	6,36	277
Laranja	F58	Precipitado	Precipitado	6,15	275
Laranja	F59	Precipitado	Precipitado	3,33	326
Laranja	F60	Precipitado	Precipitado	3	372
Laranja	F61	Precipitado	Precipitado	2,9	401
Laranja	F62	Precipitado	Precipitado	2,79	432
Marron	F3	Precipitado (++)	Precipitado (++)	7,41	301

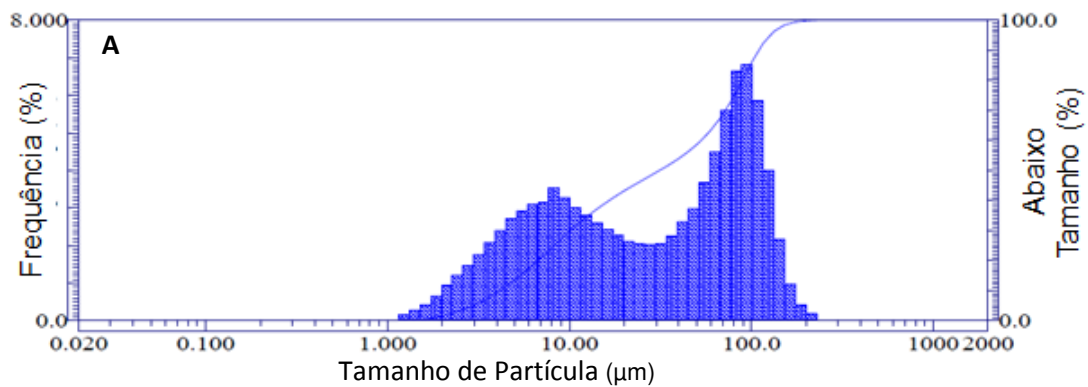
Resultados de solubilidade, pH e osmolaridade para cada formulação final de outras cores

A figura 18 representa uma tabela de frequência de distribuição de tamanho de partícula do cristal de L/Z inicial, com média de 47,1 $\mu$ m e moda 94,1 $\mu$ m. Após 3 horas de uso de moagem<sup>§§§§</sup> em moinho de bolas planetário, a média e moda de tamanho de partícula do cristal de L/Z foi de 0,36 $\mu$ m e 0,36 $\mu$ m, respectivamente. A figura 19 representa a tabela de frequência de distribuição de tamanho de partícula do cristal de L/Z após 3 horas de moagem.

---

<sup>§§§§</sup> Técnica de micronização farmacêutica, que consiste na quebra das moléculas em partículas menores, de forma a aumentar a solubilidade ou a facilitar a absorção, entre outros objetivos.

Figura 18. Frequência acumulada do tamanho de partícula inicial de Luteína e Zeaxantina cristal

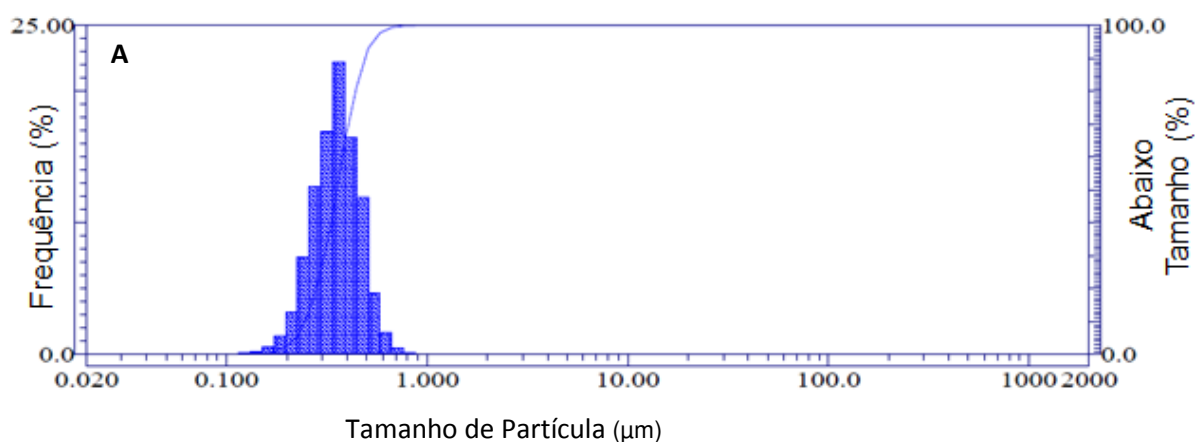


B

No.	Diâmetro (µm)	Freq. %	% abaixo de	No.	Diâmetro (µm)	Freq. %	% abaixo de	No.	Diâmetro (µm)	Freq. %	% abaixo de
1	0,022	0,000	0,000	23	0,445	16.507	81.222	45	8,816	0,000	100,000
2	0,026	0,000	0,000	24	0,510	11.898	93.120	46	10,097	0,000	100,000
3	0,029	0,000	0,000	25	0,584	4.692	97.812	47	11,565	0,000	100,000
4	0,034	0,000	0,000	26	0,669	1.626	99.438	48	13,246	0,000	100,000
5	0,039	0,000	0,000	27	0,766	0.453	99.891	49	15,172	0,000	100,000
6	0,044	0,000	0,000	28	0,877	0.109	100,000	50	17,377	0,000	100,000
7	0,051	0,000	0,000	29	1,005	0,000	100,000	51	19,904	0,000	100,000
8	0,058	0,000	0,000	30	1,151	0,000	100,000	52	22,797	0,000	100,000
9	0,067	0,000	0,000	31	1,318	0,000	100,000	53	26,111	0,000	100,000
10	0,076	0,000	0,000	32	1,510	0,000	100,000	54	29,907	0,000	100,000
11	0,087	0,000	0,000	33	1,729	0,000	100,000	55	34,255	0,000	100,000
12	0,100	0,000	0,000	34	1,981	0,000	100,000	56	39,234	0,000	100,000
13	0,115	0,000	0,000	35	2,269	0,000	100,000	57	44,938	0,000	100,000
14	0,131	0,105	0,105	36	2,599	0,000	100,000	58	51,471	0,000	100,000
15	0,150	0,229	0,334	37	2,976	0,000	100,000	59	58,953	0,000	100,000
16	0,172	0,552	0,886	38	3,409	0,000	100,000	60	67,523	0,000	100,000
17	0,197	1.406	2.292	39	3,905	0,000	100,000	61	77.339	0,000	100,000
18	0,226	3.198	5.490	40	4,472	0,000	100,000	62	88,583	0,000	100,000
19	0,259	7.374	12.864	41	5,122	0,000	100,000	63	10,460	0,000	100,000
20	0,296	12.716	25.580	42	5,867	0,000	100,000	64	116,210	0,000	100,000
21	0,339	16.970	42.551	43	6,720	0,000	100,000	65	133,103	0,000	100,000
22	0,389	22.164	64.715	44	7,697	0,000	100,000	66	152,453	0,000	100,000

A. Descrição gráfica. B. Descrição analítica. Valores expressos em micrómetros (µm). No: Número de análises. Freq. %: porcentagem de partículas em cada diâmetro.

Figura 19. Frequência acumulada do tamanho de partícula após micronização de Luteína e Zeaxantina cristal com moinho de bolas planetário



B

No.	Diametro (µm)	Freq. %	% abaixo de	No.	Diametro (µm)	Freq. %	% abaixo de	No.	Diametro (µm)	Freq. %	% abaixo de
1	0,022	0,000	0,000	23	0,445	16.507	81.222	45	8,816	0,000	100,000
2	0,026	0,000	0,000	24	0,510	11.898	93.120	46	10,097	0,000	100,000
3	0,029	0,000	0,000	25	0,584	4.692	97.812	47	11,565	0,000	100,000
4	0,034	0,000	0,000	26	0,669	1.626	99.438	48	13,246	0,000	100,000
5	0,039	0,000	0,000	27	0,766	0,453	99.891	49	15,172	0,000	100,000
6	0,044	0,000	0,000	28	0,877	0,109	100,000	50	17,377	0,000	100,000
7	0,051	0,000	0,000	29	1,005	0,000	100,000	51	19,904	0,000	100,000
8	0,058	0,000	0,000	30	1,151	0,000	100,000	52	22,797	0,000	100,000
9	0,067	0,000	0,000	31	1,318	0,000	100,000	53	26,111	0,000	100,000
10	0,076	0,000	0,000	32	1,510	0,000	100,000	54	29,907	0,000	100,000
11	0,087	0,000	0,000	33	1,729	0,000	100,000	55	34,255	0,000	100,000
12	0,100	0,000	0,000	34	1,981	0,000	100,000	56	39,234	0,000	100,000
13	0,115	0,000	0,000	35	2,269	0,000	100,000	57	44,938	0,000	100,000
14	0,131	0,105	0,105	36	2,599	0,000	100,000	58	51,471	0,000	100,000
15	0,150	0,229	0,334	37	2,976	0,000	100,000	59	58,953	0,000	100,000
16	0,172	0,552	0,886	38	3,409	0,000	100,000	60	67,523	0,000	100,000
17	0,197	1.406	2.292	39	3,905	0,000	100,000	61	77,339	0,000	100,000
18	0,226	3.198	5.490	40	4,472	0,000	100,000	62	88,583	0,000	100,000
19	0,259	7.374	12.864	41	5,122	0,000	100,000	63	101,460	0,000	100,000
20	0,296	12.716	25.580	42	5,867	0,000	100,000	64	116.210	0,000	100,000
21	0,339	16.970	42.551	43	6,720	0,000	100,000	65	133,103	0,000	100,000
22	0,389	22.164	64.715	44	7,697	0,000	100,000	66	152,453	0,000	100,000

A. Descrição gráfica. B. Descrição analítica. Valores expressos em micrómetros (µm). No: Número de análises. Freq. %: porcentagem de partículas em cada diâmetro.

## 3.2 Estudo em Olhos Cadavéricos

Para testar as 78 formulações, foram estudados 102 olhos cadavéricos obtidos a partir do Banco de Olhos do Hospital São Paulo.

Dentro destes 102 olhos, 11 apresentavam-se em mau estado para a realização das cirurgias, tendo sido rejeitados, e 13 foram usados para repetir as formulações F1 (2 vezes), F2, F4, F66-67, F71-F73, F74 (2 vezes), F76 e F77. Dos restantes, cada formulação foi testada em um olho cadavérico apenas.

A tabela 15 apresenta o grau de tingimento das membranas intraoculares de interesse (Vítreo, CA e MLI) como resultado da injeção das formulações F1-F78.

Demonstrou-se que as formulações que empregavam Cremophor EL™ não coravam nenhuma membrana nem estrutura.

Por outro lado, e sem contar com as formulações contendo Cremophor EL™ (F5-F49), apenas 5 formulações (F3, F52, F53, F56 e F67) coravam menos de +++/4 o Vítreo, tendo a maior parte das formulações testadas corado +++/4 ou ++++/4.

Adicionalmente, a combinação com mais baixa concentração de AT a atingir a coloração máxima da CA foi a F74 seguida da F71 e F4.

Da mesma forma, a combinação com mais baixa concentração de AB a atingir a coloração máxima da MLI foi a F66.



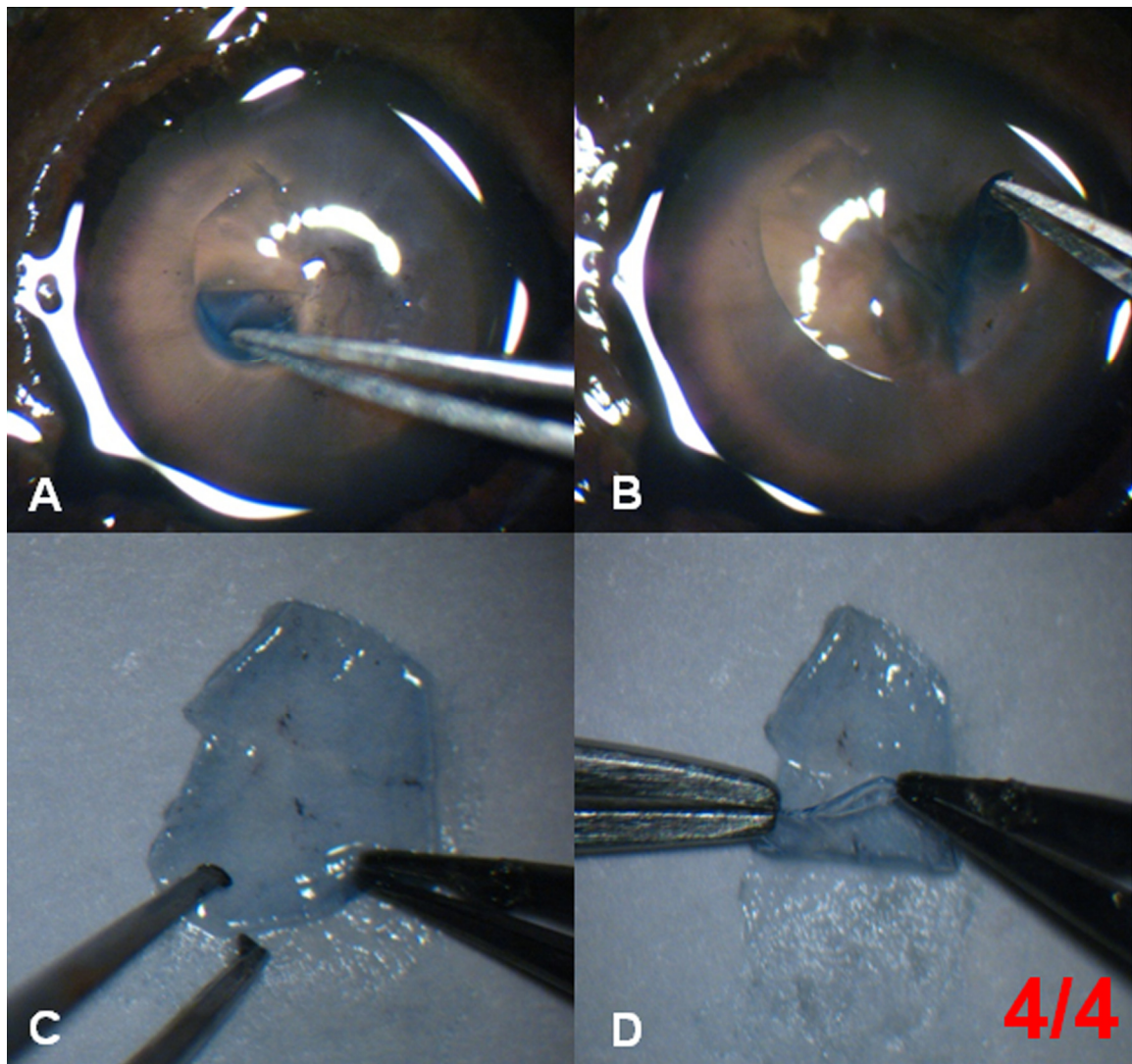
Tabela 15 – Grau de tingimento do Vítreo, Cápsula Anterior e Membrana Limitante Interna com as diferentes formulações usadas

Formulação	Coloração Vítreo	Coloração CA	Coloração MLI	Formulação	Coloração Vítreo	Coloração CA	Coloração MLI
F1	++++/4		++++/4	F40	0	0	0
F2	+++/4	3		F41	0	0	0
F3	+/4		+/4	F42	0	0	0
F4	++++/4	4		F43	0	0	0
F5	0	0	0	F44	0	0	0
F6	0	0	0	F45	0	0	0
F7	0	0	0	F46	0	0	0
F8	0	0	0	F47	0	0	0
F9	0	0	0	F48	0	0	0
F10	0	0	0	F49	0	0	0
F11	0	0	0	F50	+++/4		+/4
F12	0	0	0	F51	+++/4	2	
F13	0	0	0	F52	+/4	1	1
F14	0	0	0	F53	+/4	1	1
F15	0	0	0	F54	+++/4	1	1
F16	0	0	0	F55	+++/4	1	1
F17	0	0	0	F56	+/4		+/4
F18	0	0	0	F57	++++/4		+/4
F19	0	0	0	F58	++++/4	1	+/4
F20	0	0	0	F59	++++/4	1	+/4
F21	0	0	0	F60	++++/4	2	+/4
F22	0	0	0	F61	++++/4	2	+/4
F23	0	0	0	F62	++++/4	2	+/4
F24	0	0	0	F63	+++/4		+/4
F25	0	0	0	F64	+++/4		+/4
F26	0	0	0	F65	++++/4		+/4
F27	0	0	0	F66	++++/4		++++/4
F28	0	0	0	F67	+/4		++++/4
F29	0	0	0	F68	+++/4		+/4
F30	0	0	0	F69	+++/4	1	
F31	0	0	0	F70	+++/4	2	
F32	0	0	0	F71	++++/4	4	
F33	0	0	0	F72	++++/4	4	
F34	0	0	0	F73		4	
F35	0	0	0	F74	++++/4	3	
F36	0	0	0	F75	+++/4		+/4
F37	0	0	0	F76	+++/4		+++/4
F38	0	0	0	F77	+++/4	4	
F39	0	0	0	F78	++++/4	2	

CA: Cápsula Anterior; MLI: Membrana Limitante Interna; 0: nenhuma coloração para qualquer membrana/estrutura; +/4, ++/4, +++/4, ++++/4: grau de coloração, respetivamente, fraca, moderada, boa e intensa do vítreo e MLI; 1, 2, 3 e 4, na coloração da CA, representa, respetivamente, coloração até ¼, entre ¼ e ½, entre ¾ e ½ e maior que ¾ do total da CA.

