

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
ASSOCIAÇÃO AMPLA UEPG/UNICENTRO**

JOEL TORIBIO ESPINOZA

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE LIPOSSOMAS
CONTENDO β -SITOSTEROL EM UM MODELO EXPERIMENTAL *EX VIVO* DE
CATARATOGÊNESE**

**PONTA GROSSA
2021**

JOEL TORIBIO ESPINOZA

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE LIPOSSOMAS
CONTENDO β -SITOSTEROL EM UM MODELO EXPERIMENTAL *EX VIVO* DE
CATARATOGÊNESE**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Josiane de Fátima Padilha de Paula

**PONTA GROSSA
2021**

T683 Toribio Espinoza, Joel
Desenvolvimento, caracterização e avaliação de lipossomas contendo β -sitosterol em um modelo experimental *ex vivo* de cataratogênese / Joel Toribio Espinoza. Ponta Grossa, 2021.
87 f.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Josiane de Fátima Padilha de Paula.

1. Catarata. 2. Lipossomas. 3. B-sitosterol. 4. Transmitância. 5. Espectroscopia de raman. I. Padilha de Paula, Josiane de Fátima. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. III.T.

CDD: 615.321

Ponta Grossa, 08 de setembro de 2021.

ATA DE EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 11/2021 DO DOUTORANDO **JOEL TORIBIO ESPINOZA** REALIZADA NO DIA 08 DE SETEMBRO DE 2021, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Ao oitavo dia de setembro de dois mil e vinte e um, às 14 horas, via videoconferência, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão pública sob a presidência da Professora Doutora Josiane de Fátima Padilha de Paula reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas do doutorando Joel Toribio Espinoza, na linha de pesquisa: Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamentos e Correlatos, constituída pela Professora Doutora Josiane de Fátima Padilha de Paula (PPGCF/UEPG) e demais Doutores (membros titulares): Patrícia Mathias Döll Boscardin (DEFAR/UEPG), Jane Manfron (PPGCF/UEPG), Daniela Gasparido Folquitto (CESCAGE) e Mona Lisa Simionatto Gomes (UNICESUMAR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem o exame de defesa de tese de Doutorado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição.

O título do trabalho foi: **“DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE LIPOSSOMAS CARREGANDO β -SITOSTEROL EM UM MODELO EXPERIMENTAL *ex vivo* DE CATARATOGÊNESE”**. Encerrada a defesa, a banca considerou APROVADA a tese, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 30 dias, a versão definitiva da tese de Doutorado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____

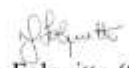
Alteração de título: sim x não ☐

Novo título: “Desenvolvimento, caracterização e avaliação de lipossomas contendo β -sitosterol em um modelo experimental *ex vivo* de cataratogênese”.


Josiane de Fátima Padilha de Paula (PPGCF/UEPG) - Presidente


Patrícia Mathias Döll Boscardin (DEFAR/UEPG) -
Titular


Jane Manfron (PPGCF/UEPG) - Titular


Daniela Gasparido Folquitto (CESCAGE) - Titular


Mona Lisa Simionatto Gomes (UNICESUMAR) -
Titular

Ponta Grossa, 08 de setembro de 2021

Dedico este trabalho aos meus pais Victoriano e Hermenegilda, pelo amor incondicional e sabedoria de seus conselhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me manter saudável física e mentalmente, me amparando e abençoando a cada dia e cuidando das pessoas que eu amo.

A minha família, principalmente por suportar a distância, por todos os esforços, incentivos, orações, paciência, compreensão e pelo amor incondicional.

À minha orientadora, Prof. Dra. Josiane Padilha de Paula, por me proporcionar a oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, foi com sua experiência que conseguimos a realização de este trabalho. Também pela amizade, confiança e conselhos, sempre alegre e confiante.

Às professoras Dra. Cassia Gonçalves Magalhães, pela parceria científica e pelo suprimento de β -sitosterol e demais reagentes. À Prof. Dra. Patricia Mathias Döll Boscardin e Prof. Dr. Giovanni Favero, pelos matérias e laboratório para a cultura de lentes. Ao Prof. Dr. Leandro Lipinski e suas Alunas, hoje Dras. Bruna Carletto e Adriana Koga, pelos lentes de ratos doados.

Às Prof. Dra. Jane Manfron Budel, Prof. Dra. Patrícia Mathias Döll Boscardin, Prof. Dra. Daniela Gaspar do Folquitto e Prof. Dra. Mona Lisa Simionatto Gomes por contribuírem com seus conhecimentos durante a qualificação.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelos ensinamentos e exemplo profissional.

Aos meus amigos da comunidade de estudantes estrangeiros da UEPG, por ser minha segunda família em Ponta Grossa. E em especial à Renata, que sempre ofereceu sua ajuda e esteve em todo momento.

Aos colegas de laboratório, Ana, Bárbara, Dani, Francielle, Robson, Rosana e Sandra, pelo apoio no português, conhecimento compartilhado e colaboração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a fundação Araucaria, pelo financiamento e ao Complexo de Laboratórios Multiusuários, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelo suporte técnico.

RESUMO

A catarata, principal causa de cegueira em todo o mundo, se deve a uma turvação no cristalino do olho, em consequência do estresse oxidativo, da perda na função chaperona das proteínas cristalinas e outros fatores que desencadeiam a precipitação das mesmas. O presente estudo avaliou o efeito do β -sitosterol na prevenção da catarata utilizando um modelo *ex vivo* de cataratogênese. Foram desenvolvidos lipossomas carregados com β -sitosterol (BSL), preparados pelo método de fase reversa modificada e avaliados quanto ao tamanho de partícula (DM), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ), assim como os aspectos morfológicos mediante microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG). A atividade anticataratogênica do BSL foi estudada em modelo de cultura de lentes *ex vivo* de ratos Wistar com suplementação de selenito de sódio. As lentes foram fotografadas antes e após a cultura. A opacidade da lente (transmitância) foi determinada usando um espectrofotômetro UV-Vis e foram determinadas as mudanças estruturais nas proteínas através de espectroscopia de Raman. O BSL apresentou um diâmetro médio de $183,90 \pm 15,41$ nm, o índice de polidispersão de $0,319 \pm 0,01$ e um PZ de $-31,25 \pm 0,63$ mV. As fotografias mostraram que o BSL diminuiu a progressão da opacidade, e os espectros de transmitância das lentes incubadas com BSL comprovaram que houve uma atenuação na redução da transmitância induzida pelo selenito de sódio. A espectroscopia Raman revelou aumentos e diminuições nos microambientes de resíduos de triptofano nas lentes induzidas e variação na intensidade das amidas. O tratamento com BSL permitiu manter viável a estrutura dobrável da β -folha das cristalinas, sugerindo uma alternativa terapêutica para prevenção da formação da catarata. O desenvolvimento de sistemas nanoestruturados carregados com potenciais compostos terapêuticos e sua avaliação espectroscópica podem fornecer informações interessantes sobre possíveis tratamentos para catarata.

Palavras-chave: Catarata. Lipossomas. β -sitosterol. Transmitância. Espectroscopia de Raman.

ABSTRACT

Cataracts, the main cause of blindness worldwide, is due to cloudiness in the eye lens, as a result of oxidative stress, loss of chaperone function of crystallin proteins and other factors that trigger their precipitation. The present study evaluated the effect of β -sitosterol in preventing cataract using an *ex vivo* model of cataractogenesis. β -Sitosterol loaded liposomes (BSL) were developed, prepared by the modified reverse phase method and evaluated for mean diameter (MD), polydispersion index (PDI), zeta potential (ZP), as well as morphological aspects by scanning electron microscopy (SEM-FEG). The anticataratogenic activity of BSL was studied in an *ex vivo* lens culture model of Wistar rats supplemented with sodium selenite. Lenses were photographed before and after culture. Lens opacity (transmittance) was determined using a UV-Vis spectrophotometer and structural changes in proteins were determined by Raman spectroscopy. The BSL had a mean diameter of 183.90 ± 15.41 nm, a PDI of 0.319 ± 0.01 and a ZP of -31.25 ± 0.63 mV. The photographs showed that BSL slowed the progression of opacity, and the transmittance spectra of lenses incubated with BSL showed attenuation in the reduction in transmittance induced by sodium selenite. Raman spectroscopy revealed increases and decreases in microenvironments of tryptophan residues in induced lenses and variation in amide intensity. Treatment with BSL allowed to maintain the foldable structure of the crystalline β -leaf, suggesting a therapeutic option for preventing cataract formation. The development of nanostructured systems loaded with potential therapeutic compounds and their spectroscopic evaluation can provide information about possible treatments for cataracts.

Keywords: Cataract. Liposomes. β -sitosterol. Transmittance. Raman spectroscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama esquemático da estrutura do olho humano.....	19
Figura 2 - Estrutura do cristalino.....	20
Figura 3 - Mutações genéticas associadas à catarata.....	25
Figura 4 - Opacificação capsular posterior.....	27
Figura 5 - Estrutura molecular da (A) Quercetina, (B) Naringina e (C) Rutina.....	31
Figura 6 - Estrutura molecular do β -sitosterol.....	32
Figura 7 - Espectro de Transmissão de Lentes Humanas.....	37
Figura 8 - Comparação dos espectros Raman ($500\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$) de lente normal e catarata madura.	40
Figura 9 - Estrutura do segmento anterior do olho e barreiras oculares para entrega de drogas.	42
Figura 10 - Fluxograma das etapas experimentais do estudo.....	48
Figura 11 - Suporte de lente para análise de porcentagem de transmitância.....	52
Figura 12 - Síntese de BSL.....	54
Figura 13 - Micrografias de SEM-FEG de BSL.....	55
Figura 14 - Fotografia comparativa entre as lentes incubadas nos grupos Controle, CAT, LIP e BSL durante o período de 0, 24, 48, 72 e 96 horas de incubação.....	56
Figura 15 - Espectros de transmissão das lentes incubadas no grupo (A) controle, (B) CAT, (C) LIP e (D) BSL durante o período de 0, 48 e 49 horas de incubação.....	58
Figura 16 - Espectros Raman na região de $1800\sim 400\text{ cm}^{-1}$ de núcleos de lentes de ratos Wistar após 96 horas de incubação.	61

Figura 17 - Mudanças na razão de intensidades Raman I_{940} / I_{998} após o período de incubação.	63
Figura 18 - Mudanças na razão de intensidades Raman I_{1230} / I_{998} após o período de incubação.	64
Figura 19 - Mudanças na razão de intensidades Raman I_{1265} / I_{1443} após o período de incubação.	64
Figura 20 - Mudanças na razão de intensidades Raman I_{1665} / I_{1443} após o período de incubação.	65
Figura 21 - Mudanças na razão de intensidades Raman I_{508} / I_{490} após o período de incubação.	66
Figura 22 - Mudanças na razão de intensidades Raman I_{850} / I_{828} após o período de incubação.	67
Figura 23 - Mudanças na razão de intensidades Raman I_{880} / I_{750} após o período de incubação.	68
Figura 24 - Mudanças na razão de intensidades Raman I_{750} / I_{1443} após o período de incubação.	69
Figura 25 - Mudanças na razão de intensidades Raman I_{998} / I_{750} após o período de incubação.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - As principais cristalinas presentes na lente humana	21
Tabela 2 - Típicos números de onda de bandas Raman e suas atribuições gerais.....	39
Tabela 3 - Classificação dos Grupos de Tratamento estudados.	51
Tabela 4 - Distribuição de DM, PDI e PZ do BSL.....	54
Tabela 5 - Transmissão espectral média para sete comprimentos de onda selecionados.....	59
Tabela 6 - Os valores médios para a razão de intensidade relativa das principais bandas Raman observados em lentes após 96 horas de cultura.	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Aldose redutase
BSL	Lipossoma carregado com β -Sitosterol
BSS	Solução salina balanceada estéril
CAT	Grupo catarata
CO ₂	Dióxido de carbono
CV	Coeficiente de variação
DLS	Dynamic light scattering – espalhamento de luz dinâmica
DM	Diâmetro médio
DMEM	Meio Eagles modificado por Dulbecco
DP	Desvio padrão
DPPC	Dipalmitoil fosfatidilcolina
DPR	Desvio padrão relativo
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FBS	Soro bovino fetal
FDA	Agência de Administração de medicamentos e alimentos dos Estados Unidos
MEV-FEG	Microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo
GPX	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
HTS	Triagem de alto rendimento
IOL	Lente intraocular
KRB	Tampão Kreps-Ringer
LIP	Grupo tratado com lipossoma vazio
LSS	Lanosterol sintetase
MDA	malondialdeído
min	Minuto
MTS	Translocação de membrana
mV	Milivolt
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PC	L- α -fosfatidilcolina
PDB	Banco de dados de proteínas
PDI	Índice de polidispersão
pH	Potencial hidrogeniônico
PZ	Potencial Zeta
RMN	Ressonância magnética nuclear

ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM	Rotações por minuto
SBDD	Descoberta de fármacos baseados na estrutura
SH	Sulfidrilo
SIT	β -Sitosterol
SOD	Superóxido dismutase
TMC	N-trimetil quitosana
Tyr	Tirosina
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1	CATARATA	18
3.1.1	Fisiologia / anatomia da lente.....	18
3.1.2	Proteínas cristalinas.....	20
3.1.3	Mecanismos moleculares da formação da catarata	22
3.1.4	Tipos da catarata.....	23
3.1.4.1	Catarata senil ou relacionada à idade	23
3.1.4.2	Catarata congênita	24
3.1.4.3	Desenvolvimento da catarata por complicações secundárias.....	25
3.2	TRATAMENTO CONVENCIONAL DA CATARATA.....	26
3.3	NOVAS ESTRATÉGIAS PARA O TRATAMENTO DA CATARATA.....	28
3.3.1	Procedimentos in sílico	28
3.3.2	Antioxidantes e outras moléculas promissoras	30
3.3.3	β -sitosterol.....	32
3.4	MODELOS EXPERIMENTAIS DA CATARATA INDUZIDA.....	33
3.4.1	Catarata induzida por selenito de sódio.....	33
3.4.2	Radiação Ultravioleta	34
3.4.3	Indução da catarata por hiperglicemia.....	34
3.4.4	Catarata induzida por Dexametasona	35
3.4.5	Catarata induzida por Peróxido de Hidrogênio	35
3.5	ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS EM CATARATA.....	36
3.5.1	Porcentagem de Transmitância por Espectroscopia UV-Vis	36
3.5.2	Espectroscopia de Raman em lentes com catarata	38
3.6	LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS NA LENTE	41
3.6.1	LIPOSSOMAS	43

4	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1	EQUIPAMENTOS	46
4.2	REAGENTES E SOLVENTES.....	46
4.3	DESENHO EXPERIMENTAL	48
4.4	MÉTODOS.....	49
4.4.1	Preparação dos lipossomas contendo com β -sitosterol	49
4.4.2	Caracterização do BSL.....	49
4.4.2.1	Análise do Potencial Zeta, Índice de Polidispersão e Diâmetro Médio	49
4.4.2.2	Microscopia Eletrônica de Varredura com Efeito de Campo (SEM-FEG).....	50
4.4.3	Animais	50
4.4.4	Preparo das lentes para estudo ex vivo.....	50
4.4.5	Preparo das lentes para formação da catarata.....	51
4.4.6	Avaliação da morfologia da catarata por microscopia digital	51
4.4.7	Porcentagem de Transmitância	52
4.4.8	Análise por Espectroscopia de Raman	53
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BSL	54
5.2	ANÁLISE DE MODELO EX VIVO DE CATARATOGÊNESE.....	56
5.2.1	Avaliação da morfologia da catarata por microscopia digital	56
5.2.2	Avaliação da porcentagem de transmitância	57
5.2.3	Avaliação por espectroscopia de Raman.....	61
6	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXO A - CARTAS DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA DOS EXPERIMENTOS CUJOS RATOS DO GRUPO CONTROLE FORAM APROVEITADOS.....	82

1 INTRODUÇÃO

A catarata é a principal causa de cegueira em todo o mundo. É considerada uma doença multifatorial, que pode ocorrer em qualquer idade, entretanto, tem maior incidência em pessoas com mais de 40 anos de idade. Dentre as complicações da catarata estão o glaucoma secundário e, conseqüentemente, uma cegueira irreversível (HILDRETH; BURKE; GLASS, 2009; THOMPSON; LAKHANI, 2015).

Esta patologia é caracterizada por uma turvação do cristalino do olho, a qual é produto da agregação das proteínas chamadas cristalinas. Os principais fatores associados à alteração de cristalinas são os genéticos (mutações) e os de estresse oxidativo, este último relacionado à idade (CATARATA, 2017).

Atualmente, estudos têm visado o desenvolvimento de medicamentos para prevenir ou eliminar a catarata e, baseados na sua fisiopatologia, agentes antioxidantes vêm sendo estudados e têm apresentado ótimos resultados. A quercetina, por exemplo, atua inibindo a aldose redutase, uma enzima elevada na diabetes e envolvida no processo de geração da catarata (PATIL; GACCHE, 2017).

Estudos mostraram que a mutação da Lanosterol sintase (LSS), responsável pela síntese do Lanosterol, gera a catarata congênita e que a administração tópica do Lanosterol diminuiu a agregação das proteínas cristalinas em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* em catarata severa em cães (ZHAO *et al.*, 2015).

Com base neste resultado positivo, vislumbrou-se a possibilidade de se utilizar compostos com similaridade estrutural com o Lanosterol. Makley *et al.* (2015) fez uma busca computacional (estudo *in silico*) e determinou que compostos esteroides eram candidatos ideais para interagir com as proteínas α -B-cristalinas, dentre os quais um oxiesterol conseguia manter a função chaperona destas proteínas e conseqüentemente a manutenção da transparência da lente.

Neste contexto, surge a ideia da utilização do β -sitosterol, essencial na estrutura da membrana celular vegetal, e que pode ser encontrado em plantas de diversas famílias. Este fitoesteroide é amplamente estudado por causa das diversas propriedades medicinais, como antimicrobiana, anti-inflamatória, anticancerígena, angiogênica, antioxidante, imunomoduladora, antidiabética, antinociceptiva e sem grande toxicidade (AMBAVADE; MISAR; AMBAVADE, 2014; LACATUSU *et al.*, 2012).

Assim, considerando a semelhança estrutural com o Lanosterol e as propriedades antioxidantes (GUPTA *et al.*, 2011), o β -sitosterol mostra-se como uma grande alternativa para o desenvolvimento do tratamento farmacológico da catarata.

No entanto, a administração de fármacos nos tecidos oculares apresenta desafios devido à existência de barreiras oculares, incluindo as barreiras da córnea e da conjuntiva que cobrem a superfície ocular, circulação do fluido lacrimal, efeitos das pálpebras e avascularidade do cristalino (JANAGAM; WU; LOWE, 2017; PATHAK; SUTARIYA; HIRANI, 2016).

Apenas 5% dos fármacos oculares aplicados topicamente ficam disponíveis para o tratamento dos distúrbios no local, os 95% restantes são desperdiçados nas lágrimas. Portanto, sugere-se que o potencial anti-catarata das biomoléculas como β -sitosterol poderia ser melhorado pela nanoencapsulação em sistemas nanoparticulados, não tóxicos, biodegradáveis e compatíveis com os olhos (CALVO; VILA-JATO; ALONSO, 1997; LACATUSU *et al.*, 2012; SUNKIREDDY *et al.*, 2013).

Muitas formulações que visam melhorar a biodisponibilidade de biomoléculas têm sido desenvolvidas, dentro delas estão as partículas lipídicas sólidas, lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas poliméricas (LACATUSU *et al.*, 2012), etc.

Sistemas para administração ocular na forma de lipossomas apresentam vantagens como biodisponibilidade e estabilidade aprimoradas dos fármacos incorporados, liberação direcionada e controlada, além da redução dos efeitos colaterais dos fármacos (FATHALLA; SOLIMAN; FOAUD, 2015). Tanto a bicamada lipídica quanto o espaço aquoso podem incorporar compostos hidrofóbicos ou hidrofílicos, respectivamente.

Em particular, demonstrou-se que a eficácia dos lipossomas na administração ocular de fármacos depende de vários fatores, mas principalmente da carga superficial lipossômica, uma propriedade que foi relatada como um determinante importante na retenção pré-córnea de vesículas (CALVO; VILA-JATO; ALONSO, 1997).

Adicionalmente, para poder testar o potencial de um determinado composto para o tratamento da catarata, é preciso de um modelo experimental para testes *in vivo* e *in vitro*.

A catarata induzida por selenito de sódio apresenta várias semelhanças com a catarata senil humana, como a formação de vesículas, aumento de cálcio, insolubilização de proteínas, formação de amiloides, proteólise, peroxidação lipídica, formação de peróxido de hidrogênio, e um decréscimo no nível de glutathione reduzida (GSH) (DOGANAY; BORAZAN, 2006).

Não existe tratamento farmacológico aprovado pelas agências reguladoras, o que leva a uma busca intensa por estratégias farmacológicas para o manejo da catarata. Um método simples de triagem de compostos para mitigar a formação da catarata seria útil na busca de abordagens eficazes na farmacoterapia dessa doença (HERUYE *et al.*, 2019).

Os tratamentos farmacológicos para retardar ou prevenir o desenvolvimento da catarata, e subsequente cegueira, poderiam causar um grande impacto na saúde e na economia, resultando no aumento da qualidade de vida, especialmente nos países em desenvolvimento, onde a prevalência da catarata é mais alta (DOGANAY *et al.*, 2006; MOREAU; KING, 2012; SUNKIREDDY *et al.*, 2013; TOH *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2015).

Por tanto, a incorporação do β -sitosterol em lipossomas se apresenta como uma estratégia promissora para o tratamento da catarata. A veiculação deste fitoesterol nesses sistemas nanoparticulados pode levar à diminuição da dosagem, liberação controlada e manutenção dos efeitos terapêuticos, além de proporcionar uma nova alternativa terapêutica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver, caracterizar e avaliar o potencial de lipossomas contendo β -sitosterol em um modelo experimental *ex vivo* de cataratogênese induzida por selenito de sódio.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a obtenção um lipossoma contendo com β -sitosterol por meio de um método de evaporação de fase reversa modificada;
- Efetuar a caracterização do lipossoma contendo com β -sitosterol.
- Avaliar a atividade dos lipossomas carregados com β -sitosterol em um modelo experimental da catarata *ex vivo*;
- Verificar a porcentagem de transmitância de lentes isoladas dos ratos antes e após a cultura com lipossomas contendo β -sitosterol;
- Ivestigar pela espectroscopia de Raman a estrutura das proteínas nas lentes dos ratos antes e após a cultura com lipossomas contendo β -sitosterol;
- Analizar estatisticamente os resultados obtidos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CATARATA

A catarata é uma anormalidade patológica comum da lente ocular e é uma das principais causas de cegueira, representando aproximadamente 51% de toda a cegueira no mundo (WHO, 2019). Ocorre a turvação da lente do olho que impede a visão clara, representando uma opacidade patológica que interfere com a transparência causada tanto por distúrbios na repetição regular de retículo citoplasma-membrana da lente, como por perturbações da ordem local de curto alcance das proteínas cristalinas no interior das fibras celulares (BLOEMENDAL *et al.*, 2004).

Embora a incidência da maioria das cataratas esteja relacionada à idade, a etiologia da doença é multifatorial e pode estar relacionada ao envelhecimento normal, uso excessivo de álcool, lesões oculares, tabagismo acumulativo, exposição à radiação UV, diabetes mellitus, elevado índice de massa corporal (HERUYE *et al.*, 2019; HILDRETH; BURKE; GLASS, 2009) etc. Os sintomas causados pela catarata são visão turva, visão de cor marrom, cores desbotadas, halo ao redor de objetos, brilho ao redor das luzes, visão noturna ruim, visão dupla, etc.(HILDRETH; BURKE; GLASS, 2009).

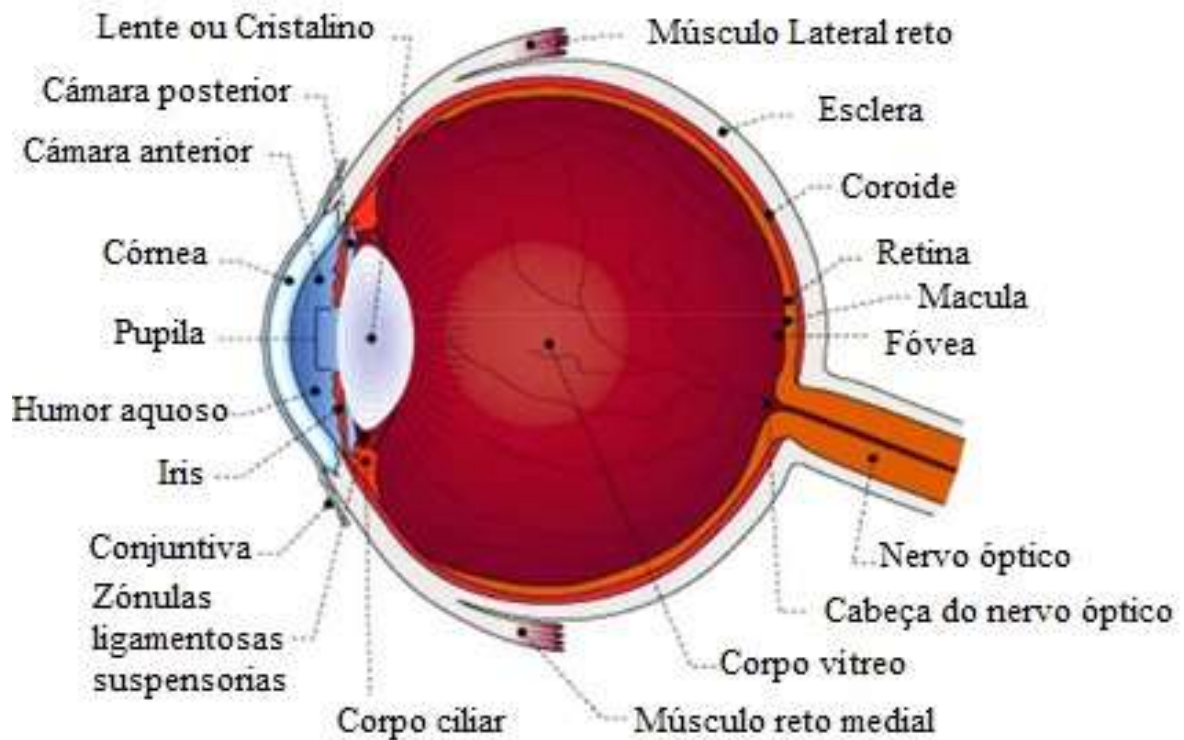
3.1.1 Fisiologia / anatomia da lente

A lente ou cristalino é um disco biconvexo transparente localizado atrás da íris dentro do olho (Figura 1). Suas funções são manter a sua própria clareza, focar a luz ou uma imagem na retina e fornecer acomodação (THOMPSON; LAKHANI, 2015).

