




Ensaio HET-CAM para avaliação de colírio a base da casca e polpa de pequi (*Caryocar brasiliense*): estudo preliminar

HET-CAM assay for evaluation of eye drops based on pequi (*Caryocar brasiliense*) peel and pulp: a preliminary study

João Marcelo Carvalho do Carmo ^{*1}, Bárbara Elisa Basilio de Oliveira¹, Nathany Arcaten¹, Mariana Ferreira da Silva¹, Cristielle Nunes Souto², Mônica Rodrigues Ferreira Machado¹, Andréia Vitor Couto do Amaral¹

1 Universidade Federal de Jataí (UFJ), Jataí, Goiás, Brasil 

2 Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), RJ, Rio de Janeiro, Brasil 

*autor correspondente: joaomcarcelo_c2@hotmail.com

Recebido: 19 de maio, 2024. Aceito: 10 de setembro, 2024. Publicado: 27 de março, 2025. Editor: Luiz Augusto B. Brito

Resumo: Afecções oftálmicas de origem infecciosa ou inflamatória podem frequentemente acometer animais de companhia. Neste sentido, pesquisas referentes ao *Caryocar brasiliense* vêm apresentando benefícios como ação antibiótica, antioxidante, antifúngica e anti-inflamatória e, diante disso, é esperado que possa ser benéfico para o tratamento de oftalmopatias. Objetivou-se nessa pesquisa desenvolver soluções dos extratos da casca e polpa do pequi e, em seguida, realizar testes pré-clínicos para avaliar o potencial irritante por meio do ensaio HET-CAM, por meio do aparecimento de lesões vasculares, simulando a conjuntiva ocular. Para isso, foram utilizados 56 ovos embrionados de galinha, submetidos a soluções do extrato etanólico da casca (EEC) e do extrato hexânico polpa (HEP), nas concentrações denominadas colírio da casca (CC) e colírio da polpa (CP) a CC0,1%, CC0,2%, CC0,25%, CC1% e CC2,5% e CP1%, CP1,5%, CP2%, CP10% e CP20%, além dos controles negativos, utilizando Tween a 0,5% e 1% e NaCl. O controle positivo foi realizado com NaOH 0,1 N, onde reações de hemorragia, hiperemia e coagulação foram observadas. O modelo de regressão que melhor se ajustou aos dados foi o polinomial de segunda ordem, apresentando o valor ideal para CP de 0,18% e para CC de 0,24%. Os benefícios terapêuticos do *Caryocar brasiliense*, juntamente ao baixo potencial de irritação das soluções testadas, indicam um uso promissor para oftalmopatias.

Palavras-chave: teste alternativo; ovo embrionado; oftalmologia; irritação ocular.

Abstract: Ophthalmic disorders of infectious or inflammatory origin can often affect companion animals. In this context, research related to *Caryocar brasiliense* has shown benefits such as antibiotic, antioxidant, antifungal, and anti-inflammatory action, and it is expected to be beneficial for ophthalmopathy treatment. This research aimed to develop solutions of pequi peel and pulp extracts and then perform preclinical tests to assess the irritating potential using the HET-CAM test through the appearance of vascular lesions, simulating the ocular conjunctiva. For this purpose, 56 embryonated chicken eggs were subjected to solutions of ethanol extract



of peel (EEP) and hexane extract of pulp (HEP) at concentrations of 0.1, 0.2, 0.25, 1.0, and 2.5% for eyedrops of peel (EPe) and 1.0, 1.5, 2.0, 10.0, and 20.0% for eyedrops of pulp (EPu), in addition to negative controls, consisting of Tween at 0.5 and 1.0% and NaCl. The positive control was performed with 0.1 N NaOH, and bleeding, hyperemia, and coagulation reactions were observed. The second-order polynomial was the regression model that best fitted the data, presenting the ideal value for EPu of 0.18% and EPe of 0.24%. The therapeutic benefits of *C. brasiliense* and the low potential for irritation of the tested solutions indicated a promising use for ophthalmopathies.

Keywords: alternative test; embryonated egg; ophthalmology; eye irritation.

1. Introdução

O pequi, fruto do *C. brasiliense* é envolvido por uma casca de característica lenhosa, rica em fibras, carboidratos, magnésio, cálcio e cobre. Pode conter até quatro sementes volumosas, com amêndoas grandes e carnosas, contendo espinhos agudos em seu interior ⁽¹⁾. Sua polpa é composta por ácidos graxos insaturados, como o linoleico ⁽²⁾ que papel importante no processo de cicatrização, aumentando a síntese de colágeno e fornecendo ao tecido maior força tênsil ⁽³⁾, além de atenuar o processo inflamatório no período de reparo tecidual ⁽⁴⁾.

Sendo rica também em carotenoides como anteraxantina, criptoflavina, zeaxantina, β-criptoxantina, ζ-caroteno, β-caroteno e mutatoxantina, que possuem ação antioxidante, além de serem precursores de vitamina A ⁽⁵⁾, que é conhecida por regular a diferenciação e proliferação das células epiteliais da córnea, atuando também na preservação das células caliciformes da conjuntiva e por isso vem sendo utilizada no tratamento de doenças oftálmicas como a ceratoconjuntivite seca ^(6,7). Não foram encontrados estudos sobre os efeitos do extrato da casca ou da polpa do *C. brasiliense* sobre a superfície ocular, contudo um estudo *in vitro* apontou que o extrato alcoólico da casca apresenta potencial antimicrobiano frente a *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes a meticilina isoladas da superfície ocular de cães com oftalmopatias⁽⁸⁾.