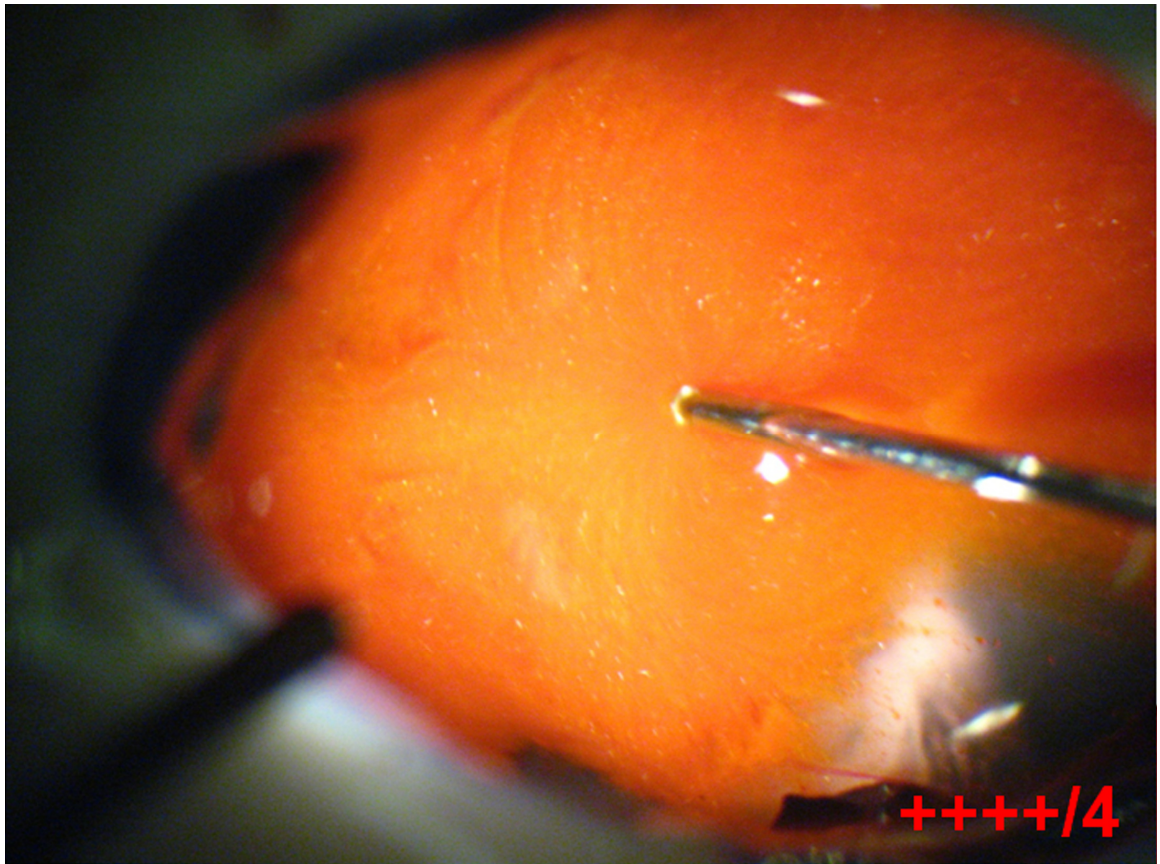
As figuras 20-22 ilustram o grau de tingimento das estruturas intraoculares proporcionado pela injeção dos corantes formulados nos olhos cadavéricos de doadores de córnea.

Figura 20. Tingimento da Cápsula Anterior de olhos humanos com Luteína e Zeaxantina 0,3% + Azul Brilhante 0,025%



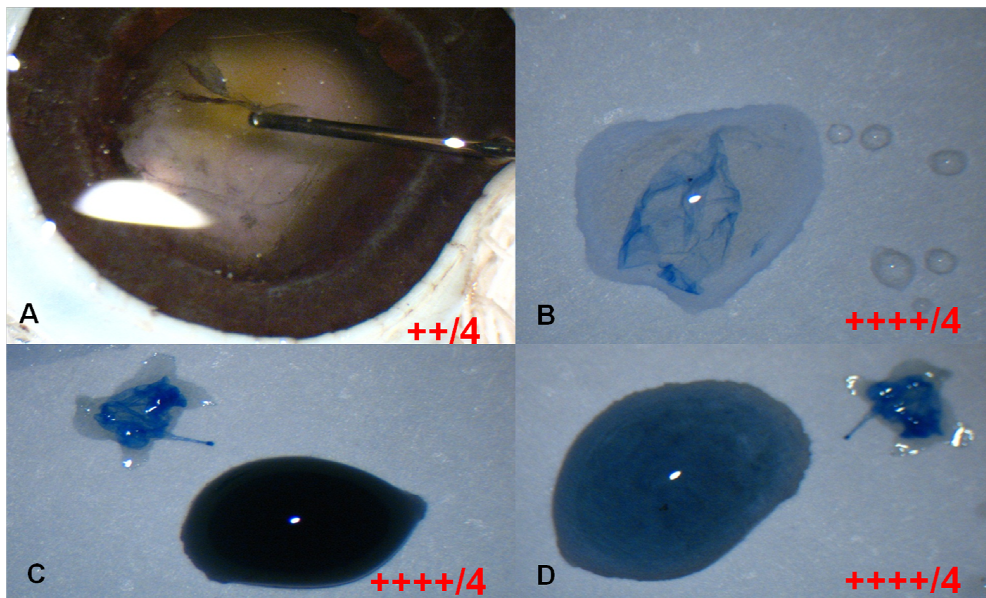
Após uma incisão de 360 graus no limbo, removeu-se a córnea seguida da íris. Em seguida, 0,3 mL do corante (L/Z 0,3% + AB 0,025%) foi colocado sobre a CA durante trinta segundos, seguido por irrigação com solução salina. **A**, uma capsulorrexia anterior curvilínea contínua foi feita. **B**, A CA esverdeada foi removida cirurgicamente. **C**, a membrana da CA foi colocada sob uma folha de papel branco para avaliar contraste. **D**, A membrana da CA esverdeada foi dobrada contra a folha de papel branco e evidenciou uma forte coloração de 4/4.

Figura 21. Tingimento do Vítreo obtido após a injeção de 0,3 mL de Luteína e Zeaxantina 20%



Para a avaliação da coloração do Vítreo, o segmento anterior do bulbo ocular foi removido integralmente através de uma incisão de 1 mm por detrás do limbo. Os cristais de L/Z a 20% depositaram-se no Vítreo e induziram uma forte coloração laranja, avaliada em ++++/4

Figura 22. Tingimento da membrana limitante interna obtido após a injeção de 0,3 mL de solução de Luteína e Zeaxantina 0,3% + Azul Brilhante 0,025%



Um volume de 0,3 mL da solução de corante natural composta por uma solução de L/Z em 1% e uma solução de L/Z 0,25% + AB 0,025% foi injetada na cavidade vítrea posterior ao longo da MLI. **A.** Remoção da MLI guiada por uma solução de L/Z 1% como corante cirúrgico. A MLI - de cor amarela escura pode ser identificada e removida, no entanto, o grau de tingimento foi moderado/regular (++/4). **B.** uma solução de L/Z 0,25% + AB 0,025% coraram fortemente a MLI facilitando a sua identificação e remoção. A MLI esverdeada foi colocada contra uma folha de papel branca e classificada com uma pontuação ++++/4, conforme tingimento máximo do corante. **C.** A MLI foi deixada na superfície da folha de papel branco e uma gota da solução-corante esverdeada foi colocada ao lado. **D.** A gota de corante de L/Z foi deixada por 30 segundos na superfície da folha de papel branco e o volume em excesso foi aspirado com uma seringa. Visualmente, tanto a gota do corante e a MLI recentemente removida tinham a mesma cor esverdeada, recebendo uma pontuação de coloração de ++++/4.

### 3.3 Estudo de Toxicidade em Coelhos

#### 3.3.1 Exame Ocular

Nos vinte e seis coelhos testados não foram observados casos de hemorragia vítrea, catarata ou endoftalmite, após oftalmoscopia indireta no tempo 0, 1 e 7 dias. Um coelho (número 24), registrou hiperemia conjuntival e quemose no olho injetado com corante após 24h, a qual desapareceu na avaliação realizada aos 7 dias.

### 3.3.2 Eletrorretinografia

Não foi observada uma diminuição significativa da amplitude de ondas a e b no tempo 1 e 7 dias, conforme mostra a tabela 16 e 17. Contudo, reduções maiores foram observadas após 24h do que após 7 dias. Registrou-se inclusivamente uma redução isolada da amplitude da onda “a” no olho injetado com SSB (controle) (tabelas 13 e 14).

Tabela 16 – Diferença percentual de amplitude de ondas entre tempo 0 e 7 dias após injeção do corante

7dias	Injeção de Corante (OD)			Injeção de SSB (OE)		
	Amplitude Onda-B		Amplitude Onda-A	Amplitude Onda-B		Amplitude Onda-A
	Bastonete	Máxima	Máxima	Bastonete	Máxima	Máxima
	% diferença	% diferença	% diferença	% diferença	% diferença	% diferença
<b>Coelho</b>						
<b>1</b>	-11,5	9,2	-10,0	64,9	42,9	24,2
<b>2</b>	-9,5	-15,2	4,6	6,4	15,7	-19,2
<b>3</b>	-33,2	-0,3	-6,1	7,6	37,6	19,4
<b>4</b>	3,5	0,6	-17,5	22,7	44,1	23,9
<b>5</b>	9,3	-7,7	13,4	10,5	1,6	7,5
<b>6</b>	16,7	-4,1	-17,2	56,0	8,4	-12,5
<b>7</b>	45,9	-1,1	-15,7	84,6	20,0	129,8
<b>8</b>	-5,0	-2,1	-33,6	-17,8	-7,0	-10,2
<b>9</b>	5,5	-2,1	0,0	-7,3	-5,3	-47,5
<b>10</b>	57,3	10,9	0,0	18,2	12,3	39,1
<b>11</b>	-21,3	5,8	-33,6	141,1	53,1	-2,8
<b>12</b>	40,2	32,1	31,7	14,3	-14,1	-11,0
<b>13</b>	-2,9	1,6	-8,7	40,8	24,7	5,6
<b>14</b>	-28,6	-5,6	-41,7	48,8	44,1	22,0
<b>15</b>	-41,9	-32,1	-32,5	23,1	2,3	-1,0
<b>16</b>	-27,3	-25,0	-36,7	17,8	-4,0	14,0
<b>17</b>	11,9	1,3	-9,2	39,5	52,6	58,9
<b>18</b>	130,9	33,0	118,9	92,6	29,5	-7,4
<b>19</b>	29,7	-16,6	26,1	8,9	12,9	31,2
<b>20</b>	-12,8	-27,5	-5,6	-7,1	-29,9	-40,3

Análise descritiva dos resultados da média para cada olho de coelhos submetido a injeção intravítrea de formulação-corante no olho direito (OD) e solução salina balanceada (SSB) no olho esquerdo (OE); amplitude do eletrorretinograma e porcentagem da diferença entre tempo 0 e 7 dias após a injeção; coelhos 6-10 (grupo 1), coelhos 16-20 (grupo 2), coelhos 1-5 (grupo 3) e coelhos 11-15 (grupo 4)

Tabela 17 – Diferença porcentual de amplitude de ondas entre tempo 0 e 24 horas após injeção do corante

24hs	Injeção Corante (OD)			Injeção SSB (OE)		
	Amplitude Onda-B		Amplitude Onda-A	Amplitude Onda-B		Amplitude Onda-A
	Bastonete	Máxima	Máxima	Bastonete	Máxima	Máxima
	% diferença	% diferença	% diferença	% diferença	% diferença	% diferença
<b>Coelho</b>						
<b>21</b>	-19,8	-20,0	-37,5	-54,2	-29,2	-68,4
<b>22</b>	-30,6	-40,3	-40,7	42,7	14,2	-34,7
<b>23</b>	-17,3	-18,8	-22,7	-18,5	-0,2	6,5
<b>24</b>	-70,9	-68,8	-72,4	-16,8	-6,4	-33,9
<b>25</b>	-33,9	-26,7	-8,4	-8,7	-12,2	-0,7
<b>26</b>	-14,2	-26,6	-5,2	20,7	23,9	11,9

Análise descritiva dos resultados da média para cada olho de coelhos submetido a injeção intravítrea de formulação-corante no olho direito (OD) e solução salina balanceada (SSB) no olho esquerdo (OE); amplitude do eletrorretinograma e porcentagem da diferença entre tempo 0 e 24 horas após a injeção; coelhos 23-24 (grupo 2), coelhos 25-26 (grupo 3), coelhos 21-22 (grupo 4).

A tabela 18 abaixo mostra os resultados de média e desvio-padrão da onda-b e onda-b máxima associados ao conjunto dos olhos injetados com formulação-corante e solução controle para cada grupo, no tempo 0 e 7 dias. Adicionalmente, calculou-se o valor de p associado a cada onda dos olhos direitos e esquerdos de cada grupo.

Tabela 18 – Análise descritiva da média e desvio-padrão de cada olho testado

		<i>Tempo 0</i>	<i>Tempo 7dias</i>	<i>Valor de p</i>
<i>Grupo 1</i>	<b>Olho Direito</b>			
	Onda-b	171.5 (118,0-206.0)	147,0 (114,5-186,5)	0,225
	Onda-b máxima	169.0 (150,0-237.0)	172,0 (138,5-201,0)	0,685
	<b>Olho Esquerdo</b>			
	Onda-b	128.0 (119,5-171.0)	176,0 (132,0-204,5)	0,042
	Onda-b máxima	174.5 (136,5-188.0)	217,5 (157,0-254,5)	0,043
<i>Grupo 2</i>	<b>Olho Direito</b>			
	Onda-b	118.0 (85,0-180,5)	145,5 (124,0-181,5)	0,138
	Onda-b máxima	163.0 (119,5-238.5)	159,5 (131,0-233,5)	0,500
	<b>Olho Esquerdo</b>			
	Onda-b	103.5 (65,0-136.0)	118,0 (108,0-161,5)	0,345
	Onda-b máxima	178.5 (115-188.5)	174,0 (132,0-193,5)	0,224
<i>Grupo 3</i>	<b>Olho Direito</b>			
	Onda-b	84.5 (61,0-114.5)	66,5 (47,5-118,5)	0,345
	Onda-b máxima	153.0 (112,0-204.0)	138,5 (118,5-243,0)	0,892
	<b>Olho Esquerdo</b>			
	Onda-b	91.0 (62,5-136,0)	138,0 (93,0-155,5)	0,043
	Onda-b máxima	153.5 (98,0-245,5)	202,5 (150,0-214,5)	0,138
<i>Grupo 4</i>	<b>Olho Direito</b>			
	Onda-b	74,0 (40,5-97,0)	75,5 (64,5-118)	0,500
	Onda-b máxima	152,5 (89,5-192.5)	119,0 (105,5-160,5)	0,224
	<b>Olho Esquerdo</b>			
	Onda-b	90,0 (60,5-112,5)	116,5 (78,5-155,5)	0,079
	Onda-b máxima	149,5 (135,5-186,5)	175,5 (11,5-223,5)	0,685

Análise estatística descritiva dos resultados da média para cada olho de coelhos submetido a injeção intravítrea de formulação-corante no olho direito (OD) e solução salina balanceada (SSB) no olho esquerdo (OE); mostram-se valores de amplitude de onda-b e onda-b máxima entre tempos 0 e 7 dias após injeções, com correspondentes valores de p; dados de valor de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Comparações pré e pós foram realizadas com teste de Wilcoxon pareado. Todas as análises foram feitas com Stata v. 11 (College Station, Texas).

### 3.3.3 Histologia

A histologia dos olhos tratados com corantes e olhos controle não mostraram sinais de toxicidade anatômicas importantes. A aparência histopatológica da retina e coróide enquadrou-se dentro dos limites normais, sem quaisquer sinais de necrose de retina ou inflamação.

No que diz respeito a danos na retina 7 dias após a injeção de corante, observou-se apenas uma ligeira irregularidade da superfície da retina em um olho injetado com uma formulação de L/Z 0,3% + AB 0,025%, três olhos injetados com L/Z 0,25% + AB 0,05% e um olho injetado com L/Z 0,5% + AB 0,0125%. Não foram observadas áreas difusas mas apenas áreas focais de vacuolização e células multinucleadas em camadas de células ganglionares na maioria dos olhos em todos os grupos.

O exame do grupo controle mostrou áreas focais de vacuolização ou edema celular nas camadas de células ganglionares e nas camadas nucleares internas. Um olho do grupo controle apresentou uma área difusa de vacuolização na camada de células ganglionares (figura 23).