Histologicamente, o cristalino é composto por um epitélio invertido, cuboide, de camada única, que secreta uma membrana basal espessa sobrejacente chamada cápsula do cristalino à qual as zônulas se ligam. Suas necessidades metabólicas são atendidas pelo humor aquoso adjacente (THOMPSON; LAKHANI, 2015).

O centro da lente, conhecido como núcleo, contém fibras celulares diferenciadas terminalmente, das quais as mais internas são formadas na fase embrionária. As camadas externas da lente conhecidas como córtex da lente, cercam o núcleo e mantêm algum nível de troca de proteína e atividade metabólica (MOREAU; KING, 2012).

Figura 1 - Diagrama esquemático da estrutura do olho humano



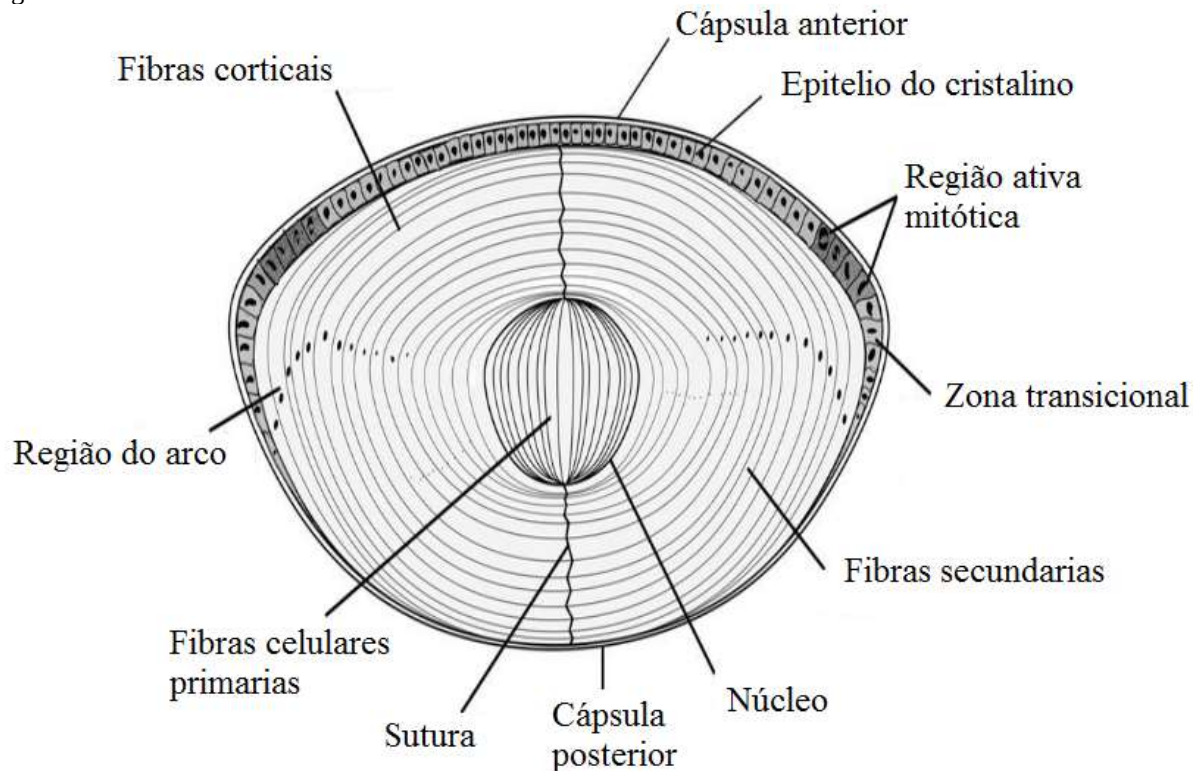
Fonte: Adaptado de Bu *et al.*(2007)

O cristalino ocular (Figura 2) difere de todos os outros órgãos por ser avascular, sem qualquer inervação, sendo composto por um tipo de célula que atinge diferentes estágios de diferenciação se originando de uma única célula comum: a célula precursora do cristalino. (CVEKL; ASHERY-PADAN, 2014).

Durante o desenvolvimento da lente, as células epiteliais diferenciam-se em fibras do cristalino que se alongam nas direções anterior e posterior do equador do cristalino. Quando o alongamento está completo, as extremidades das fibras da lente se desprendem do epitélio ou da cápsula do cristalino e, em seguida, ficam ao lado das fibras opostas para formar as suturas do cristalino (BARBOSA-SABANERO *et al.*, 2012).

Ao longo da vida, novas camadas de fibras são adicionadas continuamente dentro da periferia da lente, resultando na formação de conchas de crescimento concêntricas. Como as células epiteliais são incapazes de se desprender e, ao contrário, são diferenciadas em fibras da lente, elas são compactadas centralmente, com as células do núcleo da lente. Sem organelas, essas células centrais são mais suscetíveis aos efeitos fotooxidativos do envelhecimento (BARBOSA-SABANERO *et al.*, 2012; THOMPSON; LAKHANI, 2015).

Figura 2 - Estrutura do cristalino



Fonte: Adaptado de Maddirala (2015)

Esta perda de organelas celulares é necessária para a transparência, mas como consequência, disso a fibra terminalmente diferenciada não pode mais sintetizar ou degradar proteínas. Assim, as proteínas do cristalino que estão localizadas no centro e sintetizadas durante o desenvolvimento fetal, não podem ser substituídas e devem durar a vida útil do organismo (BLOEMENDAL *et al.*, 2004).

3.1.2 Proteínas cristalinas

As cristalinas das lentes são originalmente proteínas solúveis em água e a transparência da lente do olho depende da manutenção das estruturas terciárias nativas e da solubilidade dessas proteínas ao longo da vida (KIM *et al.*, 2015; MOREAU; KING, 2012). A distribuição das proteínas através da lente é desigual, atingindo valores máximos na região nuclear densa (ERCKENS *et al.*, 2001).

Para que as lentes consigam reter a transparência ao longo da vida na ausência de renovação de proteínas, as cristalinas devem satisfazer não apenas a exigência de solubilidade associada à alta concentração celular, mas também a da longevidade (BLOEMENDAL *et al.*, 2004).

As lentes oculares dos mamíferos são constituídas por três grupos principais de cristalinas, α -, β - e γ -cristalinas (Tabela 1). Estas classificações baseiam-se (i) na homologia dentro de cada classe, (ii) nos pesos moleculares dos oligômeros/monômeros e (iii) no seu subsequente tempo de eluição em cromatografia de exclusão por tamanhos (CHAUDHURY; ROY; DASGUPTA, 2017).

Os membros das famílias α -, β - e γ -cristalinas são as principais proteínas solúveis do cristalino. As β - e γ -cristalinas compreendem domínios duplicados que compartilham dobras duplas da proteína folha- β . As γ C-, γ D-, γ S-cristalinas são monoméricas, enquanto que os membros homólogos das famílias β A e β B formam oligômeros (MOREAU; KING, 2012).

A α -cristalina cumpre a função de uma chaperona molecular, além de ser uma proteína estrutural, enquanto a γ -cristalina da banda é apenas proteína estrutural. A α -cristalina desempenha um papel importante, sendo responsável pela transparência e insolubilização.

Sua função de chaperona é proteger as proteínas da agregação e do estresse ambiental ao longo da vida. Para isto a α -cristalina se liga eficientemente a proteínas danificadas ou parcialmente desdobradas, sequestrando-as para evitar agregação proteica generalizada. Estas cristalinas podem proteger as proteínas contra a desnaturação causada pelo aumento da temperatura e da proteólise (BLOEMENDAL *et al.*, 2004; HESS; MITTON; BUNCE, 1996; MOREAU; KING, 2012; SACHARZ *et al.*, 2016).

Tabela 1 - Principais cristalinas presentes na lente humana

Proteína	Tamanho (Da)	Resíduo	Gene
α A	19909	173	CRYAA
α B	20159	175	CRYAB
β A1	23191	198	CRYBA1
β A2	21964	196	CRYBA2
β A3	25150	215	CRYBA1
β A4	22243	195	CRYBA4
β B1	27892	251	CRYBB1
β B2	23249	204	CRYBB2
β B3	24230	211	CRYBB3
γ A	20761	173	---
γ B	20776	174	---
γ C	20747	173	CRYGC
γ D	20607	173	CRYGD
γ S	20875	177	CRYGS

Fonte: (BLOEMENDAL *et al.*, 2004; MOREAU; KING, 2012).

Acredita-se que as γ -cristalinas são proteínas monoméricas interagindo não apenas entre si, mas também com outras proteínas, como as α -cristalinas, vimentina e aquaporina. Portanto, a agregação de γ -cristalinas mutantes poderia levar à redução de outras cristalinas, como resultado de interações anormais de proteínas e formação de agregados não específicos. A formação desses agregados mutantes pode levar a outros efeitos, como o processo de denucleação das células da fibra do cristalino e a regulação negativa de outros membros da γ -cristalina, contribuindo para o processo de cataratogênese (CHENG *et al.*, 2016).

A fibra madura da lente não possui capacidade sintética de proteína e, portanto, não pode aumentar seu conteúdo de proteína chaperona quando a proteína não nativa começa a se agregar. Com a idade, o conteúdo de cada uma das conformações cristalinas muda, reduzindo a quantidade de α -cristalina e aumentando simultaneamente a quantidade de β - e γ -cristalina (BLOEMENDAL *et al.*, 2004; SACHARZ *et al.*, 2016).

A desestabilização das proteínas cristalinas conduz a intermediários propensos à formação de agregados proteicos, de alta massa molecular, insolúveis e dispersantes de luz. Estes agregados incluem ou sobrecarregam o conteúdo da proteína chaperona da lente (KIM *et al.*, 2015; MOREAU; KING, 2012).

3.1.3 Mecanismos moleculares da formação da catarata

Considera-se que a agregação anormal de proteínas do cristalino é desencadeada por várias modificações pós-translacionais ou modificações covalentes associadas a danos, como oxidação, desamidação, truncagem, glicação, isomerização ou clivagem, resultando em interações proteína-proteína e agregações incorretas que ocorrem durante o processo de envelhecimento. A catarata é então inevitável (BLOEMENDAL *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2015; MOREAU; KING, 2012).

A oxidação de aminoácidos que ocorre no tecido do cristalino pode afetar as funções cristalinas, incluindo sua interação com outras proteínas, e pode resultar na formação da catarata. Diversos locais de oxidação foram identificados nas cristalinas, visando resíduos de triptofano, cisteína e metionina (KIM *et al.*, 2015; MOREAU; KING, 2012).

A desaminação é um dos danos mais prevalentes para as cristalinas, introduzindo-lhe uma carga negativa, transformando os resíduos de glutamina em glutamato. A asparagina também é suscetível à desamidação, e ambos os resíduos são modificados em agregados da catarata (CETINEL; MONTEMAGNO, 2015; MOREAU; KING, 2012).

Esses eventos de truncamento podem causar desestabilização proteica mais pronunciada. Como o estado agregado em muitos casos é formado a partir de uma proteína cristalina parcialmente desdobrada, essas moléculas podem ser particularmente suscetíveis a danos covalentes (MOREAU; KING, 2012).

Bloemendal *et al.* (2004) afirmam que a catarata relacionada à idade deriva de duas rotas moleculares distintas: desdobramento de proteínas resultando em agregação protéica e/ou interação alterada e associação entre cristalinas nativas resultando em menor solubilidade.

A desregulação do teor do íon cálcio no cristalino também está implicada na formação das cataratas através da ativação de proteases calpaína. Calpaína 2, em particular, é fortemente sugerido para desempenhar um papel em algumas formas da catarata humana. A ativação desta enzima hidrolisa as proteínas estruturais da lente (MADDIRALA, 2015; MOREAU; KING, 2012; ONO; SORIMACHI, 2012).

Outra questão que atraiu a atenção é o lanosterol, uma molécula anfipática enriquecida no cristalino. É sintetizado pela lanosterol sintase (LSS) em uma reação chave de ciclização de uma via de síntese de colesterol. Zhao *et al* (2015) identificaram duas mutações distintas homozigotas LSS *missense* (W581R e G588S) em duas famílias com catarata congênita extensa.

Ambas as mutações afetam os resíduos de aminoácidos altamente conservados e prejudicam as principais funções catalíticas da LSS. O tratamento com lanosterol, mas não o colesterol, diminuiu significativamente os agregados proteicos pré-formados tanto *in vitro* como em experimentos *in vivo* em cachorros (ZHAO *et al.*, 2015).

3.1.4 Tipos da catarata

3.1.4.1 Catarata senil ou relacionada à idade

A catarata relacionada à idade é um problema significativo em todo o mundo. O estresse oxidativo tem sido sugerido como um mecanismo subjacente comum da cataratogênese. Danos oxidativos iniciais alteram significativamente a função das células epiteliais do cristalino, geram o aumento dos níveis de peroxidação lipídica, uma desregulação do conteúdo de cálcio e a ativação das calpaínas (GUPTA *et al.*, 2003; MOREAU; KING, 2012).

As cataratas podem ser clinicamente divididas em 3 tipos principais; cataratas corticais, nucleares e subcapsulares posteriores, nomeadas segundo as regiões da lente onde a dispersão de luz se origina. A catarata nuclear é a mais comum, descreve o amarelecimento normal e a esclerose do núcleo do cristalino, está associada ao aumento da idade e é ainda graduada pela sua progressão e cor (THOMPSON; LAKHANI, 2015; THRIMAWITHANA *et al.*, 2018a).

Alguns dos agentes capazes de induzir a catarata incluem metais pesados, radiação UV e outros tratamentos que induzem a formação de espécies reativas de oxigênio. Estudos sugerem que pode haver uma influência genética no desenvolvimento da catarata relacionada à idade e estudos de ligação identificaram regiões genômicas de interesse (MOREAU; KING, 2012).

Além disso, entre as mulheres na pós-menopausa, há evidências de que o estrogênio pode desempenhar um papel protetor na redução da incidência da catarata relacionada à idade (HALES *et al.*, 1997).

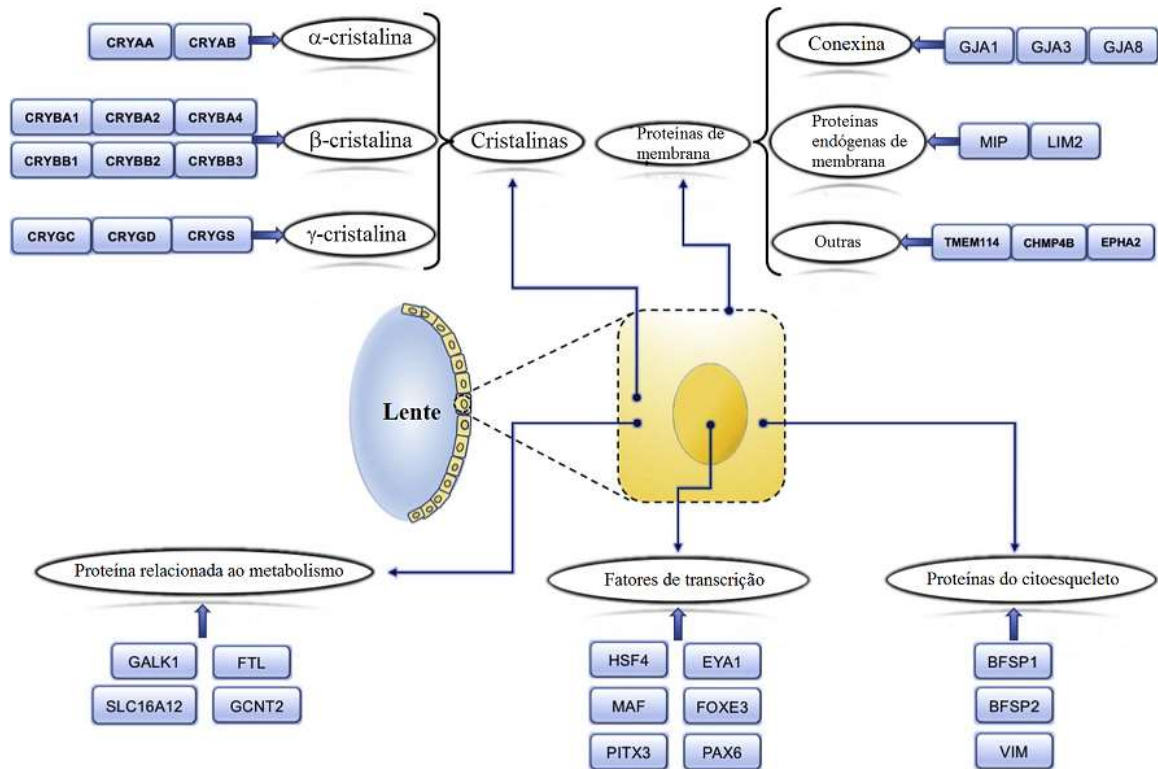
3.1.4.2 Catarata congênita

A catarata congênita tem uma incidência estimada de 1- 6 por 10.000 nascimentos e é a principal causa de deficiência visual em crianças em todo o mundo. Até o momento, perto de 15 genes relacionados à catarata foram identificados em pacientes com catarata hereditária (Figura 3).

Entre os principais genes envolvidos estão os (a) genes que codificam as proteínas estruturais cristalinas: CRYAA, CRYAB, CRYBA1, CRYBB1, CRYBB2, CRYGC e CRYGD; (b) genes que codificam as proteínas de membrana das lentes: MIP, LIM2, GJA1, GJA3 e GJA8 (codifica para MIP26, MP19, conexina43, conexina46 e conexina50, respectivamente); (c) genes que codificam proteínas do citoesqueleto, p. BFSP2; e (d) genes do factor de transcrição PITX3 e HSF4; e proteínas relacionadas ao metabolismo: GALK1, SLC16A12, FTL e CGNT2 (CHENG *et al.*, 2016; ZHU *et al.*, 2017).

Além disso, mutações nos genes α -, β -, e γ -cristalina são responsáveis por uma grande porcentagem da catarata de início precoce. Várias mutações foram caracterizadas, incluindo Arg14Cys, Pro23Thr, Arg36Ser, Arg58His e Trp156Stop em γ D-cristalina (MOREAU; KING, 2012).

Figura 3 - Mutações genéticas associadas à catarata



Fonte: Adaptado de Zhu *et al.* (2017).

Essas considerações sugerem que as α -, β - e γ -cristalinas são essenciais para a função da lente, embora o nível de expressão seja adaptado às propriedades ópticas da lente. De fato, a perda de α -cristalinas leva à diferenciação celular aberrante das fibras. Não são conhecidas cataratas hereditárias devido à falta de α -, β - e γ -cristalina, todas as mutações da catarata hereditárias ligadas a esses genes causam desdobramento e agregação de proteínas ou contêm mutações pontuais que resultam em proteínas adequadamente dobradas com baixa solubilidade (BLOEMENDAL *et al.*, 2004).

3.1.4.3 Desenvolvimento da catarata por complicações secundárias

Várias doenças sistêmicas ou oculares podem predispor os indivíduos à catarata. Pacientes com diabetes mellitus apresentam alta prevalência da patologia. (THOMPSON; LAKHANI, 2015). Nos olhos diabéticos, o sorbitol convertido de glicose pela aldose redutase se acumula gradualmente, induz a geração de radicais livres e exerce estresse oxidativo ao cristalino.

O aumento descontrolado dos níveis de glicose no cristalino pode levar diretamente à glicação proteica, o que é prejudicial à atividade de chaperona α -cristalina. Além disso, geração de radicais superóxido e formação de produtos finais de glicação avançada (YANG *et al.*, 2017).

Subsequentemente, o acúmulo de radicais livres e proteínas glicadas exacerbou ainda mais a inativação das enzimas antioxidantes do cristalino, como a superóxido dismutase (SOD) e a glutathione peroxidase (GPx), o que prejudica a capacidade antioxidante do cristalino. Juntos, os danos induzidos pelo acúmulo de sorbitol, estresse oxidativo e glicação protéica em olhos diabéticos causam opacificação e catarata (MOREAU; KING, 2012; YANG *et al.*, 2017).

Altas concentrações de glicose também ativam a via do poliol. A ativação da aldose redutase, a primeira enzima desta via, resulta na produção de altos níveis de sorbitol. O aumento da formação de “poliol” pode resultar em mudanças celulares que resultam de estresse osmótico, mudanças no REDOX, geração de espécies reativas de oxigênio, indução de fatores de crescimento e mudanças de sinalização (KADOR; WYMAN; OATES, 2016; LIM *et al.*, 2006; MOREAU; KING, 2012).

Uma variedade de condições oculares também é comumente associada à catarata. A uveíte, distrofia miotônica, a dermatite atópica, a neurofibromatose, o hipoparatiroidismo e a síndrome de Down, entre muitos outros, também estão associadas à formação da catarata (THOMPSON; LAKHANI, 2015; WEST-MAYS; BOWMAN, 2016).

Outras síndromes oculares associadas à catarata incluem o fechamento agudo do ângulo congestivo, miopia alta (patológica) e distrofias hereditárias do fundo, como retinite pigmentosa, amaurose congênita de Leber, atrofia girata e síndrome de Stickler (THOMPSON; LAKHANI, 2015).

3.2 TRATAMENTO CONVENCIONAL DA CATARATA

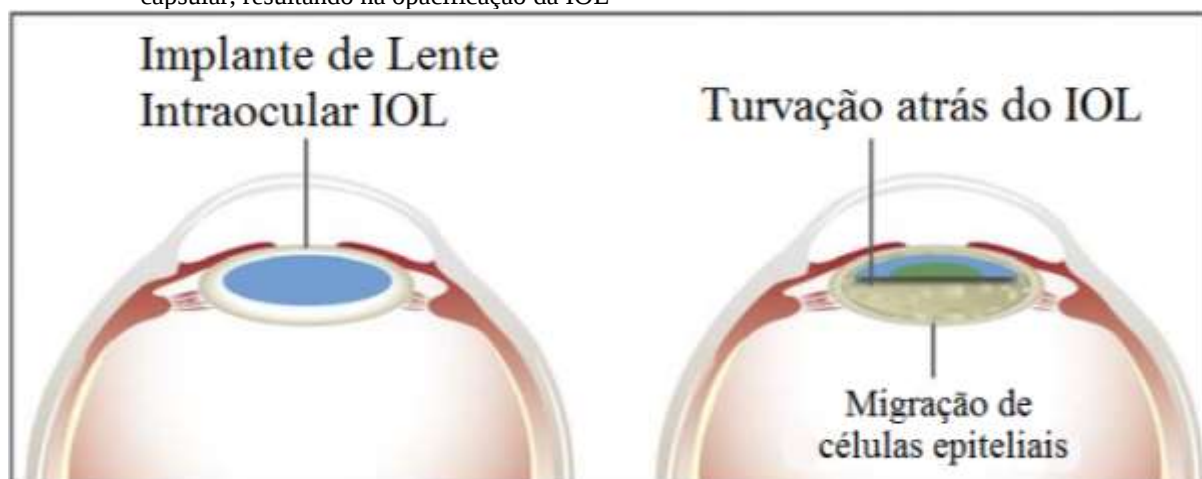
O tratamento cirúrgico com facoemulsificação e implante de lente intraocular (IOL) continua sendo o único tratamento comprovado. A cirurgia da catarata tem uma alta taxa de sucesso; no entanto, esse procedimento não é isento de risco com opacificação capsular posterior e outras complicações, como deiscência zonular, hemorragia supracoroidiana, aumento da pressão intra-ocular, descompensação da córnea e descolamento da retina (DOGANAY *et al.*, 2006; MOREAU; KING, 2012; SUNKIREDDY *et al.*, 2013).

A opacificação capsular posterior, a complicação mais comum, resulta do crescimento ectópico das células epiteliais remanescentes na cápsula posterior do cristalino (Figura 4).

Estas eventualmente invadem o eixo visual, fazendo com que a cápsula se enrugue, o que por sua vez dispersa a luz. Em muitos casos, um segundo procedimento é necessário para restaurar a visão (MOREAU; KING, 2012; TOH *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2015).

Mamíferos incluindo humanos, roedores, gatos e cães são capazes de regenerar o cristalino a partir de células LE (epiteliais do cristalino) quando a bolsa capsular permanece intacta. A regeneração de lente em mamíferos foi demonstrada como resultado de células LE remanescentes na cápsula do cristalino (BARBOSA-SABANERO *et al.*, 2012).

Figura 4 - Opacificação capsular posterior; Células epiteliais humanas migram e se diferenciam na bolsa capsular, resultando na opacificação da IOL



Fonte: Cetinel e Montemagno (2015).