O tratamento dessas afecções oftálmicas geralmente é realizado com utilização de medicamentos tópicos e sistêmicos, contudo essa última via apresenta dificuldade na perfusão dos fármacos sobre os tecidos oculares, devido às barreiras biológicas, necessitando, portanto, de maiores doses que pode causar efeitos adversos sistêmicos e oculares ⁽⁹⁾. Tem sido cada vez maior a busca de ativos naturais visando uma diminuição dos efeitos colaterais causados pelos medicamentos sintéticos ⁽¹⁰⁾. Para que tais ativos sejam utilizados como solução oftálmica é necessário que sejam feitos testes toxicológicos, devido ao fato de que as estruturas externas oculares são delicadas, como a córnea, conjuntiva e a íris, que podem sofrer injúrias químicas proveniente dos princípios ativos, bem como dos excipientes presentes nas soluções oftálmicas⁽¹¹⁾.

O teste de irritação ocular geralmente utilizado é o teste de *Draize*, que consiste na instilação de substâncias testes na superfície ocular de coelhos albinos em dose única, visando observar o grau de irritação e inflamação ⁽¹²⁾. Contudo, devido ao sofrimento que os animais modelos são submetidos, tem-se buscado métodos alternativos *in vitro*, seguindo o conceito dos 3 Rs (reduzir, substituir e refinar) para o uso de animais como modelo de experimentação, buscando obter-se os mesmos parâmetros *in vivo* ^(13,14). No Brasil, atualmente é proibido o uso de animais em pesquisas para desenvolvimento de produtos

de higiene, cosméticos e perfumes ⁽¹⁵⁾. Entre os métodos alternativos de irritação ocular se destacam o HET-CAM (*Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane*) que possibilita uma avaliação do potencial irritante por meio de lesões vasculares, simulando a conjuntiva ocular ^(16,17,18).

Tendo em vista os benefícios medicinais das propriedades do *C. brasiliense*, com ações anti-inflamatórias, antimicrobianas e proliferativas das células da córnea, espera-se que tais compostos possam ser promissores como adjuvantes no tratamento de doenças oculares em animais de companhia, na forma de colírio. Esta pesquisa tem como objetivo formular soluções da polpa e casca de pequi em diferentes concentrações para uso oftálmico futuro, iniciando os testes pré-clínicos necessários através do teste HET-CAM, com o intuito de identificar concentrações ideais que não causem irritação.

2. Material e métodos

2.1 Obtenção do extrato

Os frutos de *C. brasiliense* foram adquiridos *in natura* de um comércio local da cidade de Jataí, Goiás, colhidos de lote único, provenientes de perímetro rural e enviados para o laboratório de química da universidade federal de Jataí (UFJ). As cascas e polpas foram separadas e fatiadas a cada material vegetal sofreu adição de solvente orgânico de acordo com sua polaridade, sendo para casca o álcool 92,8% e hexano para a polpa. Após adição dos solventes, as diferentes partes do *C. brasiliense*, permaneceram em percolamento por 7 dias, tendo o volume de solvente evaporado e repostado subsequentemente nesse período. Em seguida os solventes foram separados em rotaevaporador e os extratos oriundos da separação foram mantidos em banho maria até atingirem peso constante, garantindo total eliminação de solventes do meio.

O extrato hexânico da polpa (HEP), foi fracionado em concentrações distintas denominadas Colírio da polpa (CP) nas concentrações 1,0%, 1,5% e 2%, diluídas em Tween 80 (Tween 80 -Labsynth) a 0,5%. Também foram formulados CP nas concentrações de 10% e 20% diluídas em tween a 1%. Para obtenção das concentrações de 0,5% e 1%, o Tween 80 foi diluído em solução fisiológica (Solução Fisiológica NaCl 0,9% 250 mL - Medflex), homogeneizadas por agitação no vórtex por 15 minutos em temperatura ambiente. Já o extrato etanólico da casca (EEC) fracionado em cinco concentrações, denominadas colírio da casca (CC): 0,1%, 0,2%, 0,25%, 1% e 2,5%, diluídas em solução fisiológica (NaCl a 0,9%), após agitação em vórtex por 15 minutos.

Para mimetização de futuros colírios as soluções da casca foram diluídas em cloreto de sódio a 0,9%, tendo em vista sua osmolaridade (290 mOsm), próxima do fluido lacrimal de cães (337.4±16.2 mOsm) ⁽¹⁹⁾. Já o pH das soluções foi reajustado em 7,2, adicionando-se ácido clorídrico (quando necessária a diminuição do pH) ou hidróxido de sódio (quando necessário o aumento do pH), visando neutralizá-lo, substâncias já utilizadas em colírios comerciais, mantendo-o próximo do pH 7,0, valor médio do pH lacrimal de cães ⁽²⁰⁾.

2.2 Ensaio experimental

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o N° 013/19. Para os testes, foram utilizados 56 ovos de galinha fecundados de linhagem Cobb, com dois dias de idade, obtidos de matrizes de galinhas com 34 a 35 dias de idade, doados pela empresa São Salvador Alimentos (Itaberaí, Goiás, Brasil). Após a recepção, os ovos foram mantidos em temperatura ambiente controlada de 24° C por 24 horas, em sala escura e silenciosa. Em seguida, os ovos foram colocados em incubadora digital, modelo RcomPR50, com temperatura de 37,5°C e umidade entre 50% e 60%. Foi programada a função de rotação automática para uma rolagem a cada 60 minutos, até o oitavo dia de incubação e interrompida no nono dia para a realização do HET-CAM. Durante esse período, as condições necessárias para incubação citadas anteriormente foram monitoradas diariamente e ajustadas conforme necessário, sendo a viabilidade dos embriões monitoradas com ovoscopia.