No grupo 1 (olho direito injetado com L/Z 0,5%), observou-se pequenas áreas focais de vacuolização na camada de fibras nervosas e camada nuclear interna bem como artefatos nos segmentos externos do fotorreceptor em três retinas (figura 24).

No grupo 2 (olho direito injetado com L/Z 0,5% + AB 0,0125%), dois olhos mostraram um leve edema dos discos dos fotorreceptores (figura 25).

Em 3 olhos corados do grupo 3 (injetados com L/Z 0,3% + 0,025% AB), observou-se vacuolização focal, edema celular ou artefatos devido à preparação histológica no segmentos externos dos fotorreceptores. Os restantes olhos apresentaram artefatos devido a descolamento de retina nos segmentos externos dos fotorreceptores (figura 26).

No grupo 4 (olho direito injetado com L/Z 0,25% + AB 0,05%), todas as retinas mostraram artefato devido a preparação histológica nos segmentos externos dos fotorreceptores (figura 27).

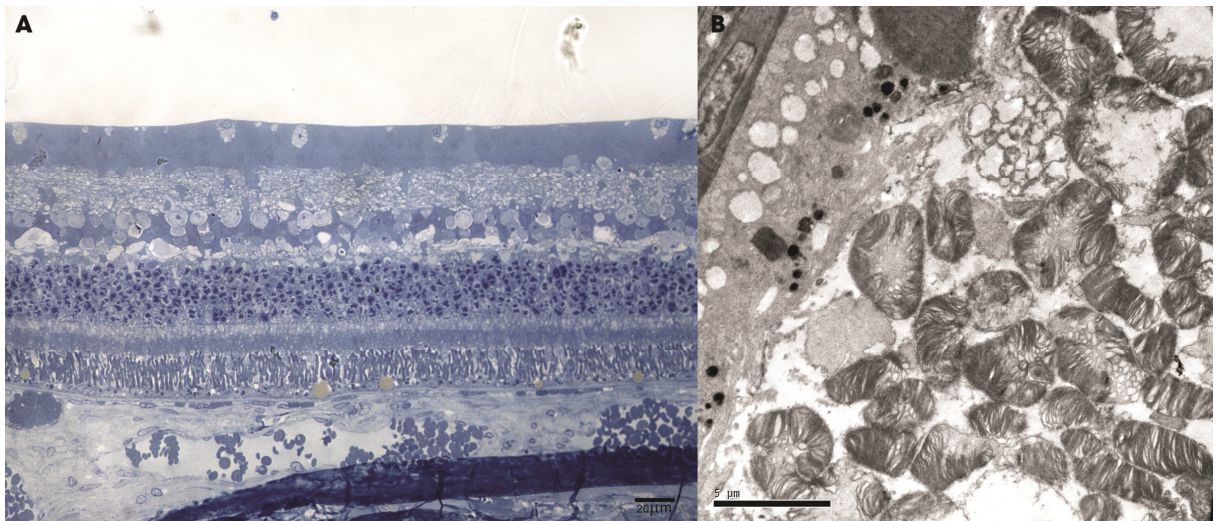
No que diz respeito aos resultados de 24 horas após a injeção intravítrea de corante, foi observada vacuolização focal nas camadas de fibras, em todos os grupos, e nas camadas nucleares internas de duas retinas submetidas do grupo 4 e de uma retina do grupo 2 e 3.



Foi observada vacuolização em camadas de células ganglionares com células multinucleadas em todos os grupos e vacuolização difusa de um olho no grupo 2 e 4.

Foram observados também artefatos ou áreas de fragmentação nos segmentos externos dos fotorreceptores, na maioria das retinas. O exame de histologia mostrou mais alterações aos elementos celulares 7 dias após a injeção intravítrea com a formulação do grupo 4. Não houve diferenças significativas nas alterações da retina entre resultados dos grupos em 24 horas. As camadas plexiformes exterior e interior, EPR e coriocapilar mostraram-se intactas em todos os grupos.

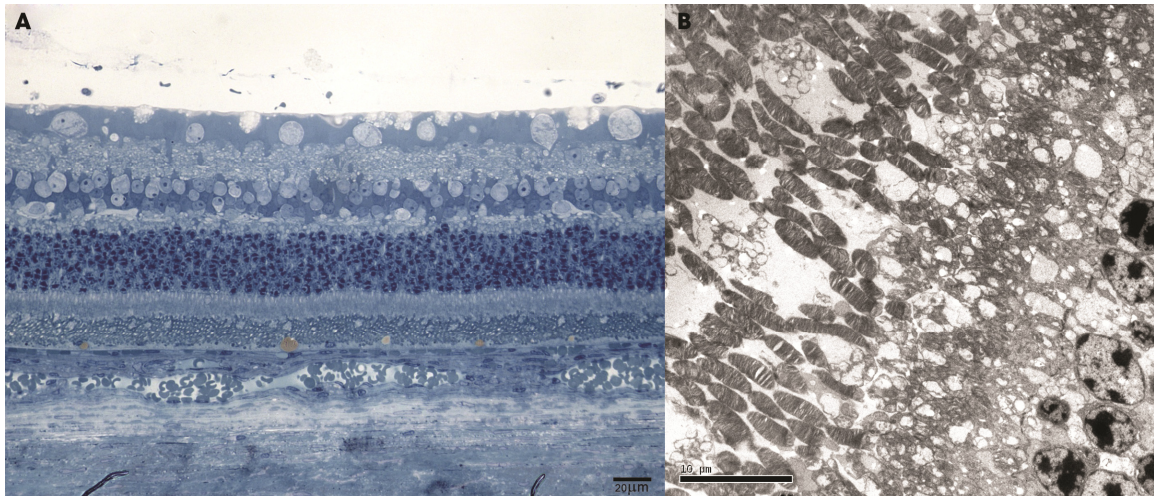
Figura 23. Histologia de retina 7 dias após injeção intravítrea no grupo controle



A. Microscopia óptica demonstrando camadas retinianas com leves anormalidades na camada de fotorreceptores (azul de toluidina, magnificação 40x);

B. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) demonstrando presença de edema e vacuolização na camada de células nervosas e edema nas células ganglionares (MET, magnificação 4000x).

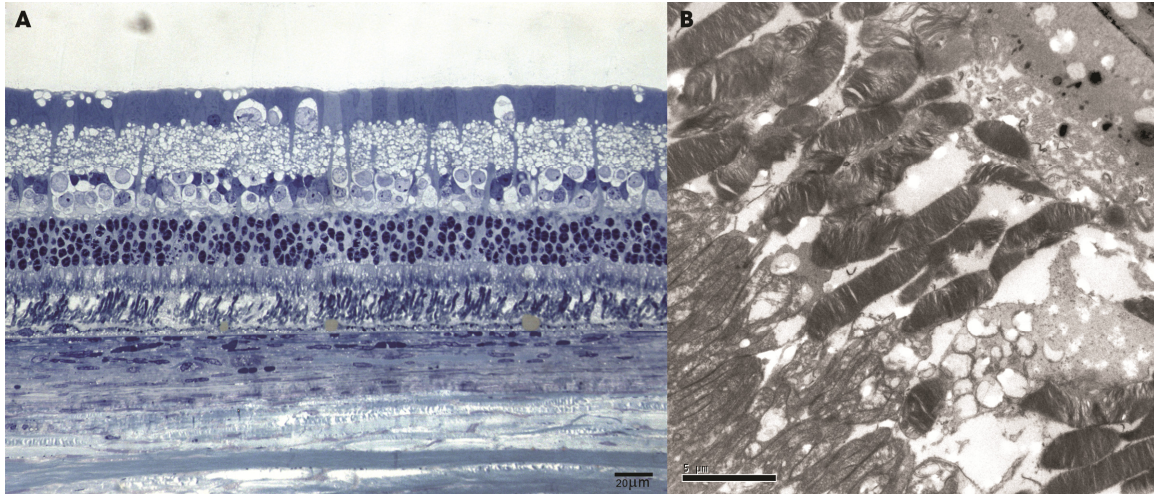
Figura 24. Histologia de retina 7 dias após injeção intravítrea no grupo 1



A. Microscopia óptica demonstrando camadas retinianas com leves anormalidades na camada de fotorreceptores (azul de toluidina, magnificação 40x);

B. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) demonstrando presença de vacuolização e leve edema das células ganglionares (MET, magnificação 4000x).

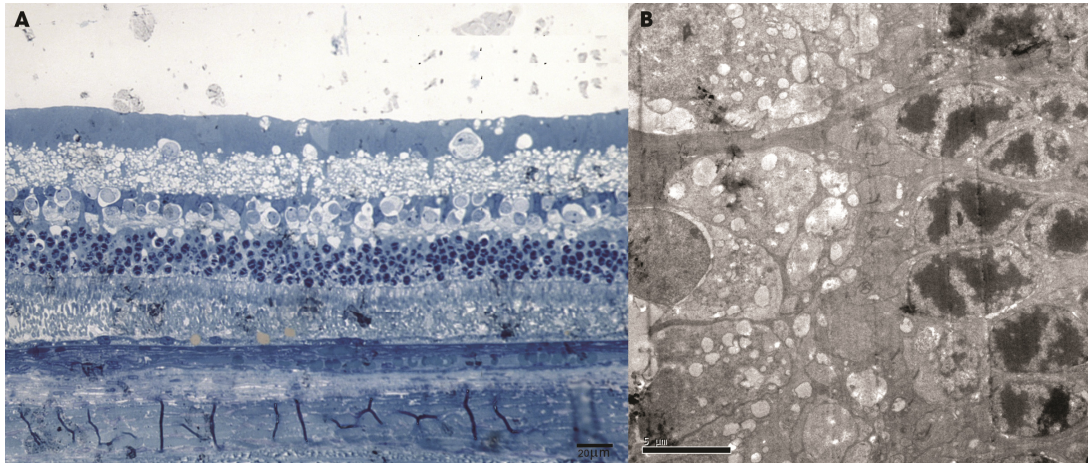
Figura 25. Histologia de retina 7 dias após injeção intravítrea no grupo 2



A. Microscopia óptica demonstrando camadas retinianas (azul de toluidina, magnificação 40x);

B. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) demonstrando presença de anormalidades nos segmentos externos dos fotorreceptores com discreto edema dos discos (MET, magnificação 4000x).

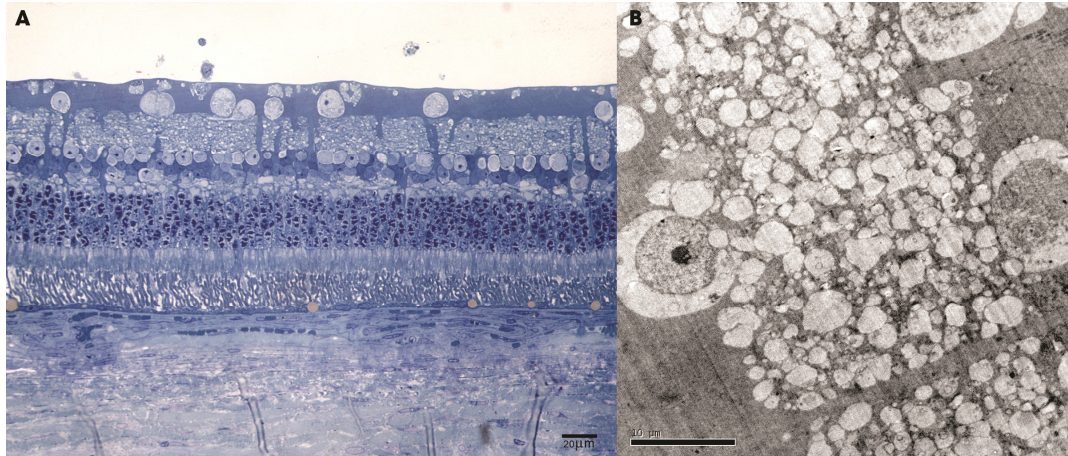
Figura 26. Histologia de retina 7 dias após injeção intravítrea no grupo 3



A. Microscopia óptica demonstrando camadas retinianas com leves anormalidades na camada de fotorreceptores (azul de toluidina, magnificação 40x);

B. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) demonstrando presença de anormalidades nos segmentos externos dos fotorreceptores com discreto edema dos discos (MET, magnificação 4000x).

Figura 27. Histologia de retina 7 dias após injeção intravítrea no grupo 4



A. Microscopia óptica demonstrando camadas retinianas com leves anormalidades na camada de fotorreceptores (azul de toluidina, magnificação 40x);

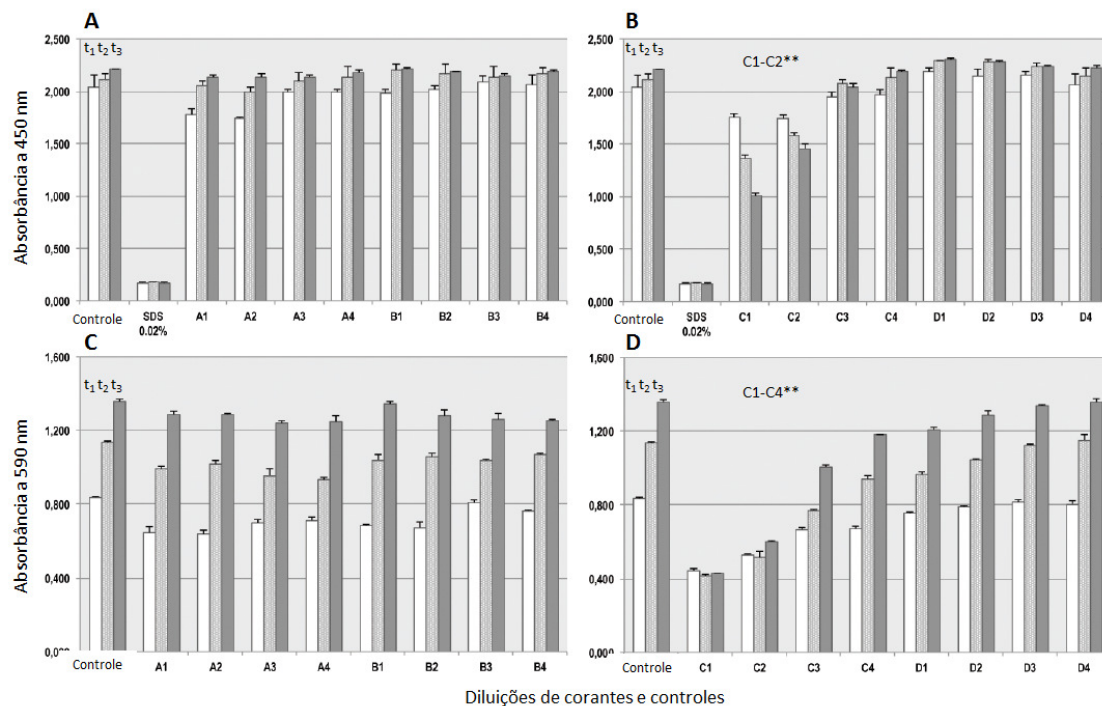
B. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) demonstrando presença de anormalidades nos segmentos externos dos fotorreceptores com edema dos discos e anormalidades morfológicas (MET, magnificação 4000x).

### 3.4 Estudo de Citotoxicidade e Proliferação Celular

#### 3.4.1 Em células do epitélio pigmentado retiniano humano

Abaixo, apresentam-se os principais resultados referentes às absorbâncias registradas de cada meio de cultura exposto as várias formulações testadas, tanto às 24, 48 e 72 horas, em diferentes diluições, de acordo com os dois modelos (WST-1 e CVDE), em linha celular do epitélio pigmentado retiniano humano ARPE-19.

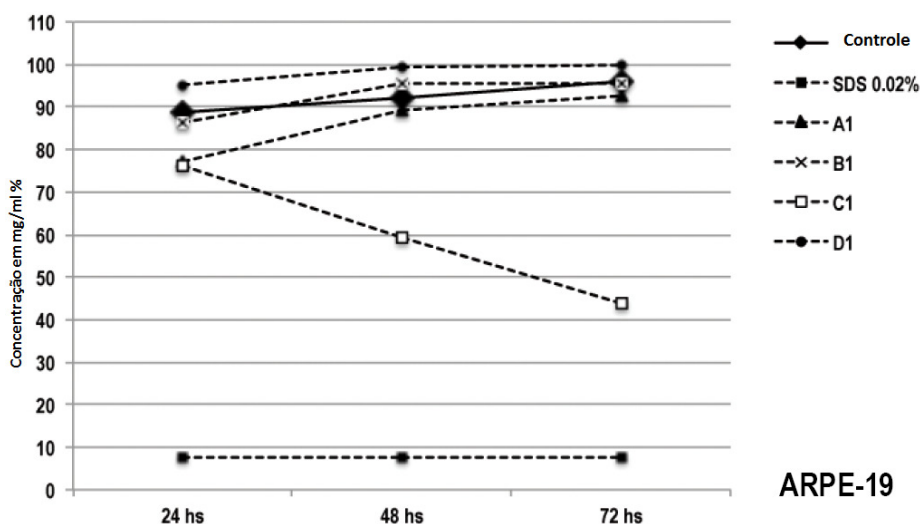
Figura 28. Citotoxicidade das formulações-corantes testadas em células do epitélio pigmentado da retina usando os modelos WST-1 e CVDE



**A.** Absorbância do meio de cultura exposto às formulações-corantes L/Z 1% + AT 0,04% e L/Z 1% + AB 0,025% usando o método WST-1. **B.** Absorbância do meio de cultura exposto a L/Z 0,3% + AB 0,025% e L/Z 2%, usando o método WST-1. **C.** Absorbância do meio de cultura exposto a L/Z 1% + AT 0,04% e L/Z 1% + AB 0,025%, usando o método CVDE. **D.** Absorbância do meio de cultura exposto a L/Z 0,3% + AB 0,025% e L/Z 2%, usando o método CVDE. Controle: meio de cultura usado como controle negativo; SDS 0,02%: dodecilsulfato de sódio a 0,02% usado como controle positivo; A1-A4: diluições 1/15, 1/30, 1/60 e 1/120, respectivamente, da formulação L/Z 1% + AT 0,04%; B1-B4: diluições 1/15, 1/30, 1/60 e 1/120, respectivamente, da formulação L/Z 1% + AB 0,025%; C1-C4: diluições 1/15, 1/30, 1/60 e 1/120, respectivamente, da formulação L/Z 0,3% + AB 0,025%; D1-D4: diluições 1/15, 1/30, 1/60 e 1/120, respectivamente, da formulação L/Z 2%; t<sub>1</sub>, t<sub>2</sub> e t<sub>3</sub>: tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas, correspondentes às barras branca, prata e cinza, para todas as diluições, respectivamente.

