

## **Avaliação da irritação ocular do 4NC: livre e lipossoma por método alternativo ao uso de animais**

Marcelo de Sousa VIEIRA, Marilisa Pedroso Nogueira GAETI, Rayanne Lara Ribeiro de SOUZA, Laís de Brito RODRIGUES, Renato Ivan de ÁVILA, Eliana Martins LIMA, Marize Campos Valadares BOZINIS

marizecv@farmacia.ufg.br

Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular - FARMATEC, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Pç Universitária, 1166, St. Universitário, CEP 74605-220, Goiânia, GO, Brasil.

**Palavras-chave:** Irritação Ocular, BCOP, 4-nerodilcatecol, Lipossoma

### **Introdução**

Muitos investimentos tem sido empregados nos últimos vinte anos em validação de metodologias *in vitro* aplicadas a avaliação de toxicidade em atendimento aos 3 Rs (*reduction, replacement and refinement*) (NICEATM, 2006). A Diretiva 86/689 de proteção animal diz que “*experimentos em animais não serão mais aceitos uma vez que haja método alternativo que reproduza os resultados in vivo*” (EC, 1986). O teste de irritação ocular desenvolvido por Draize em 1944 continua sendo utilizado e aceito pelas agências regulatórias (SCOTT, ESKES, et al., 2010). Para a determinação da segurança ocular não existe ainda uma única metodologia que substitua a utilização de animais, no entanto metodologias *in vitro* como o BCOP (*Bovine Corneal Opacity and Permeability*) tem sido usadas para reduzir o número de animais e em casos como os cosméticos, em associação com outros ensaios, em substituição ao uso de animais. Além disto, o método é rápido e reprodutível para avaliar a irritabilidade ocular (DONAHUE, AVALOS et al., 2011). O BCOP permite classificar o grau de irritação induzida por substâncias, o qual contempla ainda avaliação histológica, importante para a identificação de substâncias moderadamente irritantes (CARTER, HARBELL, 2006). Caso haja informações sobre a substância que indiquem irritação grave ou corrosiva apenas um animal é utilizado para o teste (BARILE, 2010).

O 4-nerolidilcatecol (4NC) é o principal metabólito secundário extraído da raiz e das folhas da *Pothomorphe umbellata* (REZENDE et al., 2004). Ropke et al, (2003)

encontraram eficácia superior ao  $\alpha$ -tocoferol do extrato de *P. umbellata* na proteção *in vivo* contra radiação UV. Silva et al (2005) relatam FPS 4 do 4NC isolado. Considerando o potencial deste fitoconstituente como ativo cosmético, neste trabalho, avaliamos a capacidade do 4NC de induzir irritação ocular, bem como o 4NC lipossomado, pelo teste do BCOP.

### **Materiais e Métodos**

4NC foi isolado pela Dra. Kennia Rocha Rezende-Faculdade de Farmácia-Universidade Federal de Goiás (FF-UFG). Lipossomas com 1% de 4NC foram desenvolvidos no Farmatec FF-UFG coordenado pela Dra. Eliana Martins Lima.

Olhos bovinos recém coletados (máx. 4h após abate) de abatedouro comercial foram transportados em HBSS (pH 7,4) sob refrigeração. A excisão foi realizada avaliando as condições gerais da córnea. A figura 1 mostra os passos. As córneas foram expostas às substâncias puras por 10 min e ao 4NC a 1%. Após exposição à substância-teste a opacidade é medida e a córnea exposta à fluoresceína para a avaliação da permeabilidade (figura 1C).



Figura 1 - A) Excisão da córnea do globo ocular. B) Posicionamento da córnea na câmara posterior e fechamento da câmara. C) Exposição à substância-teste e a fluoresceína sódica. D) Opacitômetro.

A quantificação da fluoresceína é feita em placa de 96 poços a 490 nm em espectrofotômetro. Utilizamos como controles a glicerina (negativo) e álcool etílico P.A. (positivo). Os valores aceitos de IVIS (*in vitro score*, Equação 1) para o controle positivo são entre 39,9 - 65,4; (n=632) (NICEATM, 2006).

O IVIS (*in vitro score*) é calculado pela seguinte equação:

$$\text{Equação 1: } IVIS = \text{média opacidade} + (15 \times \text{permeabilidade } 490 \text{ nm})$$

$$IVIS > 55,1 \text{ Irritante severo (OECD, 2009)}$$

O 4NC livre e lipossoma (ambos a 1%) foram expostos por 10 min. Utilizando o controle veículo de cada forma apresentada. Dois experimentos em triplicata.

## Resultados e Discussão

O álcool etílico foi usado como controle e apresentou IVIS de 64,1 (Quadro 1). Tanto o 4NC livre quanto em lipossomas foram classificados como não irritantes nas condições testadas. As figuras 2 e 3 mostram a opacidade e a permeabilidade das córneas após exposição às substâncias-teste, respectivamente.