O teste HET-CAM foi realizado utilizando ovos de galinha embrionados de acordo com o protocolo de Luepke e Kemper ⁽¹⁶⁾, ao nono dia de incubação, distribuídos aleatoriamente em 14 grupos de quatro ovos, onde cada grupo foi testado com uma solução distinta, sendo elas denominadas (CP) a CP 1,0%, CP 1,5%, CP2%, CP10%, CP20%. Bem como CC 0,1%, CC 0,2%, CC 0,25%, CC 1% e CC 2,5%, diluídas em solução fisiológica. Como controles negativos foram utilizadas duas concentrações de polissorbato 80 a 0,5% (CN0,5%) e 1% (CN1%), bem como NaCl (CN0,9%). E como controle positivo foi utilizado NaOH 0,1 N (CPNaOH).

Cada ovo foi cuidadosamente higienizado com solução fisiológica aquecida a 37°C no momento da retirada da incubadora, seguida da perfuração da casca com uma agulha lançoada e remoção com o auxílio de uma pinça anatômica na região câmara de ar até exposição da CAM. Os ovos foram aleatoriamente selecionados para cada grupo, recebendo 0,2 ml da solução correspondente ao grupo sorteado, instilado cuidadosamente sobre a CAM, com auxílio de pipetador. A membrana foi exposta durante 20 segundos a substância teste, e posteriormente instilou-se 10 ml de solução fisiológica aquecida 25°C para remoção da solução instilada. Posteriormente foi observado e registrado a ausência e presença de fenômenos de irritação subsequentes por um total de cinco minutos a partir da instilação da solução teste.

Todos os eventos foram filmados com auxílio de dispositivo digital Apple-Iphone 12, possibilitando observar e revisar a presença ou ausência dos seguintes fenômenos: hipermia (aumento do fluxo sanguíneo), hemorragia (extravasamento de sangue dos vasos sanguíneos) e de coagulação (opacidade da CAM ou de coagulação nos vasos). Ao final de cada teste, cada ovo embrionado foi submetido imediatamente à eutanásia por meio de resfriamento rápido à -20°C. A avaliação do potencial irritante foi feita com base no aparecimento dos fenômenos de irritação em intervalos de 0,5 minuto, 2 e 5 minutos ⁽¹⁶⁾.

2.3 Análise dos dados

Os fenômenos de hiperemia (Hip), hemorragia (Hem) e coagulação (Coag) foram registrados, quando presentes. Cada concentração, bem como os controles foram analisados em quadruplicata. O tempo dos eventos foi registrado em minutos, conforme a tabela 1. Para

o cálculo do escore de irritação (mean score - MSc) obtendo-se um valor numérico único, possibilitando observar a capacidade de irritação da solução testada, em uma escala comum que varia de 0 a 21 (Tabela 2). Foram testados modelos de regressão linear e quadrático utilizando o Software Graphpad Prism 6. O modelo de regressão quadrático foi expresso pela seguinte equação:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X + \beta_2 X^2 + \epsilon$$

Em que:

Y é a variável dependente; X é a variável independente; β_0 , β_1 e β_2 são os coeficientes do modelo; X^2 é o termo quadrático que captura a curvatura da relação; ϵ é o termo de erro que representa a variação não explicada pelo modelo.

Já o modelo de regressão linear foi descrito pela equação:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X + \epsilon$$

Em que:

Y é a variável dependente; X é a variável independente; β_0 é o intercepto, ou constante, que representa o valor esperado de Y quando $X=0$; β_1 é o coeficiente de regressão para X, que representa a mudança esperada em Y para cada unidade de mudança em X.

Tabela 1. Tabela utilizada para identificar as pontuações das lesões apresentadas nas CAM, durante a avaliação (hiperemia, hemorragia e coagulação) de acordo com o tempo de aparecimento (0,5 minutos; 2 minutos e 5 minutos) segundo Luepk e Kemper ⁽¹⁷⁾.

Efeitos	Pontuação		
	0,5 min (30s)	2 min (120 s)	5 min (300 s)
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

Tabela 2. Categoria de irritação mediante a faixa de pontuação obtida da média de pontos de cada grupo segundo Luepk e Kemper ⁽¹⁷⁾.

Faixa de pontuação	Categoria de irritação
0 a 0,9	Não irritante
1 a 4,9	Levemente irritante
5 a 8,9	Irritação moderada
9 a 21	Irritação severa

3. Resultados

As concentrações do CP apresentaram coloração amarelo citrino, ligeiramente turvo, necessitando de agitação em vórtex por um período de 15 minutos para homogeneização. Contudo, ainda se notava uma discreta separação de fases, sendo a de coloração mais amarelada como sobrenadante, porém se tornava homogênea com agitação manual, sem presença de odor. Já as concentrações do CC, apresentaram coloração âmbar claríssimo, sem sobrenadante ou decantação e inodoro, posterior a agitação em vórtex, por 15 minutos para homogeneização. O pH de todas as soluções foi ajustado para 7,2, buscando proximidade com o pH lacrimal.

No grupo de CPNaOH, foram verificadas as alterações de hemorragia e hiperemia logo após a instilação da solução de NaOH em todos os ovos e coagulação em apenas um ovo. Tais alterações persistiram por todo o período do teste, obtendo-se graduação 14,25, classificado, definido como irritante severo. No CN0, 5% foram verificado hiperemia em apenas um ovo aos 5 minutos e no CN1% foi observado hemorragia aos 5 minutos, obtendo graduação de 0,25 e 0,75 respectivamente, sendo ambas concentrações de Tween 80 utilizadas pra diluição dos CP classificadas como não irritantes.