A figura 29 abaixo mostra o valor de 50% da concentração inibitória máxima \*\*\*\* (CI<sub>50</sub>) para a diluição 1/15 de cada formulação-corante testada às 24, 48 e 72 horas.

Figura 29. Concentração inibitória máxima a 50% de cada formulação-corante em células do epitélio pigmentado da retina



CI<sub>50</sub> para cada formulação-corante diluída a 1/15 e respetivos controlos negativo (meio de cultura) e positivo (SDS 0,02%), às 24, 48 e 72 horas de incubação em células ARPE-19. A1-D1: respetivamente, L/Z 1% + AT 0,04%, L/Z 1% + AB 0,025%, L/Z 0,3% + AB 0,025% e L/Z 2%. SDS 0,02%: dodecilsulfato de sódio a 0,02%; hs: horas.

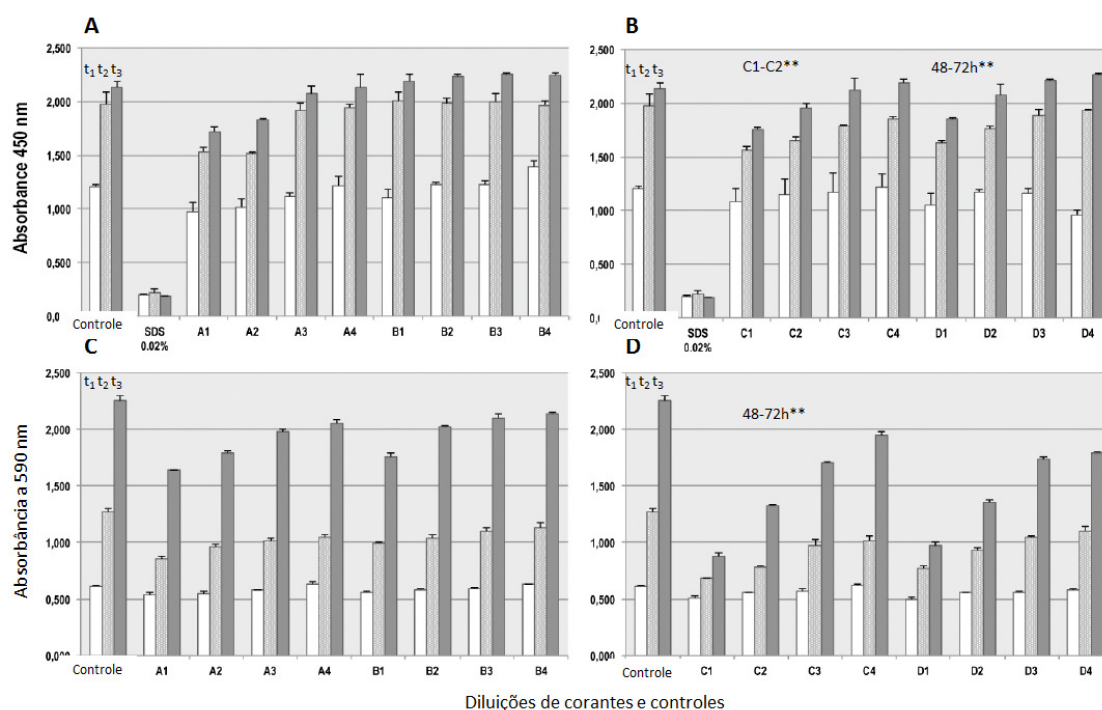
Na linha de cultura celular ARPE-19, as diluições 1/15 e 1/30 da formulação C (L/Z 0,3%+AB0,025%) produziram uma redução estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) na resposta metabólica celular (entre 20 e 50%) após 24h, no modelo WST-1. As mesmas diluições (1/15 e 1/30) também inibiram significativamente ( $p < 0,001$ ) o crescimento celular “in vitro”, no modelo CVDE, de forma diretamente proporcional à concentração de corante e ao tempo de teste. A CI<sub>50</sub> desta formulação foi de 0,18 mg/mL L/Z + 0,015 mg/mL AB + 0,84 mg/mL APV. As outras formulações testadas registraram variações inferiores a 10% do controlo negativo. A CI<sub>50</sub> da formulação L/Z 1% + AT 0,04% (A) foi > 0,7 mg/mL L/Z + 0,028 mg/mL AT, a CI<sub>50</sub> da formulação L/Z 1% + AB 0,025% (B) foi > 0,7 mg/mL L/Z + 0,018 mg/mL AB e a a CI<sub>50</sub> da formulação L/Z 2% (D) foi > 1.35 mg/mL L/Z.

\*\*\*\*\* CI<sub>50</sub> – concentração inibitória em que a molécula inibe 50% da atividade metabólica do substrato.

### 3.4.2 Em células do epitélio corneano humano

Abaixo, apresentam-se os principais resultados referentes às absorbâncias registradas de cada meio de cultura exposto as várias formulações testadas, tanto às 24, 48 e 72 horas, em diferentes diluições, de acordo com os dois modelos (WST-1 e CVDE), em linha celular do epitélio corneano humano.

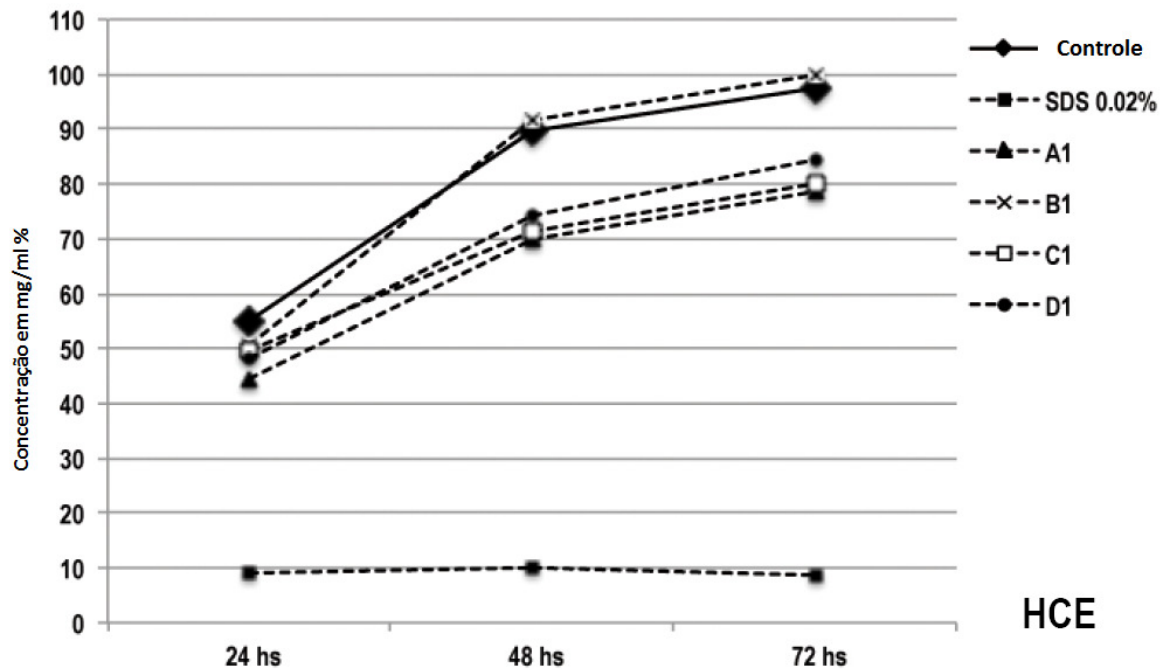
Figura 30. Citotoxicidade das formulações-corantes testadas em células do epitélio corneano humano usando os modelos WST-1 e CVDE



**A.** Absorbância do meio de cultura exposto às formulações-corantes L/Z 1% + AT 0,04% e L/Z 1% + AB 0,025% usando o método WST-1. **B.** Absorbância do meio de cultura exposto às formulações-corantes L/Z 0,3% + AB 0,025% e L/Z 2%, usando o método WST-1. **C.** Absorbância do meio de cultura exposto às formulações-corantes L/Z 1% + AT 0,04% e L/Z 1% + AB 0,025% usando o método CVDE. **D.** Absorbância do meio de cultura exposto às formulações-corantes L/Z 0,3% + AB 0,025% e L/Z 2%, usando o método CVDE. Controle: meio de cultura usado como controle negativo; SDS 0,02%: dodecilsulfato de sódio a 0,02% usado como controle positivo; A1-A4: diluições 1/15, 1/30, 1/60 e 1/120, respectivamente, da formulação L/Z 1% + AT 0,04%; B1-B4: diluições 1/15, 1/30, 1/60 e 1/120, respectivamente, da formulação L/Z 1% + AB 0,025%; C1-C4: diluições 1/15, 1/30, 1/60 e 1/120, respectivamente, da formulação L/Z 0,3% + AB 0,025%; D1-D4: diluições 1/15, 1/30, 1/60 e 1/120, respectivamente, da formulação L/Z 2%; t<sub>1</sub>, t<sub>2</sub> e t<sub>3</sub>: tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas, correspondentes às barras branca, prata e cinza, para todas as diluições, respectivamente.

A figura 31 abaixo mostra a  $IC_{50}$  para a diluição mínima (1/15) de cada formulação-corante testada às 24, 48 e 72 horas.

Figura 31. Concentração inibitória máxima a 50% de cada formulação-corante em células do epitélio corneano humano



$CI_{50}$  para cada formulação-corante diluída a 1/15 e respetivos controlos negativo (meio de cultura) e positivo (SDS 0,02%), às 24, 48 e 72 horas de incubação em células HCE. A1-D1: respetivamente, L/Z 1% + AT 0,04%, L/Z 1% + AB 0,025%, L/Z 0,3% + AB 0,025% e L/Z 2%. SDS 0,02%: dodecilsulfato de sódio a 0,02%; hs: horas.

Para a linha celular HCE, as alterações da atividade metabólica mitocondrial não excederam 15%, quando comparada com os controlos respetivos. Todas as diluições da formulação C (L/Z 0,3% + AB 0,025%) inibiram significativamente ( $p < 0,001$ ) o crescimento celular “in vitro”, no modelo CVDE, de forma diretamente proporcional à concentração de corante principalmente às 72 horas. A  $CI_{50}$  desta formulação foi de 0,18 mg/mL L/Z + 0,015 mg/mL AB + 0,84 mg/mL APV.

## **4 Discussão**

### **4.1 Estudo de Desenvolvimento Farmacotécnico, Estudo em Olhos Cadavéricos, Estudo de Toxicidade Intravítrea em Coelhos e Estudo de Citotoxicidade e Proliferação Celular**

Relativamente à produção das formulações e escolha dos veículos, deliberadamente, excluíram-se os solventes orgânicos após os testes de solubilidade dos mesmos, pelo seu perfil de toxicidade. Considerou-se essencial conhecer o perfil de solubilidade da L/Z em vários solventes, incluindo os orgânicos, de forma a entender a extensão da sua hidrofobicidade e, desse modo, obter bases mais sólidas para sugerir novas misturas de solventes que poderiam solubilizá-la (figuras 8-10).

Dentro dos surfactantes não iônicos, escolheu-se o óleo de rícino polietoxilado (Cremophor EL™, BASF, Inc., Ludwigschafen, Alemanha) pois o mesmo é referido na literatura por ser um solvente eficiente para moléculas hidrofóbicas<sup>(133)</sup>. Com este estudo, ficou muito claro que o Cremophor EL™ é um tensoativo muito eficaz, capaz de estabilizar moléculas apolares em solventes polares e produzir produtos farmacotecnicamente muito bons. No entanto, demonstrou-se que a sua presença na formulação impedia a coloração da CA, vítreo, HP e MLI (tabela 15) e induzia toxicidade tanto nas células HCE como nas células ARPE-19, fato que resultou na descontinuação do uso proposto na formulação do produto final.

Tentou-se ainda solubilizar as formulações por mistura de APV com Cremophor EL™ mas descobriu-se que o APV reduz a solubilidade da L/Z no Cremophor EL™. Por outro lado, descobriu-se empiricamente que o equilíbrio hidro-lipofílico deve ser entre 11 e 14, para maior estabilidade das formulações. Adicionalmente, o Span 80 aumenta demasiado a viscosidade da formulação, embora seja um tensoativo poderoso, e o Polietilenoglicol não melhora a solubilização, uma vez que eleva o equilíbrio hidro-lipofílico para valores de 15-18. Mesmo a solubilização, teoricamente possível de ser atingida com solventes orgânicos seguida por imediata remoção por liofilização, não foi possível, uma vez que nem THF nem Acetona podem ser removidos totalmente de uma emulsão.



Por último, ao se tentar formar o complexo de inclusão com HP- $\beta$ -CD, descobriu-se que era necessária uma micronização do tamanho de partícula da L/Z para uma inclusão ideal no complexo final.

As formulações F1-2, F9-10, F15-16, F27, F34-36, F39-49, F59, F66 e F74 apresentaram, teoricamente, uma estabilidade melhor visto não se haver detectado a presença de precipitados, após inspeção microscópica, às 24 e 48 horas. Algumas destas formulações, são objeto de um novo estudo de estabilidade atualmente a decorrer na empresa Ophthalmos S.A.

A embalagem escolhida para acondicionamento primário foi frascos-ampola âmbar fechados em atmosfera de Argônio, devido ao fato da L/Z, como qualquer antioxidante, ter de ser protegido contra a entrada de oxigênio e luz, uma vez que vai-se consumir ao tentar estabilizar os fótons de energia que lhe atingem.

Apesar dos avanços da cirurgia vitreoretiniana, há ainda complicações importantes da técnica cirúrgica, como formação de catarata (a complicação mais frequente após a vitrectomia), em até 70 a 90% dos casos em pacientes maiores de 50 anos de idade e com mais de um ano de seguimento<sup>(43)</sup>. Por outro lado, redescolamentos da retina (em cerca de 5-10% dos casos), insucesso na cirurgia de buraco macular (em cerca de 10-20% dos casos), dependendo do estágio evolutivo da doença, glaucoma, defeitos campimétricos, endoftalmite, entre outras complicações, podem ocorrer dependendo da doença de base<sup>(119, 132)</sup>.

A remoção das membranas pré-retinianas, como as membranas epirretinianas fibrogliais e a MLI, consiste em uma etapa cirúrgica importante tanto para tratamento como para diminuição da recidiva de patologias retinianas<sup>(76, 133)</sup>. A formação de membranas epirretinianas e também a ocorrência de novas roturas são pontos importantes na técnica de vitrectomia primária para o descolamento da retina<sup>(29, 43)</sup>.

A remoção completa do vítreo é uma etapa crucial para o sucesso da cirurgia de vitrectomia primária para tratamento do descolamento de retina. Remanescentes do vítreo podem levar a uma proliferação vitreorretiniana, com conseqüente redescolamento da retina e atrofia do bulbo ocular, e a glaucoma neovascular, em casos de retinopatia diabético-proliferativa.

A TA ainda é o padrão para visualização do vítreo, enquanto a fluoresceína sódica ou o acetato de fluormetolona surgem como uma alternativa, porém com muito pouco uso(3). Da análise dos resultados obtidos com a aplicação da formulação de L/Z cristal isolada nas concentrações de 0,5%, 2%, 5% e 20% em olhos cadavéricos humanos até 12h após o óbito, observa-se que os cristais de L/Z têm uma elevada afinidade com o gel vítreo e possibilitam uma identificação integral desta estrutura. Adicionalmente, as formulações F57, F59, F60 e F62 (tabela 3A) permitiram uma visualização significativa da base vítrea em tom dourado, propiciado pela cor da L/Z.