Não existe atualmente nenhum agente farmacológico universalmente aceito para inibir ou regredir a opacificação no cristalino humano. Portanto, o tratamento farmacológico para reverter a catarata pode ter grandes impactos na saúde e na economia, especialmente nos países em desenvolvimento, onde a prevalência da catarata é a mais alta (DOGANAY *et al.*, 2006; TOH *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2015).

3.3 NOVAS ESTRATÉGIAS PARA O TRATAMENTO DA CATARATA

3.3.1 Procedimentos *in silico*

A integração de estratégias computacionais e experimentais tem sido de grande valor na identificação e desenvolvimento de novos compostos promissores. Amplamente utilizado no design moderno de fármacos, os métodos de *docking* molecular exploram as conformações de ligantes adotadas nos locais de ligação de alvos macromoleculares. Esta abordagem também estima a energia livre de ligação ligante-receptor avaliando fenômenos críticos envolvidos no processo de reconhecimento intermolecular (FERREIRA *et al.*, 2015).

Além dos dados de farmacodinâmica (por exemplo, potência, afinidade, eficácia, seletividade), as propriedades farmacocinéticas (ADMET: absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) também foram estudadas por meio da aplicação dessas metodologias (LIPINSKI; DOMINY; FEENEY, 1997).

Um *docking* molecular é um dos métodos mais utilizados no Projeto de Medicamentos Baseados em Estrutura (SBDD) devido à sua capacidade de prever, com um grau substancial de precisão, a conformação de ligantes de moléculas pequenas dentro do local de ligação ao alvo apropriado (FERREIRA *et al.*, 2015).

Os propósitos do *docking* molecular são basicamente três: predição de pose, triagem virtual e classificação de afinidade de ligante. Além disso, os algoritmos de *docking* molecular executam previsões quantitativas de energéticos de ligação, fornecendo classificações de compostos ancorados com base na afinidade de ligação dos complexos ligante-receptor. O pré-requisito para o sucesso nessas três tarefas é uma estrutura proteica corretamente selecionada (FERREIRA *et al.*, 2015; HONGMAO, 2016).

O campo progrediu lado a lado com os avanços nos métodos espectroscópicos biomoleculares, como a cristalografia de raios X e a ressonância magnética nuclear (RMN), que permitiram progressos notáveis na biologia molecular e estrutural. Essas técnicas permitiram a resolução de mais de 100.000 estruturas tridimensionais de proteínas, fornecendo informações estruturais vitais sobre os principais alvos de drogas macromoleculares. O *Protein Data Bank* (PDB) é o único arquivo mundial de dados estruturais de macromoléculas biológicas (BERMAN *et al.*, 2000).

Na catarata, o *docking* molecular é atualmente abordado usando cristalinas, calpaína ou aldose redutase (AR) como alvos. Uma forma potencial de tratar a catarata pode ser identificando moléculas que se ligam e estabilizam às cristalinas, favorecendo as formas

nativas solúveis. Os chaperones farmacológicos (PCs) são pequenas moléculas que se ligam e estabilizam um estado nativo de uma proteína (MAKLEY *et al.*, 2015).

A química combinatória e as técnicas de triagem de alto rendimento (HTS) são usadas na pesquisa de medicamentos porque produzem *leads* com uma eficiência que se compara favoravelmente ao desenho de fármacos 'racionais' e, talvez mais importante, porque essas técnicas expandem a amplitude das oportunidades terapêuticas e, portanto, os *leads* para a descoberta de fármacos. No entanto, a maioria dos medicamentos destina-se a terapia oral e a introdução de atividade oral não é previsível, tem tempo e custo elevado e pode facilmente consumir mais recursos do que a otimização da atividade *in vitro* (LIPINSKI; DOMINY; FEENEY, 1997).

Makley *et al.* (2015) exploraram pequenas moléculas com capacidade de reverterem essa agregação e tornarem-se um potencial terapêutico para o tratamento da catarata. Eles usaram um método de triagem que monitora o efeito de ligantes no desdobramento da proteína dependente da temperatura e identificou vários compostos que se ligam e estabilizam a forma solúvel das cristalinas. Em estudos *in vivo*, um desses compostos melhorou a transparência da lente em camundongos.

Chahuan *et al.* (2017) investigaram as interações entre α A-cristalina humana e duas bases de Schiff, os inibidores potentes contra a agregação de proteínas induzida por Cu^{2+} , e demonstraram efeito cooperativo positivo sobre a atividade chaperona de α A-cristalina contra esse tipo de agregação. Estudos de *docking* molecular também substanciaram as observações experimentais (CHAUHAN *et al.*, 2017).

Muralidharan *et al.* (2015) adotaram uma estratégia eficaz para rastrear os potenciais inibidores da calpaína por meio de uma abordagem de triagem virtual de alto rendimento (HTVS). Antes da triagem virtual, os ligandos disponíveis com Maybridge (Thermo Fisher Scientific Inc., LE, Reino Unido) foram submetidos a cálculos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), seguidos por filtração através da “regra de cinco de Lipinski”.

Um complexo mutado (S115C) calpaína 1 (1KXR) -ligante foi submetido a simulação de dinâmica molecular. Posteriormente, a validação experimental da propriedade anti-cataratogênica do composto “hit” foi determinada em um modelo animal experimental *in vitro* da catarata induzida por selenito de sódio (MURALIDHARAN *et al.*, 2015).

Em outro estudo, o *docking* molecular e simulação dinâmica foram usados para prever os pontos de interação e os padrões de combinação entre gigantol e Aldose Redutase (AR) e a sintase induzida do óxido nítrico (iNOS). Os sítios de ligação Gigantol-AR foram

Trp111, His110, Tyr48 e Trp20, e os sítios de ligação gigantol-iNOS foram Ile195 e Gln257. As principais formas de interação foram forças hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e forças de van der Waals (FANG *et al.*, 2015).

Embora a aldose redutase pareça ser uma candidata atraente para testar sua inibição por pequenas moléculas, vários compostos produziram resultados desanimadores em ensaios clínicos, e os efeitos colaterais e a toxicidade tornaram-se grandes problemas. Atualmente, não há estudos de inibidores da aldose redutase visando à prevenção ou tratamento da catarata registrados na FDA dos EUA (MOREAU; KING, 2012).

3.3.2 Antioxidantes e outras moléculas promissoras

O surgimento da catarata no cristalino por forte radiação UV e poluição crescente pode ser efetivamente reduzido por biomoléculas antioxidantes naturais. A maioria desses antioxidantes são agentes redutores como tióis ou polifenóis que terminam reações em cadeia baseadas em radicais livres. Moléculas antioxidantes naturais proeminentes com atividade anti-catarata são principalmente flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides, vitaminas e lactoferrina (SUNKIREDDY *et al.*, 2013).

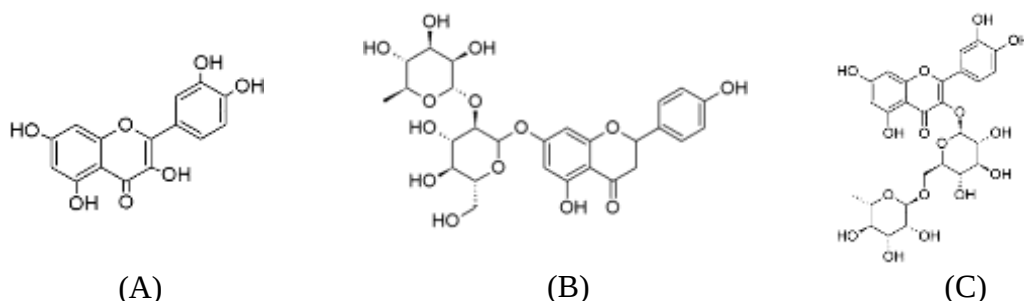
O flavonol quercetina (Figura 5A) é o flavonoide mais amplamente consumido na dieta humana. A quercetina é considerada um agente que pode reduzir o risco de formação da catarata afetando múltiplas vias pertinentes à opacificação da lente do olho, incluindo estresse oxidativo, glicação não enzimática, a via do poliol, proteases da calpaina da lente e sinalização celular epitelial (STEFEEK, 2011; STEFEK; KARASU, 2011).

Naringina (Figura 5B), um polifenol glicosilado da classe das flavanonas e sua aglicona, naringenina, demonstrou possuir muitos benefícios à saúde, como vasorrelaxante, antioxidante, inibidor da fosfodiesterase, propriedades antiteratogênicas, hepatoprotetoras e anti-inflamatórias, além de prevenir a peroxidação lipídica e agente antiagregante plaquetário (CORDENONSI *et al.*, 2016; FENG *et al.*, 2017; GHOSAL; GHOSH; KUMAR, 2018; SHPIGELMAN *et al.*, 2014).

A rutina (Figura 5C) é um flavonol abundantemente presente em ervas e espécies vegetais, tem mostrado efeito antioxidante e com potencial anticataratogênico. Foi demonstrado o potencial antiglicante e o mecanismo de ação da rutina usando proteínas de lente de olho de cabra como proteínas modelo, preveniram e/ou inibiram a glicação de proteínas e controlar condições patológicas diabéticas e assim atrasar o desenvolvimento da

catarata diabética devido à presença de rutina (BHADADA; VYAS; GOYAL, 2016; ISAI *et al.*, 2009; MUTHENNA *et al.*, 2012).

Figura 5 - Estrutura química da (A) Quercetina, (B) Naringina e (C) Rutina



Fonte: O autor (2021).

Foi observado o efeito de flavonoides selecionados, incluindo quercetina, naringina, e rutina, na opacidade do cristalino induzida pela glicação, demonstrando a eficácia dos flavonoides como condutores promissores para a inibição da reação de glicação e melhora da cataratogênese induzida por açúcar (PATIL; GACCHE, 2017; SASIKALA *et al.*, 2013).

Os efeitos protetores do resveratrol dentro do olho são extensos. Foi demonstrado que possui propriedades antioxidantes, antiapoptóticas, anti-tumorigênicas, antiinflamatórias, antiangiogênicas e vasorelaxantes. Há potenciais benefícios da suplementação de resveratrol em uma ampla gama de doenças oculares (BOLA; BARTLETT; EPERJESI, 2014). O resveratrol suprimiu o estresse oxidativo induzido por selenito e a formação da catarata em ratos (DOGANAY *et al.*, 2006).

A catarata induzida, induzida por selenito de sódio, e tratada com luteolina, reduziu o estresse oxidativo e a cataratogênese, mantendo o *status* antioxidante, reduzindo a geração de espécies reativas de oxigênio e a peroxidação lipídica no cristalino. A luteolina mostrou resultados marcantes na proteção contra a catarata de selenito *in vitro* (ROOBAN *et al.*, 2012).

Zhao *et al.* (2015) mostraram que o tratamento tópico com Lanosterol pode reduzir a gravidade da catarata e aumentar a transparência em lentes de coelho com catarata *in vitro* e a gravidade da catarata *in vivo* em cães. Este estudo identifica o Lanosterol como uma molécula chave na prevenção da agregação de proteína da lente e aponta para uma nova estratégia para prevenção e tratamento da catarata.

Um padrão anti-catarata como L-cisteína (HERUYE *et al.*, 2019), ou como a carnosina, já passaram por testes clínicos e mostraram resultados encorajadores que merecem mais investigação (TOH *et al.*, 2007).

3.3.3 β -sitosterol

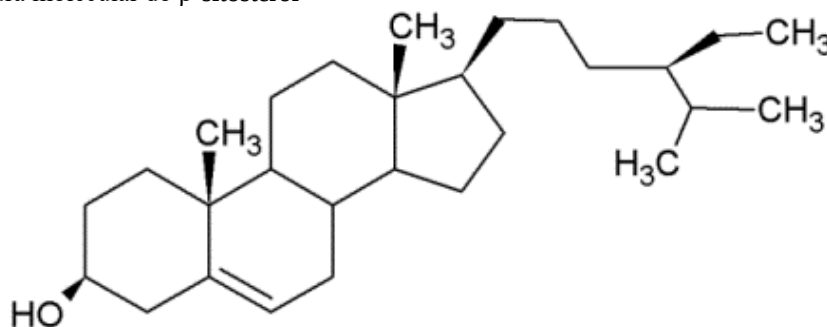
Os esteróis são componentes essenciais da membrana celular da célula animal e vegetal. O colesterol e o β -sitosterol são prevalentes em animais e plantas, respectivamente. O β -sitosterol é sintetizado nas plantas pela via do ácido mevalônico (AMBAVADE; MISAR; AMBAVADE, 2014; SAEIDNIA *et al.*, 2014).

O “screening” farmacológico do β -sitosterol revelou várias atividades como antimicrobiana, anti-inflamatória, anticancerígena, antifertilidade, angiogênica, antioxidante, imunomoduladora, antidiabética, antinociceptiva (Figura 6) sem grande toxicidade, atividades hipocolesterolêmicas e angiogênicas (AMBAVADE; MISAR; AMBAVADE, 2014; CHOI *et al.*, 2002; LACATUSU *et al.*, 2012; MOON *et al.*, 1999; PALERMO *et al.*, 2013).

O glucopiranido de β -sitosterol foi isolado de *Nelumbo nucifera* Gaertn., e mostrou exercer um efeito inibidor na aldose redutase de lentes de rato (15,10%) na concentração de 10 g/mL (LIM *et al.*, 2006).

Em outro estudo, Patel *et al.* (2012) também avaliaram o efeito inibitório na aldose redutase da lente de rato, a partir de extrato etanólico e o composto isolado β -sitosterol de *Hybanthus enneaspermus* (L.) F. Muell. (Violaceae), e foi encontrada atividade inibitória da aldose redutase [IC_{50} ($82,71 \pm 0,42 \mu\text{g/mL}$)], sendo que a inibição ocorreu de forma competitiva.

Figura 6 - Estrutura molecular do β -sitosterol



Fonte: O autor (2020).

Apesar do baixo percentual, quando comparado aos flavonoides isolados das mesmas plantas, esses estudos são precursores da utilização do β -sitosterol em modelo da catarata (PATEL *et al.*, 2012).

Gupta *et al.* (2011), utilizando um modelo experimental para diabetes mellitus induzida por danos oxidativos, demonstrou que β -sitosterol tem um potencial antioxidante. Os efeitos antidiabéticos promissores, assim como os efeitos antioxidantes faz que este composto seja considerado promissor para estudos clínicos.

3.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DA CATARATA INDUZIDA

A lente ocular é um órgão ideal para experimentos de cultura a longo prazo, pois não tem suprimento sanguíneo direto nem conexão com o sistema nervoso. A lente do olho é um excelente modelo para estudos devido aos possíveis benefícios relacionados à compreensão das causas e meios de prevenção da catarata (DOVRAT; SIVAK, 2005). Na sequência estão descritos alguns dos modelos experimentais mais utilizados:

3.4.1 Catarata induzida por selenito de sódio

O modelo da catarata induzida por selenito de sódio é uma das ferramentas mais comuns para o desenvolvimento experimental da catarata, usado como um sistema modelo para a catarata induzida por estresse oxidativo. Este modelo oferece vantagens importantes, como conveniência, formação rápida da catarata e reprodutibilidade (DOGANAY *et al.*, 2006).

Diversos processos bioquímicos como metabolismo epitelial alterado, acúmulo de cálcio, proteólise induzida por calpaína, precipitação de cristalinas, transição de fase e perda do citoesqueleto ocorrem durante o desenvolvimento da catarata induzida por selenito (DOGANAY *et al.*, 2006). As lentes cultivadas em selenito de sódio não desenvolvem cataratas nucleares, mas desenvolvem cataratas corticais ou exibem uma opacidade uniforme (HESS; MITTON; BUNCE, 1996; THRIMAWITHANA *et al.*, 2018a).

Hess *et al.* (1996) compararam propriedades do córtex e do núcleo de lentes de ratos controle tratados com selenito de sódio. O tratamento com selenito de sódio afeta as contribuições da organização de proteínas, organização celular e a ocorrência de metabólitos de baixo peso molecular como participantes na manutenção da transparência da lente.

A administração de selenito resulta em peroxidação lipídica, formação de peróxido de hidrogênio e diminuição no nível reduzido de glutathione (GSH) nas lentes de ratos, este tipo da catarata também é acompanhado por uma diminuição nas atividades das enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX)(DOGANAY *et al.*, 2006; PATEL *et al.*, 2011).

A capacidade do selenito de sódio de causar catarata foi relatada pela primeira vez em 1978. O método consiste em injeção subcutânea única de selenito de sódio a 19 a 30 μmol / kg de peso corporal em ratos amamentados, de 10-14 dias de idade. A catarata é produzida dentro de 4 a 6 dias (DOGANAY *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 2010a).

No entanto, a principal desvantagem desse modelo é a regeneração de GSH em 25 dias após a injeção de selenito de sódio, o que limita esse modelo a ser aplicável apenas para estudos que requerem menos de 30 dias de teste com o fármaco (MADDIRALA, 2015).

3.4.2 Radiação Ultravioleta

Os efeitos da exposição ambiental à radiação ultravioleta (quase UV) (300-400 nm) no cristalino ocular do esquilo (*Sciurus carolinensis*) foram relatados. Nas lentes desses animais expostos aos raios UV, ocorreram mudanças na parte anterior. As células epiteliais centrais incharam, desapareceram ou sofreram proliferação. Uma faixa de células de fibras degeneradas e desorientadas foi vista no cortex, com um grau de liquefação (ZIGMAN *et al.*, 1991).

Outros estudos relatam que ratos foram usados em experimentos de danos da retina à luz, em que suas lentes foram expostas a três exposições radiantes de 30 J/cm^2 a 380 nm. (GORGELS; VAN NORREN, 1992). Em outro estudo, os animais foram expostos unilateralmente *in vivo* à radiação UV-B de 8 kJ/m^2 por 15 minutos (KRONSCHLÄGER *et al.*, 2013).

Chaudhury *et al.* (2017) relataram uma investigação do dano induzido pelo estresse oxidativo à γ B-cristalina sob exposição a UV (CHAUDHURY; ROY; DASGUPTA, 2017).

3.4.3 Indução da catarata por hiperglicemia

Os mecanismos atuais propostos para vincular a hiperglicemia e a cataratogênese incluem a glicação não enzimática das proteínas do cristalino, o estresse oxidativo e a ativação da via do poliol. Destes mecanismos, a via do poliol pode estar relacionada com a

permeabilidade à água do cristalino e canais de água, porque a homeostase osmótica pode ser perturbada pela conversão da glicose em sorbitol em lentes banhadas em soluções de alta glicose (RUIZ-EDERRA; VERKMAN, 2006).

Na catarata com galactose, a concentração de dulcitol aproxima-se do equivalente osmótico do potássio da fibra do cristalino, uma condição que é altamente estressante para as membranas das fibras (CAI; KUCK; YU, 1989).

A formação da catarata foi induzida *in vitro* por incubação em soluções de alta glicose e *in vivo* por toxicidade por acetaminofeno (RUIZ-EDERRA; VERKMAN, 2006). Outro estudo avaliou a inibição da atividade da glicação e da aldose redutase com flavonoides da dieta. As lentes de cabra isoladas foram incubadas individualmente em tampão Krebs-Ringer (KRB) (com uma concentração basal de glicose de 10 mM e osmolalidade de 255–295 mOsm) com a adição de 30 mM de glicose em concentração suprafisiológica para induzir a glicação (PATIL; GACCHE, 2017).

3.4.4 Catarata induzida por Dexametasona

O estresse oxidativo e a depleção de GSH estão implicados na etiopatogênese da catarata induzida por glicocorticoides. Foram relatados diminuição dos níveis de GSH após a exposição ao glicocorticoide, juntamente com um aumento nos níveis de peróxido lipídico no cristalino. Além disso, a proteção por antioxidantes, como a vitamina E e o ácido ascórbico, contra danos causados por um corticosteroide solúvel sugere o papel do estresse oxidativo na formação da catarata induzida por esteroides. (MADDIRALA, 2015).

3.4.5 Catarata induzida por Peróxido de Hidrogênio

O peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila atacam as proteínas e os ácidos graxos poliinsaturados das membranas lipídicas, causando danos aos olhos (MADDIRALA, 2015).

A oxidação da proteína da lente é um fator importante para a formação da catarata. Reduções univalentes de oxigênio por meio de reações metabólicas e fotoquímicas geram espécies reativas de oxigênio (EROS). Assim, muitos estudos *in vitro*, *in vivo* e em humanos apoiam fortemente a associação entre estresse oxidativo e desenvolvimento da catarata. (SUNKIREDDY *et al.*, 2013).

Lentes bovinas intactas foram cultivadas em DMEM com L-cisteína na presença ou ausência de peróxido de hidrogênio (HERUYE *et al.*, 2019). A α -Cristalina foi administrada

em cardiomiócitos de rato por fusão com a sequência de translocação da membrana (MTS), que medeia a distribuição intracelular de péptidos. MTS- α BC exibiu uma função semelhante à chaperona, impedindo a agregação induzida pelo tratamento com H_2O_2 (REDDY; REDDY, 2015).

3.5 ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS EM CATARATA

3.5.1 Porcentagem de Transmitância por Espectroscopia UV-Vis

Estudos sobre transmitância espectral da lente (Figura 7) revelaram diferenças consideráveis nas espécies e a transmissão pode mudar com a idade (ARTIGAS; NAVEA; LÓPEZ-MURCIA, 2014; BOETTNER; WOLTER, 1962; GORGELS; VAN NORREN, 1992).

O número ao lado de cada curva indica a idade da lente cristalina. Além disso, as curvas adaptadas de Boettner e Wolter (1962) são mostradas (indicadas como B&W) e a idade da lente cristalina. Os da B&W 53 e B&W 75 se referem à transmissão direta, não total.

A quantidade total de luz visível transmitida por lentes humanas adultas e idosas também é muito variável. Na faixa etária de 40 a 59 anos, a transmissão total de luz é praticamente independente da idade, já que representa apenas cerca de 6% da variação; no entanto, na faixa de 60 anos ou mais, a idade tem uma influência maior na transmissão de luz total, respondendo por quase 50% da variação (ARTIGAS *et al.*, 2012).

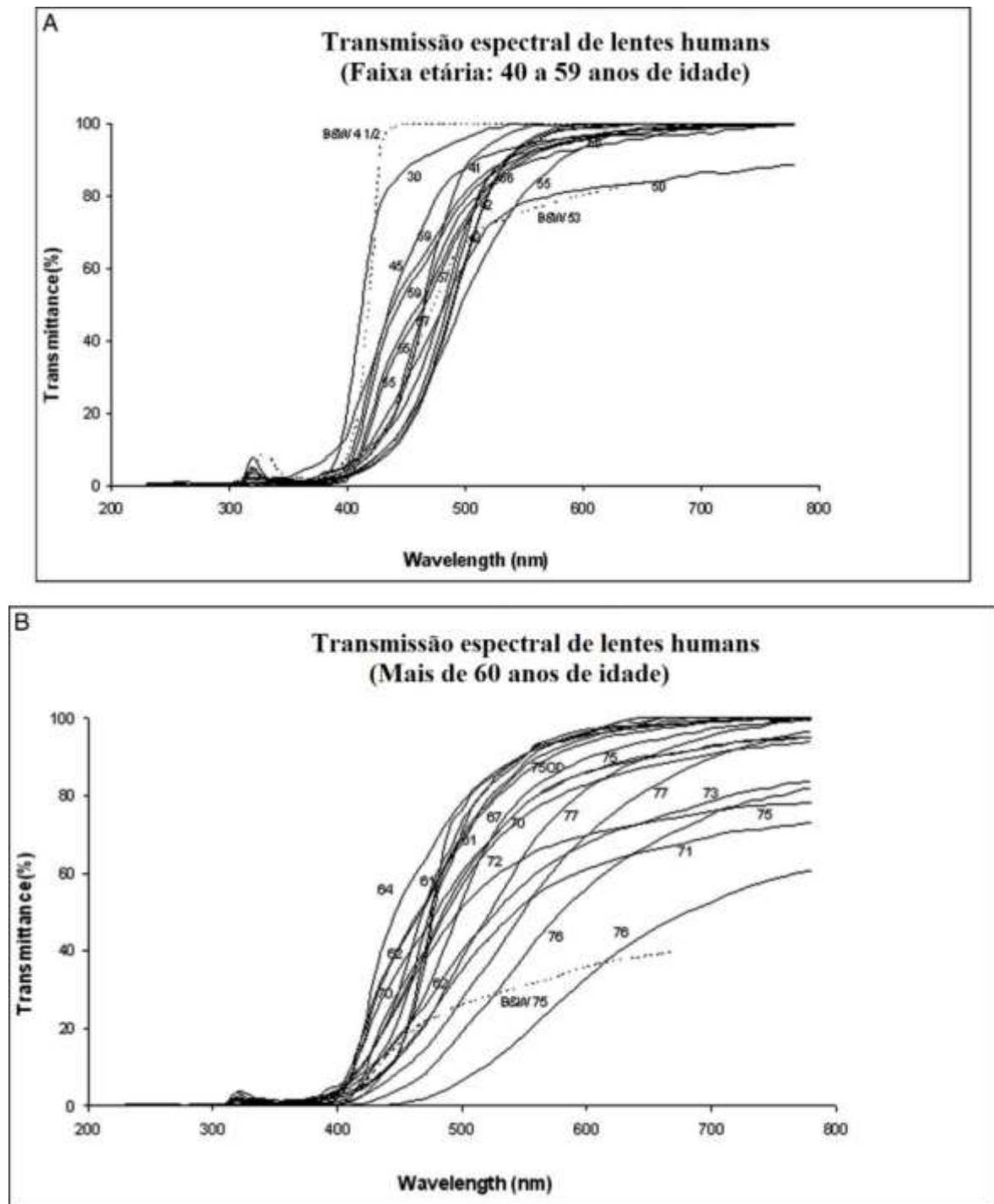
A radiação inclui a maioria dos raios diretamente transmitidos, mas quase nenhuma dispersão e autofluorescência. Devido ao efeito óptico da lente, nem todos os raios diretos entraram na abertura do fotomultiplicador. A medição da transmitância direta, portanto, produz valores relativos, não absolutos (GORGELS; VAN NORREN, 1992).