As concentrações de CC, causaram na CAM hiperemia após 2 minutos de instilação com CC0,1%, CC0,2% e CC0,25%, sendo em dois, um e três ovos respectivamente, tendo a graduação entre 0 e 0,9 na escala HET-CAM, considerados como não irritantes. Já o CC1%, causou hiperemia aos 2 minutos em um ovo, e aos cinco minutos em outro, graduando 1 na escala HET-CAM. Após a instilação do CC2,5%, observou-se hemorragia apenas aos 5 minutos, em dois ovos, graduando 1,5 na escala HET-CAM, sendo ambas consideradas irritantes leves.

Nos grupos dos CP, a CAM apresentou hiperemia após dois minutos com instilação do CP1% em dois ovos; CP1,5% em um ovo e CP2,5% em dois ovos, obtendo graduações entre 0 e 0,9 na escala HET-CAM, sendo considerados não irritantes. Ao se instilar CP10% foi observado hiperemia aos dois minutos em um ovo, bem como hemorragia, seguida de hiperemia aos cinco minutos em outro ovo, graduando 2,25 na escala HET-CAM. No CP20%, foi observado o fenômeno de coagulação aos dois minutos em apenas um ovo, sendo também observado hemorragia aos dois minutos, em outros dois ovos, graduando 4,2 na escala HET-CAM, sendo tais concentrações consideradas irritantes leves (Tabela 3).

Tabela 3. Diferentes concentrações da casca e da polpa de *C. brasiliense* testadas no experimento com seus respectivos escores de irritação e classificação do grau de irritação segundo o HET-CAM.

Soluções	Escore de irritação (MSc)	Classificação
CPNaOH	14,25	IS
CN0,5%	0,25	NI
CN 1%	0,75	NI
CN0,9%	0	NI
CP1%	0,5	NI
CP1,5%	0,25	NI

CP2%	0,5	NI
CP10%	2,25	LI
CP20%	4,25	LI
CC0,1%	0,5	NI
CC0,2%	0,25	NI
CC0,25%	0,75	NI
CC1%	1	LI
CC2,5%	1,5	LI

CP: Controle Positivo; CN0,5: Controle Negativo de Tween a 0,5%; CN1%: Controle Negativo de Tween a 0,5%; CP: Colírio da polpa; CC: Colírio da casca; NI: Não irritante; LI: Levemente irritante; IS: Irritante severo.

Segundo os resultados, quanto maior a concentração, maior será seu potencial irritante (Fig. 1 e 2).

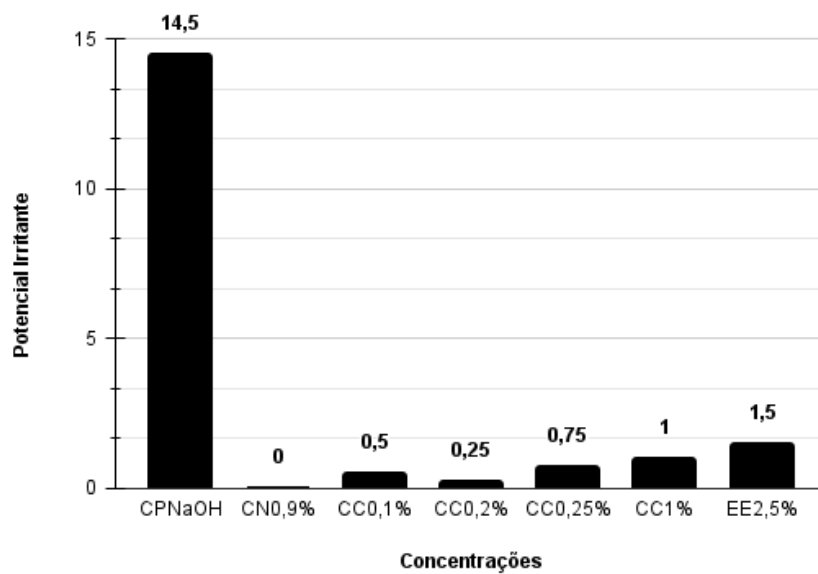


Figura 1. Potencial irritante das diferentes concentrações do Colírios da casca (CC) do *C. brasiliense* e controle negativo (CN0,9%): NaCl e o Controle positivo CPNaOH: NaOH.

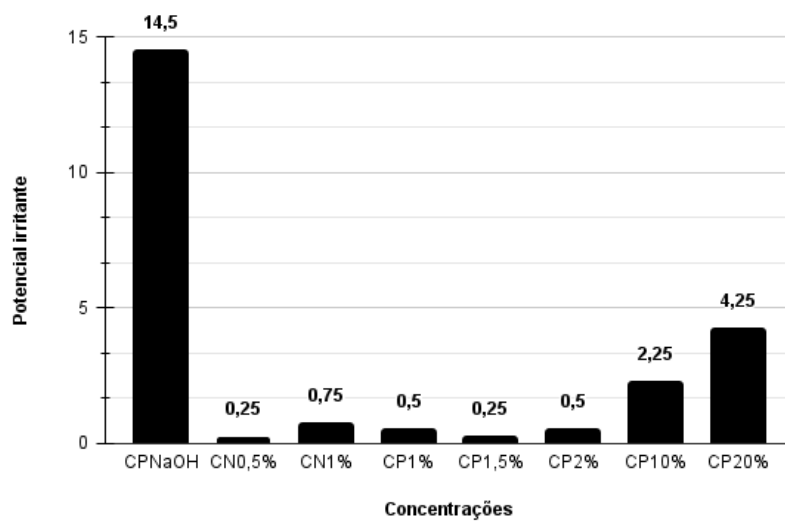


Figura 2. Potencial irritante das diferentes concentrações testadas do Colírio da polpa (CP) do *C. brasiliense* e os controles negativos: CN1% (Tween a 1%) e CN0,5% (Tween a 1%) e o controle positivo CPNaOH (NaOH).