Da análise dos resultados do teste de eficácia em olhos cadavéricos humanos e da observação das características apolares da L/Z quando do desenvolvimento da formulação, melhor evidenciadas nas tabelas 10-13, coloca-se a hipótese que a afinidade dos cristais de L/Z para o gel vítreo seja possibilitada por uma interação de van der Waals, provavelmente Forças de London, entre as moléculas e a estrutura ou membrana a corar, além da interação hidrofóbica normal possibilitada pela interação dinâmica das moléculas polares ao seu redor. Este estudo foi o primeiro da literatura a demonstrar a afinidade dos cristais de luteína para o Vítreo, com o fim de facilitar a sua identificação. Em qualquer molécula apolar, como a L/Z, no instante em que a sua nuvem electrónica estiver mais deslocada para um dos polos da molécula, forma-se um dipolo instantâneo que gera uma pequena força intermolecular de atração<sup>(134)</sup>. Ou seja, por um período, aparecem dois polos na L/Z, viabilizando a ligação com o Vítreo. Propõe-se que esta hipótese e interações supostas sejam estudadas no futuro a partir de métodos de difração de raios X em monocamadas de Langmuir, cujo modelo teórico está bem descrito na literatura<sup>(135)</sup>.

A injeção intravítrea de TA provoca a deposição de seus cristais, de forma a facilitar a identificação do vítreo.

No entanto, situações como hipópio, pseudo-hipópio, inflamações intraoculares ou todas estas (endofatlimite não-infecciosa) podem estar associadas à administração intraocular de TA<sup>(59)</sup>. Esta endoftalmite não-infecciosa associada à injeção de TA parece estar relacionada com a inflamação induzida pela migração de macrófagos<sup>(136, 137)</sup>. A L/Z testada no estudo de toxicidade intravítrea, quando usada isoladamente em concentração de 0,5% em APV, não apresentou redução significativa da onda b do eletroretinograma dos coelhos testados ( $p < 0,05$ ), tanto a 24h como a 7 dias de seguimento (tabela 18). Da análise da histologia, registrou-se uma presença residual de possível edema ou pequenos focos de vacuolização nas células ganglionares e camada nuclear externa, os quais também se verificaram com a injeção de solução-controle SSB no olho esquerdo dos mesmos coelhos (figuras 24 e 25).

Por outro lado, o estudo de citotoxicidade e proliferação celular não demonstrou toxicidade celular em células HCE e ARPE-19 às 24, 48 e 72 horas com uma solução de L/Z 2%, obtendo uma  $IC_{50} >> 1,35 \text{ mg/mL}$  L/Z pelo método WST-1. Estes resultados foram confirmados a partir de outro método – CVDE – o qual registrou ausência de proliferação ou de alterações na proliferação celular observadas em todas as diluições às 24h, 48h e 72h (figuras 28 a 31). A formulação L/Z 0,3% + AB 0,025% mostrou um efeito inibitório do crescimento celular “in vitro”, o que justifica os valores menores de absorvância observados no teste de citotoxicidade. No entanto, estes resultados são diretamente correlacionados com a densidade celular reduzida observada a partir das 24h, sendo que a  $CI_{50}$  desta formulação foi de 0,18 mg/mL L/Z + 0,015 mg/mL AB + 0,84 mg/mL APV. Estes resultados permitem concluir que, apesar de um efeito inibitório do crescimento celular “in vitro” observado para as diluições das formulação L/Z 0,3% + AB 0,025%, não se registrou uma redução proporcional na atividade metabólica das culturas celulares corneanas e retinianas. A velocidade de inibição da atividade mitocondrial celular (até 15%) não excedeu a velocidade de inibição do crescimento celular.

Por outro lado, se considerarmos que o volume de líquido dentro do olho, incluindo o gel vítreo, no início da cirurgia é de cerca de 4mL e que a quantidade de corante que se costuma usar é ao redor de 0,3ml, isto significa que no tempo zero, estamos a usar 1/15 do corante dentro do olho, o qual se pretende que fique em contato médio de 30 segundos com as membranas a corar.

Considerando que o volume de líquido dentro do olho após uma cirurgia de catarata ou vitreorretiniana é de cerca de 600ml, em cada minuto, existem 10 mL ou 120mL de líquidos dentro do olho, no caso de uma cirurgia vitreorretiniana de 1 hora ou cirurgia de catarata de 5 minutos, respectivamente. Com 10mL de líquido dentro do olho, a cada minuto, no quinto minuto já teríamos uma concentração de corante equivalente a 1/1465, ou seja, 0,07%. Como o tempo médio de atuação do corante é de cerca de 30 segundos, tempo em que o corante está em contato com a membrana a corar, e considerando a presença residual (0,07%) de corante passados 5 minutos de cirurgia, as diluições usadas de 1/15 até 1/120 colocadas em contato direto com as membranas a corar desde 24 a 72 horas, representam aproximações conservadoras e desafiadoras da toxicidade celular, contribuindo para quantificar a citotoxicidade das formulações à base de luteína e zeaxantina. Os achados deste teste permitem caracterizar formulações-corantes com L/Z até 2%, isolada ou combinada com AB até 0,025% e AT até 0,04%, como uma opção potencialmente segura para uso em cirurgia de catarata e vitreorretiniana.

As formulações F57, F59, F60 e F62 testadas (tabela 3A) possuem também L/Z na forma de cristal. O cristal de L/Z é a forma mais pura de L/Z disponível hoje no mundo<sup>(92)</sup>. Devido ao fato de que (1) o cristal de L/Z, fornecido como matéria-prima pelo fabricante, apresentar desafios à dissolução e dispersão da formulação final e (2) o tamanho de partícula de cristal de L/Z enviado pelo fabricante (média = 47,1 µm, figura 18) ser considerado teoricamente elevado para evitar potenciais problemas como iridociclites, optou-se por fazer um passo prévio de micronização farmacêutica do tamanho de partícula do cristal de L/Z, sob atmosfera de Argônio, em moinho de bolas planetário. Com isto conseguiu-se uma redução do tamanho médio de partícula de 47,1µm para 0,31µm (figuras 18 e 19). Acredita-se que esta redução do tamanho de partícula ajudou na solubilização das formulações-corantes finais e que poderá representar menores riscos para o paciente no qual a formulação-corante será injetada, quando do início do estudo clínico.

Adicionalmente, a eficácia corante da solução de L/Z cristal a 20% apresenta resultados muito satisfatórios (++++/4, tabela 15, figura 21). Em testes subsequentes em olhos cadavéricos humanos com concentrações na ordem dos 2% e 5%, obteve-se resultados de eficácia semelhantes (++++/4, tabela 15), com especial enfoque para o grau de nitidez da coloração da base vítrea.

Com base nos resultados de desenvolvimento farmacotécnico, de eletrorretinografia, de histologia por microscopia ótica e eletrônica, de citotoxicidade e proliferação celular em células HCE e ARPE-19 e de eficácia, acredita-se que formulações-corantes com L/Z poderão ser uma opção futura segura e eficaz como corantes intraoculares para coloração vítrea. Mais estudos devem ser efetuados para corroborar o perfil de segurança e eficácia da L/Z isolada, sobretudo em concentrações de 2% e 5%.

A remoção da MLI, apesar de trazer benefícios na cirurgia de buraco macular, também é passível de complicações. Duas das principais complicações relacionadas à remoção da MLI são a presença de defeitos de campo visual e anormalidades no EPR<sup>(76, 133)</sup>. Estas complicações podem estar relacionadas ao trauma direto à retina/EPR devido ao fato de a MLI ser uma estrutura fina e semitransparente, de difícil identificação durante o ato cirúrgico<sup>(28, 29)</sup>. A remoção da MLI pode ser tecnicamente difícil, o que aumenta os riscos de dano à retina neurossensorial. Em virtude de sua identificação ser difícil durante a cirurgia, os maiores problemas técnicos residem em se iniciar a remoção da MLI, e também em se completar esse procedimento. Portanto, técnicas que otimizem a visualização da MLI podem facilitar o procedimento de sua remoção, além de reduzir os riscos associados de dano retiniano<sup>(15, 33)</sup>.

Em certas doenças como a miopia, tração vitreomacular e retinopatia diabética, ou mesmo em alguns casos de descolamentos da retina, principalmente em pacientes jovens, nos quais a HP é mais aderida à retina, é muito frequente a presença de remanescentes vítreos fortemente aderidos à MLI. Muitas vezes, nota-se uma hialoidosquise ou vitreosquise posterior, que é muito difícil de ser completamente identificada sem o uso da cromovitrectomia<sup>(43)</sup>.

Casos como esses eram responsáveis por grande parte dos insucessos cirúrgicos observados no passado, e até mesmo nos dias de hoje. Essa realidade tem sido modificada através das inovações em vitrectomia, como os novos sistemas de visibilização possibilitados com o advento dos corantes cirúrgicos.

Corantes vitais como a ICV, ifCV e AB são hoje os mais usados para a adequada identificação e remoção da MLI<sup>(29)</sup>. No entanto, estes corantes podem entrar em contato com células da retina, como os fotorreceptores ou o EPR, quando usados na cirurgia do buraco macular<sup>(28)</sup>. Apesar dos relatos de toxicidade associada ao uso de ICV como corante intraocular, este continua a ser o corante padrão ouro para a identificação da MLI<sup>(28, 30, 33)</sup>. Embora muitos estudos clínicos tenham proposto que a melhora da função visual possa ser alcançada depois da vitrectomia assistida com ICV, outros pesquisadores informaram que alguns pacientes, injetados com ICV, tiveram sinais clínicos da toxicidade, como defeitos de campos visuais, alterações do EPR e diminuição da acuidade visual. Além disso, as informações disponíveis na literatura sobre a histopatologia da MLI, removida durante a vitrectomia com ICV, revelaram resultados controversos<sup>(28, 30, 33)</sup>. Tais resultados demonstraram, às vezes, "nenhuma", e em outras vezes, "algumas" estruturas celulares sobre e sob a MLI. A presença de elementos retinianos, como a membrana plasmática de células Mueller, miofibroblastos e astrócitos aderidos à superfície retiniana da MLI corada com ICV, causou inquietação nos últimos anos. A hipótese para se explicar tal achado envolve um possível dano retiniano devido a uma remoção mais profunda da MLI, ou seja, a ICV poderia aprofundar o plano de clivagem durante a remoção da MLI<sup>(28, 30, 33)</sup>.

Em estudos experimentais, ficou especialmente evidente que a ICV causou citotoxicidade ao EPR humano, em células ganglionares retinianas cultivadas e em células de Muller, de forma dose dependente, porém, mais frequentemente, em concentrações acima de 0,1%<sup>(106)</sup>. Foi conduzido um estudo em 11 olhos humanos submetidos a cirurgia de buraco macular, em que a remoção da MLI foi auxiliada pelo tingimento com ICV a 5mg/mL.

A angiografia fluoresceínica, realizada em olhos com defeitos no EPR, demonstrou que alteração do EPR na área do buraco macular prévio resultou em impregnação precoce do contraste sem vazamento, caracterizando defeitos em janela compatíveis com provável atrofia do EPR, por toda a extensão do buraco macular prévio (que se apresentava selado em todos os casos)<sup>(30)</sup>.

Devido às preocupações sobre a toxicidade do ICV e do AT na cirurgia ocular, surgiu a necessidade de se investigar corantes alternativos para a cromovitrectomia<sup>(28, 29, 75)</sup>. Recentemente, o AB foi aprovado na Europa em uma concentração de 0,025%, para a identificação da MLI. Também foi certificado como corante alimentar na Europa e pode ser usado como marcador cardiovascular e de proteínas em doenças neurológicas<sup>(138)</sup>. Dados sobre a utilização de AB para cromovitrectomia e cirurgia de catarata foram publicados em 2006<sup>(139)</sup>. A toxicidade retiniana do AB foi investigada por alguns autores em experimentos pré-clínicos, em ratos e primatas, e não foram observadas alterações patológicas à microscopia óptica ou eletrônica, na sequência da injeção de pequenas doses de AB. Em acompanhamento de longo prazo, não foram observados sinais de toxicidade associado ao AB em doses muito baixas<sup>(140, 141)</sup>. Em um estudo clínico recente, o AB promoveu uma boa coloração da MLI em uma solução iso osmolar de 0,025% no tratamento de membranas e buracos de mácula, com melhora visual em até 90% dos pacientes e sem sinal clínico de toxicidade<sup>(48)</sup>. Rodrigues et al., observaram uma forte coloração da MLI com AB, confirmando relatos anteriores<sup>(128)</sup>. No entanto, um estudo recente sugere que a migração subretiniana do AB pode levar a danos atróficos ao EPR durante a cromovitrectomia<sup>(42)</sup>.

Ao testar a eficácia de formulações de L/Z cristal isolada no tingimento da MLI de olhos cadavéricos humanos, observou-se um tingimento máximo de ++/4 com a formulação F58 (figura 22). Esse grau de tingimento modesto sugere que o nível de afinidade da L/Z para a MLI é provavelmente menor que a afinidade desta para o Vítreo, o que hipoteticamente pode ser explicado pelo grau de polaridade do colágeno tipo IV presente na MLI<sup>(32)</sup>. Por outro lado, e apesar do relato de toxicidade subretiniana dose dependente associado ao AB, este continua a ser uma opção clinicamente segura em relação à ICV no tingimento da MLI<sup>(42)</sup>.

Surgiu, então, a ideia de se combinar a L/Z com o AB de forma a produzir uma formulação-corante final que possa ter afinidade para a MLI, com ausência de toxicidade clinicamente relevante e com um grau de eficácia semelhante à ICV. Várias formulações desta combinação foram testadas e a eficácia corante atingida foi significativa (++++/4, F1, tabela 15) e o perfil de toxicidade foi satisfatório. Além disso, obteve-se uma coloração verde final, resultante da combinação alaranjado da L/Z e do azul do AB, cor semelhante a oferecida pela ICV, considerada como padrão ouro para se identificar a MLI.

Várias formulações foram testadas com o objetivo de se associar a quantidade mínima de AB a uma solução de L/Z necessária a produzir uma coloração significativa da MLI. Mostrou-se que concentrações menores que 0,025% de AB produziam resultados de tingimento discretos, mas que a concentração de 0,025% associada a 1% de L/Z produzia um resultado máximo de ++++/4 (tabela 15). É importante referir que a concentração de 0,025% de AB é metade da que atualmente se usa e comercializa no Brasil, o que por si só, pode resultar numa vantagem teórica na redução de eventual perfil de toxicidade retiniana associada ao AB, uma vez que parece ser dose dependente<sup>(42)</sup>.

Costa et al., publicaram que a fototoxicidade sobre a retina induzida pela luz do endoiluminador depende do comprimento de onda da fonte de luz, sendo mais significativa e pronunciada com a luz azul e luz ultravioleta<sup>(7)</sup>. Por outro lado, vários estudos documentaram o papel desempenhado pela L/Z na natureza em varrer e sequestrar as espécies radiculares de oxigênio geradas pelos fótons de alta energia de luz ultravioleta e visível, por volta dos 446nm<sup>(106, 142, 143)</sup>. Esta ação fotoprotetora da L/Z também é considerada uma das razões pela qual a L/Z tem sido associada a uma possível prevenção da DMRI ou à diminuição da sua progressão<sup>(86-88, 90-92, 103, 108-110)</sup>. Este papel de “filtro de luz” e de “antioxidante”, esquematizado nas figuras 16 e 17, pode desempenhar um papel benéfico na estabilização da formulação contendo L/Z e AB (ou AT) e em um efeito fotoprotetor teórico quando da aplicação em cirurgia intraocular.



Adicionalmente, Penha et al., demonstraram que soluções hipo osmóticas de várias substâncias injetadas no espaço sub-retiniano de coelhos (inclusive de glicose a 5%, sabidamente atóxica ao EPR) podem resultar em dano ao EPR importante, chamando a atenção dos cirurgiões vitreoretinianos que a osmolaridade das soluções (e não apenas a concentração) é um fator importante a ser considerado durante a cromovitrectomia<sup>(60)</sup>. Ademais, o mesmo método citado foi a base para um modelo experimental responsável por importantes contribuições na área do conhecimento em cromovitrectomia<sup>(51)</sup>. Das setenta e oito formulações estudadas contendo L/Z isolada ou associada a AB ou AT, apenas duas (F15-16) assumiram valores abaixo de 273 mOsm/Kg. Uma vez que a osmolaridade ideal se situa à volta de 300mOsm/Kg  $\pm$  10% <sup>(7)</sup>, acredita-se que as formulações à base de L/Z não trarão problemas de hipoosmolaridade.

Demonstrou-se também que o IfCV tem um perfil de toxicidade menor que a ICV sendo portanto uma alternativa mais segura aos cirurgiões adaptados ao uso dos corantes verdes atuais – sabidamente os que têm grande afinidade pela MLI<sup>(44)</sup>. As formulações de L/Z associadas a AB testadas para tingimento da MLI apresentaram também ausência de toxicidade retiniana significativa. A L/Z testada no estudo de toxicidade intravítrea, isolada a 0,5% ou combinada com AB até sua concentração máxima de 0,05% em APV, não apresentou redução média significativa da onda b do eletroretinograma dos coelhos testados ( $p < 0,05$ ), tanto a 24h como a 7 dias de seguimento (tabela 18). Da análise histológica as formulações acima, registrou-se uma presença de leve edema ou pequenos focos de vacuolização nas células ganglionares, os quais também se verificaram com a injeção de solução controle SSB nos mesmos coelhos. Por outro lado, o estudo de citotoxicidade pelo método WST-1, em células do epitélio pigmentado retiniano humano, não registrou toxicidade celular às 24, 48 e 72 horas com nenhuma solução contendo L/Z (isolada até 2% e combinada com AB, até concentração máxima deste de 0,025% em APV, figura 28). Estes resultados foram confirmados pelo método CVDE, o qual registrou ausência de proliferação ou de alterações na proliferação celular observadas em todas as formulações testadas às 24h, 48h e 72h. Estes achados contribuem para caracterizar formulações-corantes com L/Z isolada até 2% e combinada com AB – até um máximo de L/Z 1% + AB 0,025% - como uma opção potencialmente segura para uso em cirurgia vitreoretiniana.