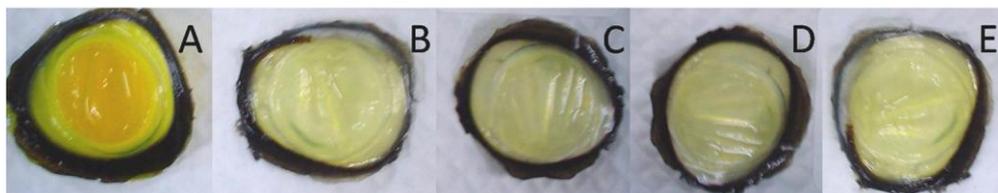


Figura 2 - Opacidade: Córneas após exposição à fluoresceína sódica. A fluoresceína marca tecido danificado. A) Álcool etílico 100%. B) 4NC 1% livre. C) Controle veículo 4NC (óleo de girassol). D) 4NC nanolipossomas e E) Nanolipossomas branco.

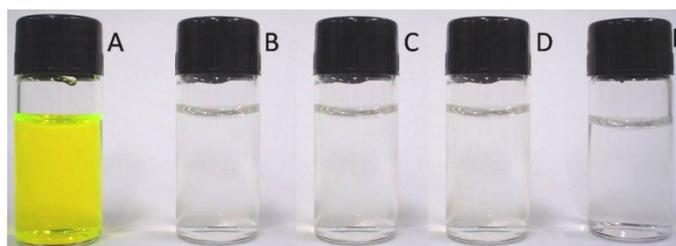


Figura 3 - Permeabilidade: Meio coletado da câmara posterior após exposição à fluoresceína sódica para leitura em espectrofotômetro a 490nm. A) Álcool etílico 100%. B) 4NC 1% livre. C) Controle veículo 4NC (óleo de girassol). D) 4NC nanolipossomas e E) Nanolipossomas branco.

Tanto a opacidade quanto a permeabilidade córnea encontradas em nossos experimentos estão em consonância com os valores de literatura (NICEATM, 2006; SCHRAGE et al., 2011) (Quadro 1).

Quadro 1: Comparação entre os valores de opacidade, permeabilidade e IVIS encontrados experimentalmente no LFTC e literatura.

Referência	Substância-teste	Opacidade	Permeabilidade	IVIS	Classificação OECD (2009)
NICEATM, 2006	Glicerol	0,3	0,007	0,5	Não Irritante
	Ácool Etílico	18,5	2,266	55,1	Irritante Grave
SCHRAGE et al., 2011	Glicerol	2,7	0,099	4,2	Não Irritante
	Ácool Etílico	29	1,349	48,6	Irritante Grave
LFTC, 2011	Glicerol	3,0	0,033	1,5	Não irritante
	Ácool Etílico	38,0	1,739	64,1	Irritante Grave
	4NC livre	1,00	0,22	1,3	Não Irritante
	4NC nanoestruturado	0,5	0,15	0,7	Não Irritante

A figura 2 evidencia a opacidade da córnea exposta ao álcool etílico e mostra a diferença entre as córneas expostas ao 4NC e seus controles que não

apresentaram opacidade. A permeabilidade encontrada também apresenta valores consonantes com os de literatura e condiz com os achados da opacidade. A opacidade está diretamente ligada a danos a camada epitelial que rompe a integridade da córnea aumentando a permeabilidade (figura 4). Os IVIS's encontrados em nossos experimentos classificam o álcool etílico e a glicerina como irritante grave e não irritante, respectivamente. O 4NC livre apresentou IVIS igual a 1,3 e, em sua forma nanoestruturada, igual a 0,7 demonstrando que sua utilização a 1% seja segura para os olhos.