Resultados em imagens de ovos dos grupos controles negativos e positivo apresentando ausência ou presença de fenômenos de irritação, fotografadas aos 5 minutos (Fig. 3).

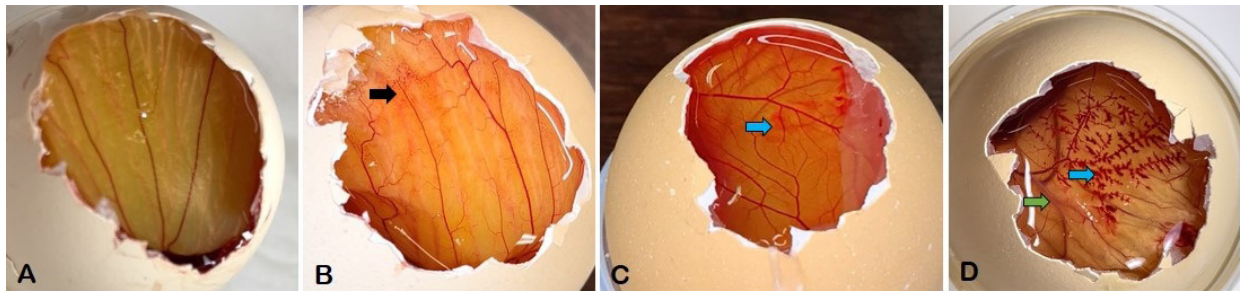


Figura 3. A: Ovo do grupo tratado com CN0,9 sem alterações de irritação. B: Ovo do grupo tratado com CN0,5% apresentando hiperemia em seta preta. C: Ovo do grupo tratado com CN1% apresentando hemorragia em seta azul. D: Ovo do grupo tratado com CPNaOH apresentando hemorragia em seta azul e coagulação em seta verde (Trombo no vaso sanguíneo).

Resultados em imagens de ovos tratados com HEP e EE em diferentes concentrações apresentando fenômenos de irritação, fotografadas aos 5 minutos (Fig. 4)

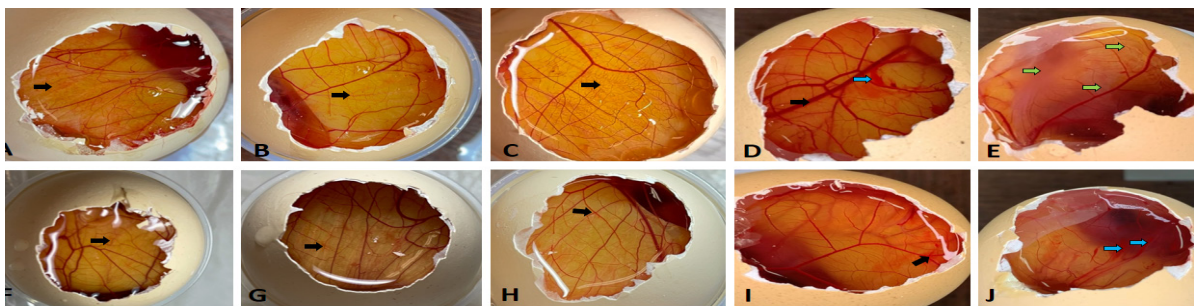


Figura 4. A: Ovo do grupo tratado com CP1% apresentando hiperemia em seta preta. B: Ovo do grupo tratado com CP1,5% apresentando hiperemia em seta preta. C: Ovo do grupo tratado com CP2% apresentando hiperemia em seta preta. D: Ovo do grupo tratado com CP10% apresentando hemorragia em seta azul e hiperemia em seta preta. E: Ovo do grupo tratado com CP20% apresentando coagulação em seta verde. F: Ovo do grupo tratado com CC0,1% apresentando hiperemia em seta preta. G: Ovo do grupo tratado com CC0,2% apresentando hiperemia em seta preta. H: Ovo do grupo tratado com CC0,25% apresentando hiperemia em seta preta. I: Ovo do grupo tratado com CC1% apresentando hiperemia em seta preta. J: Ovo do grupo tratado com CC2,5% apresentando hemorragia em seta azul.

Para determinação da dose com menor potencial de irritação, o modelo de regressão que melhor se ajustou aos dados foi o polinomial de segunda ordem, representado pela equação $Y=0,09739+0,2178x-0,0004972x^2$, $R^2=0,9944$, valor de $X=0,18$ para CP e CC representado pela equação $Y=0,3612+0,7720x-0,1267x^2$ e $R^2 =0,8774$ e valor de $X=0,24$. O modelo linear apresentou $R^2 = 0,9942$ e equação $Y=0,2077x+0,1172$ para CP e enquanto CC apresentou equação $Y=0,4403x+0,4433$ e $R^2 = 0,8557$ representados em gráfico na figura 5 (Fig. 5).