A perfusão comprometida da coriocapilar pelo gás e a ocorrência de buracos maculares iatrogênicos são mencionados na literatura como um dos possíveis mecanismos de injúria ao EPR<sup>(20, 56)</sup>. É interessante notar que a combinação de L/Z com AB ou AT torna a formulação final mais densa, com valores finais de 1,1g/cm<sup>3</sup>. Esta densidade adicional faz com que as partículas de corante se depositem por gravidade no polo posterior sem ter de usar-se troca fluido gasosa ou fazer uma injeção demasiado perto da retina. Isto reduz o risco de injúria ao EPR por evitar o efeito do jato de alta velocidade perto da retina bem como pela possibilidade de manutenção da fibra óptica distante da retina.

O AT é um corante com afinidade significativa para a MER<sup>(28, 42, 49, 144)</sup>. A frequência de anormalidades no EPR, após a remoção de membranas epirretinianas idiopáticas, é de 1-3%<sup>(145)</sup>. Provavelmente, o espectro inferior da luz seja o mais importante fator envolvido na fisiopatogênese desses defeitos, porque ondas eletromagnéticas curtas têm mais energia por fóton. Há manobras que devem ser utilizadas para minimizar a fototoxicidade: planejamento cuidadoso do procedimento cirúrgico, utilização de filtros, minimização do tempo do procedimento cirúrgico e manutenção da fibra óptica distante da retina<sup>(145)</sup>. No entanto, as formulações à base de L/Z poderiam apresentar uma vantagem teórica, uma vez que está demonstrado que absorve fotóns de energia no comprimento de onda de cerca de 446nm, o que se traduz em radiações de elevada energia<sup>(93)</sup>. Ao absorver parte dessa energia fotônica de elevada intensidade, podem contribuir para proteger contra eventuais anormalidades no EPR. A investigação pré-clínica revelou que o AT em concentrações inferiores a 0,2% não promoveu danos relevantes no EPR humano e nas células neuronais<sup>(28)</sup>. No entanto, as doses usadas de AT para tingimento da MER variam entre 1% e 1,5%, ou seja, são no mínimo 5 vezes maiores que o limiar de toxicidade para o EPR humano.

Em cirurgia de catarata, o AT é amplamente utilizado no mundo com o objetivo de corar a CA do cristalino e permitir uma remoção da CA com maior facilidade<sup>(28-30, 57, 144)</sup>.

A figura 20 ilustra a eficácia de tingimento (4/4) da CA com a formulação L/Z 0,3% + AB 0,025%.

No entanto, criaram-se novas formulações em que se substituiu o AB pelo AT de forma a obter uma coloração mais intensa da CA e melhorar a formulação e afinidade para esta membrana. A formulação testada que demonstrou um grau de tingimento da CA mais intenso e completo foi a L/Z 1%+ AT 0,04% (F74, grau de tingimento 4/4). A adição de L/Z a uma solução de AT não só tornou a formulação-corante verde como permitiu diminuir a quantidade de AT até um mínimo de 0,4%, de forma a manter a propriedade tintorial e a avidéz pela CA. Com esta formulação, a CA foi inteiramente removida através de uma capsulorréxis circular contínua, resultando na fácil identificação e remoção total da membrana corada.

A adição de L/Z na formulação-corante parece permitir reduzir a concentração de AT para um mínimo de 0,4%, o que significa uma redução de 3-4 vezes de concentração. Isto pode, por si só, representar uma forma de potencialmente reduzir o risco de toxicidade futura. A avaliação de citotoxicidade pelo modelo WST-1 em células HCE não revelou toxicidade associada à combinação L/Z 1% + AT 0,04% (figura 30). Foi, igualmente, demonstrada uma ausência de toxicidade da mesma formulação no teste de proliferação celular usando o modelo CVDE. Repetiram-se os mesmos testes em células ARPE-19, com os dois modelos e para a mesma formulação, e não se registrou toxicidade celular, nas condições de teste (figura 28).

A realização da facoemulsificação associada à vitrectomia, que permite ao cirurgião mais acesso e conseqüente maior remoção da base vítrea é, sem dúvida, outro grande avanço em busca da melhoria dos resultados cirúrgicos. O procedimento tem as indicações evidenciadas na tabela 19.

Tabela 19 – Indicações da facovitrectomia

---

Opacidade cristalíniana que dificulte a observação de detalhes do pólo posterior
Toque inadvertido no cristalino durante a VVPP
Descolamento de retina regmatogênico (com ou sem proliferação vitreoretiniana-PVR)
Retinopatia diabético-proliferativa: hemorragia vítrea e descolamento tracional da retina
Pacientes com catarata prévia pequena e mais de 50 anos de idade
Buraco de mácula, membrana epirretiniana e/ou tração vitreomacular
Trauma ocular penetrante ou perfurante

---

Principais indicações para a realização do procedimento de facovitrectomia.

O tratamento de duas condições – ambas com potencial de diminuição da visão – em uma única cirurgia promove uma melhora rápida, tanto visual como anatômica. Múltiplas cirurgias se traduzem em risco cirúrgico aumentado (infecções, risco anestésico, dentre outros), aumento dos custos financeiros e em termos de qualidade de vida para o paciente<sup>(146)</sup>. As opacidades dos meios oculares limitam a visão do cirurgião e prejudicam a observação dos detalhes da retina e sua periferia, especialmente em áreas com neovascularização, tração e proliferação vitreorretiniana<sup>(118)</sup>. A abordagem cirúrgica da mácula pode se tornar complicada na presença de uma catarata densa. A remoção da catarata possibilita uma vitrectomia mais completa ao se promover um melhor acesso à base vítrea, facilitando a depressão escleral e a cirurgia vitreorretiniana bimanual auxiliada por uma iluminação acessória (chandelier), muito útil para a identificação e tratamento de roturas anteriores<sup>(119, 123)</sup>.

Neste estudo pretendeu-se testar formulações contendo L/Z, isoladamente ou em associação com AB ou AT, como possível corante para uso em cirurgia de catarata ou cirurgia vitreorretiniana. Para isso, foram elaboradas setenta e oito formulações, as quais foram aplicadas como corantes na cápsula anterior, vítreo, hialóide posterior e membrana limitante interna de olhos humanos cadavéricos. As quatro formulações com melhor estabilidade e eficácia foram escolhidas para serem testadas em vinte e seis coelhos, em um teste de toxicidade intravítrea, seguido de análise eletroretinográfica e histológica, com microscopia ótica e eletrônica, e um subgrupo semelhante de formulações farmacotecnicamente e clinicamente aceitáveis, foram submetidas a testes de citotoxicidade específicos.

A concentração e osmolaridade da formulação, a presença de anormalidades clínicas, eletrofisiológicas e histológicas progressivas e proporcionais, ao nível de concentração do corante injetado na cavidade vítrea dos coelhos, e a presença de dano reversível nas camadas retiniana internas e externas, foram estudadas para caracterizar o perfil de segurança da formulação contendo Luteína e Zeaxantina a ser usada como corante intraocular.

## 4.2 Uso potencial de corantes contendo luteína e zeaxantina

Sugere-se, como regra geral, que a facoemulsificação e cromovitrectomia sejam realizadas por meio da injeção de corante, utilizando-se uma cânula de silicone e sob fluído - “técnica úmida” - devendo a infusão de solução salina balanceada no olho estar desligada. A injeção do corante deve ser realizada de forma lenta e com cuidado para se evitar uma infusão rápida e conseqüente migração subretiniana do corante, o que pode causar toxicidade ao epitélio pigmentado retiniano. É recomendado também que a fibra óptica fique o mais distante possível da retina.

Sugere-se o seguinte racional para se otimizar o uso das soluções-corantes formuladas neste estudo nas cirurgias de facoemulsificação e cromovitrectomia:

**A** – L/Z 1% + AT 0,04% (F74): ideal para identificação da cápsula anterior;

**B** - L/Z isolada: ideal para identificação do vítreo

1. Usar a L/Z isolada a 2% (F59) como a primeira escolha para identificação do vítreo. A injeção deve ser realizada diretamente no vítreo.
2. Usar a L/Z 0,3% + AB 0,025% (F1) como segunda escolha para identificação do vítreo.

**C** – L/Z 1% + AB 0,025% (F66): ideal para identificação da membrana limitante interna e hialóide posterior

1. Usar a L/Z 0,3% + AB 0,025% como a primeira escolha para identificação da membrana limitante interna e hialóide posterior. A injeção deve ser realizada diretamente na membrana ou estrutura no polo posterior, de forma lenta e sem que haja direcionamento específico a qualquer eventual buraco macular, para evitar trauma mecânico.

## **5 Conclusões**

### **A. Comportamento farmacotécnico de formulações-corantes contendo Luteína e Zeaxantina para uso em cirurgia de catarata e vitreorretiniana:**

1. O álcool polivinílico foi o melhor veículo para dispersar a Luteína e Zeaxantina e deve ser tamponado com tampão fosfato;
2. O Cremophor EL™ demonstradamente possui toxicidade celular;
3. É necessário fazer uma micronização do tamanho das partículas de cristal de Luteína e Zeaxantina antes de se produzir a formulação para uso intraocular;
4. A combinação de Luteína e Zeaxantina com Azul Brilhante ou Azul de Trypan, de acordo com o processo de produção, produz um corante final verde de pH e osmolaridade fisiologicamente aceitáveis.

### **B. Eficácia corante das formulações contendo Luteína e Zeaxantina nas membranas e estruturas relevantes para a cirurgia de catarata e vitreorretiniana:**

1. A formulação Luteína e Zeaxantina a 1% associada a Azul de Trypan a 0,04% é a melhor formulação testada para corar a Cápsula Anterior, em termos de eficácia;
2. A Luteína e Zeaxantina em forma de cristal tem uma afinidade significativa para o Vítreo;
3. A formulação Luteína e Zeaxantina a 1% associada a Azul Brilhante a 0,025% foi a melhor para corar a Membrana Limitante Interna;

4. A formulação Luteína e Zeaxantina a 0,3% associada a Azul Brilhante a 0,025% foi a melhor para corar simultaneamente o Vítreo e a Membrana Limitante Interna;

### **C. Toxicidade intravítrea das formulações contendo Luteína e Zeaxantina em coelhos:**

1. Não se observaram alterações estatisticamente significativas no perfil eletrorretinográfico de olhos de coelhos injetados com soluções de Luteína e Zeaxantina versus estado basal e grupo controle;
2. Não se registraram alterações histológicas significativas ou sinais anatômicos de toxicidade nas camadas celulares retinianas, até 7 dias seguintes à injeção de formulações contendo Luteína e Zeaxantina;

### **D. Citotoxicidade e Proliferação Celular das formulações contendo Luteína e Zeaxantina em cultura celular corneana e retiniana:**

Nenhuma das formulações testadas à base de Luteína e Zeaxantina revelou níveis estatisticamente significativos de citotoxicidade ou inibição da proliferação celular em células do epitélio corneano humano e do epitélio pigmentado retiniano humano.

## 6 Anexo

- Aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 23 de Julho de 2010.  
CEP 0589/10

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a) **DIOGO DE SOUSA MARTINS**  
Co-Investigadores: Rubens Belfort Jr (orientador), Maurício Mala, Acácio Souza Lima  
Disciplina/Departamento: Oftalmologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo  
Patrocinador: UNIFESP.

### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "O uso de luteína e zeaxantina como solução corante segura e eficaz para a identificação da membrana epirretiniana, membrana limitante interna e vítreo".

**CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO:** Experimental, categoria B e estudo com olhos de cadáveres..

**RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE:** Sem risco.

**OBJETIVOS:** Testar o uso de luteína e zeaxantina como corante da membrana epirretiniana, membrana limitante interna e vítreo como forma de facilitar ao cirurgião oftalmologista a identificação das microestruturas Intraoculares durante a cromovitrectomia.

**RESUMO:** Estudo com 30 coelhos Dutch-belted, fêmeas. Anestésico: ketamina e xylazina. Eutanásia: fenobarbital. O estudo terá 3 etapas: desenvolvimento da formulação Intra-ocular; estudo em olhos cadavéricos; estudo da toxicidade em coelhos. Este projeto será realizado pelo Departamento de Oftalmologia /Instituto da Visão da UNIFESP com cooperação com Ophthalmos Indústria e Comércio de Produtos Farmacêuticos Ltda e Kemlin do Brasil Ltda. Para preparação da solução de luteína e zeaxantina, serão realizados testes de solubilidade, caracterizar a absorvência da solução por espectrofotometria, identificar a cor resultante dos grupos cromóforos, testar parâmetros físico-químicos, testar aderência da luteína a cultura de células e teste de estabilidade. A segunda etapa do estudo, com olhos cadavéricos, será realizada em cooperação com o Banco de Olhos do Hospital São Paulo, onde os olhos cadavéricos para transplante de córnea são preparados. Serão utilizados os olhos cadavéricos de doadores humanos de córneas. A córnea é removida e conservada para transplante e o restante do bulbo ocular normalmente é desprezado, ou o tecido escleral é utilizado como implante humano para corrigir afinamentos esclerais ou em cirurgia de enucleação. Antes da eliminação da maioria dos tecidos oculares e eventual preparação da esclera, serão realizados experimentos de coloração de MLI, vítreo e cápsula anterior do cristalino. MLI e a cápsula anterior do cristalino serão removidas e fixadas para análise histológica e microscopia eletrônica. A terceira etapa será conduzida para avaliar a toxicidade em coelhos. Duas técnicas cirúrgicas serão utilizadas para aplicação sub-retiniana ou intravítrea do corante. Serão realizados fundoscopia e angiografia fluoresceínica. Os olhos serão enucleados para análise histológica e microscopia eletrônica.



**FUNDAMENTOS E RACIONAL:** A luteína, além de ser um carotenóide conhecido e estudado pela sua associação à possível prevenção da maculopatia relacionada à idade, pode revelar-se um corante natural, seguro e eficaz na cromovitrectomia, permitindo a fácil identificação e remoção integral da membrana epirretiniana, MLI e Vítreo pelo cirurgião oftalmologista.

**MATERIAL E MÉTODO:** Estão descritos os procedimentos do estudo.

**DETALHAMENTO FINANCEIRO:** Kemlin do Brasil Ltda e Ophthalmos Indústria e Comércio de Produtos Farmacêuticos Ltda - R\$ 20528,40.

**CRONOGRAMA:** 24 meses.

**OBJETIVO ACADÊMICO:** Doutorado.

**ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA:** 18/7/2011 e 17/7/2012.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

0589/10

## 7 Referências

- 1 Souza NV. Princípios de cirurgia ocular. Medicina Ribeirão Preto. 1997;30:94-6.
- 2 Jacobs DS, Cox TA, Wagoner MD, Ariyasu RG, Karp CL; American Academy of Ophthalmology; Ophthalmic Technology Assessment Committee Anterior Segment Panel. Capsule staining as an adjunct to cataract surgery. Ophthalmology. 2006;113(4):707–13. Comment in: Ophthalmology. 2010;117(7):1642-2.e1; Ophthalmology. 2007;114(1):197; author reply 197.
- 3 Dib E, Rodrigues EB, Maia M, Meyer CH, Penha FM, Furlani BA, et al. Corantes vitais em cromovitrectomia. Arq Bras Oftalmol [Internet]. 2009 [citado 2011 Jan 12];71:845-50. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abo/v72n6/22.pdf>.
- 4 Rodrigues EB, MM, Meyer CH, Penha FM, Dib E, Farah ME. Vital dyes for chromovitrectomy. Curr Opin Ophthalmol. 2007;18(3):179–87.
- 5 Farah ME, Maia M, Penha FM, Rodrigues EB. The use of vital dyes during vitreoretinal surgery – chromovitrectomy. In: Nguyen QD, Rodrigues EB, Farah ME, Mieler WF. Retinal pharmacotherapy. Philadelphia, PA: Saunders; 2010. p. 331-5.
- 6 Rodrigues EB, Meyer CH, Penha FM, Dib E, Farah ME. Vital dyes for chromovitrectomy of vital dyes in vitreoretinal surgery and chromovitrectomy. Dev Ophthalmol. 2008;42:29–34.
- 7 Costa EF, Rodrigues EB, Farah ME, Dib E, Penha FM, Magalhães O, et al. Vital Dyes and light sources for chromovitrectomy: comparative assessment of osmolarity, pH, and spectrophotometry. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009;50(1):385-91.
- 8 Penha FM, Rodrigues EB, Maia M, Furlani BA, Regatieri C, Melo GB, et al. Retinal and ocular toxicity in ocular application of drugs and chemicals – Part II: retinal toxicity of current and new drugs. Ophthalmic Res. 2010;44(4):205-24.
- 9 Rodrigues EB, Penha FM, Farah ME, de Paula Fiod Costa EF, Maia M, Dib E, et al. Preclinical investigation of the retinal biocompatibility of six dyes for chromovitrectomy. Retina. 2009;29(4):497–510.
- 10 Gimbel HV, Neuhann T. Development, advantages and methods of continuous circular capsulorhexis technique. J Cataract Refract Surg. 1990;16(1):31-7. Comment in: J Cataract Refract Surg. 2001;27(9):1346-7.
- 11 Assia EI, Apple DJ, Barden A, Tsai JC, Castaneda VE, Hoggatt JS. An experimental study comparing various anterior capsulectomy techniques. Arch Ophthalmol. 1991;109(5):642-7. Comment in: Arch Ophthalmol. 1992;110(2):170.
- 12 Marback EF, Freitas LL, Fernandes FP, Branco BC, Belfort Jr R. Anterior capsule staining using 0,025% trypan blue in cataracts without red reflex. Arq Bras Oftalmol [Internet] 2001 [citado 2009 Jul 21];64(4):333-5. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abo/v64n4/12317.pdf>.