A transmitância total é definida como a fração de fótons que são transmitidos para o meio espaço total. A transmitância direta é definida como a fração de fótons transmitida somente na direção direta (BOETTNER; WOLTER, 1962).

Existem diferentes compostos absorvedores em tecidos biológicos (numerosos cromóforos, que aparecem na lente do olho com o envelhecimento e durante o processo patológico), incluindo cromóforos de comprimento de onda longo diminuindo a transparência da lente do olho na região visível e próxima do infravermelho (TUCHIN *et al.*, 1994).

Dentro da região visual foram identificadas duas classes importantes de cromóforos, quinureninas e proteínas envelhecidas (VAN DEN BERG; FELIUS, 1995).

Figura 7 - Espectro de transmissão de lentes humanas. (A) Transmissão espectral total das lentes cristalinas com idade de 30 e entre 40 e 59 anos. (B) Transmissão espectral total das lentes cristalinas com 60 anos ou mais



Fonte: Adaptado de (ARTIGAS *et al.*, 2012).

Embora os sistemas de classificação da catarata tenham sido aprimorados e os oftalmologistas experientes sejam capazes de avaliar a maioria das cataratas sem dificuldade, eles ainda podem encontrar problemas ao julgar casos com catarata nuclear. A razão é que o

diagnóstico clínico diário da catarata é realizado subjetivamente (NISHIMOTO; SASAKI, 1995).

A medição da transmissão espectral pode fornecer uma ferramenta útil em estudos da catarata em um modelo animal desta patologia (HERUYE *et al.*, 2019). A espectroscopia dos tecidos oculares, levando-se em conta a dispersão e absorção de luz elástica, é muito promissora para a análise dos processos de envelhecimento em lentes cristalinas e para diagnósticos da catarata em seus estágios iniciais (TUCHIN *et al.*, 1994).

3.5.2 Espectroscopia de Raman em lentes com catarata

A espectroscopia Raman é uma técnica óptica qualitativa e quantitativa para determinar a composição molecular da matéria. Melhorias nos instrumentos espectroscópicos, especialmente na modalidade de detecção de sinais de baixo nível de luz, estenderam a técnica Raman para aplicações biomédicas, mesmo em estruturas delicadas como o olho (BOT *et al.*, 1989; ERCKENS *et al.*, 2001).

Devido ao seu princípio de trabalho não destrutivo, quimicamente seletivo e livre de rótulo, a espectroscopia Raman tornou-se uma técnica analítica emergente e tem sido usada para a análise de mudanças estruturais em proteínas do cristalino e para monitorar o curso da formação da catarata (HORI KIRI *et al.*, 1992; KANN *et al.*, 2015; MIZUNO *et al.*, 1987).

O espectro Raman de proteínas fornece informações características sobre interações moleculares de resíduos de peptídeos (HUANG; CHEN, 2018). Sinais Raman, mostrados na Tabela 2 podem ser obtidos para a estrutura secundária da proteína, sulfidril, dissulfeto, água e os resíduos aromáticos, tais como fenilalanina, tirosina e triptofano (CAI; KUCK; YU, 1989).

Por exemplo, a medição Raman da relação $I_{3417}: I_{2936}$ é uma maneira mais sensível de refletir o aumento da água na catarata. Há um aumento na relação tirosina $I_{832}: I_{858}$ (normal 1,74; catarata 3,43), indicando um fortalecimento da ligação de hidrogênio fenólico, uma mudança que foi encontrada nos espectros Raman de todas as cataratas estudadas (CAI; KUCK; YU, 1989).

Tabela 2 - Típicos números de onda de bandas Raman e suas atribuições gerais

Origem	Cumprimento de onda (cm ⁻¹)	Assinatura	Informação Estrutural
Cistina	510	S-S	Conformação Gauche-gauche-gauche
	525	S-S	Conformação Gauche-gauche-gauche
	545	S-S	Conformação Trans-gauche-trans
Cistina	2,550-2,580	S-H	Presença de tiol dos resíduos de cisteína
Tirosina	850/830	Ressonância Fermi entre anel fundamental e harmônico	Estado do grupo fenólico OH (expostos ou enterrados, doador ou aceitador de ligações de hidrogênio)
Triptofano	760, 880, 1,360	Anel Indol	Banda intensa acentuada indica resíduos enterrados; sensível à polaridade do ambiente
Fenilalanina	1,006	Anel	Conformação insensível; útil como padrão de intensidade interna
Fosforil	1,085	PO ₄ -	Fosfolipídios
Resíduos alifáticos	1,730	C=O	Grupos Ester
	1,450, 1,465	C-H	Microambiente, polaridade
Amida I	2,800-3,000	C-H	Microambiente, polaridade
	1,655±5	Amida C=O, N-H	α-Helice
	1,670±3	Amida C=O, N-H	Folha-β antiparalela
	1,665±3	Amide C=O, N-H	Estrutura desordenada (solvatada)
	1,685	Amide C=O, N-H	Estrutura desordenada (não ligada a hidrogênio)
Amida III	>1,275	N-H, C-N	α-Helice
	1,235±5	N-H, C-N	Folha-β antiparalela
	1,245±4	N-H, C-N	Estrutura desordenada
	1,235	N-H, C-N	Estrutura desordenada (não ligada a hidrogênio)

Fonte: Huang e Chen (2018).

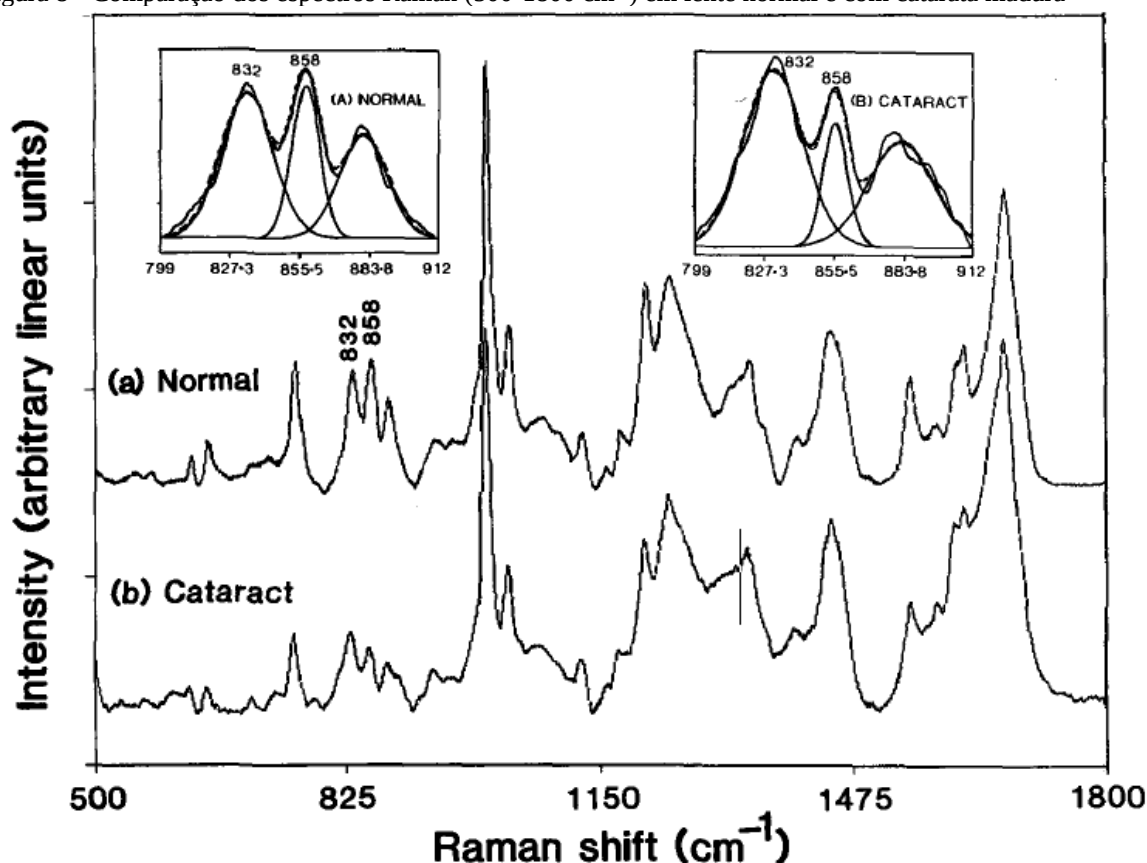
Assim, um aumento na relação $I_{832}:I_{858}$ indica um aumento na força da ligação de hidrogênio do grupo hidroxila fenólica (Figura 8). Essa proporção muda de 0,85 para 1 na formação da catarata diabética e hereditária.

Um aumento semelhante na proporção de dupletos de tirosina também foi detectado no caso da catarata induzida por baixas temperaturas em uma lente de rato (CAI; KUCK; YU, 1989; OZAKISJ; MIZUNOLT; IRIYAMAS, 1987).

O conteúdo relativo de água, de aminoácidos enxofrados e mudanças nos microambientes de resíduos de aminoácidos aromáticos foram quantitativamente examinados em catarata da lente de rato induzida por de sódio (HORIKIRI *et al.*, 1992).

É interessante notar que, em todos os tipos da catarata examinadas até o momento, a razão do duplete de Tyr, $I_{832}:I_{858}$, sempre aumenta com a formação da catarata. Em outras palavras, a agregação de proteínas na cataratogênese é sempre acompanhada pelo fortalecimento da ligação de hidrogênio Tyr (CAI; KUCK; YU, 1989).

Figura 8 - Comparação dos espectros Raman (500-1800 cm^{-1}) em lente normal e com catarata madura



Fonte: Cai, Kuck e Yu (1989).

A conformação (estrutura secundária) do esqueleto proteico é indicada pelas denominadas linhas de amida I (estiramento C=O) e amida III (curvatura N-H acoplada com estiramento O-N) próximas a 1650-1680 cm^{-1} e 1220-1280 cm^{-1} , respectivamente. Sinais nestas bandas indicam estrutura de folha- β plissada predominantemente anti-paralela (CAI; KUCK; YU, 1989; ZIGMAN *et al.*, 1991).

São relatados que mudanças conformacionais devido à oxidação de Cys-131 & Cys-142 de α -cristalinas, oxidação de Cys-37 & Cys-66 de β -B2-cristalinas e oxidação de Cys-170 & Cys-185 de β -A3/A1-cristalina desempenham papel importante na agregação de cristalinas. Deamidação de Asn-143 de γ S-cristalina e a oxidação do triptofano de várias cristalinas também é relatada como sendo o iniciador da formação da catarata. O estudo

espectroscópico Raman em lentes humanas de diferentes idades revelou diferenças na conformação das cristalinas entre o núcleo e o córtex (SUNKIREDDY *et al.*, 2013).

3.6 LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS NA LENTE

A liberação de fármacos nos tecidos oculares apresenta vários desafios devido a existência de barreiras oculares, incluindo as barreiras da córnea e da conjuntiva que cobrem a superfície ocular (Figura 9), circulação do fluido lacrimal, efeitos das pálpebras, avascularidade e compartimentalização das estruturas (JANAGAM; WU; LOWE, 2017; PATHAK; SUTARIYA; HIRANI, 2016).

Os principais componentes do filme lacrimal incluem mucinas, água e lipídios, e atua como barreira defensiva ao acesso de objetos estranhos à córnea e à conjuntiva. A córnea age como uma barreira que impede a absorção do fármaco do líquido lacrimal para a câmara anterior após a administração tópica e as junções restritas restringem a entrada dos fármacos do sangue (via sistêmica) na retina/humor aquoso (JANAGAM; WU; LOWE, 2017).

Por outro lado, a conjuntiva apresenta uma maior permeabilidade do que a córnea devido à sua natureza vascularizada e uma área que é aproximadamente 16 - 18 vezes maior. Desse modo, a maioria dos solutos é absorvida pela conjuntiva, drenada pelo sistema lacrimal no nariz e entra na circulação sistêmica com potenciais efeitos colaterais sistêmicos indesejados (FILIPE *et al.*, 2016).

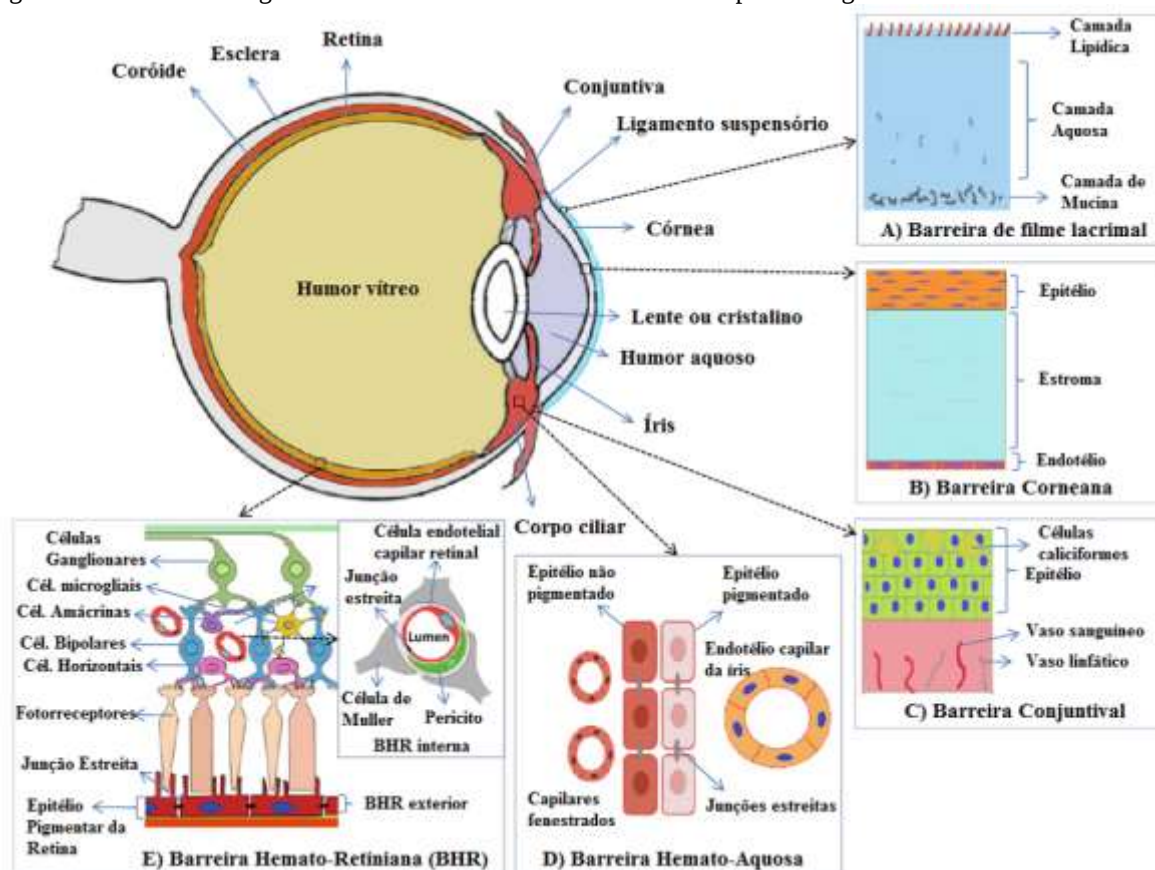
Assim, apenas 5% dos fármacos aplicados topicamente no olho ficam disponíveis e os 95% restantes são desperdiçados pelas lágrimas. Portanto, sugere-se que o potencial anticatarata das biomoléculas poderia ser melhorado pela nanoencapsulação em sistemas nanoparticulados adequados, não tóxicos, biodegradáveis e compatíveis com os olhos (CALVO; VILA-JATO; ALONSO, 1997; SUNKIREDDY *et al.*, 2013).

Os fármacos encapsulados em nanopartículas tendem a ter melhor farmacocinética, farmacodinâmica, menor toxicidade e imunogenicidade, além de poder apresentar bioreconhecimento, o que pode aumentar a eficácia do fármaco (JANAGAM; WU; LOWE, 2017). Os tamanhos das partículas administradas para aplicações oftálmicas devem ser inferiores a 10 μm , a fim de evitar a sensação de desconforto após a administração (ZIMMER; KREUTER, 1995).

Um sistema de liberação de fármaco tópico ideal possui certas propriedades desejáveis, como boa penetração corneana e conjuntival, tempo de liberação prolongado, fácil

instilação, não irritativo e confortável para minimizar lacrimação e o reflexo de piscar, além de propriedades reológicas apropriadas (BU *et al.*, 2007; NAGARWAL *et al.*, 2009).

Figura 9 - Estrutura do segmento anterior do olho e barreiras oculares para entrega de fármacos



Fonte: Adaptado de Janagam, Wu e Lowe (2017).

Formas de apresentação farmacêutica, tais como gotas oculares, suspensões ou pomadas, são as mais adequadas para o segmento anterior do olho, devido a facilidade de administração, por serem não invasivas, pela aceitabilidade do paciente e pelo baixo custo (PATHAK; SUTARIYA; HIRANI, 2016; THRIMAWITHANA *et al.*, 2018a).

Apesar dos resultados positivos publicados em estudos *in vitro* e *in vivo*, o número de tratamentos farmacológicos disponíveis para doenças oculares e cataratas na clínica é limitado (THRIMAWITHANA *et al.*, 2018a).

Wang *et al.* (2008) usaram um complexo de inclusão de dissulfiram (DSF) em uma formulação de colírio para aumentar a biodisponibilidade do fármaco através da membrana da córnea.

Juntamente com a adição do hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), como potenciador de penetração, a formulação para gotas oculares suprimiu com êxito o efeito da catarata durante até 48 horas em coelhos (WANG *et al.*, 2008).

Estudos demonstram que as nanopartículas de sílica-CeCl₃ [cloreto de sílica-cério (III)] formam conjugados estáveis com α -cristalina e aumentam a atividade de chaperonas em experimentos de cultura de lente de camundongos *in vitro*. As nanopartículas também foram eficazes na prevenção da glicação de α -cristalina e na redução do estresse oxidativo (CETINEL; MONTEMAGNO, 2015).

Antioxidantes, ativadores de chaperonas e inibidores de agregação de proteínas são candidatos promissores para uso no tratamento da catarata. No entanto, mesmo com formulações mais eficientes, as barreiras do olho devem ser superadas para se obter um tratamento localizado e direcionado. A nanotecnologia oferece as soluções terapêuticas necessárias para contornar as barreiras físicas e aumentar a biodisponibilidade, bem como a entrega direcionada, sustentada e controlada (CETINEL; MONTEMAGNO, 2015).

3.6.1 LIPOSSOMAS

Os lipossomas são partículas biocompatíveis e biodegradáveis que consistem em bicamadas lipídicas semelhantes a membranas compostas principalmente por fosfolipídios anfifílicos. Os lipossomas possuem estruturas esféricas ocas (vesículas) com fases lipofílica (bicamada lipídica) e hidrofílica (compartimento aquoso) (PATHAK; SUTARIYA; HIRANI, 2016).

A composição lipossômica convencional consiste em uma bicamada lipídica, que pode ser composta por fosfolipídios catiônicos, aniônicos ou neutros e colesterol, que encerra um núcleo aquoso. O colesterol é uma biomolécula importante para a função da membrana celular devido à sua capacidade de controlar a fluidez da membrana lipídica, sendo frequentemente adicionado aos lipossomas fosfolipídicos para melhorar a estabilização (ARAMAKI *et al.*, 2016).

Os lipossomas oferecem várias vantagens como sistemas de administração para via ocular, como biodisponibilidade e estabilidade aprimoradas dos medicamentos incorporados, liberação direcionada e controlada e redução dos efeitos colaterais dos medicamentos (FATHALLA; SOLIMAN; FOAUD, 2015). Tanto a bicamada lipídica quanto o espaço aquoso podem incorporar compostos hidrofóbicos ou hidrofílicos, respectivamente.

Em particular, demonstrou-se que a eficácia dos lipossomas na administração ocular de fármacos depende de vários fatores, mas principalmente da carga superficial lipossômica, uma propriedade que foi relatada como um determinante importante na retenção pré-córnea de vesículas (CALVO; VILA-JATO; ALONSO, 1997).

Zhao *et al.* (2015) usaram solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo lipossomas formados por dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) para aumentar a solubilidade dos compostos de esterol e imitar a condição dos esteróis nas membranas celulares. O Lanosterol, mas não o colesterol, dissolveu com sucesso as proteínas cristalinas agregadas das fibrilas do tipo amiloide de uma maneira dependente da concentração.

Wang *et al.* (2011) também exploraram o uso de lipossomas revestidos com N-trimetil quitosana (TMC) para entregar a coenzima Q 10 às células epiteliais da lente humana para proteger contra danos oxidativos. As cadeias de quitosana foram modificadas para o derivado quaternizado TMC para superar problemas como a precipitação de quitosana a pH neutro.

Este estudo também demonstrou que os lipossomas revestidos com TMC exibiram excelente permeação da córnea, aumentando o coeficiente de permeabilidade em mais de duas vezes em comparação com os valores obtidos em um estudo de controle (WANG *et al.*, 2011).

As formulações lipossômicas revestidas com quitosana que encapsulam uma combinação de fármacos, lanosterol e hesperidina foram preparadas e caracterizadas. A principal diferença entre os lipossomas combinatórios revestidos com quitosana e não revestidos é a liberação de fármacos, conforme indicado pelos estudos de liberação *in vitro* (HUANG; LI; MUHEMAITIA, 2019).

A liberação lenta e sustentada dos fármacos revestidos com quitosana, em comparação com a rápida liberação dos não revestidos, indica um aumento do tempo de retenção dos fármacos combinatórios na córnea. Isto leva a um atraso na progressão da catarata, como visto em estudos *in vivo* (HUANG; LI; MUHEMAITIA, 2019).

A poli (L-lisina), um polímero catiônico, e lipossomas modificados abaixo de 100 nm foram administrados como colírios para atingir a retina. Comprovou-se que os lipossomas modificados aumentaram a penetração dos fármacos através das barreiras oculares no segmento anterior do olho (SASAKI *et al.*, 2013).

Tai *et al.* (2018) estudaram a relação entre as características das bicamadas esterol-fosfolípídicas e a estabilidade das vesículas. Lipossomas de soja e lecitina de gema de ovo

contendo colesterol, β -sitosterol e ergosterol foram preparados pelo método de hidratação-sonicação do filme lipídico.

A incorporação de colesterol, β -sitosterol ou ergosterol, respectivamente, levou a diferentes tamanhos de vesículas, estabilidade sérica e física e propriedades de membrana dos lipossomas em comparação com os brancos (TAI *et al.*, 2018).

Gallová *et al.* (2008) compararam a influência do esterol de mamífero, colesterol, e do esterol vegetal β -sitosterol nos parâmetros estruturais de bicamadas em vesículas unilamelares feitas de diacilfosfatidilcolinas monoinsaturadas. Verificou-se que ambos os esteróis aumentam a espessura da bicamada, onde o β -sitosterol pareceu ser mais eficaz que o colesterol (GALLOVÁ *et al.*, 2008).

Estudos relatam a incorporação de β -sitosterol nos lipossomas para avaliar diferentes atividades terapêuticas, como efeito quimiopreventivo nas metástases tumorais (IMANAKA *et al.*, 2008), efeito de aumento da penetração nas células HepG2 da linha celular humana de hepatoblastoma (KAWANO *et al.*, 2002) e como sistemas de administração de medicamentos para melhorar a absorção oral de insulina (CUI *et al.*, 2015).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

- Balança semi-analítica de prato único (SHIMADZU. Modelo UX420H, Quioto, Japão);
- Rotaevaporador (QUIMIS, Diadema - SP - Brasil);
- Lavadora Ultrassônica (MAXICLEAN, modelo USC-1600^a, SP - Brasil);
- Ultraturrax (IKA. Modelo T18 Basic, Campinas (Cambuí) – SP - Brasil);
- Estufa (QUIMIS, modelo Q316M4, Diadema - SP - Brasil);
- pHmetro (HANNA, modelo HI 221, São Paulo, Brasil);
- Espectrofotômetro UV-VIS (NIR VARIAN CARY 50, Estados Unidos);
- Espectrômetro RAMAN Infravermelho Modelo: Xplora Plus Marca: Horiba;
- Ultrafreezer (NUAIRE, modelo GLACIER -86°C, Plymouth, USA);
- Ultracentrífuga refrigerada (HITACHI, modelo HIMAC CR21GII, Tóquio, Japão);
- Liofilizador (TERRONI, modelo LD1500A, São Paulo, Brasil);
- Sistema ultrapurificador de água (MILLIPORE, Bedford, MA, Estados Unidos);
- Sistema de Osmose reversa (QUIMIS, Diadema - SP - Brasil);
- Analisador de potencial zeta, peso molecular e tamanho de partícula ZETASIZER NANO SERIES (MALVERN, modelo NANO ZS90, Reino Unido);
- Metalizador (QUORUM TECHNOLOGIES, modelo SC7620 Mini Sputter Coater, , Londres, Reino Unido);
- Microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo FEG-SEM (TESCAN, modelo MYRA3, República Tcheca);
- Cabine de fluxo laminar (VECO, Campinas, Brasil);
- Estufa incubadora ISOTEMP (FISHER SCIENTIFIC, Estados Unidos);
- Microscópio Digital Portátil Usb2.0 1000x Eletrônico (China).