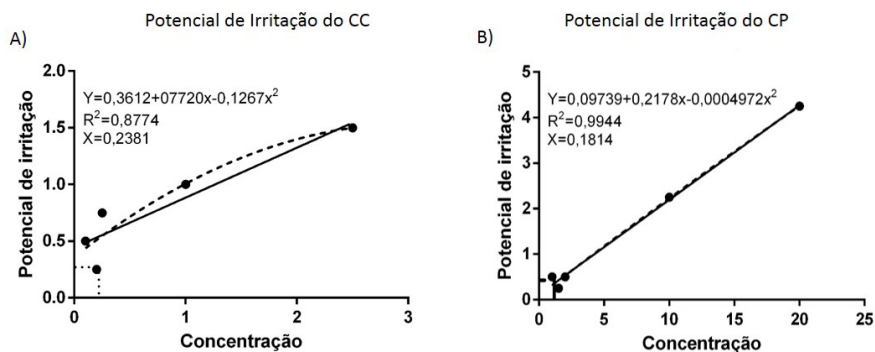


Figura 5. Potencial irritante de ovos de galinha embrionados testados com Colírio da casca (CC) em gráfico **A** e gráfico **B** testados com Colírio da polpa (CP), sendo que as linhas tracejadas demonstram os comportamentos de modelo quadrático e a linha contínua comportamento de modelo linear. A variável independente (X) é a dose administrada, enquanto a variável dependente (Y) é a resposta observada.

4. Discussão

É descrito na literatura que os principais constituintes do extrato de *C. brasiliense* são compostos químicos que apresentam ação antimicrobiana como, por exemplo, os flavonoides que podem interagir com a membrana citoplasmática, inibindo sua função e comprometendo a integridade celular, podendo também inibir a síntese de ácidos nucléicos, interrompendo o metabolismo bacteriano ⁽²¹⁾, bem como os terpenóides que possuem características lipofílicas que afetam a estabilidade da membrana citoplasmática das bactérias, levando à perda de enzimas e nutrientes celulares ⁽²²⁾.

Os componentes antibióticos presentes no extrato de *C. brasiliense* possuem potencial terapêutico significativo, especialmente nas concentrações de CC1% e CC2,5%, dosagens consideravelmente superiores às utilizadas na presente investigação. Tais concentrações podem ser eficazes no manejo de afecções oftálmicas bacterianas em animais de companhia, incluindo ceratite ulcerativa, uveíte e ceratoconjuntivite seca. A literatura sustenta essa hipótese; estudos prévios revelaram que o extrato da casca de *C. brasiliense* a 2,2% exibe atividade antibiótica substancial contra *Staphylococcus spp.* resistentes à metilina, uma cepa isolada da superfície ocular de cães acometidos por tais oftalmopatias ⁽⁸⁾. Em contraste, o mesmo estudo constatou a ausência de atividade antibiótica do extrato da polpa contra as mesmas bactérias em concentrações inferiores a 25%. Este achado sugere que o extrato da polpa, nas concentrações empregadas neste trabalho, pode não proporcionar a eficácia desejada para fins terapêuticos. Consequentemente, estes resultados sublinham a relevância de uma criteriosa seleção das concentrações e componentes do extrato de *C. brasiliense*, visando otimizar a eficácia terapêutica contra cepas bacterianas resistentes, o que pode ter implicações importantes na medicina veterinária e no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento.

Tendo em vista que não foram encontrados estudos acerca da toxicidade tópica com uso de extratos de pequi, as substâncias testadas foram diluídas em concentrações menores, levando em consideração a alta presença de taninos e flavonoides, substâncias xenobióticas que podem produzir metabólitos tóxicos ao organismo ⁽²³⁾. Para tanto o HEP foi diluído em Tween 80, agindo como demulcente facilitando a solubilidade dos componentes lipídicos ⁽²⁴⁾, que por sua vez foi diluído previamente em cloreto de sódio a 0,9% (NaCl). O EE também foi diluído em NaCl, sendo utilizado como diluente visando a mimetização de um colírio veterinário, tendo em vista sua osmolaridade (290 mOsm) é próxima do fluido lacrimal de cães (337.4±16.2 mOsm) ⁽¹⁹⁾. Os veículos (Tween e NaCl), apontaram segurança, visto que foram testados nos grupos de controles negativos, sendo classificados como não irritantes ao HET-CAM no presente estudo.

Com o intuito de não gerar irritação, foram utilizados excipientes tampões comumente utilizados na formulação de colírios, para neutralizar o pH para 7,2, sendo eles ácido clorídrico (quando necessária a diminuição do pH) ou hidróxido de sódio (quando necessário o aumento do pH), levando em consideração que em cães o pH da lágrima pode variar entre 6,0 e 8,0, com média 7,0 ⁽²⁰⁾.

O aparecimento dos fenômenos vasculares nos grupos testados com CP10% e CP20%, bem como da casca a 1 e 2,5%, classificando tais concentrações como potenciais irritantes ao olho, não descartam a utilização dessas substâncias *in vivo*, uma vez que poderão ainda ser verificadas por meio de outros testes, tais como o CAM-TBS (*Chorionallantoic membrane – trypan blue staining*) que tem a metodologia inicial a do HET-CAM, contudo se é aplicado azul *trypan* após instilação da substância teste, possibilitando a avaliação de danos a CAM através da quantidade de corante absorvido, sendo possível identificar falsos positivos no HET-CAM, uma vez que o mesmo tende a superestimar as reações vasculares ⁽¹⁷⁾. Contudo, as concentrações testadas nesse estudo que se apresentaram não irritantes não precisarão ser testadas em animais, haja vista que apresentarão efeitos semelhantes ao do HET-CAM, não gerando irritação *in vivo*.