- 13 Brown SM, Graham WA, McCartney DL. Trypan blue in pediatric cataract surgery. *J Cataract Refract Surg.* 2004;30(10):20-33. Comment in: *J Cataract Refract Surg.* 2003;29(9):1733-7.
- 14 Hoffer KJ, McFarland JE. Intracameral subcapsular fluorescein staining for improved visualization during capsulorrhexis in mature cataracts. *J Cataract Refract Surg.* 1993;19(4):566.
- 15 Horiguchi M, Miyake K, Ohta I, Ito Y. Staining of the lens capsule for circular continuous capsulorrhexis in eyes with white cataract. *Arch Ophthalmol.* 1998;116(4):535-7.
- 16 Horiguchi M, Nagata S, Yamamoto N, Kojima Y, Shimada Y. Kinetics of indocyanine green dye after intraocular surgeries using indocyanine green staining. *Arch Ophthalmol.* 2003;121(3):327-31.
- 17 Toprak AB, Erkin EF, Guler C. Trypan blue staining of the anterior capsule under an air bubble with a modified cannula. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging.* 2003;34(3):236-8.
- 18 Chang YS, Tseng SY, Tseng SH, Chen YT, Hsiao JH. Comparison of dyes for cataract surgery. Part 1: cytotoxicity to corneal endothelial cells in a rabbit model. *J Cataract Refract Surg.* 2005;31(4):792-8.
- 19 Chang YS, Tseng SY, Tseng SH. Comparison of dyes for cataract surgery - Part 2: efficacy of capsule staining in a rabbit model. *J Cataract Refract Surg.* 2005;31(4):799-804.
- 20 Michels M, Lewis H, Abrams GW, Han DP, Mieler WF, Neitz J. Macular phototoxicity caused by fiberoptic endoillumination during pars plana vitrectomy. *Am J Ophthalmol.* 1992;114(3):287-96.
- 21 Rodrigues EB, Meyer CH, Kroll P. Chromovitrectomy: a new field in vitreoretinal surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2005;243(4):291-3.
- 22 Rodrigues EB, Meyer CH, Farah ME, Kroll P. Intravitreal staining of the internal limiting membrane using indocyanine green in the treatment of macular holes. *Ophthalmologica.* 2005;219(5):251-62.
- 23 Teba FA, Mohr A, Eckhardt C, Wong D, Kusaka S, Joondeph BC, et al. Trypan blue staining in vitreoretinal surgery. *Ophthalmology.* 2003;110(12):2409-12. Comment in: *Ophthalmology.* 2004;111(8):1622-3; author reply 1623.
- 24 Burk M, Da Mata AP, Snyder ME, Rosa RH Jr, Foster RE. Indocyanine green-assisted peeling of the retinal internal limiting membrane. *Ophthalmology.* 2000;107(11):2010-4. Comment in: *Ophthalmology.* 2003;110(9):1864.
- 25 Fine BS, Tousimis AJ. The structure of vitreous body and suspensory ligaments of the lens. *Arch Ophthalmol.* 1961;65:95-110.
- 26 Gree WR. Pathology of the vitreous. In: Frayer WC, editor. *Lancaster course of ophthalmic histopathology.* Unit 8(Histopathology). 1981.

- 27 Funata M, Wendel RT, de la Cruz Z, Green WR. Clinicopathologic study of bilateral macular holes treated with pars plana vitrectomy and gas tamponade. *Retina*. 1992;12(4):289-98.
- 28 Farah ME, Maia M, Rodrigues EB. Dyes in ocular surgery: principles for use in chromovitrectomy. *Am J Ophthalmol*. 2009;148(3):332-40.
- 29 Rodrigues EB, Costa EF, Penha FM, Melo GB, Botto's J, Dib E, et al. The use of vital dyes in ocular surgery. *Surv Ophthalmol*. 2009;54(5):576-617.
- 30 Maia M, Haller JÁ, Pieramici DJ, Margalitr E, De Juan E Jr, Farah ME, et al. Retinal pigment epithelial abnormalities after internal limiting membrane peeling guided by indocyanine green staining. *Retina*. 2004;24(1):157-60.
- 31 Magalhães O Jr, De Avila MP, Maia M, Nosé R, Costa EF, Rodrigues EB, et al. Difference between bevel-up and bevel-down 23-gauge one-step incisions: analysis of anterior chamber optical coherence tomography and IOP. *Retina*. 2010;30(3):521-3.
- 32 Fekrat S, Wendel RT, de la Cruz Z, Green WR. Clinicopathologic correlation of an epiretinal membrane associated with a recurrent macular hole. *Retina*. 1995;15(1):53-7.
- 33 Kwork AK, Man-Chan W, Woo DC. Indocyanine green assisted retinal internal limiting membrane removal in stage 3 or 4 macular hole surgery. *Br J Ophthalmol*. 2003;87(1):71-4.
- 34 Bonaventure N, Goswamy S, Karli P. Electroretinogram (ERG) and visual evoked response (VER) in rabbits reared in total darkness or continuous illumination. *Doc Ophthalmol*. 1971;30(1):339-47.
- 35 Kralinger MT, Stolba U, Velikay M, Egger S, Binder S, Wedrich A, et al. Safety and feasibility of a novel intravitreal tamponade using a silicone oil for proliferative vitreoretinopathy: first results of the Austrian Clinical Multicenter Study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2010;248(8):1193-8.
- 36 Fisher YL, Slakter JS, Yannuzzi LA, Guyer DR. A prospective natural history study and kinetic ultrasound evaluation of idiopathic macular holes. *Ophthalmology*. 1994;101(1):5-11.
- 37 Gribomont AC. ["Rupture" of the internal limiting membrane in surgery of the macular hole: preliminary results]. *Bull Soc Belge Ophtalmol*. 1999;272:9-11. French.
- 38 Melberg NS, Thomas MA. Visual field loss after pars plana vitrectomy with air/fluid exchange. *Am J Ophthalmol*. 1995;120(3):386-8.
- 39 Weinberger AW, Kirchhof B, Mazinani BE, Schrage NF. Persistent indocyanine green (ICG) fluorescence 6 weeks after intraocular ICG administration for macular hole surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2001;239(5):388-90.
- 40 Abels C, Fickweiler S, Weiderer P, Bäuml W, Hofstädter F, Landthaler M, et al. Indocyanine green (ICG) and laser irradiation induce photooxidation. *Arch Dermatol Res*. 2000;292(8):404-11.

- 41 Hughes A. Topographical relationships between the anatomy and the physiology of the rabbit visual system. *Doc Ophthalmol.* 1971;30:33-159.
- 42 Malerbi FK, Maia M, Farah ME, Rodrigues EB. Subretinal brilliant blue G migration during internal limiting membrane peeling. *Br J Ophthalmol.* 2009;93(12):1687. Erratum in: *Br J Ophthalmol.* 2011;95(1):154. Comment on: *Br J Ophthalmol.* 2008;92(3):330-1.
- 43 Penha FM, Maia M, Farah ME, Kawakami LT, Höfling-Lima AL. Thermal damage to a light probe using a xenon light source. *Acta Ophthalmol.* 2008;86(4):461-2.
- 44 Penha FM, Maia M, Farah ME, Dib E, Principe AH, Devin F, et al. Morphologic and clinical effects of subretinal injection of indocyanine green and infracyanine green in rabbits. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2008;24(1):52-61.
- 45 Rodrigues EB, Meyer CH. Meta-analysis of chromovitrectomy with indocyanine green in macular hole surgery. *Ophthalmologica.* 2008;222(2):123-9.
- 46 Maia M, Penha FM, Farah ME, Dib E, Príncipe A, Lima Filho AA, et al. Subretinal injection of preservative-free triamcinolone acetonide and supernatant vehicle in rabbits: an electron microscopy study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2008;246(3):379–88.
- 47 Uno F, Malerbi F, Maia M, Farah ME, Maia A, Magalhães O Jr. Subretinal trypan blue migration during epiretinal membrane peeling. *Retina.* 2006;26(2):237-9.
- 48 Henrich PB, Haritoglou C, Meyer P, Ferreira PR, Schotzau A, Katamay R, et al. Anatomical and functional outcome in brilliant blue G assisted chromovitrectomy. *Acta Ophthalmol.* 2010;88(5):588–93.
- 49 Maia M, Penha F, Rodrigues EB, Principe A, Dib E, Meyer CH, et al. Effects of subretinal injection of patent blue and trypan blue in rabbits. *Curr Eye Res.* 2007;32(4):309-17.
- 50 Maia M, Margalit E, Lakhanpal R, Tso MO, Grebe R, Torres G, et al. Effects of intravitreal indocyanine green injection in rabbits *Retina.* 2004;24(1):69–79.
- 51 Maia M, Kellner L, De Juan E Jr, Smith R, Farah ME, Margalit E, et al. Effects of indocyanine green injection on the retinal surface and into subretinal space in rabbits. *Retina.* 2004;24(1):80–91.
- 52 Lobeck E. Untersuchungen über die bedeutung des netzhautrisses bei netzhautablösung. Experimentelle Untersuchungen über den intraocularen Flüssigkeitwechsel bei künstlicher Netzhautablösung. *Graefes Arch Ophthalmol.* 1932;128:513-73.
- 53 Kutschera E. [Vital staining of the detached retina with retinal breaks]. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol.* 1969;178(1):72-87. German.
- 54 Sjaarda RN, Frank DA, Glaser BM, Thompson JT, Murphy RP. Resolution of an absolute scotoma and improvement of relative scotomata after successful macular hole surgery. *Am J Ophthalmol.* 1993;116(2):129-39.

- 55 Au Eong KG, Fujii GY, de Juan E Jr, Jensen PS, Sommerville DN, Shelley TH, et al. A new three-port cannular system for closed pars plana vitrectomy. *Retina*. 2002;22(1):130-2.
- 56 Ueno M, Hisatomi T, Enaida H, Kagimoto M, Mochizuki Y, Goto Y, et al. Biocompatibility of brilliant blue G in a rat model of subretinal injection *Retina*. 2007;27(4):499–504.
- 57 Farah ME, Maia M, Furlani B, Bottós J, Meyer CH, Lima V, et al. Current Concepts of trypan blue in chromovitrectomy. *Dev Ophthalmol*. 2008;42:91–100.
- 58 Costa RA, Farah ME, Freymuller E, Morales PH, Smith R, Cardillo JA. Choriocapillaris photodynamic therapy using indocyanine green. *Am J Ophthalmol*. 2001;132(4):557–65.
- 59 Maia M, Farah ME, Belfort RN, Penha FM, Lima Filho AA, Aggio FB, et al. Effects of intravitreal triamcinolone acetonide injection with and without preservative. *Br J Ophthalmol*. 2007;91(9):1122–4. Comment in: *Br J Ophthalmol*. 2007;91(9):1099-101.
- 60 Penha FM, Maia M, Farah ME, Príncipe AH, Freymüller EH, Maia A, et al. Effects of subretinal injections of indocyanine green, trypan blue, and glucose in rabbit eyes. *Ophthalmology*. 2007;114(5):899 –908.
- 61 Cacciatori M, McPherson R. Idiopathic macular hole surgery with low-concentration infracyanine green-assisted peeling of the internal limiting membrane. *Am J Ophthalmol*. 2007;143(4):726-30; author reply 727.
- 62 Stalmans P, Van Aken EH, Veckeneer M, Feron EJ, Stalmans I. Toxic effect of indocyanine green on retinal pigment epithelium related to osmotic effects of the solvent. *Am J Ophthalmol*. 2002;134(2):282–5. Comment in: *Am J Ophthalmol*. 2003;135(2):258; author reply 259.
- 63 Ho JD, Tsai RJ, Chen SN, Chen HC. Removal of sodium from the solvent reduces retinal pigment epithelium toxicity caused by indocyanine green: implications for macular hole surgery. *Br J Ophthalmol*. 2004;88(4):556–9.
- 64 Kadonosono K, Takeuchi S, Yabuki K, Yamakawa T, Mekada A, Uchio E. Absorption of short wavelengths of endoillumination in indocyanine green solution: implications for internal limiting membrane removal. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2003;241(4):284–6. Comment in: *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2003;241(11):958; author reply 959-90.
- 65 Engel E, Schraml R, Maisch T, Kobuch K, König B, Szeimies RM, et al. Light-induced decomposition of indocyanine green. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(5):1777-83.
- 66 Haritoglou C, Yu A, Freyer W, Priglinger SG, Alge C, Eibl K, et al. An evaluation of novel vital dyes for intraocular surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(9):3315-22.
- 67 Schuettauf F, Haritoglou C, May CA, Rejdak R, Mankowska A, Freyer W, et al. Administration of novel dyes for intraocular surgery: an in vivo toxicity animal Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(8):3573-8.

- 68 Czajka MP, McCuen BW 2nd, Cummings TJ, Nguye H, Stinnett D, Wong F. Effects of indocyanine green on the retina and retinal pigment epithelium in a porcine model of retinal hole. *Retina*. 2004;24(2):275-82.
- 69 Meyer CH, Rodrigues EB. A novel applicator for the selective painting of pre-retinal structures during vitreoretinal surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2006;243(5):487-9.
- 70 Scupola A, Giammaria D, Tiberti AC, Balestrazzi E. Use of perfluorocarbon liquid to prevent contact between indocyanine green and retinal pigment epithelium during surgery for idiopathic macular hole. *Retina*. 2006;26(2):236-7.
- 71 Chuang LH, Wang NK, Yeung L, Chen YP, Hwang YS, Wu WC, et al. Use of autologous whole blood during internal limiting membrane peeling and macular hole surgery is protective for indocyanine green toxicity. *Cutan Ocul Toxicol*. 2010;29(2):98-104.
- 72 Saito M, Iida T. A Surgical technique to protect the macular hole in indocyanine green-assisted vitrectomy. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2006;37(6):511-5.
- 73 Peyman GA, Huamonte FU, Rose M. Management of traumatic retinal detachment with pars plana vitrectomy, scleral buckling, and gas injection. *Acta Ophthalmol*. 1975;53(5):731-7.
- 74 Kiernan JA. Classification and naming of dyes, stains and fluorochromes. *Biotech Histochem*. 2001;76(5-6):261-78.
- 75 Schulte EK. Standardization of biological dyes and stains: pitfalls and possibilities. *Histochemistry*. 1991;95(1):319-28.
- 76 Machemer R, Parel JM, Norton EW. Vitrectomy: a pars plana approach. Technical improvements and further results. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*. 1972;76(2):462-6.
- 77 Rizzo S, Genovesi-Ebert EF, Di Bartolo E, Vento A, Miniaci S, Williams G. Injection of intravitreal bevacizumab (Avastin) as a preoperative adjunct before vitrectomy surgery in the treatment of severe proliferative diabetic retinopathy (PDR). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008;246(6):837-42.
- 78 Wollensak G, Spoerl E, Wirbelauer C, Pham DT. Influence of indocyanine green staining on the biomechanical strength of porcine internal limiting membrane. *Ophthalmologica*. 2004;218(4):278-82.
- 79 Marmor MF, Martin LJ, Tharfe S. Osmotically induced retinal detachment in the rabbit and primate. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1980;19(9):1016-29.
- 80 Enaida H, Sakamoto T, Hisatomi T, Goto Y, Ishibashi T. Morphological and functional damage of the retina caused by intravitreal indocyanine green in rat eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2002;240(3):209-13.