4.2 REAGENTES E SOLVENTES

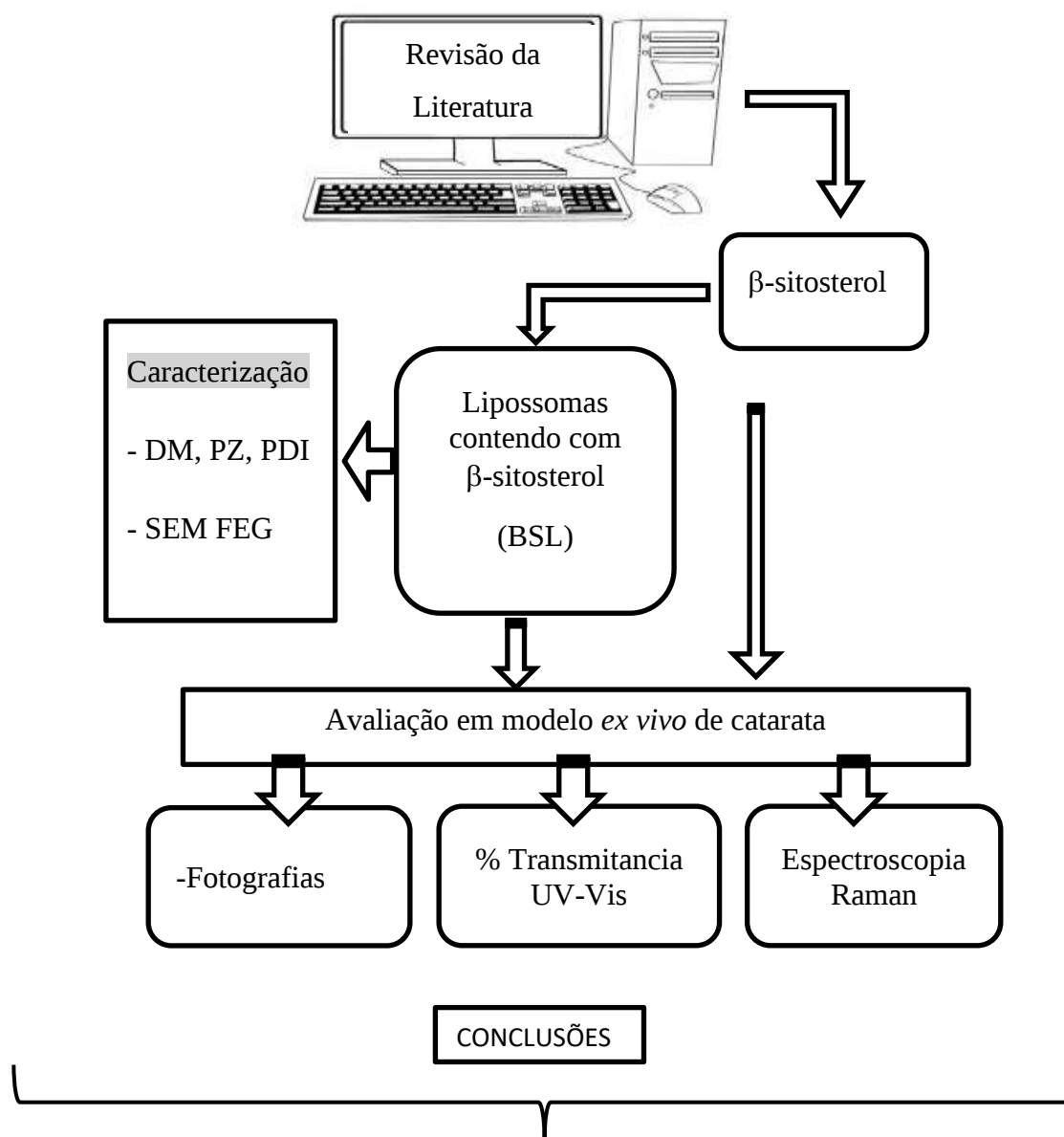
- Colesterol 94 % (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- Clorofórmio P.A. ACS 99.8% (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, Estados Unidos);

- β -sitosterol, obtido a partir de *Monteverdia gonoclada* (Mart.) Biral (Celastraceae), pela professora Cássia Magalhaes (Núcleo de Estudos de Plantas Medicinais NEPLAM do departamento de Química – Universidade Federal de Minas Gerais);
- Água purificada Milli-Q (MILLIPORE, Bedford, MA, Estados Unidos);
- L- α -Fosfatidilcolina $\geq 99\%$ de gema de ovo (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- Cloreto de Sódio P.A. (BIOTEC, Brasil);
- Clorofórmio P.A. ACS 99,8% (VETEC);
- Etanol P.A. (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil);
- Solução tampão fosfato 0,1 M;
- Selenito de sódio BioReagent, adequado para cultura de células, $\geq 98\%$ (SIGMA-ALDRICH);
- Meio de Eagles Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado com 20% de soro bovino fetal, 100 ug/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina.
- OUTROS MATERIAIS:
- Seringas 3, 5, 10 e 20 mL;
- Agulha hipodérmica Gris 27G (0.4 mm) 5/8" (BD);
- Papel filtro qualitativo tamanho de poro 14 μm (QUALY);
- Filtro de seringa tamanho de poro 0,22 μm K18-230 (KASVI);
- Frasco coletor universal (J.PROLAB);
- Tubos FALCON de 15 e 50 mL;
- Tubos de EPPENDORF 2 mL;
- Equipamento cirúrgico de aço inoxidável;
- Placas de cultura de plástico Falcon (24, 48 e 96 poços).

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

As etapas do trabalho foram resumidas no fluxograma ilustrado na Figura 10.

Figura 10 - Fluxograma das etapas experimentais do estudo



Fonte: O autor (2021)

4.4 MÉTODOS

4.4.1 Preparação dos lipossomas contendo com β -sitosterol

Os lipossomas contendo com β -Sitosterol (BSL) foram preparados usando o método de evaporação de fase reversa (SZOKA; PAPAHAADJOPOULOS, 1978). Suspensões de lipossomas (0,9 mg/mL) foram preparadas usando L- α -fosfatidilcolina (PC) e β -sitosterol na relação molar de 4:1. Assim, os lipídios foram dissolvidos em 5 mL de clorofórmio, constituindo a fase orgânica. Esta foi adicionada lentamente com o auxílio de uma seringa acoplada a uma agulha na fase aquosa (proporção 1:10 v/v) (LOW *et al.*, 2013), em banho ultrassônico (frequência de 40 kHz e potência de 135 Watts), por 15 min. Posteriormente a suspensão foi evaporada em evaporador rotativo a 55°C, sob vácuo, formando um organogel (EID; AZZAZY, 2014; MERTINS, 2004).

Em seguida, este organogel foi reconstituído com água até o volume inicial e sonicada no banho ultrassônico por 15 minutos, formando as vesículas lipossômicas. Esta suspensão foi filtrada em filtro 0,22 μ m para remover agregados lipídicos. A suspensão foi liofilizada e armazenada a 4 °C até utilização posterior para estudos de cataratogênese *ex vivo*.

Para a síntese de lipossomas vazios (LIP) foram seguidos os procedimentos mencionados anteriormente, substituindo o β -Sitosterol por colesterol.

4.4.2 Caracterização do BSL

4.4.2.1 Análise do Potencial Zeta, Índice de Polidispersão e Diâmetro Médio

O tamanho e índice de polidispersão foram determinados por espalhamento dinâmico de luz ZETASIZER NANO SERIES (MALVERN Instruments, model NANO ZS90), com um ângulo de detecção de 90° a 25°C. Para as amostras liofilizadas, os lipossomas foram ressuspensos em água deionizada antes das medições. As amostras também foram diluídas da mesma maneira para a análise do potencial zeta.

4.4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura com Efeito de Campo (SEM-FEG)

A avaliação morfológica e superficial do BSL foi realizada utilizando um microscópio eletrônico de varredura MYRA 3 LMH (Tescan) com emissão em campo. Uma quantidade de 10 μ L das suspensões de BSL foi adicionada ao porta-amostras e seca em estufa a 36 °C durante 24 h. As amostras foram metalizadas com ouro usando um mini revestidor de aspersão SC7620 e as micrografias foram obtidas após a visualização das amostras usando tensões de aceleração entre 10 e 25 kV.

4.4.3 Animais

Ratos fêmeas Wistar de grupos controle de diferentes experimentos com córneas e lentes normais foram utilizados nesses experimentos. Todos os animais foram adquiridos, mantidos e utilizados de acordo com a Comissão de ética do uso de animal da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Brasil (Anexo).

4.4.4 Preparo das lentes para estudo *ex vivo*

As lentes foram cuidadosamente retiradas, fazendo um corte na córnea, removendo-a e pressionando o globo ocular até a saída da lente. Qualquer lesão na lente, particularmente uma perfuração, resultará na produção de uma catarata (SHOCH, 1962). As lentes assim obtidas foram colocadas em cada poço de uma placa de 24 poços contendo solução salina balanceada estéril (BSS), a uma temperatura entre 25 e 37°C, para evitar catarata decorrente da separação de fases das γ -cristalinas a baixa temperatura. Em seguida, as lentes foram observadas com o auxílio de um microscópio digital, em um fundo escuro, para observar a integridade das lentes (ARTIGAS; NAVEA; LÓPEZ-MURCIA, 2014; BLOEMENDAL *et al.*, 2004; SIVAK; STUART; WEERHEIM, 1992).

As lentes depositadas nos recipientes de amostra foram lavadas suavemente com BSS, cada lente isolada foi colocada em uma placa de cultura (24 poços) contendo 2 mL de Meio Eagles Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100 μ g/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina (GUPTA *et al.*, 2010a, 2010b; ROOBAN *et al.*, 2012). As lentes foram incubadas a 37°C sob 90% de umidade, 95% de ar e 5% de atmosfera de gás CO₂ por 24 h (GUPTA *et al.*, 2010b).

A morfologia da catarata foi avaliada em fotografia realizada em fundo escuro, para evitar o uso de lentes danificadas. Após esta primeira cultura considerou-se o tempo zero. As fotografias foram registradas e análises espectroscópicas realizadas. As lentes foram lavadas

novamente com BSS estéril em câmara de fluxo laminar antes da cultura e indução da catarata com selenito de sódio (DOGANAY *et al.*, 2006).

4.4.5 Preparo das lentes para formação da catarata

A avaliação terapêutica da atividade anticataratogênica do BSL foi realizada em modelo de cultura de órgãos de lente *ex vivo* com suplementação de selenito de sódio.

As lentes foram cultivadas em placas de 24 poços, cada poço foi preenchido com 2 mL de meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS), 100 U/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina, com e sem selenito de sódio 100 μ M (GUPTA *et al.*, 2010a, 2010b; MURALIDHARAN *et al.*, 2015; ROOBAN *et al.*, 2012). Lentes transparentes foram selecionadas e divididas aleatoriamente em quatro grupos de cultura (Tabela 3).

Tabela 3 - Classificação dos grupos de tratamento estudados

GRUPO	CONTEÚDO
Controle	DMEM (normal [controle])
CAT	DMEM + Selenito de Sódio 100 μ M
LIP	DMEM + Selenito de Sódio 100 μ M + solução de LIP
BSL	DMEM + Selenito de Sódio 100 μ M + solução de BSL (β -Sitosterol 100 μ M)

Fonte: O Autor (2019).

As lentes foram, então, incubadas em estufa a 5% de CO₂ e 37°C, por 96 h. Cada poço foi reabastecido com o respectivo tratamento a cada 24 h.

Os grupos tratados com LIP e BSL foram adicionados em conjunto com o meio DMEM e selenito de sódio na concentração correspondente a cada grupo, em seguida agitados em ultraturrax (IKA T24) a 10.000 rpm, colocados em um banho ultrasom por 10 min e filtrados em filtro de seringa 0,22 μ m; procedimento realizado em câmara de fluxo laminar.

4.4.6 Avaliação da morfologia da catarata por microscopia digital

A morfologia da catarata foi avaliada por microscópio digital, em fundo escuro. As fotografias foram digitalizadas para avaliação morfológica e comprovação da integridade das lentes.

4.4.7 Porcentagem de Transmitância

Para determinar a transmitância espectral, a lente foi medida independentemente. A transmitância espectral das lentes foi medida usando um espectrômetro NIR VARIAN CARY 50 UV/VIS, com uma faixa espectral de 200-800 nm.

As lentes foram colocadas no porta-amostra, o qual foi projetado e adaptado especialmente para colocar a amostra (lente) diretamente na frente e cobrindo o orifício de entrada completo da esfera de integração do espectrofotômetro (Figura 11).

O ar foi tomado como referência para medir a transmitância, isto significa que o espectro de referência era simplesmente o resultado da luz atravessando o porta-amostra vazio, que é efetivamente a linha de base de transmissão de 100%. As medições correspondem à transmissão total do cristalino. O feixe de UV irradiou toda a superfície anterior da lente.

Figura 11 - Suporte de lente para análise de porcentagem de transmitância



Fonte: O autor (2018).

4.4.8 Análise por Espectroscopia de Raman

Os espectros Raman de lentes antes e após a indução da catarata foram obtidos utilizando um Espectrômetro RAMAN Infravermelho Modelo: Xplora Plus Marca: Horiba. O comprimento de onda de excitação a 785 nm foi fornecido pelo laser de íons de argônio 35 mW. A calibração de frequência foi realizada medindo o espectro Raman do Silício. Todos os espectros foram registrados a uma velocidade de varredura de 25-100 $\text{cm}^{-1}.\text{min}^{-1}$ com largura de fenda espectral de 7 cm^{-1} . A calibração de frequência foi realizada medindo o espectro Raman do indeno. As regiões espectrais medidas foram 1800-400 cm^{-1} (PALUSZKIEWICZ *et al.*, 2016).

Para as medições dos espectros de Raman, a lente foi colocada no fundo de cubeta cheia com a solução salina. O feixe de laser foi introduzido a partir do fundo da cubeta e focado em um centro do núcleo da lente (MIZUNO *et al.*, 1987). A luz difusa do centro foi coletada a 90° do feixe incidente. Os espectros Raman foram medidos pelo menos em triplicata. A razão de intensidade de duas bandas Raman foi calculada comparando suas alturas de pico (OZAKI *et al.*, 1987).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

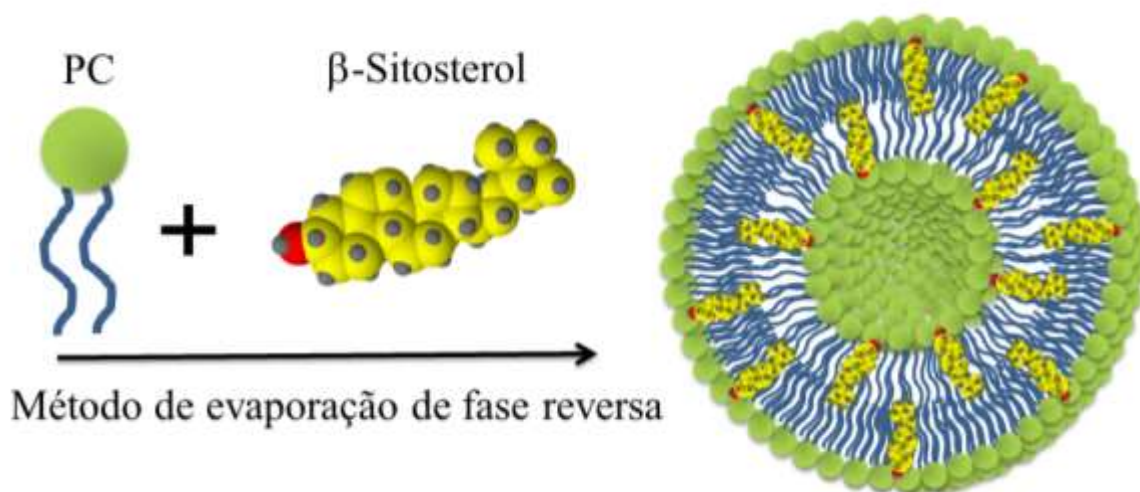
Os dados obtidos foram analisados estatisticamente e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. A significância das diferenças entre os grupos foi avaliada usando ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey ou teste de Dunnett (HERUYE *et al.*, 2019). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,01$. Todos os testes foram realizados nos programas Origin 8.6 (OriginLab Corp., MA, USA) e BIOSTAT 5.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BSL

A técnica de produção dos BSLs mostrou-se de fácil execução, resultando em soluções homogêneas e sem precipitação após a filtração. Esta homogeneidade indicou que o β -sitosterol, que é insolúvel em água, foi encapsulado dentro da bicamada lipídica do lipossoma (Figura 12).

Figura 12 - Síntese de BSL a partir de α -fosfatidilcolina (PC) e β -sitosterol



Fonte: O autor (2021).

Os resultados obtidos para os lipossomas carregados com β -sitosterol (BSL) estão apresentados na Tabela 4. O DM foi de 183,90, PDI de 0,319 e PZ de -31,25 mV. As vesículas apresentaram formato esférico ou elipsoidal e podem ser observadas na Figura 13.

O tamanho dos lipossomas observado nas imagens, de aproximadamente 155 nm até 200 nm, foram concordantes com os valores obtidos na análise de tamanho pela técnica do espalhamento dinâmico de luz (Tabela 4).

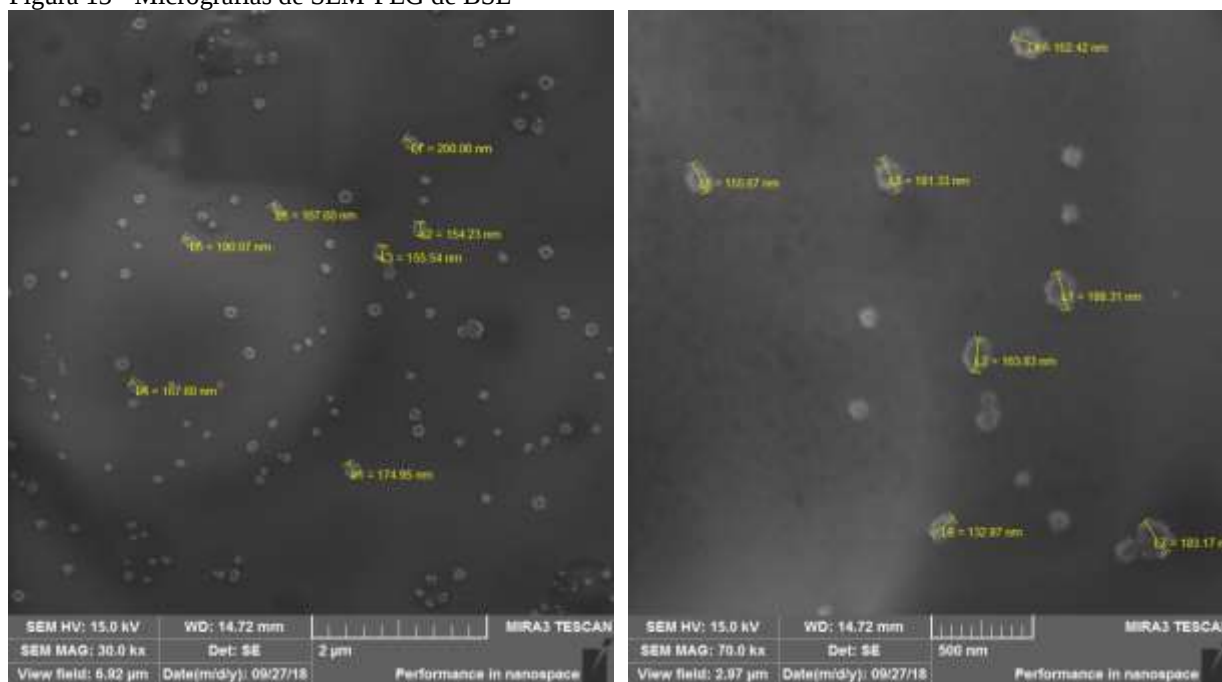
Tabela 4 - Distribuição de DM, PDI e PZ do BSL

	DM (nm) $\pm$ DP	PDI $\pm$ DP	PZ (mV) $\pm$ DP
BSL	183,90 $\pm$ 15,41	0,319 $\pm$ 0,01	-31,25 $\pm$ 0,63

Fonte: O autor (2018).

Outros autores obtiveram resultados de diâmetro médio próximos encapsulando β -sitosterol, tentando avaliar quimioprevenção de metástases tumorais (IMANAKA *et al.*, 2008) e como sistemas de liberação para melhorar a absorção oral de insulina (KAWANO *et al.*, 2002).

Figura 13 - Micrografias de SEM-FEG de BSL



Fonte: O autor (2018).

Maitani *et al.* (2001) desenvolveram lipossomas contendo β -sitosterol e doxorrubicina, usando o método de injeção de etanol modificado. Os tamanhos dos lipossomas foram 195,6-216,1 nm e o potencial zeta entre -20 e -30 mV, enquanto o PDI foi de 0,13 a 0,25 (MAITANI *et al.*, 2001).

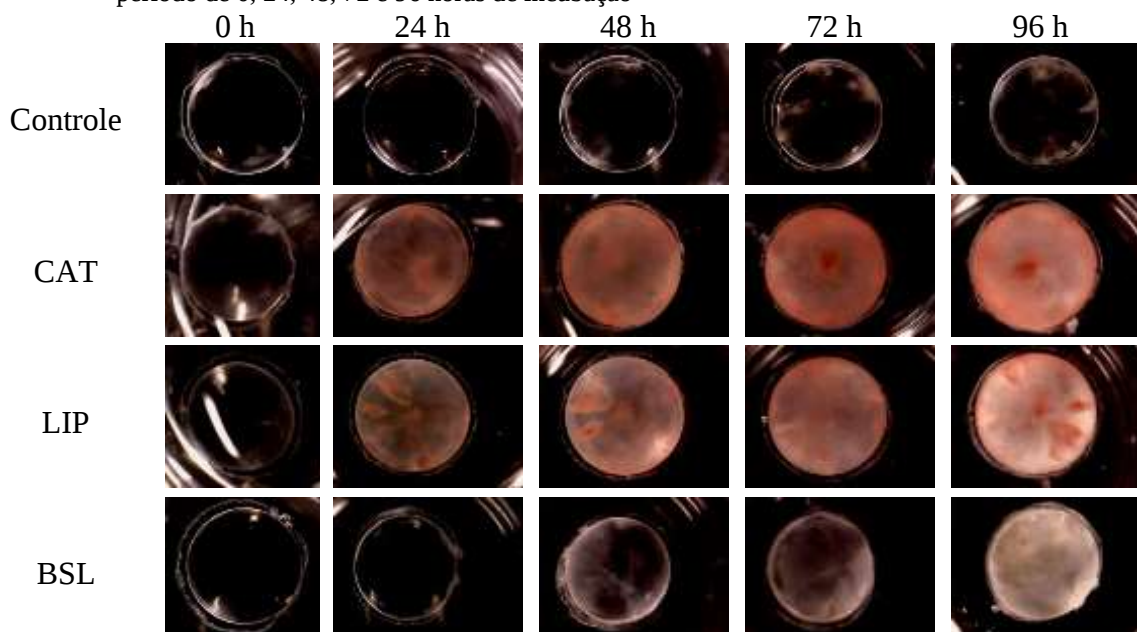
Da mesma forma, a inclusão de β -sitosterol ou substituição do colesterol na bicamada lipídica da membrana dos lipossomas foi relatada, onde o β -sitosterol parece ser mais eficaz que o colesterol para aumentar a espessura da bicamada (GALLOVÁ *et al.*, 2008, 2011) fazendo com que o lipossoma seja mais resistente aos fenômenos de fusão e deformação da membrana (TAI *et al.*, 2018).

5.2 ANÁLISE DE MODELO *EX VIVO* DE CATARATOGENESE

5.2.1 Avaliação da morfologia da catarata por microscopia digital

As imagens apresentadas na Figura 14 correspondem a antes (0 horas) e após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação. As lentes mantiveram sua integridade, portanto não houve ruptura da cápsula.

Figura 14 - Fotografia comparativa entre as lentes incubadas nos grupos Controle, CAT, LIP e BSL durante o período de 0, 24, 48, 72 e 96 horas de incubação



Fonte: O autor (2020).

Antes da incubação, as lentes eram incolores e opticamente transparentes. Isto foi possível devido à temperatura de retirada da amostra. Segundo Bloemendal *et al.* (2004) é importante manter temperatura fisiológica para evitar a "catarata fria" devido à separação de fase das cristalinas em baixas temperaturas.

Todas as lentes não expostas ao selenito de sódio (grupo controle) se mantiveram transparentes por até 96 horas de incubação, enquanto todas as lentes expostas ao selenito de sódio desenvolveram opacidades em diversos graus em apenas 24 horas. Observou-se que a catarata inicia na região periférica, não nuclear; como foi relatado para o modelo do selenito de sódio (HESS; MITTON; BUNCE, 1996; THRIMAWITHANA *et al.*, 2018b).

Conforme pode ser observado na Figura 14 a concentração de selenito de sódio no grupo CAT gerou opacidade em apenas 24 horas. O mesmo foi observado no grupo LIP indicando que a estrutura básica de um lipossoma não interfere no desenvolvimento da catarata nas lentes incubadas em presença de selenito de sódio.

Já as lentes do grupo BSL tiveram retardo na geração da catarata, mantendo a transparência por até 48 horas, com leve formação de opacidade. Apesar de serem equivalentes em concentração de selenito de sódio, as lentes tratadas com BSL apresentaram menor opacidade que os grupos CAT e LIP, ficando evidente a ação do BSL no retardo da formação da catarata.