Segundo o teste de irritação HET-CAM, observou-se que as soluções com menores concentrações foram aquelas com menor potencial irritante, indicando relação entre concentração e potencial irritante, o que pode ser observado em testes com outros extratos de plantas. Como no estudo realizado com *Cantua buxifolia juss*, que apresentou categoria não irritante na escala HET-CAM com as concentrações 0,1%, 0,2% e 0,3% ⁽²⁵⁾. Mesmo havendo uma carência de estudos utilizando *C. brasiliense* para tratamentos oftálmicos, o uso de fitoterápicos em oftalmologia tem se mostrado próspero. Soluções a partir de *Citrus limon* ⁽²⁶⁾, *Copaifera multijuga* ⁽²⁷⁾, *Aloe vera* ⁽²⁸⁾ e *Ottonia martiana* ⁽²⁹⁾ já foram testadas visando seu uso na terapêutica frente à oftalmopatias apresentando resultados promissores, provando que o uso terapêutico de vegetais em oftalmologia pode ser benéfico.

Os modelos de regressão são utilizados em ensaios de dose resposta no uso de fármacos ⁽³⁰⁾. Segundo o modelo que apresentou o melhor ajuste (polinomial de segunda ordem), as doses que apresentaram menor potencial de irritação foram de 0,18% para HEP e 0,23%

para EE. Um modelo de regressão é uma ferramenta estatística poderosa para analisar ensaios de dose-resposta, onde a relação entre diferentes doses de um produto (como um fármaco ou um nutriente) e a resposta observada em um organismo é avaliada. Este trabalho trata de um ensaio de dose-resposta, o objetivo é entender como diferentes doses dos produtos avaliados afetaram o potencial de irritação ⁽³¹⁾. Em um ensaio de dose-resposta, a relação entre a dose e a resposta nem sempre é linear. Um aumento inicial na dose pode levar a um aumento proporcional na resposta até certo ponto, após o qual a resposta pode estabilizar ou até mesmo diminuir, indicando uma relação mais complexa ⁽³²⁾, como o observado neste estudo.

5. Conclusão

As concentrações de 0,18% e 0,24% indicam baixo potencial irritante para as soluções de colírio da polpa e colírio da casca, respectivamente. Este trabalho abre caminho para pesquisas *in vivo* sobre o uso oftálmico dos extratos de *C. brasiliense* com essas concentrações em animais com oftalmopatias, agregando valor medicinal à espécie e promovendo o aproveitamento de resíduos da casca, reduzindo seu impacto ambiental.

Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Declaração de disponibilidade de dados

Os dados serão fornecidos mediante solicitação ao autor correspondente.

Contribuições do autor

Conceitualização: J. M. C. do Carmo, C. N. Souto e A.V. C. do Amaral; *Curadoria de dados*: J. M. C. do Carmo, C. N. Souto, M. R. F. Machado e A.V. C. do Amaral; *Análise formal*: J. M. C. do Carmo; *Metodologia*: J. M. C. do Carmo, M. F. da Silva, B. E. B. de Oliveira e N. Arcaten; *Investigação*: J. M. C. do Carmo, C. N. Souto, M. F. da Silva, B. E. B. de Oliveira, N. Arcaten e A.V. C. do Amaral; *Validação*: A.V. C. do Amaral; *Supervisão*: A.V. C. do Amaral; *Recursos*: A.V. C. do Amaral; *Administração do projeto*: A.V. C. do Amaral; *Aquisição de financiamento*: A.V. C. do Amaral; *Redação (rascunho original)*: J. M. C. do Carmo e A.V. C. do Amaral; *Redação (revisão e edição)*: J. M. C. do Carmo, C. N. Souto, M. R. F. Machado e A.V. C. do Amaral.

Referências

1. Lorenzi, H. Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum. 1992 273p.
2. Lima A de, Silva AM de O e, Trindade RA, Torres RP, Mancini-Filho J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). Revista Brasileira de Fruticultura. 2007; 29(3):695–8. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452007000300052>
3. Nascimento WM, Maia Filho ALM, Costa CLS da, Martins M, Araújo KS de. Estudo da resistência cicatricial cutânea de ratos tratados com óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*). ConScientiae Saúde. 2016 Jan 21;14(3):449–55. <https://doi.org/10.5585/conssaude.v14n3.5467>
4. Batista JS, Silva AE, Rodrigues CMF, Costa KMFM, Oliveira AF, Paiva ES, et al. Avaliação Da Atividade Cicatrizante Do Óleo De Pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) Em Feridas Cutâneas Produzidas Experimentalmente Em Ratos. Arquivos do Instituto Biológico. 2010 Set;77(3):441–7. <https://doi.org/10.1590/1808-1657v77p4412010>
5. Ramos M.I.L., Umaki M.C.S., Hiane P.A., Ramos F. M. M. Efeito do cozimento convencional sobre os carotenóides pró-vitâmicos "A" da polpa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). Boletim do Centro de