- 81 Ho JD, Chen H, Chen SN, Ray Jui-Fang Tsai RJF. Reduction of indocyanine green-associated photosensitizing toxicity in retinal pigment epithelium by sodium elimination. *Arch Ophthalmol*. 2004;122(6):871-8.
- 82 Ivert L, Kjeldbye H, Gouras P. Long-term effects of short term retinal bleb detachments in rabbits. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2002;240(3):232-7.
- 83 Peyman GA, Cheema RA, Conway MD, Fang T. Triamcinolone acetonide as an aid to visualization of the vitreous and the posterior hyaloid during pars plana vitrectomy. *Retina*. 2000;20(5):554-5.
- 84 Cheema F, Peyman GA, Fang T, Jones A, Lukaris AD, Lim K. Triamcinolone acetonide as an adjuvant in the surgical treatment of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2007;38(5):365-70.
- 85 Aleman TS, Duncan JL, Bieber ML, de Castro E, Marks DA, Gardner LM, et al. Macular pigment and lutein supplementation in retinitis pigmentosa and Usher syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(8):1873-81.
- 86 Hammond BR Jr, Johnson E, Russell RM, Krinsky NI, Yeum KJ, Edwards RB, et al. Dietary modification of human macular pigment density. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38(9):1795-801.
- 87 Bone RA, Landrum JT, Mayne ST, Gomez CM, Tibor SE, Twaroska EE. Macular pigment in donor eyes with and without AMD: a case-control study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(1):235-40. Erratum in: *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(3):548.
- 88 Granado F, Olmedilla B, Blanco I. Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *Br J Nutr*. 2003;90:487-502.
- 89 Snodderly D, Handelman GJ, Adler AJ. Distribution of individual macular pigment carotenoids in central retina of macaque and squirrel monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991;32(2):268-79.
- 90 Seddon JM, Ajani UA, Sperduto RD, Hiller R, Blair N, Burton TC, et al. Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group. *JAMA*. 1994;272(18):1413-20. Erratum in: *JAMA*. 1995;273(8):622. Comment in: *JAMA*. 1994;272(18):1455-6.
- 91 Gale C, Hall NF, Phillips D, Martyn CN. Plasma antioxidant vitamins and carotenoids and age-related cataract. *Ophthalmology*. 2001;108(11):1992-8.
- 92 Landrum JT, Bone RA, Joa H, Kilburn MD, Moore LL, and Sprague KE. A one year study of the macular pigment: the effect of 140 days of a lutein supplement. *Exp Eye Res*. 1997;65:57-62.
- 93 Sujak A, Gabrielska J, Grudzinski W, Borc R, Mazurek P, and Gruszecki WI. Lutein and zeaxanthin as protectors of lipid membranes against oxidative damage: the structural aspects. *Arch Biochem Biophys*. 1999;371:301-7.
- 94 Beatty S, Boulton M, Henson D, Koh HH, and Murray IJ. Macular pigment and age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*. 1999;83:867-77.



- 95 Yemelyanov A, Katz NB, Bernstein P. Ligand-binding characterization of xanthophyll carotenoids to solubilized membrane proteins derived from human retina. *Exp Eye Res* 2001;72:381-92.
- 96 Sommerburg O, Keunen JE, Bird A, van Kuijk F. Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: the macular pigment in human eyes. *Br J Ophthalmol*. 1998;82:907-10.
- 97 Polyakov NE. Carotenoids as scavengers of free radicals in a fenton reaction: antioxidants or pro-oxidants? *Free Radical Biol Med*. 2001;31(3):398-404.
- 98 El-Agamery A. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch Biochem Biophys*. 2004;430:37-48.
- 99 Krinsky N. Possible Biologic Mechanisms for a Protective Role of Xanthophylls. *J Nutr*. 2002;132:540-2.
- 100 Falsini B, Piccardi M, Larossi G, Fadda A, Merendino E, Valentini P. Influence of short-term antioxidant supplementation on macular function in age-related maculopathy. *Ophthalmology* 2003;110:51-61.
- 101 Margrain T, Boulton M, Marshall J, Slinney D. Do blue light filters confer protection against age-related macular degeneration? *Prog Retin Eye Res* 2004;23:523-31.
- 102 Ahmed S, Lott MN, Marcus D. The Macular Xanthophylls. *Surv Ophthalmol* 2005;50:183-93.
- 103 Tan JS, Wang JJ, Flood V, Rochtchina E, Smith W, Mitchell P. Dietary Antioxidants and the Long-term Incidence of Age-Related Macular Degeneration. The Blue Mountain Eye Study. *Ophthalmology*. 2008;115:334-41.
- 104 Thomson LR, Toyoda Y, Delori FC, Garnett KM, Wong ZY, Nichols CR, Cheng KM, Craft NE, and Kathleen, C. D. Long term dietary supplementation with zeaxanthin reduces photoreceptor death in light-damaged Japanese quail. *Exp Eye Res*. 2002;75:529-42.
- 105 Bernstein PS, Zhao DY, Wintch SW, Ermakov IV, McClane RW, and Gellermann W. Resonance Raman measurement of macular carotenoids in normal subjects and in age-related macular degeneration patients. *Ophthalmology*. 2002;109:1780-7.
- 106 Nolan J, Stack J, Mellerio J, Godhinio M, Neelam K, Beatty S. Monthly consistency of macular pigment optical density and serum concentrations of lutein and zeaxanthin. *Curr Eye Res* 2006;31:199-213.
- 107 Obana A, Hiramitsu T, Gohto Y, Ohira A, Mizuno S, Hirano T, Bernstein PS, Fujii H, Iseki K, Tanito M, and Hotta Y. Macular carotenoid levels of normal subjects and age-related maculopathy patients in a Japanese population. *Ophthalmology*. 2008;115:147-57.
- 108 Rosenthal JM, Kim J, de Monastario F, Thompson DJ, Bone RA, Landrum JT, de Moura FF, Khachik F, Chen H, Schleicher RL, Ferris FL, 3rd, and Chew EY. Dose-

ranging study of lutein supplementation in persons aged 60 years or older. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:5227-33.

109 Moeller SM, Volland R, Tinker L, Blodi BA, Klein ML, Gehrs KM, Johnson EJ, Snodderly DM, Wallace RB, Chappell RJ, Parek N, Ritenbaugh C, Mares JA. Associations between age-related nuclear cataract and lutein and zeaxanthin in the diet and serum in the Carotenoids in the Age-Related Eye Disease Study, an Ancillary Study of the Women's Health Initiative. *Arch Ophthalmol.* 2008;126(3):354-64.

110 Cho E, Seddon JM, Rosner B, Willett WC, and Hankinson SE. Prospective study of intake of fruits, vegetables, vitamins, and carotenoids and risk of age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol.* 2004;122:883-92.

111 Thomson LR, Toyoda Y, Langner A, Delori FC, Garnett KM, Craft N, Nichols CR, Cheng KM, and Dorey CK. Elevated retinal zeaxanthin and prevention of light-induced photoreceptor cell death in quail. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:3538-49.

112 Satia JA, Littman A, Slatore CG, Galanko JA, and White E. Long-term use of beta-carotene, retinol, lycopene, and lutein supplements and lung cancer risk: results from the VITamins And Lifestyle (VITAL) study. *Am J Epidemiol.* 2009;169:815-28.

113 Sahni S, Hannan MT, Blumberg J, Cupples LA, Kiel DP, and Tucker KL. Inverse association of carotenoid intakes with 4-y change in bone mineral density in elderly men and women: the Framingham Osteoporosis Study. *Am J Clin Nutr.* 2009;89:416-24.

114 Perrone S, Longini M, Marzocchi B, Picardi A, Bellieni CV, Proietti F, Rodriguez A, Turrisi G, and Buonocore G. Effects of Lutein on Oxidative Stress in the Term Newborn: A Pilot Study. *Neonatology.* 2009;97:36-40.

115 McCall DO, McCgartland CP, McKinley MC, Patterson CC, Sharpe P, McCance DR, Young IS, and Woodside JV. Dietary intake of fruits and vegetables improves microvascular function in hypertensive subjects in a dose-dependent manner. *Circulation.* 2009;119:2153-60.

116 LaRowe TL, Mares JA, Snodderly DM, Klein ML, Wooten BR, and Chappell R. Macular pigment density and age-related maculopathy in the Carotenoids in Age-Related Eye Disease Study. An ancillary study of the women's health initiative. *Ophthalmology.* 2008;115(876-883).

117 Sousa-Martins D, Maia M, Moraes M, Lima-Filho AA, Rodrigues EB, Chen J, et al. Use of Lutein and Zeaxanthin Alone or Combined with Brilliant Blue to Identify Intraocular Structures Intraoperatively. *Retina.* 2012;32 (7):1328–36.

118 Chung TY, Chung H, Lee JH. Combined surgery and sequential surgery comprising phacoemulsification, pars plana vitrectomy, and intraocular lens implantation: comparison of clinical outcomes. *J Cataract Refract Surg.* 2002;28(11):2001-5.

119 Yuen CY, Cheung BT, Tsang CW, Lam DS. Surgically induced astigmatism in phacoemulsification, pars plana vitrectomy, and combined phacoemulsification and vitrectomy: a comparative study. *Eye.* 2009;23(3):576-80.

- 120 Lee NY, Park SH, Joo CK. Refractive outcomes of phacoemulsification and intraocular lens implantation after pars plana vitrectomy. *Retina*. 2009;29(4):487-91.
- 121 Lee SB, Lee DG, Kwag JY, Kim JY. The effect of mydriatics on posterior synechia after combined pars plana vitrectomy, phacoemulsification, and intraocular lens implantation. *Retina*. 2009;29(8):1150-4.
- 122 Heath G, Rahman R. Combined 23-gauge, sutureless transconjunctival vitrectomy with phacoemulsification without face down posturing for the repair of idiopathic macular holes. *Eye*. 2010;24(2):214-22.
- 123 Melberg NS, Thomas MA. Nuclear sclerotic cataract after vitrectomy in patients younger than 50 years of age. *Ophthalmology*. 1995;102(10):1466-71.
- 124 Hsuan JD, Brown NA, Bron AJ, Patel CK, Rosen PH. Posterior subcapsular and nuclear cataract after vitrectomy. *J Cataract Refract Surg*. 2001;2001(27):3.
- 125 Machemer R. Pars plana vitrectomy. Introduction. *Trans Sect Ophthalmol Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*. 1976;81(3):350-1.
- 126 Machemer R. Development of pars plana vitrectomy. My personal contribution. *Klin Monbl Augenheilkd*. 1995;207(3):147-61.
- 127 Peyman GA, Huamonte F, Goldberg MF. Management of cataract in patients undergoing vitrectomy. *Am J Ophthalmol*. 1975;80(1):30-6.
- 128 Rodrigues EB, Costa EF, Maia M, Dib E, Moraes M Jr. Ability of New Vital Dyes to Stain Intraocular Membranes and Tissues in Ocular Surgery. *Am J Ophthalmol*. 2010;149:265–77.
- 129 Gillies RJ, Didier N, Denton M. Determination of Cell Number in Monolayer-Cultures. *Analytical Biochemistry*. 1986;159(1):109-13.
- 130 Merritt K, Gaiind A, and Anderson JM. Detection of bacterial adherence on biomedical polymers. *J Biomed Mater Res*. 1998;39(3):415-22.
- 131 Strickley RG. Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations. *Pharmaceutical Research*. 2004;21(2):201-30.
- 132 Javaheri M, Fujii GY, Rossi JV, Panzan CQ, Yanai D, Lakhanpal RR. Effect of oxygenated intraocular irrigation solutions on the electroretinogram after vitrectomy. *Retina*. 2007;27(1):87-94.
- 133 Kasner D. Vitrectomy: a new approach to management of vitreous. *Highlights Ophthalmol*. 1969;11:304-10.
- 134 Ninham BW, Parsegian VA. Van der Waals forces: special characteristics in lipid-water systems and a general method of calculation based on the Lifshitz theory. *Biophys J*. 1970;10(7):646-63.
- 135 Herculano RD, Pavinatto FJ, Caseli L, D'Silva C, Oliveira ON. The lipid composition of a cell membrane modulates the interaction of an antiparasitic peptide at the air–water interface. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011;1808:1907-12.

- 136 Jonas JB, Kreissig I, Degenring R. Intravitreal triamcinolone acetonide for treatment of intraocular proliferative, exudative, and neovascular diseases. *Prog Retin Eye Res.* 2005;24:587-611.
- 137 Nelson ML, Tennant MT, Sivaligan A. Infectious and presumed noninfectious endophthalmitis after intravitreal triamcinolone injection. *Retina.* 2003;23:686-91.
- 138 Westermeier, R. Sensitive, quantitative and fast modifications for coomassie blue staining of polyacrylamide gels. *Proteomics.* 2006;6(2):61-4.
- 139 Hisatomi T, Enaida H, Matsumoto H, Kagimoto T, Ueno A, Hata Y et al. Staining Ability and Biocompatibility of Brilliant Blue G. *Arch Ophthalmol.* 2006;124:514-9.
- 140 Enaida H, Hisatomi T, Hata Y, Ueno A, Goto Y, Yamada T, et al. Brilliant Blue G Selectively Stains the Internal Limiting Membrane/Brilliant Blue G-Assisted Membrane Peeling. *Retina.* 2006;26:631-6.
- 141 Ozawa T, Britz GW, Kinder DH, et al. Bromophenol blue staining of tumors in a rat glioma model. *Neurosurgery.* 2005;57(5):1041-7.
- 142 González S, Astner S, Wu A, Goukassian D, and Pathak MA. Dietary Lutein/Zeaxanthin Decreases Ultraviolet B-Induced Epidermal Hyperproliferation and Acute Inflammation in Hairless Mice. *J Invest Dermatol.* 2003;121:399-405.
- 143 Lee EH, Faulhaber D, Hanson KM, Ding W, Peters S, Kodali S, Granstein RD. Dietary Lutein Reduced Ultraviolet Radiation-Induced Inflammation and Immunosuppression. *J Invest Dermatol.* 2004;122:510-7.
- 144 Rodrigues EB, Penha FM, Costa ED, Maia M, Dib E, Moraes M Jr, Meyer CH, et al Ability of New Vital Dyes to Stain Intraocular Membranes and Tissues in Ocular Surgery. *Am J Ophthalmol.* 2010;149:265-77.
- 145 Hikichi T, Yanagya N, Kado M, Akiba J, Yoshida A. Posterior vitreous detachment induced by injection of plasmin and sulfur hexafluoride in the rabbit vitreous. *Retina.* 1999;19(1):55-8.
- 146 Grusha YO, Masket S, Miller KM. Phacoemulsification and lens implantation after pars plana vitrectomy. *Ophthalmology.* 1998;105(2):287-94.

## Abstract

**Purpose:** To study the safety and efficacy of lutein and zeaxanthin (L/Z), alone or combined with synthetic dyes, in cataract and vitreoretinal surgery as well as to propose and characterize new intraocular dye formulations containing these molecules. **Design:** Pharmacotechnical development and experimental preclinical studies. **Methods:** Pharmacotechnical development of intraocular formulations was based on vehicle selection, pre and post-stability, micronization techniques, manipulation, filling, sterilization, packaging and scale-up. Open-sky phacovitrectomy in 102 cadaveric eyes at maximum 12-hours post-mortem was performed using a pre-validated scoring scale for cornea and retinal tissue staining. In-vivo experimental intravitreal toxicity study in 26 dutch-belt rabbits was conducted followed by electroretinography assessment and histology analysis by optical and electronic microscopy. Cytotoxic and Cell Proliferation analysis using WST-1 and CVDE models both in HCE and ARPE-19 were performed to confirm toxicity profile. **Results:** Dye solutions using Cremophor EL™ as vehicle show no staining affinity with anterior capsule, vitreous, posterior hyaloid, internal limiting membrane and epiretinal membrane. Additionally, these Cremophor EL™-containing dye solutions showed a significant cytotoxicity and inhibit cellular proliferation. Most formulations tested obtained close to physiological osmolarity values and difficult solubilization in polar vehicles without particle size reduction. Staining efficacy tests in cadaveric eyes have shown only 5 non-Cremophor EL™ formulations staining the vitreous less than +++/4. As for the AC and MLI, two formulations have achieved maximum staining with lowest levels of AT and AB, respectively: L/Z 1% + AT 0.04% and L/Z 1% + AB 0.025%. Intravitreal toxicity study shows no formulation exhibited toxicity “in-vivo” in retinal cells. These results were corroborated with the cytotoxicity test which proved absence of toxicity for any L/Z formulation alone or combined with AB or AT using APV vehicle as carrier. **Discussion:** The evolution of vitreoretinal surgical techniques has been worldwide reported. Chromovitrectomy plays an important role in these innovations and is very useful to improve the surgical results. There is a consensus that application of vital dyes facilitates the delicate removal of intraocular membranes during vitreoretinal surgery. Controversy still remains around various issues, mainly potential toxicity and safety. There is room for further investigation of novel and specific vital dyes. Dyes such as L/Z alone or combined with AB or AT may be a better staining option due to its safety and efficacy. Additionally, L/Z formulations are

heavier than water which makes the dye solution to deposit naturally in the membrane surface without needing to flush near the retina, a risk that may be avoided. **Conclusions:** L/Z 1%+AB 0.025% and L/Z 1% + AT 0.04% were considered the best formulas based on stability, pH and osmolarity. These same formulations achieved the best results in staining cadaveric eye vitreous/MLI and anterior capsule at 4/4 or ++++/4, respectively. Toxicity tests show that these two formulations have an acceptable safety profile in the models used. L/Z-containing dyes may be a safe, efficacious and suitable alternative to current cataract and vitreoretinal surgery dye options.