5.2.2 Avaliação da porcentagem de transmitância

Os resultados obtidos para a porcentagem de transmitância por espectroscopia UV-Vis estão ilustrados na Figura 15. Como pode ser observado, todas as lentes no tempo zero, na faixa de comprimento de onda entre 400 e 800 nm, apresentaram diminuição no fator de transmissão espectral médio, o que é característico de um cristalino saudável.

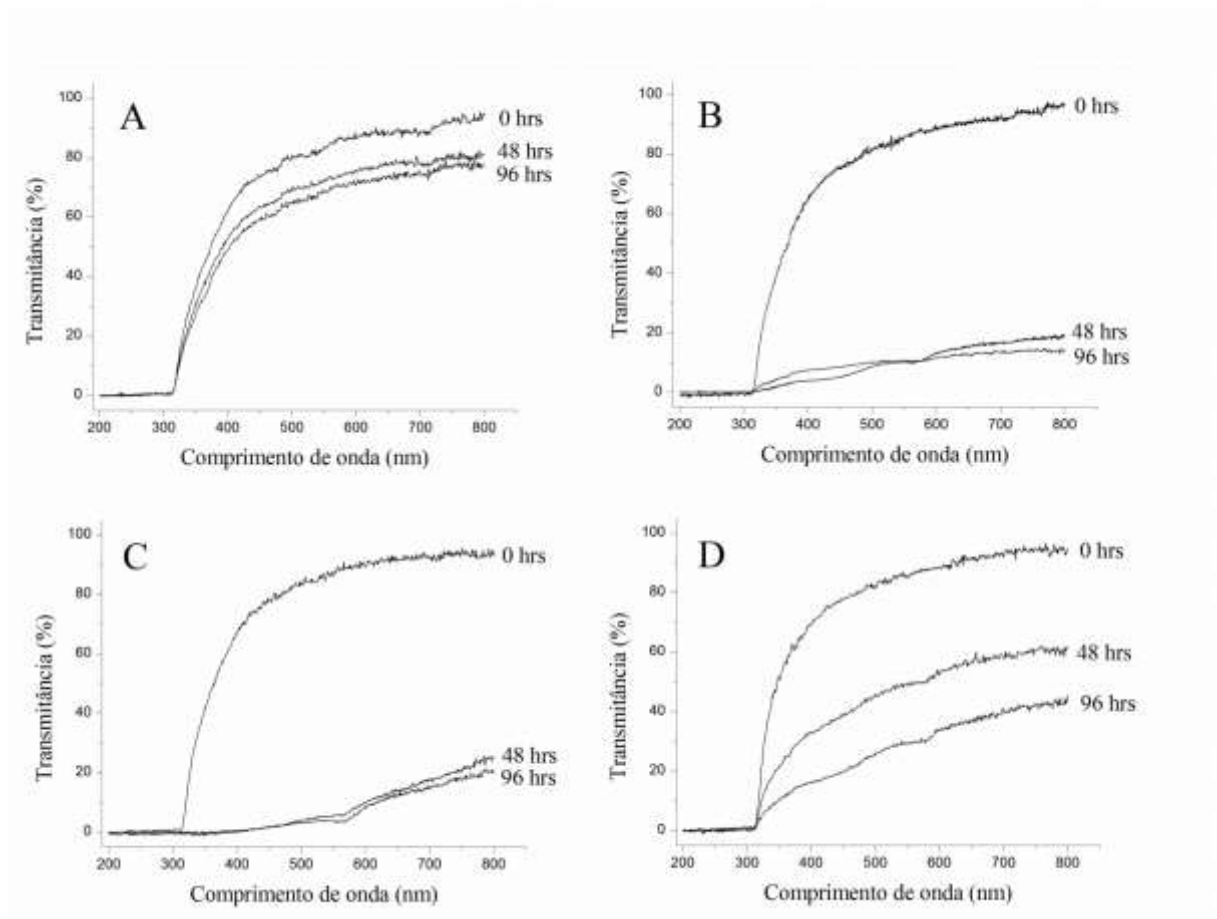
Estas diminuições nestas faixas e também para comprimentos de onda menores que 400 nm foram relatadas por outros autores, onde a porcentagem de transmissão começa a reduzir para valores muito baixos (BOETTNER; WOLTER, 1962). Isso porque a córnea e o cristalino realizam quase toda a absorção e têm curvas de absorbância/transmitância espectrais que bloqueiam a maioria dos UV-B e UV-A, respectivamente (TUKLER; BERGMANSON; WALSH, 2010).

O corte da transmitância de luz através da lente ocorre em aproximadamente 320 nm. Tukler *et al.* (2010). Estudos em ratos mostraram um corte de transmitância em aproximadamente 310 nm e aumento de porcentagem de transmitância a partir da região UV-A para as bandas de onda visíveis (GORGELS; VAN NORREN, 1992; TUKLER; BERGMANSON; WALSH, 2010).

Resultados similares foram encontrados em bovinos (DOVRAT; SIVAK, 2005). Para Artigas *et al.* (2014) transmitância em 315 nm pode ser considerado como o ponto de corte, uma vez que a transmissão é virtualmente zero (ARTIGAS; NAVEA; LÓPEZ-MURCIA, 2014).

Camundongos apresentam cortes no comprimento de onda mais baixos devido ao fato de que os roedores têm cones artificiais sensíveis à radiação ultravioleta que podem detectar até 300 nm (TUKLER; BERGMANSON; WALSH, 2010).

Figura 15 - Espectros de transmissão das lentes incubadas no grupo (A) controle, (B) CAT, (C) LIP e (D) BSL durante o período de 0, 48 e 96 horas de incubação



Fonte: O autor (2021).

A Figura 15 mostra como o espectro de transmissão da lente de rato sofreu variação quando é incubada com selenito de sódio 100 μ M. A principal diminuição na porcentagem de transmitância foi observada nos grupos CAT (Figura 15B) e LIP (Figura 15C).

A transmitância decresce totalmente em toda a região de luz visível, devido ao desenvolvimento da catarata e à elevada concentração de selenito de sódio após 48 horas de incubação. Este resultado está em concordância com as lentes fotografadas na Figura 14, onde as manchas brancas observadas correspondem a precipitados de proteínas, as quais espalham a luz que deveria ser transmitida.

No grupo BSL (Figura 15D) houve uma diminuição na região visível do espectro de forma retardada. Isto comprova que o β -sitosterol carregado em lipossoma (BSL) foi capaz de retardar a catarata após 48 horas de incubação e que a estrutura básica do lipossoma (PC e Colesterol), não interfere no resultado, como foi observado no grupo LIP.

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados da transmissão espectral média e o desvio padrão (DP) para sete comprimentos de onda e os quatro grupos selecionados.

Tabela 5 - Transmissão espectral média para sete comprimentos de onda selecionados

λ (nm)	Transmitância (%) $\pm$ DP após 48 horas (n=7)			
	Control	CAT	LIP	BSL
420	58.74 $\pm$ 11.98	7.74 $\pm$ 3.09	0.91 $\pm$ 0.56	35.26 $\pm$ 21.43
460	63.59 $\pm$ 12.49	8.79 $\pm$ 3.53	2.20 $\pm$ 0.95	40.01 $\pm$ 22.10
500	68.97 $\pm$ 13.23	10.10 $\pm$ 3.83	3.79 $\pm$ 1.92	45.68 $\pm$ 24.11
540	70.74 $\pm$ 14.14	10.50 $\pm$ 4.18	5.09 $\pm$ 2.30	48.76 $\pm$ 23.63
580	73.95 $\pm$ 14.77	10.60 $\pm$ 4.45	8.05 $\pm$ 2.68	49.57 $\pm$ 22.81
660	78.25 $\pm$ 14.85	13.26 $\pm$ 4.54	14.16 $\pm$ 6.15	56.90 $\pm$ 23.83
780	79.38 $\pm$ 13.93	13.90 $\pm$ 5.38	24.41 $\pm$ 9.34	58.86 $\pm$ 23.67

λ (nm)	Transmitância (%) $\pm$ DP após 96 horas (n=7)			
	Control	CAT	LIP	BSL
420	54.21 $\pm$ 7.73	4.20 $\pm$ 1.56	0.98 $\pm$ 0.65	17.92 $\pm$ 14.06
460	61.44 $\pm$ 8.48	5.62 $\pm$ 1.86	1.94 $\pm$ 0.79	21.81 $\pm$ 16.68
500	64.82 $\pm$ 9.13	8.67 $\pm$ 2.54	4.70 $\pm$ 3.03	25.23 $\pm$ 17.38
540	66.89 $\pm$ 8.74	9.93 $\pm$ 2.34	3.80 $\pm$ 1.65	28.96 $\pm$ 18.84
580	71.41 $\pm$ 10.24	10.95 $\pm$ 2.62	4.94 $\pm$ 2.84	30.34 $\pm$ 18.27
660	73.88 $\pm$ 9.53	15.67 $\pm$ 3.28	12.71 $\pm$ 6.51	37.00 $\pm$ 19.57
780	78.31 $\pm$ 13.10	18.06 $\pm$ 4.63	18.72 $\pm$ 9.26	44.34 $\pm$ 18.90

Fonte: O autor (2021).

* As diferenças entre os grupos são significativas para todos os comprimentos de onda ($p < 0,01$). As diferenças médias entre os grupos CAT e LIP não são significativas ao nível de 0,05 (teste post-hoc de Tukey).

Com base em Artigas *et al.* (2012) e Heruye *et al.* (2019), também foi avaliada a magnitude do declínio na transmitância em comprimentos de onda específicos (420, 460, 500, 540, 580, 660 e 780 nm) até 48 e 96 horas de incubação.

Não houve diferença significativa na transmissão espectral entre 48 e 96 horas de incubação no grupo controle. Pode se observar ainda que os valores médios do grupo controle são superiores aos dos demais grupos, indicando que essas lentes mantiveram a transmitância no espectro visível em 48 e 96 horas e exibiram uma maior clareza óptica.

Observação semelhante foi feita por Artigas *et al.* (2012) e Heruye *et al.* (2019) sobre o efeito do tempo na transmitância e opacificação da lente usando o modelo de cultura de lente. No entanto, nesses estudos houve uma diminuição significativa ($p < 0,001$), dependente do tempo, da transmitância ao longo de 120 horas, com uma perda correspondente de limpidez da lente (HERUYE *et al.*, 2019).

O rompimento das camadas de proteína pode levar a microinclusões à medida que a água migra lentamente para os locais da lesão. A irregularidade do índice de refração na área lesada pode dar origem às características de espalhamento das cataratas (THOMAS; SCHEPLER, 1980).

A maior redução na transmitância foi observada de forma consistente em áreas do espectro visível, principalmente em 420 nm, porque mudanças na transmitância de 420 nm são consideradas um indicador aceitável para o desenvolvimento de opacificação (HERUYE *et al.*, 2019).

Assim, considerando 420 nm como ponto de comparação do comprimento de onda, podemos observar que no BSL a transmitância da luz foi reduzida em $53,19\% \pm 27,77$ após 48 horas de incubação, enquanto as lentes incubadas em CAT reduziram em até $88,86\% \pm 4,68$ para o mesmo período de incubação.

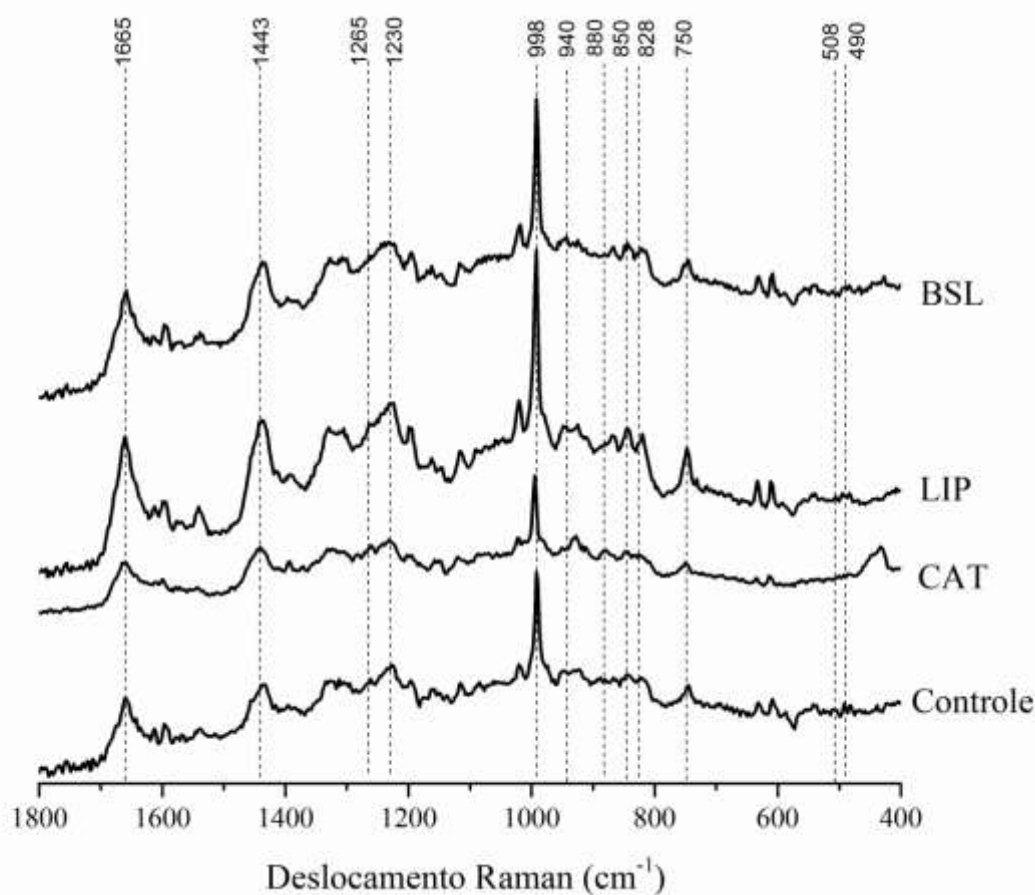
Após 96 horas, as lentes incubadas no grupo BSL reduziram a transmitância em $76,28\% \pm 18,46$, enquanto CAT desenvolveu uma opacificação quase total ($93,98\% \pm 2,31$) e impediu a passagem de luz pela lente. Evidenciando que o BSL retardou o processo de opacificação da lente.

A ANOVA *one-way* resultou para os grupos de estudo em uma diferença significativa ($p < 0,01$), e o teste de Dunnett mostrou que CAT, LIP e BSL eram diferentes do controle. Desta forma, pode-se afirmar que a presença de BSL foi diferente do grupo controle, no entanto, influenciou na amortização da queda na transmitância da luz produzida pelo selenito de sódio até 96 horas de incubação.

5.2.3 Avaliação por espectroscopia de Raman

Os espectros Raman na região de 1800-400 cm^{-1} das lentes após 96 horas de incubação estão apresentados na Figura 16. As posições das bandas Raman para todos os grupos, antes e após a incubação, são relativamente semelhantes. Essa região espectral tem uma aparência típica de um espectro Raman de proteínas, consistindo de características de Raman devido ao esqueleto peptídico das proteínas das lentes e àquelas decorrentes de várias cadeias laterais de aminoácidos (NAKAMURA *et al.*, 2000a).

Figura 16 - Espectros Raman na região de 1800~400 cm^{-1} de núcleos de lentes de ratos Wistar após 96 horas de incubação



Fonte: O autor (2019).

As linhas tracejadas (Figura 16) indicam as atribuições de pico consideradas para analisar as razões de intensidades Raman.

As avaliações espectroscópicas em cada estágio do desenvolvimento da catarata são baseadas na razão das intensidades Raman de picos relacionados ao mesmo grupo funcional

dos aminoácidos, ou seja, $I_{(\text{posição do pico 1})}/I_{(\text{posição do pico 2})}$, que indica as diferenças nas estruturas das proteínas ou o estado do aminoácidos constituintes (HUANG; CHEN, 2018).

Uma estrutura β predominante em todas as lentes foi identificada pelas bandas amida I e III observadas a 1665 e 1230 cm^{-1} , respectivamente. Em comparação, uma pequena banda α -helicoidal perto de 940 cm^{-1} foi vista em todos os espectros (GHAHRAMANI *et al.*, 2020; NAKAMURA *et al.*, 2000b). O padrão espectral de amida I e amida III observado sugere que as proteínas das lentes investigadas estão principalmente na conformação de folha- β (PALUSZKIEWICZ *et al.*, 2016).

A razão dos sinais Raman dos quatro grupos de lentes após 96 horas de incubação foi avaliada e expressa na Tabela 6. A intensidade relativa das bandas Raman foi calculada a partir da altura de seus picos.

Tabela 6 - Os valores médios para a razão de intensidade relativa das principais bandas Raman observados em lentes após 96 horas de cultura

	Razão de intensidades Raman $\pm$ DP após 96 horas (n=9)			
	Control	CAT	LIP	BSL
I_{940}/I_{998} (α -hélice)	0.67 ± 0.07	0.68 ± 0.08	0.65 ± 0.12	0.71 ± 0.05
I_{1230}/I_{998} (amida III)	0.68 ± 0.05	0.65 ± 0.04	0.67 ± 0.10	0.69 ± 0.04
I_{850}/I_{828} (dubleto tirosina)	1.03 ± 0.02	1.03 ± 0.04	1.01 ± 0.03	1.00 ± 0.02
I_{880}/I_{750} (triptofano)	1.13 ± 0.05^a	1.18 ± 0.03^a	1.13 ± 0.07^a	1.04 ± 0.02^a
I_{508}/I_{490} (dissulfeto)	0.97 ± 0.03	0.96 ± 0.02	0.97 ± 0.02	0.98 ± 0.01
I_{998}/I_{750} (triptofano)	1.83 ± 0.22^b	1.98 ± 0.17^b	1.92 ± 0.23^b	1.57 ± 0.08^b
I_{1265}/I_{1443} (α -hélice)	1.06 ± 0.07	1.00 ± 0.05	1.09 ± 0.23	1.03 ± 0.04
I_{1665}/I_{1443} (folha- β)	0.94 ± 0.06^c	0.84 ± 0.03^c	0.89 ± 0.08^c	0.89 ± 0.02^c
I_{750}/I_{1443} (triptofano)	0.94 ± 0.11^d	0.83 ± 0.04^d	0.92 ± 0.16^d	1.02 ± 0.03^d

^{a,b,c,d} Os valores médios para a razão de intensidade relativa são significativamente diferentes.

Fonte: O autro (2021).

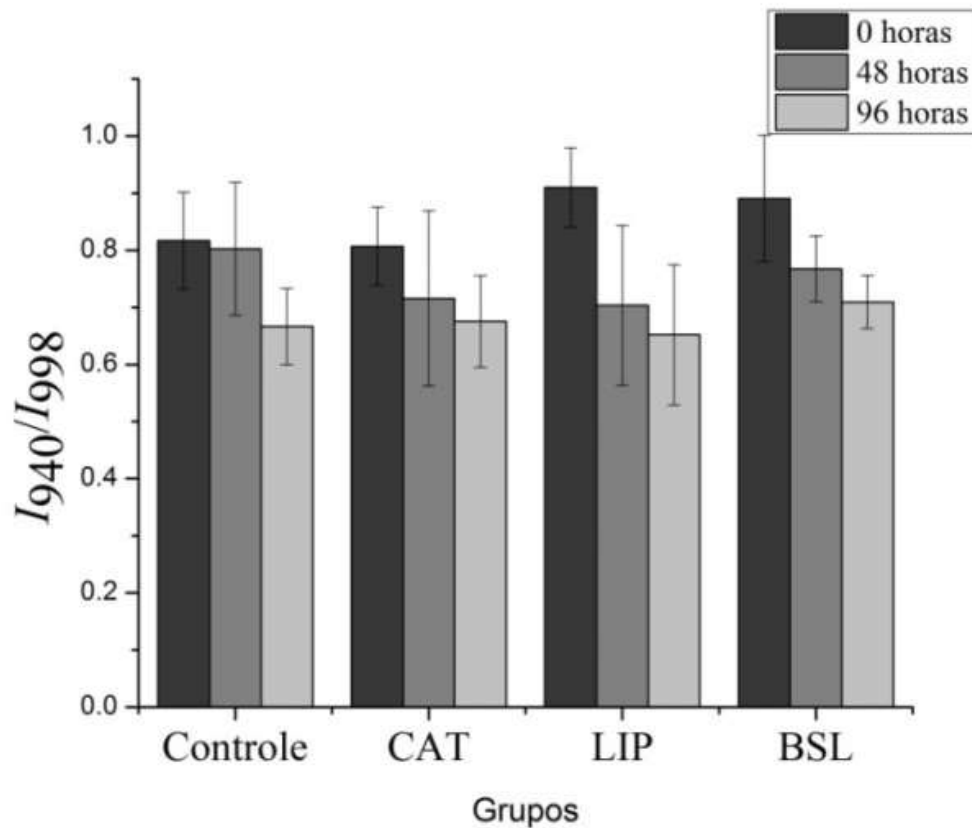
Usando a banda em 998 cm^{-1} como um padrão de intensidade, foi calculada a intensidade relativa da vibração de alongamento C-C em 940 cm^{-1} (I_{940} / I_{998}) e a da amida III (I_{1230} / I_{998}) (NAKAMURA *et al.*, 2000b).

Não houve diferença estatística entre os grupos após 96 horas de incubação, embora todas as lentes em cada grupo tenham mostrado um declínio nessas duas razões de intensidades durante o período de incubação (Figura 17 e Figura 18).

Isto mostra que houveram mudanças significativas na conformação da estrutura peptídica e no conteúdo helicoidal conforme a incubação foi mais longa. E essa diminuição deve ser devido à perda da estrutura ou diminuição do conteúdo estruturas de α -hélice. Ou seja, α -cristalinas seriam mais afetadas quando são incubadas com selenito de sódio, porque

os grupos CAT, LIP e BSL apresentaram uma diminuição mais severa após 48 horas já que é um forte oxidante sulfidrílico (PATEL *et al.*, 2011).

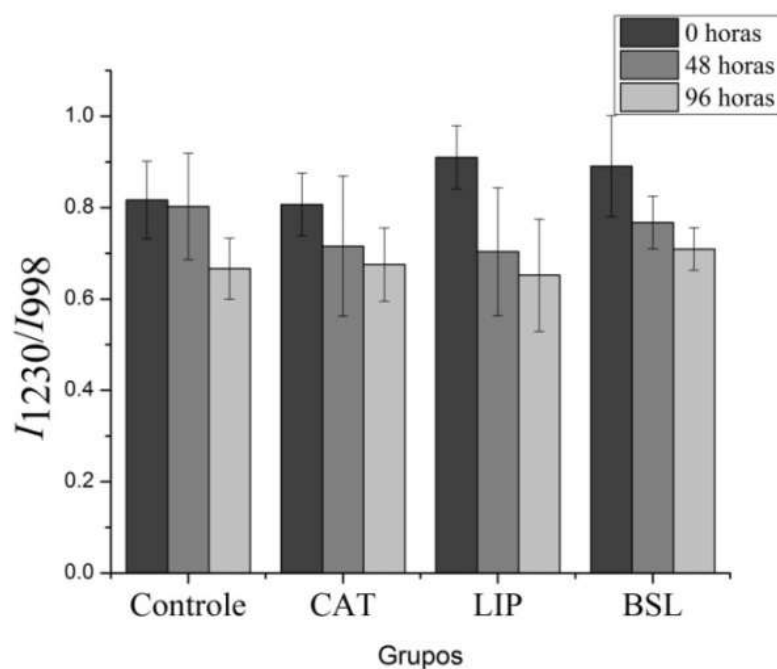
Figura 17 - Mudanças na razão de intensidades Raman I_{940} / I_{998} após o período de incubação



Fonte: O autor (2021).

O grupo controle teve diminuição na razão I_{940} / I_{998} só após 96 horas de incubação, o que estaria relacionado à deteriorização da lente. Todas as diminuições estariam associadas, principalmente, à redução do conteúdo de estruturas α -hélice e aumento de presença de conformação de folha- β (NAKAMURA *et al.*, 2000b). No estágio maduro da catarata, o sinal de Raman da folha- β é um bom indicador (HUANG; CHEN, 2018).

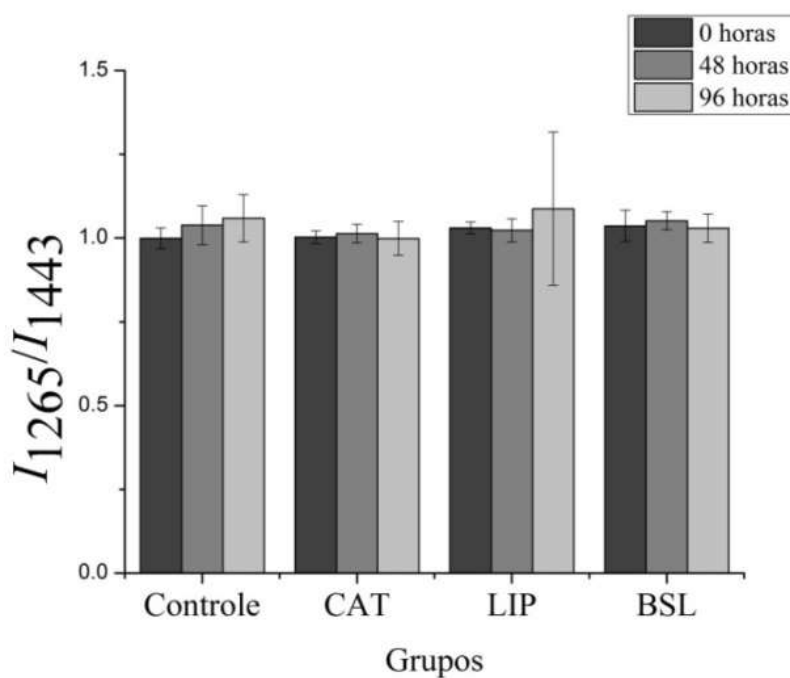
Figura 18 - Mudanças na razão de intensidades Raman I_{1230} / I_{998} após o período de incubação



Fonte: O autor (2021).