- Pesquisa de Processamento de Alimentos. 2023; 19(1). Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/1219/1019>
6. Selek H, Ünlü N, Orhan M, Irkeç M. Evaluation of Retinoic Acid Ophthalmic Emulsion in Dry Eye. *European Journal of Ophthalmology*. 2000 Abril; 10(2):121–7. <https://doi.org/10.1177/112067210001000205>
 7. Ohashi Y, Watanabe H, Kinoshita S, Hosotani H, Umemoto M, Manabe R. Vitamin A Eyedrops for Superior Limbic Keratoconjunctivitis. *American Journal of Ophthalmology*. 1988 Mai;105(5):523–7. [https://doi.org/10.1016/0002-9394\(88\)90245-0](https://doi.org/10.1016/0002-9394(88)90245-0)
 8. Bruno-Filho FF, Ataíde WF, Stella AE, Benite-Ribeiro SA, Nebo L, Amaral AVC. Inhibition potential of *Caryocar brasiliense* on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from the ocular surface of dogs with ophthalmopathies. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2023; 75(1):41–7. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-12593>
 9. Figueira L, Torrão L, Dinis SA, Palmares J. *Antibioterapia ocular*. Segunda ed. Porto: Medesign. 2010, 151 p.
 10. González JY. Uso tradicional de plantas medicinales em la Vereda San Isidro, Municipio de San José de Pare Boyacá: um estudio preliminar usando tecnicas quantitativas. *Acta Biológica Colombiana*. 2006; 11(1):1-10. Disponível em: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2006000200012&lng=en&nrm=iso
 11. Abdelkader H, Pierscionek B, Carew M, Wu Z, Alany RG. Critical appraisal of alternative irritation models: three decades of testing ophthalmic pharmaceuticals. *British Medical Bulletin*. 2015 Fev 16;113(1):59–71. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldv002>
 12. Test No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD; 2021. <https://doi.org/10.1787/9789264185333-en>
 13. Oliveira, A. G. L. et al. Ensaios da membrana cório-alantoide (HET-CAM e CAM-TBS): alternativas para a avaliação toxicológica de produtos com baixo potencial de irritação ocular. *Revista do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo*, v. 71, n. 1, p. 153-159, 2012. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/8985>
 14. Eskes C, Bessou S, Bruner L, Curren R, Harbell J, Jones P, et al. Eye irritation. *Alternative Laboratory Animal*. 2005 jul; 33 (1): 47–81. <https://doi.org/10.1177/026119290503301s09>
 15. Brasil. Resolução Nº 58, De 24 De Fevereiro De 2023. Dispõe sobre a proibição do uso de animais vertebrados, exceto seres humanos, em pesquisa científica, desenvolvimento e controle de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes que utilizem em suas formulações ingredientes ou compostos com segurança e eficácia já comprovadas cientificamente e dá outras providências. *Diário Oficial da União: Sessão 1, Brasília, DF*, ed. 41, p. 8, 01 de mar. 2023.
 16. Luepke NP. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food and Chemical Toxicology [Internet]*. 1985 fev; 23(2):287–91. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(85\)90030-4](https://doi.org/10.1016/0278-6915(85)90030-4)
 17. Luepke NP, Kemper FH. The HET-CAM test: An alternative to the draize eye test. *Food and Chemical Toxicology*. 1986 Jun; 24(6-7):495–6. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(86\)90099-2](https://doi.org/10.1016/0278-6915(86)90099-2)
 18. Leighton J, Nassauer J, Tchao R. The chick embryo in toxicology: an alternative to the rabbit eye. *Food and Chemical Toxicology*. 1985 Fev; 23(2):293–8. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(85\)90031-6](https://doi.org/10.1016/0278-6915(85)90031-6)
 19. Sebbag L, Park SA, Kass PH, Maggs DJ, Attar M, Murphy CJ. Assessment of tear film osmolarity using the TearLabTM osmometer in normal dogs and dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Veterinary Ophthalmology*. 2016 Oct 20;20(4):357–64. <https://doi.org/10.1111/vop.12436>
 20. Petersen-Jones SM, Crispin SM, British. *BSAVA manual of small animal ophthalmology*. 2ª ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association; 2002.
 21. Cushnie TPT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005 Nov;26(5):343–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>
 22. Paula-Ju W de, Rocha FH, Donatti L, Fadel-Picheth CMT, Weffort-Santos AM. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2006 Dec;16:625–30. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000500007>

23. Simões CMO. Farmacognosia : da planta ao medicamento. Florianópolis: Editora Da Ufsc ; Porto Alegre Editora Da Ufrgs; 1999.
24. Damico FM, Gasparin F, Ioshimoto GL, Igami TZ, Cunha JR. ADS, Fialho SL, et al. Intravitreal injection of polysorbate 80: a functional and morphological study. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. 2017 Dec;44 (6):603–11. <https://doi.org/10.1590/0100-69912017006010>
25. Montanchez Mercado EC, Sam Zavala SY, Solis Cespedes PA, Ramirez Julca M. Use of the flowers of *Cantua buxifolia* Juss in the preparation of eye drops for eye irritation. *Universidad Ciencia y Tecnología*. 2022 Jun 30; 26(114):203–13. <https://doi.org/10.47460/uct.v26i114.605>.
26. Perches CS, Brandão CVS, Ranzani JJT, Pellizon CH, Donatti C, Fonzar JF, et al. Uso do colírio de *Citrus lemon* em úlceras de córnea induzidas em coelhos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2012 Oct; 64(5):1161–8. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352012000500012>.
27. Dias FGG, Jorge AT, de Freitas Pereira L, Furtado RA, Ambrósio SR, Bastos JK, et al. Use of *Copaifera multijuga* for acute corneal repair after chemical injury: A clinical, histopathological and toxicogenetic study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017 Dec;96:1193–8. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.099>
28. Curto EM, Labelle A, Chandler HL. *Aloe vera*: an in vitro study of effects on corneal wound closure and collagenase activity. *Veterinary Ophthalmology*. 2014 Mar 25;17(6):403–10. <https://doi.org/10.1111/vop.12163>.
29. Lisbão CBS, Corrêa MA, Ortiz JPD, Martins BC, Laus JL. Effects of the *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae) extract on dog's ocular surface. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2012 Jun; 64(3):577–84. <https://doi.org/10.1590/S0102-0935201200030>.
30. Portier CJ, Hoel DG. Optimal design of the chronic animal bioassay. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1983 Jul 1; 12(1):1–19. <https://doi.org/10.1080/15287398309530403>
31. Ritz, C, Baty, F, Streibig, JC., & Gerhard, D. Dose-response analysis using R. *PLoS One*, 10(12), e0146021. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>
32. Seber, G. A. F., & Lee, A. J. *Linear Regression Analysis* (2nd ed.). Wiley. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780471722199>