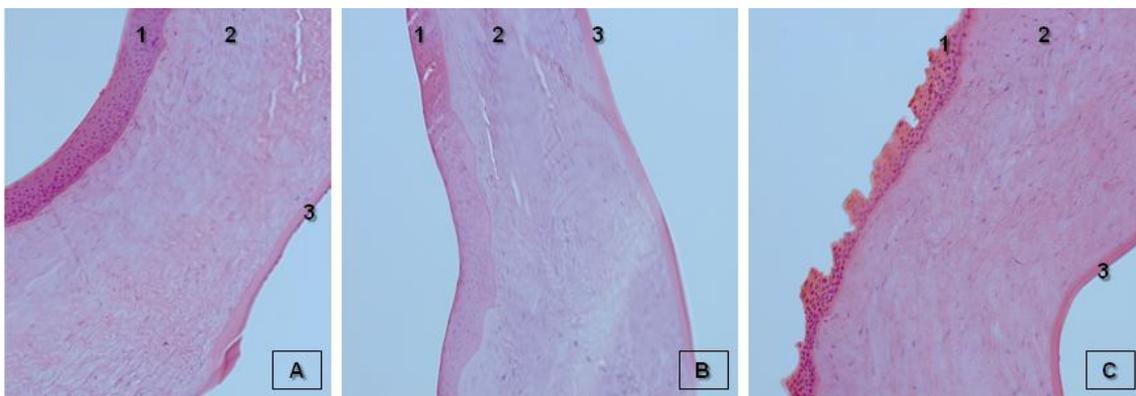


Figura 4 - Córneas bovinas expostas à A) 4NC 1%, b) glicerina 100% e C) álcool etílico 100% por 10 min. Posteriormente, os tecidos foram fixados, seccionados e corados com hematoxilina-eosina, evidenciando-se por microscopia eletrônica três camadas distintas da córnea: 1) epitélio pavimentoso estratificado, 2) estroma (substância própria), e 3) endotélio. Aumento 20x.

### **Conclusões**

Conseguimos classificar com sucesso os controles utilizados para a avaliação da reprodutibilidade do BCOP em nosso laboratório. O álcool etílico foi classificado como irritante grave apresentando IVIS maior que 55,1 e o glicerol como não irritante. Com estes resultados pudemos aplicar o BCOP como uma ferramenta eficaz para a avaliação da segurança ocular do 4NC. A classificação do 4NC, tanto em sua forma livre quanto nanoestruturada, apresentaram valores semelhantes ao nosso controle negativo classificando o 4NC como não irritante. Estes resultados nos dão indícios da utilização segura desta molécula, porém testes complementares se fazem necessários para a caracterização completa da segurança do 4NC.

### **Referências Bibliográficas**

BARILE, F. A.; Validating and troubleshooting ocular in vitro toxicology tests. *J Pharmacol Toxicol Methods* 61(2), p. 136-145, 2010.

CATER, K. C.; HARBELL, J. W.; Prediction of eye irritation potential of surfactant-based rinse-off personal care formulations by the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay. **Cutan Ocul Toxicol** 25(3), p. 217-233, 2006.

DONAHUE, D. A.; AVALOS, J.; et al. Ocular irritation reversibility assessment for personal care products using a porcine corneal culture assay. **Toxicol in Vitro** 25, p. 708-714, 2011.

EC, Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Official Journ* **L358**, 1-28, 1986.

ESKES, C.; BESSOU, S.; et al. Subchapter 3.3. Eye Irritation. In *Alternative (non-animal) Methods for Cosmetics Testing: Curr Stat and Fut Prosp.* **ATLA** 33(Suppl. 1), p. 47-81, 2005.

NICEATM (2006). *In Vitro Test Methods for Detecting Ocular Corrosives and Severe Irritants*, 484pp. Bethesda, MA, USA: National Institutes of Health. Disponível em:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox\\_docs/OTeval/OTevalrpt.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox_docs/OTeval/OTevalrpt.pdf). (Acesso 15.05.11).

OECD (2009). *OECD Guideline for the Testing of Chemicals. No. 437. Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants*, 18pp. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary>. (Acesso 15.04.11).

REZENDE, K. R.; BARROS, S. B. M. Quantification of 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) in rat plasma samples by HPLC-UV, **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, p. 373-380, 2004.

ROPKE, C. D.; Meirelles, R.R.; SILVA, V. V.; SAWADA, T.C.H.; BARROS, S. B.M. *Pothomorphe umbellata* Extract Prevents  $\alpha$ -Tocopherol Depletion After UV-irradiation. **Photochemistry and Photobiology**, 78, p. 436-439, 2003.

SCHRAGE, A.; KOLLE, S.N.; MORENO, M.C.R.; NORMAN, K.; RAABE, H.; CURREN, R.; RAVENZWAAY, B.; LANDSIEDEL, R. The Bovine Corneal Opacity and Permeability Test in Routine Ocular Irritation Testing and Its Improvement Within the Limits of OECD Test Guideline 437. **ATLA** 39, p. 37–53, 2011

SCOTT, L., C. ESKES, et al. A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. **Tox In Vitro** 24, p. 1-9, 2010.

SILVA, V. V.; ROPKE, C. D.; ALMEIDA, R.L.; MIRANDA, D.V.; KERA, C.Z.; RIVELLI, D.P.; SAWADA, T.C.H.; BARROS, S. B.M. Chemical stability and SPF determination of *Pothomorphe umbellata* extract gel and photostability of 4-nerolidylcatechol. **International Journal of Pharmaceutics**, 303, p. 125–131, 2005.

#### Apoio



#### Agradecimento

Frigorífico Vale do Cedro  
Inhumas - GO