Um outro indicador da estrutura α -hélice (I_{1265} / I_{1443}) das lentes entre os quatro grupos não mostrou diferença durante o aumento do tempo de incubação (Figura 19).

Figura 19 - Mudanças na razão de intensidades Raman I_{1265} / I_{1443} após o período de incubação

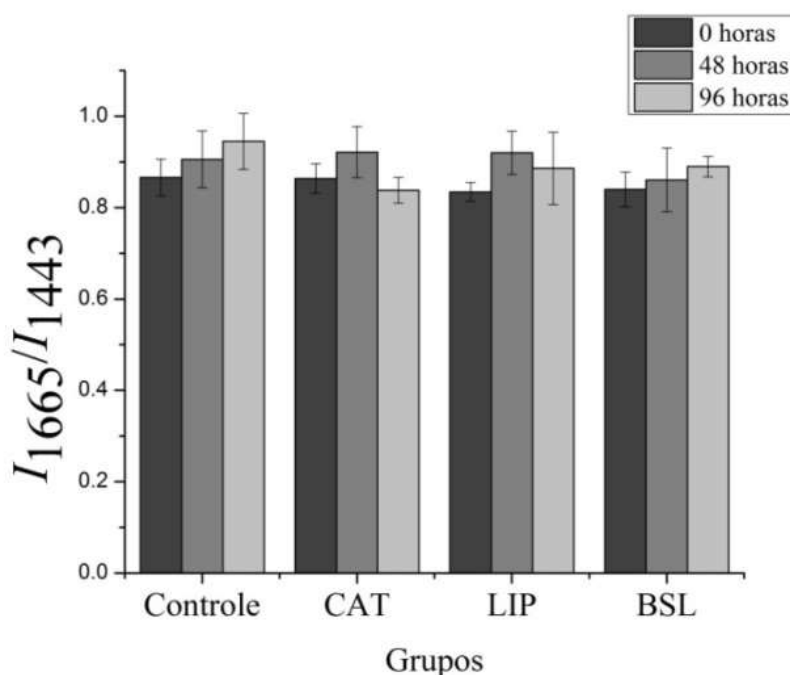


Fonte: O autor (2021).

As proporções da conformação de folha- β (I_{1665} / I_{1443}) nos grupos CAT, LIP e BSL foram menores do que a proporção no grupo Controle após 96 horas de incubação (Tabela 6). As lentes CAT e LIP mostraram uma proporção aumentada após 48 horas, porém, após 96 horas ambas diminuíram.

No entanto, a razão de intensidades referentes a folha- β dos grupos Controle e BSL (I_{1665} / I_{1443}) aumentou de forma semelhante após 48 e 96 horas de incubação (Figura 20).

Figura 20 - Mudanças na razão de intensidades Raman I_{1665} / I_{1443} após o período de incubação



Fonte: O autor (2021).

Este aumento está relacionado ao desenvolvimento das cataratas corticais (HUANG; CHEN, 2018), aonde a opacidade começa na região periférica como foi visto nas imagens das lentes após 96 horas de incubação (figura 14).

O selenito de sódio é um oxidante forte e é considerado um modelo para as cataratas causadas por estresse oxidativo (PATEL *et al.*, 2011). Assim, a catarata selenítica parece ser dominada por precipitação proteolítica induzida por calpaína rápida e pode ocorrer uma desnaturação ou desdobramento da cadeia peptídica que expõe os grupos SH à oxidação (DOGANAY *et al.*, 2006).

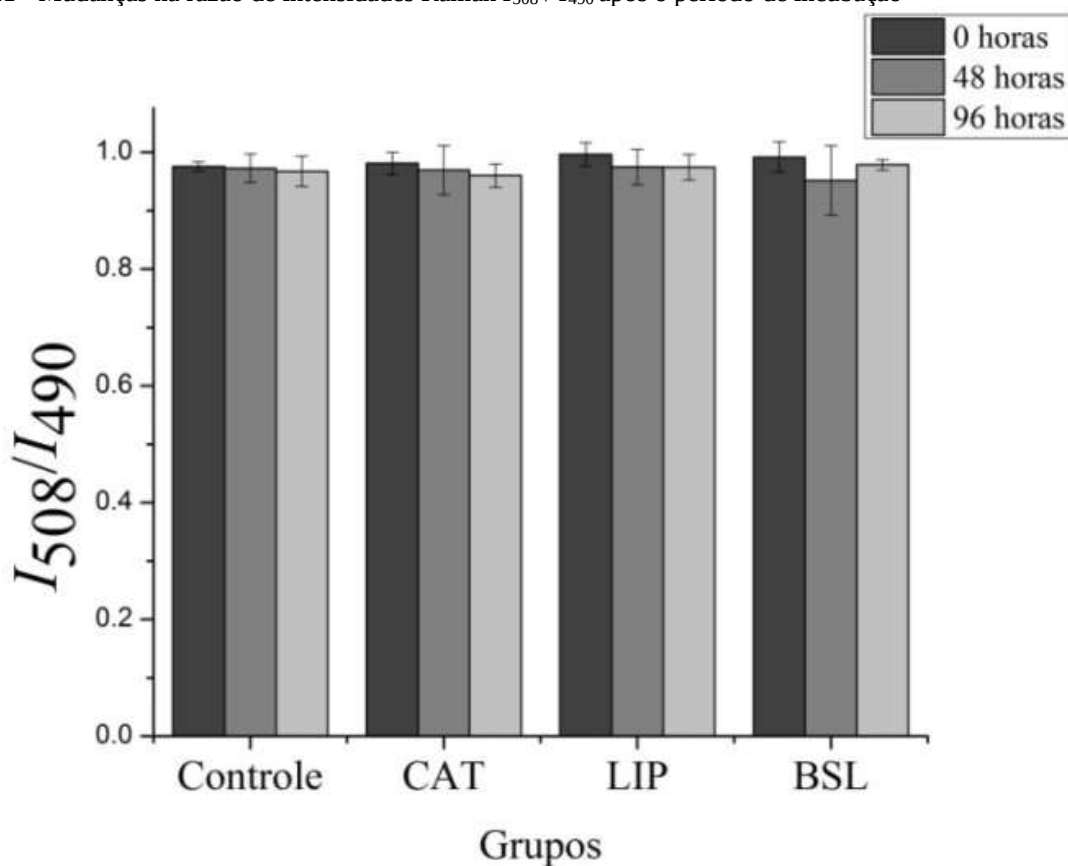
As mudanças que levam à opacificação do cristalino parecem envolver a rápida formação de grandes agregados de proteínas imóveis sem mudanças significativas na estrutura secundária, e em seguida, um rápido aumento em uma fração de água ligada associada a

grandes agregados de proteínas, sem a formação de ligações dissulfeto intra e intermoleculares (NAKAMURA *et al.*, 2000a).

Por outro lado, Doganay *et al.* (2006) relataram que a catarata de selenito não mostra agregados covalentes de alto peso molecular ou aumento da formação de dissulfeto.

No presente trabalho de modelo da catarata induzida por selenito de sódio, não foram observadas diferenças na razão de intensidade de I_{508} / I_{490} entre os grupos ou períodos de incubação (Figura 21), isto significa que não aconteceu uma perda de compostos sulfidrílicos (ZIGMAN *et al.*, 1991) e que o dissulfetos mistos de tiol não mostraram diferenças neste experimento.

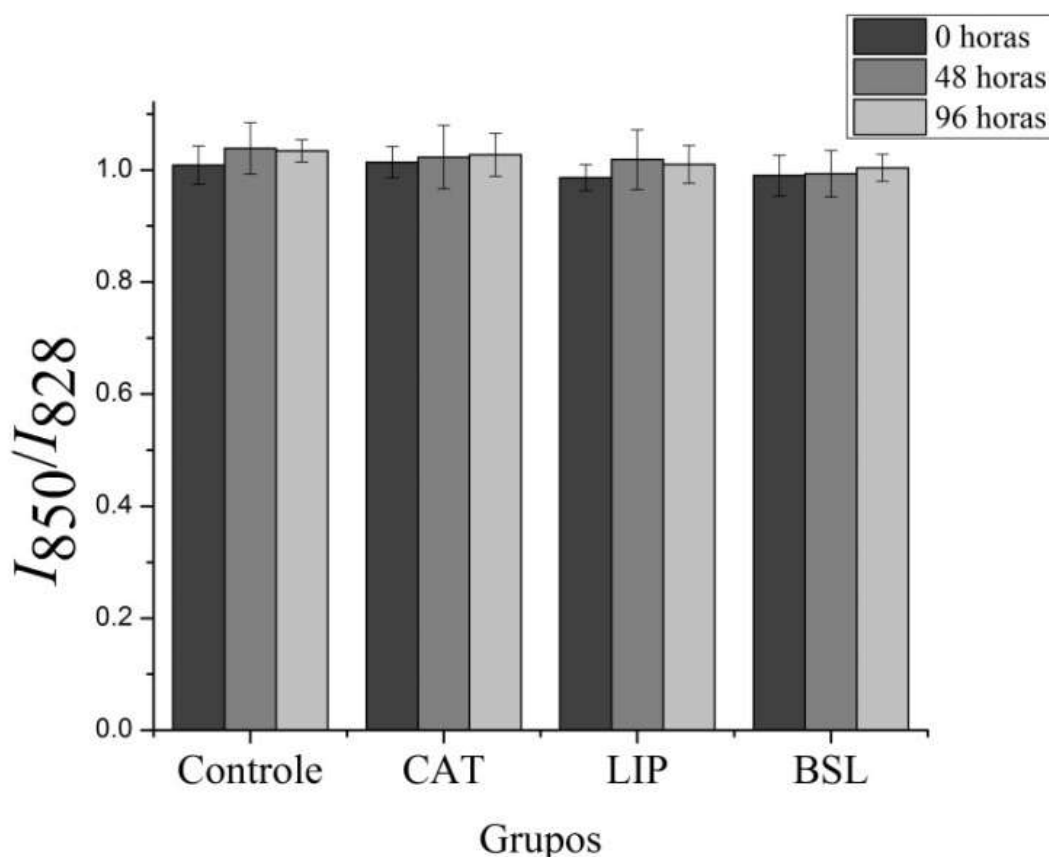
Figura 21 - Mudanças na razão de intensidades Raman I_{508} / I_{490} após o período de incubação



Fonte: O autor (2021).

As bandas em 828 cm^{-1} e 850 cm^{-1} , devido aos resíduos de tirosina em todos os grupos e entre os períodos de incubação (Figura 22), não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Figura 22 - Mudanças na razão de intensidades Raman I_{850} / I_{828} após o período de incubação



Fonte: O autor (2021).

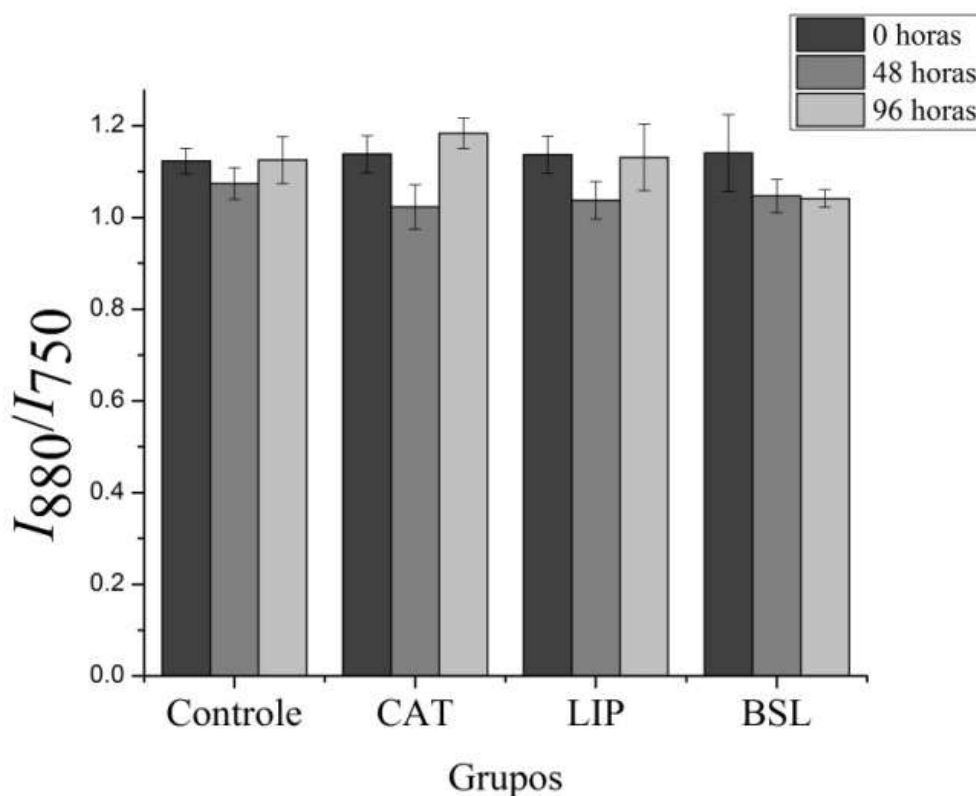
Mudanças nos microambientes de resíduos de tirosina (Tyr) em proteínas do cristalino podem ser avaliadas a partir da razão de intensidade de I_{850} / I_{828} (PALUSZKIEWICZ *et al.*, 2016; THOMAS; SCHEPLER, 1980).

Foi relatado que em todos os tipos da catarata examinados, a proporção do duplete de Tyr, $I_{832}:I_{858}$, sempre aumenta com a formação da catarata. Em outras palavras, a agregação de proteínas na cataratogênese é sempre acompanhada pelo fortalecimento da ligação de hidrogênio na hidroxila fenólica no resíduo de tirosina, que também é sensível à alteração proporcionada pela formação da catarata (CAI, 1989; OZAKI *et al.*, 1987).

Além disso, um aumento na razão I_{857} / I_{833} indica que os resíduos de tirosina se tornam hidrofóbicos devido à separação da fase proteína-água na lente opacificada (HUANG; CHEN, 2018).

A opacificação da lente por catarata causa mudanças na razão de intensidade das bandas Raman em 880 cm^{-1} e 750 cm^{-1} devido aos resíduos de triptofano (Figura 23).

Figura 23 - Mudanças na razão de intensidades Raman I_{880} / I_{750} após o período de incubação



Fonte: O autor (2021).

A banda Raman fracamente intensificada em 880 cm^{-1} devido às vibrações do triptofano prova que a sua conformação está "exposta", ou seja, as bandas $-\text{OH}$ do anel benzeno do triptofano combinadas com H_2O (BERTOLUZZA *et al.*, 1986; SACHARZ *et al.*, 2016), que indicaram que, durante a opacificação da lente, o resíduo de triptofano muda de conformação "enterrada" para "exposta".

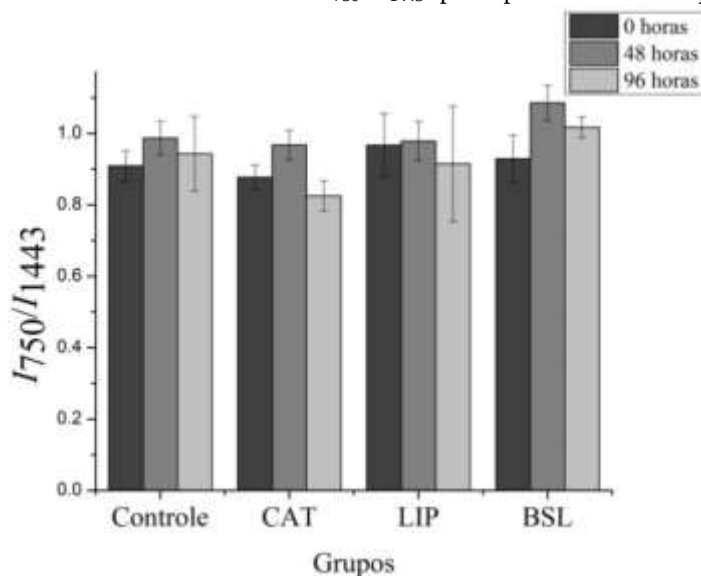
O grau dessas mudanças no resíduo de triptofano depende do tipo da catarata (NAKAMURA *et al.*, 2000b). No entanto, a incubação com selenito de sódio aumentou essa razão de intensidade em 96 horas em comparação com os outros grupos.

A razão de intensidade de resíduos de triptofano (I_{880} / I_{750}) no grupo BSL diminuiu após 48 horas, e a proporção tornou-se uma constante após 96 horas durante o período de incubação (Figura 23), indicando manutenção do estado do triptofano.

Outra intensidade Raman relacionada aos sinais de folha- β nas ligações Amida I e II é o aumento no triptofano (proporções de pico integrado I_{750} / I_{1443}) (ERCKENS *et al.*, 2001).

Não houve diferença significativa entre o grupo Controle e BSL após 96 horas de incubação ($p < 0,01$) (Tabela 6 e Figura 24), de acordo com o teste de Dunnet.

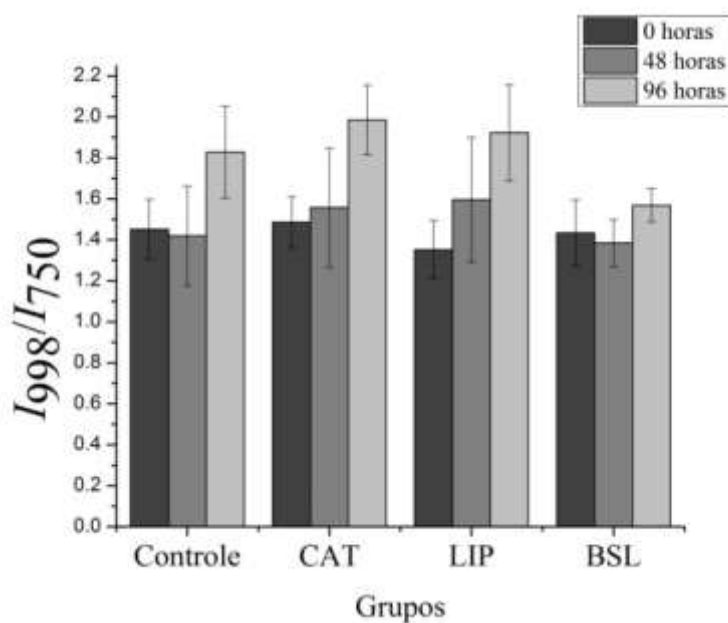
Figura 24 - Mudanças na razão de intensidades Raman I_{750} / I_{1443} após o período de incubação



Fonte: O autor (2021).

As intensidades de altura de pico da banda da fenilalanina (998 cm^{-1}) e da banda do triptofano (750 cm^{-1}) também foram comparadas entre os espectros dos grupos após 96 horas de incubação (Figura 25).

Figura 25 - Mudanças na razão de intensidades Raman I_{998} / I_{750} após o período de incubação



Fonte: O autor (2021).

A razão I_{998} / I_{750} apresentou diferença estatística ($p < 0,01$), onde os grupos CAT e LIP aumentaram essa razão e o grupo BSL diminuiu.

Thomas e Schepler (1980) registraram os espectros Raman de lentes da catarata e observaram o aumento da razão 1003 cm^{-1} vs 759 cm^{-1} , implicando na diminuição da intensidade em 759 cm^{-1} e consequentemente uma diminuição da concentração para o triptofano. Neste estudo, a razão de intensidade I_{998} / I_{750} em CAT e LIP aumentou, e a incubação no grupo BSL manteve os níveis de triptofano após 96 horas de incubação.

A formação da catarata está associada a mudanças conformacionais de proteínas, formação de agregados ou mudanças na estrutura (PALUSZKIEWICZ *et al.*, 2016, 2018). Além disso, vários locais de oxidação foram identificados nas cristalinas, visando resíduos de triptofano, cisteína e metionina (KIM *et al.*, 2015; MOREAU; KING, 2012).

A oxidação de aminoácidos em cristalinas pode afetar a atividade da chaperona α -cristalina. Nesses casos, a perda das propriedades do cristalino e uma catarata são inevitáveis (SACHARZ *et al.*, 2016). A desamidação de cristalinas é um dos tipos de dano mais prevalentes, introduzindo uma carga negativa na proteína, transformando os resíduos de glutamina em glutamato. A asparagina também é suscetível à desamidação e ambos os resíduos são modificados em agregados da catarata (CETINEL; MONTEMAGNO, 2015; MOREAU; KING, 2012).

A desregulação do conteúdo de íons de cálcio dentro do cristalino está envolvida na formação da catarata por meio da ativação de proteases de calpaína. Calpaína 2, em particular, é fortemente sugerida para desempenhar um papel em algumas formas da catarata humana. A ativação desta enzima hidrolisa as proteínas estruturais do cristalino (MADDIRALA, 2015; MOREAU; KING, 2012; ONO; SORIMACHI, 2012). Todas essas modificações nos aminoácidos podem ser analisadas por espectroscopia Raman.

As moléculas encontradas em *Rhinacanthus nasutus*, lupeol, estigmasterol e β -sitosterol são protetoras contra a toxicidade do glutamato (BRIMSON *et al.*, 2012). Assim, foi sugerido que o β -sitosterol possui atividade antioxidante. A incorporação de β -sitosterol na membrana celular evitou o estresse oxidativo induzido por GOX e a peroxidação (SHI *et al.*, 2013; VAN RENSBURG *et al.*, 2000; VIVANCOS; MORENO, 2008).

Foi relatado também que o β -sitosterol melhorou as atividades de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), glutatona (GSH) e catalase (CAT), e suprimiu a expressão de malondialdeído (MDA) em outros tecidos, evitando a peroxidação lipídica (BASKAR *et al.*, 2012; HUSSEIN *et al.*, 2020; JENA *et al.*, 2019; YIN *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2020).

A administração de antioxidantes naturais aumenta a atividade da chaperona e mitiga a formação da catarata devido ao tratamento com selenito. Isso pode ser atribuído à redução de α -cristalina oxidada, após um aumento na atividade da enzima antioxidante do cristalino diretamente, ou uma diminuição no estresse do retículo endoplasmático em células endoteliais sistêmicas (NAKAZAWA *et al.*, 2017).

Makley *et al.* (2015) propuseram um oxisterol capaz de reverter parcialmente a agregação de proteínas por meio da ligação e estabilização das formas mais solúveis de α A-cristalina e α B-cristalina. Por outro lado, a falta de Lanosterol sintase mostrou formação da catarata (ZHAO *et al.*, 2015). O Lanosterol desempenha um papel fundamental na inibição da agregação de proteínas do cristalino e na redução da formação da catarata, sugerindo uma nova estratégia para prevenir e tratar esta doença.

Esses dois autores citados utilizaram compostos esteroidais para estabilizar proteínas cristalinas com bons resultados. No presente trabalho foi possível confirmar que o β -sitosterol, composto esteroideal com alta atividade antioxidante, apresentou resultados promissores na prevenção das cataratas.

6 CONCLUSÕES

Os Lipossomas carregados com β -Sitosterol (BSLs) foram obtidos com sucesso pelo método de fase reversa modificada.

O modelo *ex vivo* de cataratogênese induzido por selenito de sódio, foi capaz de reproduzir visivelmente a catarata nas lentes isoladas dos ratos Wistar.

O tratamento com BSL permitiu a prevenção do avanço da catarata induzida por selenito de sódio após 48 e 96 horas de incubação.

A incorporação de β -sitosterol em lipossomas não permitiu que a estrutura das proteínas da lente mudasse significativamente.

Os presentes resultados mostraram que o BSL diminuiu a progressão de cataratogênese experimental induzida por selenito de sódio, portanto se apresenta como alternativa promissora para a prevenção da catarata.

Este estudo pode contribuir para a utilização de técnicas espectroscópicas para desenvolvimento de fármacos no tratamento da catarata.

REFERÊNCIAS

- AMBAVADE, S. D.; MISAR, A. V.; AMBAVADE, P. D. Pharmacological, nutritional, and analytical aspects of β -sitosterol: A review. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine**, v. 14, n. 3, p. 193–211, 2014.
- ARAMAKI, K. *et al.* Charge boosting effect of cholesterol on cationic liposomes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 506, p. 732–738, 2016.
- ARTIGAS, C.; NAVEA, A.; LÓPEZ-MURCIA, M. Spectral transmission of the pig lens : Effect of ultraviolet A + B radiation. **Journal français d’ophtalmologie**, v. 37, n. 10, p. 773–779, 2014.
- ARTIGAS, J. M. *et al.* Spectral Transmission of the Human Crystalline Lens in Adult and Elderly Persons : Color and Total Transmission of Visible Light. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 53, n. 7, p. 4076–4084, 2012.
- BARBOSA-SABANERO, K. *et al.* Lens and retina regeneration: new perspectives from model organisms. **Biochemical Journal**, v. 447, n. 3, p. 321–334, 2012.
- BASKAR, A. A. *et al.* B-Sitosterol Prevents Lipid Peroxidation and Improves Antioxidant Status and Histoarchitecture in Rats With 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Colon Cancer. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 4, p. 335–343, 2012.
- BERMAN, H. M. *et al.* The protein data bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.
- BERTOLUZZA, A. *et al.* Raman spectra of the human lens in relation to pathology and the anticataract effect of drugs. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 17, n. 1, p. 133–137, 1986.
- BHADADA, S. V.; VYAS, V. K.; GOYAL, R. K. Protective effect of Tephrosia purpurea in diabetic cataract through aldose reductase inhibitory activity. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 83, p. 221–228, 2016.
- BLOEMENDAL, H. *et al.* Ageing and vision: Structure, stability and function of lens crystallins. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 86, n. 3, p. 407–485, 2004.
- BOETTNER, E. A.; WOLTER, J. REIMER. Transmission of the Ocular Media. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 1, n. 6, p. 776–783, 1962.
- BOLA, C.; BARTLETT, H.; EPERJESI, F. Resveratrol and the eye: Activity and molecular mechanisms. **Graefe’s Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 252, n. 5, p. 699–713, 2014.
- BOT, A. C. C. *et al.* Raman microspectroscopy of fixed rabbit and human lenses and lens slices: New potentialities. **Experimental Eye Research**, v. 49, n. 2, p. 161–169, 1989.
- BRIMSON, J. M. *et al.* Rhinacanthus nasutus extracts prevent glutamate and amyloid- β neurotoxicity in HT-22 mouse hippocampal cells: Possible active compounds include lupeol, stigmasterol and β -sitosterol. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 4, p. 5074–5097, 2012.
- BU, H.-Z. *et al.* Ocular disposition, pharmacokinetics, efficacy and safety of nanoparticle-formulated ophthalmic drugs. **Current drug metabolism**, v. 8, n. 2, p. 91–107, 2007.

CAI, M. Galactose-induced Cataract in Rat: Raman Detection of Sulfhydryl Decrease and Water Increase along an Equatorial Diameter. p. 531–541, 1989.

CAI, M.; KUCK, J. F. R.; YU, N.-T. Galactose-induced Cataract in Rat: Raman Detection of Sulfhydryl Decrease and Water Increase along an Equatorial Diameter. **Experimental Eye Research**, v. 49, p. 531–541, 1989.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers. v. 153, p. 41–50, 1997.

CATARATA. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2012/04/catarata>>. Acesso em: 01 fev. 2017.

CETINEL, S.; MONTEMAGNO, C. Nanotechnology for the prevention and treatment of cataract. **Asia-Pacific Journal of Ophthalmology**, v. 4, n. 6, p. 381–387, 2015.

CHAUDHURY, S.; ROY, P.; DASGUPTA, S. Green tea flavanols protect human γ B-crystallin from oxidative photodamage. **Biochimie**, v. 137, p. 46–55, jun. 2017.

CHAUHAN, P. *et al.* Studies on molecular interactions between Schiff bases and eye lens chaperone human α A-crystallin. **Journal of Luminescence**, v. 192, n. February, p. 148–155, 2017.

CHENG, M. H. *et al.* A γ A-crystallin mouse mutant Secc with small eye, cataract and closed eyelid. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–15, 2016.

CHOI, S. *et al.* Angiogenic activity of beta-sitosterol in the ischaemia/reperfusion-damaged brain of Mongolian gerbil. **Planta medica**, v. 68, n. 4, p. 330–5, 2002.

CORDENONSI, L. M. *et al.* Simultaneous separation and sensitive detection of naringin and naringenin in nanoparticles by chromatographic method indicating stability and photodegradation kinetics. **Biomedical Chromatography**, v. 30, n. 2, p. 155–162, 2016.

CUI, M. *et al.* Liposomes containing cholesterol analogues of botanical origin as drug delivery systems to enhance the oral absorption of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 489, n. 1–2, p. 277–284, 2015.

CVEKL, A.; ASHERY-PADAN, R. **The cellular and molecular mechanisms of vertebrate lens development** (Cambridge), 2014.

DOGANAY, S. *et al.* The Effect of Resveratrol in Experimental Cataract Model Formed by Sodium Selenite. **Current Eye Research**, v. 31, n. 44, p. 147–153, 2006.

DOVRAT, A.; SIVAK, J. G. Long-term Lens Organ Culture System with a Method for Monitoring Lens Optical Quality. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, n. 3, p. 502–505, 2005.

EID, K. A.; AZZAZY, H. M. Sustained broad-spectrum antibacterial effects of nanoliposomes loaded with silver nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 9, n. 9, p. 1301–1310, 2014.

ERCKENS, R. J. *et al.* Raman spectroscopy in ophthalmology: From experimental tool to applications in vivo. **Lasers in Medical Science**, v. 16, n. 4, p. 236–252, 2001.

FANG, H. *et al.* Anti-osmotic and antioxidant activities of gigantol from *Dendrobium aurantiacum* var. *denneanum* against cataractogenesis in galactosemic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 172, p. 238–246, ago. 2015.

FATHALLA, D.; SOLIMAN, G. M.; FOAUD, E. A. Development and in vitro/in vivo Evaluation of Liposomal Gels for the Sustained Ocular Delivery of Latanoprost. **Journal of Clinical & Experimental Ophthalmology**, v. 06, n. 01, p. 16–19, 2015.

FENG, T. *et al.* Structural characterization and bioavailability of ternary nanoparticles consisting of amylose, α -linoleic acid and β -lactoglobulin complexed with naringin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 365–374, 2017.

FERREIRA, L. G. *et al.* **Molecular docking and structure-based drug design strategies**. [s.l.: s.n.]. v. 20

FILIPE, H. P. *et al.* Contact lenses as drug controlled release systems: A narrative review. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 75, n. 3, p. 241–247, 2016.

GALLOVÁ, J. *et al.* Hydrophobic thickness, lipid surface area and polar region hydration in monounsaturated diacylphosphatidylcholine bilayers: SANS study of effects of cholesterol and β -sitosterol in unilamellar vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1778, n. 11, p. 2627–2632, 2008.

GALLOVÁ, J. *et al.* The effects of cholesterol and β -sitosterol on the structure of saturated diacylphosphatidylcholine bilayers. **European Biophysics Journal**, v. 40, n. 2, p. 153–163, 2011.

GHAHRAMANI, M. *et al.* Structural and functional characterization of D109H and R69C mutant versions of human α B-crystallin: The biochemical pathomechanism underlying cataract and myopathy development. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 146, p. 1142–1160, 2020.

GHOSAL, K.; GHOSH, D.; KUMAR, S. Preparation and evaluation of naringin-loaded polycaprolactone microspheres based oral suspension using Box-Behnken design. **Journal of Molecular Liquids**, v. 256, p. 49–57, 2018.

GORGELS, T. G. M. F.; VAN NORREN, D. Spectral Transmittance of the Rat Lens. **Vision Research**, v. 32, n. 8, p. 1509–1512, 1992.

GUPTA, S. K. *et al.* Lycopene attenuates oxidative stress induced experimental cataract development: An in vitro and in vivo study. **Nutrition**, v. 19, n. 9, p. 794–799, 2003.

GUPTA, S. K. *et al.* Evaluation of anticataract potential of Triphala in selenite-induced cataract: In vitro and in vivo studies. **Journal of Ayurveda and integrative medicine**, v. 1, p. 280–286, 2010a.

GUPTA, S. K. *et al.* Trigonella foenum-graecum (fenugreek) protects against selenite-induced oxidative stress in experimental cataractogenesis. **Biological Trace Element Research**, v. 136, n. 3, p. 258–268, 2010b.

HALES, A. M. *et al.* Estrogen Protects Lenses against Cataract Induced by Transforming Growth Factor- β (TGF β). **The Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 2, p. 273–280, 1997.

- HERUYE, S. *et al.* Standardization of a new method for assessing the development of cataract in cultured bovine lenses. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 98, n. April, p. 1–7, 2019.
- HESS, J. L.; MITTON, K. P.; BUNCE, G. E. Precataractous changes affect lens transparency in the selenite cataract. **Ophthalmic Research**, v. 28, n. SUPPL. 2, p. 45–53, 1996.
- HILDRETH, C. J.; BURKE, A. E.; GLASS, R. M. Cataracts. **Jama**, v. 301, p. 2014, 2009.
- HONGMAO, S. **A Practical Guide to Rational Drug Design Related titles**. [s.l: s.n.].
- HORIKIRI, K. *et al.* Estimation Rat of Structural Lens Using Changes Raman in the Cataractous Spectroscopy. **Experimental animals**, v. 41, n. 2, p. 225–230, 1992.
- HUANG, C. C.; CHEN, W. Raman spectroscopic analysis of cataract lens: A compendious review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 53, n. 9, p. 689–702, 2018.
- HUANG, C.; LI, C.; MUHEMAITIA, P. Impediment of selenite-induced cataract in rats by combinatorial drug laden liposomal preparation. **The Libyan journal of medicine**, v. 14, n. 1, p. 1548252, 2019.
- HUSSEIN, M. E. *et al.* Roselle seed oil and its nano-formulation alleviated oxidative stress, activated nrf2 and downregulated m-RNA expression genes of pro-inflammatory cytokines in paracetamol-intoxicated rat model. **Records of Natural Products**, v. 14, n. 1, p. 1–17, 2020.
- IMANAKA, H. *et al.* Chemoprevention of tumor metastasis by liposomal β -sitosterol intake. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 3, p. 400–404, 2008.
- ISAI, M. *et al.* Prevention of selenite-induced cataractogenesis by rutin in Wistar rats. **Molecular Vision**, v. 15, p. 2570, 2009.
- JANAGAM, D. R.; WU, L.; LOWE, T. L. Nanoparticles for drug delivery to the anterior segment of the eye. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 122, p. 31–64, 2017.
- JENA, S. *et al.* Curcuma angustifolia ameliorates carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in HepG2 cells and Swiss albino rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 12, n. 9, p. 416–424, 2019.
- KADOR, P. F.; WYMAN, M.; OATES, P. J. Aldose reductase, ocular diabetic complications and the development of topical Kinostat®. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 54, p. 1–29, 2016.
- KANN, B. *et al.* Raman microscopy for cellular investigations - From single cell imaging to drug carrier uptake visualization. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 89, p. 71–90, 2015.
- KAWANO, K. *et al.* Liver targeting liposomes containing β -sitosterol glucoside with regard to penetration-enhancing effect on HepG2 cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 6, p. 766–770, 2002.
- KIM, I. *et al.* Site specific oxidation of amino acid residues in rat lens γ -crystallin induced by low-dose γ -irradiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 466, n. 4, p. 622–628, 2015.
- KRONSCHLÄGER, M. *et al.* Caffeine eye drops protect against UV-B cataract. **Experimental Eye Research**, v. 113, p. 26–31, 2013.

- LACATUSU, I. *et al.* Novel bio-active lipid nanocarriers for the stabilization and sustained release of sitosterol. **Nanotechnology**, v. 23, n. 45, p. 455702, 2012.
- LIM, S. S. *et al.* Rat Lens Aldose Reductase Inhibitory Constituents of *Nelumbo nucifera* Stamens. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 825–830, 2006.
- LIPINSKI, C. A.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, p. 3–25, 1997.
- LOW, W. L. *et al.* Antimicrobial efficacy of liposome-encapsulated silver ions and tea tree oil against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 33–39, 2013.
- MADDIRALA, S. K. Y. **Effects of n-acetylcysteine amide in preventing / treating cataracts**. Dissertação de Doutorado-Missouri University of Science and Technology (2015).
- MAITANI, Y. *et al.* Modified ethanol injection method for liposomes containing. **Journal of Liposome research**, v. 11, n. 1, p. 115–125, 2001.
- MAKLEY, L. N. *et al.* Pharmacological chaperone for α -crystallin partially restores transparency in cataract models. **Science**, v. 350, n. 6261, p. 674–677, 2015.
- MERTINS, O. **Desenvolvimento e Caracterização de Nanovesículas Lipossômicas Compósitas de Fosfatidilcolina da Lecitina de Soja e Quitosana**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2004.
- MIZUNO, A. *et al.* Effect of Aldose Reductase Inhibitor on Experimental Diabetic Cataract Monitored by Laser Raman Spectroscopy. **Experimental Eye Research**. [s.l.: s.n.].
- MOON, E. J. *et al.* A novel angiogenic factor derived from Aloe vera gel: beta-sitosterol, a plant sterol. **Angiogenesis**, v. 3, n. 2, p. 117–23, 1999.
- MOREAU, K. L.; KING, J. A. Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention. **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 5, p. 273–282, 2012.
- MURALIDHARAN, A. R. *et al.* Structure-Based Virtual Screening and Biological Evaluation of a Calpain Inhibitor for Prevention of Selenite-Induced Cataractogenesis in an in Vitro System. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 8, p. 1686–1697, 24 ago. 2015.
- MUTHENNA, P. *et al.* Inhibition of advanced glycation end-product formation on eye lens protein by rutin. **The British journal of nutrition**, v. 107, n. 7, p. 941–949, 2012.
- NAGARWAL, R. C. *et al.* Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 136, n. 1, p. 2–13, 2009.
- NAKAMURA, K. *et al.* ¹H-NMR and Raman studies on perforating trauma-induced cataract formation in a mouse lens. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1474, n. 1, p. 23–30, 2000a.
- NAKAMURA, K. *et al.* ¹H-NMR and Raman studies on perforating trauma-induced cataract formation in a mouse lens. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1474, n. 1, p. 23–30, 2000b.

NAKAZAWA, Y. *et al.* Administration of antioxidant compounds affects the lens chaperone activity and prevents the onset of cataracts. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 95, n. June, p. 137–143, 2017.

NISHIMOTO, K.; SASAKI, K. In vivo Light Scattering Intensity in the Lens versus in vitro Spectral Transmission in the Nuclear Region. **Ophthalmic Research**, v. 27, p. 1–11, 1995.

ONO, Y.; SORIMACHI, H. Calpains - An elaborate proteolytic system. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1824, n. 1, p. 224–236, 2012.

OZAKI, Y. *et al.* Inter- and intramolecular disulfide bond formation and related structural changes in the lens proteins. A Raman spectroscopic study in vivo of lens aging. **The Journal of biological chemistry**, v. 262, n. 32, p. 15545–15551, 1987.

OZAKISJ, Y.; MIZUNOLT, A.; IRIYAMAS, K. Inter- and Intramolecular Disulfide Bond Formation and Related Structural Changes in the Lens Proteins. 1987.

PALERMO, F. A. *et al.* Dietary Aloe vera components' effects on cholesterol lowering and estrogenic responses in juvenile goldfish, *Carassius auratus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 851–861, 2013.

PALUSZKIEWICZ, C. *et al.* Analysis of human lenses by Raman microspectroscopy. **Acta Physica Polonica A**, v. 129, n. 2, p. 244–246, 2016.

PALUSZKIEWICZ, C. *et al.* Vibrational microspectroscopy analysis of human lenses. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 188, p. 332–337, 2018.

PATEL, D. *et al.* Aldose reductase inhibitory principles from the whole plant of *Hybanthus enneaspermus* (Linn) F. Muell. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 1, p. S165–S169, 2012.

PATEL, D. K. *et al.* Cataract: A major secondary complication of diabetes, its epidemiology and an overview on major medicinal plants screened for anticataract activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 1, n. 4, p. 323–329, 2011.

PATHAK, Y.; SUTARIYA, V.; HIRANI, A. A. **Nano- Biomaterials For Ophthalmic Drug Delivery**. [s.l: s.n.].

PATIL, K. K.; GACCHE, R. N. Inhibition of glycation and aldose reductase activity using dietary flavonoids: A lens organ culture studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 730–738, 2017.

REDDY, V. S.; REDDY, G. B. Emerging role for alphaB-crystallin as a therapeutic agent: pros and cons. **Curr Mol Med**, v. 15, n. 1, p. 47–61, 2015.

ROOBAN, B. N. *et al.* Prevention of selenite induced oxidative stress and cataractogenesis by luteolin isolated from *Vitex negundo*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 196, n. 1–2, p. 30–38, 2012.

RUIZ-EDERRA, J.; VERKMAN, A. S. Accelerated cataract formation and reduced lens epithelial water permeability in aquaporin-1-deficient mice. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 47, n. 9, p. 3960–3967, 2006.

SACHARZ, J. *et al.* A 2D correlation Raman spectroscopy analysis of a human cataractous lens. **Journal of Molecular Structure**, v. 1124, p. 71–77, 2016.

SAEIDNIA, S. *et al.* The Story of Beta-sitosterol- A Review. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 4, n. 5, p. 590–609, 2014.

SASAKI, H. *et al.* Retinal drug delivery using eyedrop preparations of poly-l-lysine-modified liposomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83, n. 3, p. 364–369, 2013.

SASIKALA, V. *et al.* Rutin ameliorates free radical mediated cataract by enhancing the chaperone activity of α -crystallin. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 251, n. 7, p. 1747–1755, 2013.

SHI, C. *et al.* Incorporation of β -sitosterol into the membrane increases resistance to oxidative stress and lipid peroxidation via estrogen receptor-mediated PI3K/GSK3 β signaling. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 3, p. 2538–2544, 2013.

SHOCH, B. Y. D. LENS PROTEASES AND CATARACT FORMATION *. v. 60, 1962.

SHPIGELMAN, A. *et al.* β -Lactoglobulin-naringenin complexes: Nano-vehicles for the delivery of a hydrophobic nutraceutical. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 214–224, 2014.

SIVAK, J. G.; STUART, D. D.; WEERHEIM, J. A. Optical performance of the bovine lens before and after cold cataract. **Applied Optics**, v. 31, n. 19, p. 3616, 1992.

STEFEEK, M. Natural flavonoids as potential multifunctional agents in prevention of diabetic cataract. **Interdisciplinary Toxicology**, 2011.

STEFEEK, M.; KARASU, C. Eye Lens in Aging and Diabetes: Effect of Quercetin. **Rejuvenation Research**, v. 14, n. 5, p. 525–534, 2011.

SUNKIREDDY, P. *et al.* Natural antioxidant biomolecules promises future nanomedicine based therapy for cataract. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 112, p. 554–562, 2013.

SZOKA, F.; PAPAHAADJOPOULOS, D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, n. 9, p. 4194–8, 1978.

TAI, K. *et al.* The effect of sterol derivatives on properties of soybean and egg yolk lecithin liposomes: Stability, structure and membrane characteristics. **Food Research International**, v. 109, n. 17, p. 24–34, 2018.

THOMAS, D. M.; SCHEPLER, K. L. Raman spectra of normal and ultraviolet-induced cataractous rabbit lens. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci**, p. 904–912, 1980.

THOMPSON, J.; LAKHANI, N. Cataracts. **Primary Care - Clinics in Office Practice**, v. 42, n. 3, p. 409–423, 2015.

THRIMAWITHANA, T. R. *et al.* Drug delivery to the lens for the management of cataracts. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2018a.

THRIMAWITHANA, T. R. *et al.* Drug delivery to the lens for the management of cataracts. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 126, p. 185–194, 2018b.

TOH, T. Y. *et al.* Medical treatment of cataract. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 35, n. 7, p. 664–671, 2007.

TUCHIN, V. V *et al.* **Human eye lens spectroscopy and modeling of its transmittance.** Ophthalmic Technologies IV. **Anais...**1994.

TUKLER, J.; BERGMANSON, J. P. G.; WALSH, J. E. Ultraviolet radiation transmittance of the mouse eye and its individual media components. **Experimental Eye Research**, v. 90, p. 382–387, 2010.

VAN DEN BERG, T. J. T. P.; FELIUS, J. Relationship between spectral transmittance and slit lamp color of human lenses. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 36, n. 2, p. 322–329, 1995.

VAN RENSBURG, S. J. *et al.* **A comparative study of the effects of cholesterol, beta-sitosterol, beta-sitosterol glucoside, dehydroepiandrosterone sulphate and melatonin on in vitro lipid peroxidation** **Metabolic Brain Disease**, 2000.

VIVANCOS, M.; MORENO, J. J. Effect of resveratrol, tyrosol and β -sitosterol on oxidised low-density lipoprotein-stimulated oxidative stress, arachidonic acid release and prostaglandin E2 synthesis by RAW 264.7 macrophages. **British Journal of Nutrition**, v. 99, n. 6, p. 1199–1207, 2008.

WANG, S. *et al.* Protective effect of Coenzyme Q10 against oxidative damage in human lens epithelial cells by novel ocular drug carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1–2, p. 219–229, 2011.

WANG, S. L. *et al.* Permeability and anticataract effects of a topical ocular drug delivery system of disulfiram. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 18, n. 4, p. 285–291, 2008.

WEST-MAYS, J.; BOWMAN, S. **Animal Models of Ophthalmic Diseases.** [s.l: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Blindness and vision impairment prevention /Cataract. Disponível em: <<https://www.who.int/blindness/causes/priority/en/index1.html>>. Acesso em: 01 Ago. 2019.

YANG, J. *et al.* Potential of CeCl₃@mSiO₂nanoparticles in alleviating diabetic cataract development and progression. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 13, n. 3, p. 1147–1155, 2017.

YIN, Y. *et al.* Beta-sitosterol and its derivatives repress lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute hepatic injury by inhibiting the oxidation and inflammation in mice. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 9, p. 1525–1533, 2018.

ZHANG, F. *et al.* β -Sitosterol-loaded solid lipid nanoparticles ameliorate complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats: involvement of NF- κ B and HO-1/Nrf-2 pathway. **Drug Delivery**, v. 27, n. 1, p. 1329–1341, 2020.

ZHAO, L. *et al.* Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts. **Nature**, v. 523, n. 7562, p. 607–611, 2015.

ZHU, X. *et al.* New cataract markers: Mechanisms of disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 472, p. 41–45, 2017.

ZIGMAN, S. *et al.* Effect of chronic near-ultraviolet radiation on the gray squirrel lens in vivo. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 32, n. 6, p. 1723–1732, 1991.

ZIMMER, A.; KREUTER, J. Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, n. 1, p. 61–73, 1995.

**ANEXO A - CARTAS DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA DOS
EXPERIMENTOS CUJOS RATOS DO GRUPO CONTROLE FORAM
APROVEITADOS**

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA - 014/2018

Protocolo CEPG - 7311/2018

Título - Projeto de pesquisa "Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade cicatrizante de sistema de liberação nanoparticulados contendo 17-Beta estradiol e óxido de zinco e solicitação de uso de animais"

Interessado: Prof. Dr. Leandro Lipinski (DEMED: leandrolipinski@yahoo.com.br)

Data de Entrada - 04/05/2018

Prezado Professor Leandro

Em relação à utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela aprovação da utilização de 225 (duzentos e vinte e cinco) ratos wistar fêmeas com peso aproximado de 250 g

Ponta Grossa, 22 de junho de 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
CEUA - Comissão de Ética e Pesquisa em Animais
Dra. Denise Xavier Scamporrin
Coordenadora



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 010/2018

Protocolo UEPG – 7312/2018

Título – Projeto de pesquisa "Desenvolvimento, caracterização e avaliação *in vitro/in vivo* de nanopartículas poliméricas contendo ácido ursólico"

Resultado: Aprovado

Considerações

Prezado Professor Paulo Victor Farago (pvfarago@gmail.com) - DEFAR)

Em relação a utilização de animais no projeto de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela **aprovação do uso de 150 (centro e cinquenta) ratos wistar, de três meses de idade.**

Atenciosamente,

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
CEUA - Comissão de Estudos e Pesquisas em Animais
Dra. Dionizia Xavier Scamparini
Coordenadora

Profa. Dra. Dionizia Xavier Scamparini
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROESP
Fone: (042) 3220-3264



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo/ Process CEUA – 035/2018

Protocolo UEPG – 13463/2018

Título – .Projeto de pesquisa “Investigação da ação protetora do resveratrol em ratos Wistar com lesão hepática, cardíacas e renais induzidas pelo veneno bruto da vespa social *Polybia paulista*”

Interessado: Profa. Márcia Regina Paes de Oliveira (DEBIOGEM)

e-mail:marciarpaeso@gmail.com

Data de Entrada – 31/08/2018

Resultado: Aprovado com sugestões

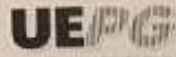
Considerações

A comissão de Ética no Uso de animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CEUA-UEPG) certifica que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa acima especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA), estabelecidas pelo Conselho Nacional para fins de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal. Dessa forma, fica autorizada a utilização de 40 ratos heterogênicos para a execução desse projeto.

Ponta Grossa, 28 de setembro de 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Prof. Dra. Dianizle Xavier Scamparini
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROESP
Fone: (042) 3220-3264



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 005/2019

Protocolo UEPG – 16450/2018

Título – Projeto de pesquisa "Estudo histológico e imunohistoquímico comparativo das cápsulas formadas por implantes de silicone com revestimento de espuma de Poliuretano e com superfície nanotexturizada"

Data de Entrada – 23/10/2018

Resultado: Aprovado

Considerações

Professor Eduardo Nascimento Silva (DEMED - dr_eduardosilva@yahoo.com.br)

Em relação a utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, do uso de utilização de 30 ratas.

Ponta Grossa, 05 de abril de 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
CEUA - Comissão de Ética do Uso de Animais
Dra. Dionizia Xavier Scomparin
Coordenadora

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84 030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROPEP
Fone: (042) 3220-3264



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 041/2018

Protocolo UEPG – 16450/2018

Título – Projeto de pesquisa "Estudo histológico e imunoistoquímico comparativo das cápsulas formadas por implantes de silicone com revestimento de espuma de poliuretano e com superfície nanotexturizada".

Interessados:

- Dr. Eduardo Nascimento Silva/DEMED (dr_eduardosilva@yahoo.com.br)
- Doutoranda Gisela Hobson Pontes/PPGFCC-UERJ – (giselapontes@uol.com.br)

Data de Entrada – 23/10/2018

Prezado Professor Dr. Eduardo Nascimento Silva e Doutoranda Gisela Hobson Pontes:

A comissão de Ética no Uso de animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CEUA-UEPG) certifica que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa acima especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA), estabelecidas pelo Conselho Nacional para fins de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal. Dessa forma, fica autorizada a utilização de 60 (sessenta) ratas (fêmeas), wistar com peso entre 200-250 g – para a execução desse projeto.

Ponta Grossa, 27 de novembro de 2018.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
CEUA - Comissão de Ética e Pesquisas em Animais
Dra. Dionízia Xavier Scamporrin
Coordenadora